

**DALTON LUIZ FERREIRA ALVES**

**ESTUDOS E PROPOSIÇÕES SOBRE A PADRONIZAÇÃO DE VENENOS E  
ANTIVENENOS OFÍDICOS DE INTERESSE MÉDICO PARA O BRASIL**

**Tese apresentada ao Curso de Pós-  
graduação em Ciências Biológicas –  
Fisiologia, Biofísica e Farmacologia  
- como requisito para obtenção do  
grau de Doutor em Farmacologia**

**ORIENTADOR: PROF. CARLOS RIBEIRO DINIZ**

**Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências Biológicas**

**Belo Horizonte – Minas Gerais – Brasil**

**1999**

Este trabalho foi realizado com o auxílio das seguintes instituições e fontes financiadoras:

- Fundação Ezequiel Dias do Estado de Minas Gerais
- Universidade Federal de Minas Gerais
- Ministério da Saúde – Secretaria de Ações Básicas de Saúde - Plano Nacional de Ofidismo
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico PADCT – FUNED
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG

## AGRADECIMENTOS

---

*A princípio em minha vida, as cerimônias e mesmo ritos não cerimoniais, deixavam-me desconfiado. Com o tempo, pude observar que o comportamento ritual permeia todas as etapas da vida do homem e dos animais, exatamente com a mesma função básica, o estabelecimento de estruturas hierárquicas. De desconfiado passei a receoso e, até mesmo vexado, por ter de me submeter a alguns.*

*- Na cerimônia de passagem, deve-se oferecer o que se tem ou o que se pede?*

*Pressionado pelas necessidades da carreira, e com estes sentimentos, comecei a escrever esta tese de doutoramento, confesso também picado pelo desconforto de saber, que já estava fora de tempo. Decidi-me como Caim, a oferecer o trigo que já vinha cultivando `a longo tempo, ao Deus dos pastores.*

*Comecei por rever todos os resultados obtidos na Fundação Ezequiel Dias juntamente com Célia, Raquel, Thais, Eládio, David, Prof. Diniz, Prof. Arinos, Dário, Lucimar, Maria das Mercês, Valdeci, Anderson, Marlene e mais ainda o pessoal do Biotério, do serpentário e da Fazenda. Em seguida os resultados de experimentos feitos no Departamento de Farmacologia com Luíz, Laudiene, Raquel e Vanderli. Vi então que muito havíamos feito em conjunto.*

*As ajudas recebidas no ICB, foram muitas, dos funcionários do CEBIO, do Jáder, do Edir, do Jorge, da Arlete, do Vanderli, do Webster, da Dona Stael, da Dinah, da Marlina, da Dona Dagmar e outros.*

*O incentivo dos colegas, citando somente os mais insistentes e repetitivos, Alvair, Beirão, Janetti, Lineu e Queiroz, nunca faltou. A colaboração dos colegas de Departamento chegou à extremos tocantes como, nos dois últimos semestres, substituindo-me em muitas aulas, para que pudesse escrever. Os professores, Mirian, Cida, Igor, Janetti, Regina e a Celina, fizeram isto, sem nem pensar em requerer a carga horária para a GED! Meus colaboradores do Depto. de Química, Dorila, Agostinho, Belinello, Genuína, Pedro, Rildo e Virgínia, concederam-me uma relativa trégua em nossos compromissos de pesquisa, para que eu adiantasse a tese.*

*A composição gráfica foi feita por minha esposa Janetti e os meus amigos Webster e Luíz.*

*À Paulo Henrique e Alessandro devo muitos socorros eletrônicos e amizade.*

*Devo a muitos dos meus alunos a motivação, colhida as vezes de seus olhos, de suas palavras, gestos e ações, para perseverar na vida de professor.*

*Assim, ao terminar de escrever, pude avaliar o quanto de ajuda receberei e compreender outra característica que grupamentos de humanos e de animais compartilham, a colaboração mútua. Esta, não cerimoniais, não ritual, não hierarquizante, não competitiva mas capaz de reconhecer e valorizar todas as contribuições, é a melhor expressão social da humanidade. O mau sentimento passou, antevejo então o dia que se aproxima e que por causa destas pessoas, passará a ser um dos mais felizes da minha vida.*

***DEDICATÓRIA:***

*À minha família,*

*Janetti, William, Carol, Leonardo e Lucas*

*À Antônio e Rosabranca,*

*Elvira, Lili, Ciaba, Lira e Sedina (minhas outras mães),*

*Jarbas e Paula, irmãos, cunhados e cunhadas.*

## SUMÁRIO

---

Agradecimentos .....	III
Dedicatória.....	IV
Símbolos - abreviaturas - glossário .....	XI
Lista de figuras .....	XVII
Lista de quadros e tabelas.....	XXVIII
I - Introdução geral .....	1
I.1 - Considerações sobre a complexidade e variabilidade de venenos ofídicos.....	1
I.2 - Considerações sobre a complexidade e variabilidade dos antivenenos (soros hiperimunes) .....	3
I.2.1 – Fatores desfavoráveis à padronização de venenos e antivenenos .....	4
I.2.2 – Homologia antigênicas – fatores favoráveis à padronização de venenos e antivenenos .....	5
I.2.3 – Modelos imunoquímicos em toxinologia.....	7
I.2.4 – Problemas imunoquímicos na mensuração de anticorpos em antivenenos.....	12
I.3 - Fundamentos do processo de padronização de venenos e antivenenos ofídicos .....	16
I.4 - Ensaio quantitativos .....	17
I.4.2 - Ensaio biológicos .....	17
I.4.3 – Critérios de validade.....	18
I.4.4 - Aplicabilidade do ensaio biológico à padronização de substâncias farmacologicamente complexas. ....	20
I.5 - Considerações e propostas para a elaboração de uma sistemática de padronização aplicável ao par veneno-antiveneno .....	22
I.5.2 - Sistema de referenciamento .....	23
I.5.3 – Critério zoogeográfico - epidemiológico - venenos de referência nacional.....	24
I.5.4 - Caracterização ampla de venenos e antivenenos .....	27

I.5.5 - Sumário: sistemática de padronização .....	29
II - Objetivos gerais .....	31
III - Estudos de letalidade do veneno e efeito protetor do antiveneno, no camundongo.....	31
III.1 – Introdução .....	31
III.1.1 - Uso tradicional dos ensaios de letalidade.....	31
III.1.2 - Dose letal mediana – probitos .....	34
III.2- Materiais e métodos .....	37
III.2.1 - Animais e amostragem.....	37
III.2.2 - Venenos e antivenenos.....	38
III.2.3 - Procedimentos experimentais.....	39
III.2.4 - Análise estatística - método dos probitos.....	40
III.2.5 - Critérios de validade estatística e critérios de validade fundamental.....	41
III.2.6 - Outros métodos estatísticos.....	43
III.3 – Resultados.....	45
III.3.1 - Curvas de letalidade .....	45
III.3.2 - Alteração da curva de letalidade pelo antiveneno - procedimento $\alpha$ .....	51
III.3.3 - Curvas de proteção (procedimento $\beta$ ) - comparação entre curvas de proteção para diferentes antivenenos crotálicos e bothrópicos .....	52
III.3.4 - Relação entre ed50 e desafio - lei dos múltiplos de proporção - equivalentes antigênicos.....	58
III.3.5 - Relação entre as dls50 de venenos de espécies bothrópicas e os seus equivalentes antigênicos frente a um antiveneno bothrópico.....	60
III.3.6 - Substituição de venenos de referência - uso de referências internas.....	62
III.4 - Discussão e conclusões parciais.....	67
III.4.1 - Critérios de validade estatística e critérios de validade fundamental.....	67
III.4.2 – “Lei dos Múltiplos de Proporção”; equivalentes antigênicos; previsibilidade da capacidade de neutralização de antivenenos .....	71

III.4.2a -Potência de um antiveneno .....	73
III .4.2b - Substituição de referência para venenos .....	74
IV - Estudos baseados na atividade hemorrágica cutânea de venenos bothrópicos em ratos .....	77
IV.1.1 - Propriedades bioquímicas dos fatores hemorrágicos .....	77
IV.1.2 - Papel fisiopatológico dos HFs e sua relação com a morbidade e letalidade no acidente ofídico.....	79
IV.1.3 - Metodologias para quantificação da atividade hemorrágica de venenos ofídicos e sua neutralização por antivenenos .....	80
IV.2 - Materiais e métodos .....	83
IV.2.1 - Venenos ofídicos.....	83
IV.2. 2. Antivenenos.....	83
IV.2.3 - Animais experimentais.....	84
IV.2.4 - Preparo de soluções.....	84
IV.2. 5 - Ensaio da atividade hemorrágica e anti-hemorrágica no rato.....	85
IV.2.6 - Métodos matemáticos e estatísticos .....	87
IV.2.6a - Estimativa de $y_0$ e $x_0$ a partir das equações de regressão linear .....	87
IV.2.6b - Normalização de coeficientes angulares .....	88
IV.2.6c - Critério de similaridade para o caso em que a resposta biológica é uma função linear da dose .....	88
VI.2.6d - Análise estatística.....	89
IV.2.7 - Avaliação do comportamento zonal da mistura veneno-antiveneno, através de dispersão de luz .....	90
IV.2.8 - Determinação da densidade das misturas de incubação veneno-antiveneno. ....	96
IV.3 – Resultados .....	97
IV.3.1 - Curvas dose-resposta de atividade hemorrágica e comparação de potências entre venenos por ensaios paralelos.....	97
IV.3.2 - Alterações da CDR de atividade hemorrágica do veneno pelo antiveneno (procedimento $\alpha$ ).....	103

IV.3.3 - Curvas de neutralização de um desafio fixo de veneno pelo antiveneno (procedimento $\beta$ ) .....	104
IV.3.4 - Relação entre desafio e a quantidade de antiveneno para neutralização total da atividade hemorrágica – “lei dos múltiplos de proporção” .....	107
IV.3.5 - O veneno de <i>B. jararaca</i> como referência para aferição da potência anti-hemorrágica dos antivenenos, frente aos venenos das espécies componentes da mistura imunogênica bothrópica - substituição de referências - equivalência antigênica.....	109
IV.3.6 - Dispersão de luz pelos produtos da reação veneno-antiveneno - avaliação do comportamento zonal da mistura veneno-antiveneno. ....	118
IV.3.7 - Determinação da densidade das misturas veneno-antiveneno .....	126
IV.4 - Discussão e conclusões parciais.....	128
IV.4.1 - O ensaio de atividade dos fatores hemorrágicos de venenos ofídicos pela injeção intradérmica no dorso de ratos .....	128
IV.4.2 - Aplicação das CDRs de atividade hemorrágica para comparação de potência entre venenos ofídicos .....	129
IV.4.3 - Aplicação do ensaio de atividade hemorrágica para a caracterização de antivenenos .....	130
IV.4.3a - Procedimento $\alpha$ .....	130
IV.4.4 - procedimento $\beta$ ou curvas de neutralização de um desafio fixo de veneno pelo antiveneno.....	130
IV.4.5 - determinação da potência anti-hemorrágica dos antivenenos, por ensaios diretos em vários níveis .....	134
IV.4.6 - O veneno de <i>B. jararaca</i> como referência para a aferição da potência anti-hemorrágica dos antivenenos bothrópicos.....	143
IV.4.7 - Método nefelométrico .....	144
V – Estudos “in vitro” – cinética da coagulação do fibrinogênio bovino pela enzima tipo-trombina de <i>Lachesis muta muta</i> , em condições de velocidade limitada pela etapa enzimática .....	147
V.1 – Introdução .....	147
V.1.1 – Considerações sobre as relações entre o conhecimento sobre venenos ofídicos e coagulação sanguínea .....	147
V.1.2 – Enzimas do “tipo-trombina” – enzima do tipo-trombina de <i>Lachesis muta muta</i> ....	149
V.1.3 – Cinética não-enzimática da coagulação do fibrinogênio .....	152

V.1.4 – Métodos para o estudo cinético de trombina e enzimas do tipo-trombina .....	155
V.1.5 Importância clínica das enzimas tipo-trombina na fisiopatologia do acidente ofídico.....	157
V.1.5 – Objetivos específicos em relação ao enzima tipo-trombina de <i>Lachesis muta muta</i> .....	159
V.2 - Materiais e métodos.....	159
V.2.1 – Enzima .....	159
V.2.2 – Substratos.....	160
V.2.3 – Venenos e antivenenos .....	160
V.2.4 – Incubações .....	161
V.2.5 – Procedimento para registro nefelométrico da coagulação do fibrinogênio .....	161
V.2.6 – Procedimentos para análise e apresentação dos resultados .....	162
V.2.7 – Separação da enzima livre da complexada com anticorpos do ABL-FUNED 900530 .....	162
V.3 – Resultados.....	164
V.3.1 – Registro nefelométrico da coagulação do fibrinogênio bovino – demonstração que a cinética está limitada pela etapa enzimática .....	164
V.3.2 – Escolha do sistema tampão, do pH, da molaridade e do tempo de incubação prévia do fibrinogênio .....	168
V.3.3 - Influência da concentração do substrato na velocidade de coagulação e na quantidade de produto formado ao final da reação.....	171
V.3.4. Influência da quantidade de enzima na velocidade de coagulação do fibrinogênio bovino e na quantidade de produto formado ao final da reação .....	175
V.3.5 - Neutralização da atividade coagulante da enzima tipo-trombina de <i>Lachesis muta muta</i> pelo ABL-FUNED 900530.....	179
V.3.6 – Mecanismo de inibição da atividade coagulante da enzima t-tlmm, pelos anticorpos presentes no ABL-900530.....	183

V.4 – Discussão e conclusões parciais .....	188
V.4.1 - Parâmetros cinéticos.....	188
V.4.2 - Aplicações do método .....	191
V.4.2.1- Dosagem da atividade tipo-trombina em venenos brutos .....	191
V.4.2.2 - Quantificação da potência neutralizante de antivenenos.....	194
V.4.2.3 – Mecanismos de inibição da atividade coagulante da enzima T-TLmm pelos anticorpos presentes no ABL-900530 .....	197
V – Conclusões finais .....	200
V.1 – A aplicabilidade dos critérios clássicos do ensaio biológico à padronização de venenos e antivenenos bothrópicos e crotálicos .....	200
VI.2 – Exequibilidade do uso de referências secundário e substituição de referências .....	201
VII – Proposições dirigidas às instituições soro-produtoras e pesquisadores na área.....	202

## SÍMBOLOS - ABREVIATURAS - GLOSSÁRIO

---

- %: percentual, percentagem
- a: intersecção com a ordenada
- AAME: acetil arginina metil ester
- AB: Antiveneno bothrópico
- ABL: Antiveneno bothrópico-laquétrico
- Ac: anticorpo
- AC: Antiveneno crotálico
- Ag: antígeno
- AL: Antiveneno laquétrico
- AME: arginina metil ester
- *B. alternatus: Bothrops alternatus*
- *B. erythromelas: Bothrops erythromelas*
- *B. insularis: Bothrops insularis*
- *B. jararaca, B.j: Bothrops jararaca*
- *B. moojeni: Bothrops moojeni*
- *B. newviedi: Bothrops newviedi*
- b: coeficiente angular
- BAEE: benzoil arginina etil ester
- BApNa: benzoil arginina p-nitroanilida
- Bra. Bot. 001: Veneno de referência brasileiro para Bothrops nº 1 (B. jararaca)
- Bra. Crot. 001: Veneno de referência brasileiro para Crotalus nº 1 (C.d. terrificus)
- *C. d. terrificus: Crotalus durissus terrificus*

- CA: componente ácido da crotoxina
- CB: componente básico da crotoxina
- CCCA: Collaborative Center for the Control of Antivenoms
- cDNA: DNA complementar
- CDR: Curva dose-resposta
- Cs: dispersão pelos complexos solúveis
- D.M.C.-F: Dose mínima coagulante sobre fibrinogênio puro
- D.M.D.: Dose mínima defibrinogenante (“in vivo” no camundongo)
- D.M.H.: Dose Mínima Hemorrágica
- D.M.M = D.M.L.: Dose mínima mortal ou letal
- D.M.N.: Dose mínima necrosante
- D.M.P.: Dose mínima proteolítica (sobre caseína)
- D.M.P-P: Dose mínima coagulante sobre plasma humano citratado padrão
- D: Preparação Desconhecida
- DE50 Ref I,II, etc.: Dose efetiva mediana de um antiveneno em relação ao veneno de referência nº
- DE50: Dose efetiva mediana
- Ded. 30%: Dose edematogênica 30% (aumento de 30% em peso da pata traseira do camundongo)
- DE<sub>50</sub>: Doses efetivas medianas
- DFP: diisopropilfluorofosfato
- DL50: Dose letal mediana
- DL<sub>50</sub>: Doses letais medianas
- Dt: dispersão total

- E.coli: Escherichia coli
- E: enzima
- E-Ab: enzima-anticorpo
- EDTA: ácido etilenodiaminotetraacético
- ELISA: Enzima-Linked Immunosorbent Assay
- Eq: equivalente
- Euteriático: teriaco em concentração para efeito ótimo.
- F XIII: Fibrinotraspeptidase
- F: dispersão pelos flocos
- F: razão de variâncias
- Fator II: Protrombina
- Fator IX: PTC, Christmas
- Fator V: Proacelerina
- Fator VIII: Fator antihemofílico – Fator de von Willebrand
- Fator X: Stuart-Prower
- Fb: fibrinogênio
- FPA: fibrinopeptídeo A
- FPB: fibrinopeptídeo B
- g.L.: graus de liberdade
- HF: Fator hemorrágico
- Ht: Hemorrhagic toxin
- I.C.V.: por via intracerebroventricular
- I.V.: por via intravenosa
- ICB-UFMG: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais

- IgG (T): Imunoglobulina da classe G que ocorre no cavalo
- IgG: Imunoglobulina da classe G
- INCQS: Instituto Nacional para o Controle de Qualidade em Saúde
- IP: por via intraperitoneal
- KA: constante de associação =  $L.M^{-1}$
- Kcat: velocidade máxima por mol/enzima
- KD: constante de dissociação =  $M.L^{-1}$
- Kd: Kilo – daltons
- Km: constante de Michelis
- Ks: constante do substrato – análogo de Km
- LHF: Fator hemorrágico da lachesis
- Lysme: lisina metil ester
- M: Molar =  $M.L^{-1}$
- Metmetro: variável modificada
- MMPs: Metallo-proteinases da matrix extracelular
- MS/SNFMF: Ministério da Saúde/Secretaria Nacional de Fiscalização em Medicina e Farmácia
- MS/SVS: Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância Sanitária
- mV: milivolt
- $m\mu$ : mili-micra
- N: normal
- N-DSK: nó terminal Amino-dissulfeto
- NHF: Fator hemorrágico de B. neuviedi
- NIH: National Institute of Health

- Ø: diâmetro
- OMS: Organização Mundial da Saúde
- OPAS: Organização Pan-Americana da Saúde
- P: Preparação Padrão
- Pi: frequência relativa = probabilidade de ocorrência ao iésimo nível
- PLA<sub>2</sub>: fosfolipases A<sub>2</sub>
- PMSF: fenilmetilsulfonil fluoreto
- QM: quadrado mínimo ou variância
- R = r<sup>2</sup>: coeficiente de determinação
- r: coeficiente de correlação linear (Pearson)
- R: dispersão residual
- SBTI: Inibidor tríptico do feijão soja
- T- TLmm: enzima tipo-trombina de lachesis muta muta
- *T. flavoviridis*: *Trimeressurus flavoviridis*
- TAME: p-toluenosulfonil arginina metil ester
- Teriaco, teriaca ou teriático: medicamento bom para mordeduras de serpentes e outras bestas selvagens – do grego “thérion”
- TSF: toluenosulfonilfluoreto
- U.K.: United Kingdoms
- U: resposta biológica em grandeza original
- Unidade NIH de trombina: quantidade de trombina que coagula 1 ml de solução padronizada de fibrinogênio (2,2 mg/ml) em 15 segundos
- V.R: variância residual
- V/eo: Kcat = velocidade máxima por mol de enzima

- Ven: veneno
- VRF: Veneno de referência Funed
- W.H.O: World Health Organization
- x: logaritmo de z
- $X^2$ : Qui-quadrado
- $X^2_{crit}$ : valor crítico do  $X^2$  ao nível de  $p\alpha$
- xo: valor pré-especificado de x
- y: metametro de U; variável dependente, variável estatística ou estocástica
- Y: valor esperado ou calculado de y
- yo: valor pré-especificado de y
- z: dose (escala aritmética)

## LISTA DE FIGURAS

---

Fig. III.2.5 - Definição de potência relativa para respostas proporcionais ao log da dose.....	42
Fig. III.3.1A - Curva de letalidade do veneno de <i>C. D terrificus</i> lote 850613 para camundongos CF1 machos. Determinação da DL50 por via intraperitoneal.....	45
Fig. III.3.1B - Comparação das curvas de letalidade dos venenos bothrópicos Bra/Bot/001 Butantan e L:8801-3 FUNED para camundongos CF1 (18 a 22) via IP em diferentes datas. ....	49
Fig. III.3.2 - Atividade neutralizante do antiveneno crotálico pelo procedimento $\alpha$ - camundongos CF1 de 18 a 22 g.....	52
Fig. III.3.3A - Soroneutralização “in vitro” de 5DL <sub>50</sub> do veneno de <i>C. D terrificus</i> (Ref. Nacional Bra/Cot/001) pelo soro AC 891214-77 (FUNED). Determinação da ED <sub>50</sub> por via intraperitoneal, camundongos CF1 machos.....	53
Fig. III.3.4 - ED <sub>50</sub> de um antiveneno em função da intensidade de desafio .....	58
Fig. III.3.5 – Relação entre a DE50 do antiveneno AB 870914-576 FUNED e o desafio, para sete venenos bothrópicos. ....	62
Fig. III.3.6A - Correlação entre as DE <sub>50</sub> (mg prot.) de antivenenos bothrópicos produzidos pela FUNED-MG (1993 - 1994) em relação aos desafios de 5 DL <sub>50</sub> da Referência Nacional Bra/Bot/002 e Referência FUNED 9201-5 .....	64
Fig. III.3.6B - Correlação entre as DE <sub>50</sub> (mg prot.) de antivenenos bothrópicos produzidos pela FUNED-MG (1995 - 1996) em relação aos desafios de 5 DL <sub>50</sub> da Referência Nacional Bra/Bot/002 e Referência FUNED 9201-5 .....	65
Fig. III.3.6C - Correlação entre as DE <sub>50</sub> (mg prot.) de antivenenos bothrópicos produzidos pela FUNED-MG (1996 - 1997) em relação aos desafios de 5 DL <sub>50</sub> da Referência Nacional Bra/Bot/002 e Referência FUNED 9201-5 .....	65
Fig. III.3.6D - Previsibilidade das EDs50 de antivenenos bothrópicos produzidos pela FUNED-MG (1994 - 1995) em relação à Referência Nacional Bra/Bot/ 002, através de estimativa pelas DE <sub>50</sub> determinadas frente à Referência FUNED 9201-05 .....	66

Fig. IV.2.7A -Curva de Floculação – Antígeno puro / Anticorpos tipo H .....	93
Fig. IV.2.7B – Curva de floculação esperada – Sistema poliespecífico / Anticorpos tipo H .....	94
Fig. IV.2.7C – Curva de floculação esperada – parâmetros ópticos não normalizados .....	95
Fig. IV.2.7D – Curva de floculação esperada – parâmetros ópticos normalizados.....	95
Lesões hemorrágicas intradérmicas no dorso de ratos, induzidas pelo veneno bruto de <i>B. jararaca</i>	
Fig. IV.3.1A <i>B. jararaca</i> 870502.....	99
Fig. IV.3.1B <i>B. jararaca</i> Ref. FUNED 880530. Delineamento experimental: Quadrado latino 5 x 6.....	99
Fig. IV.3.1C Ref. Nacional B.j. Bra/Bot/002 Delineamento experimental: Quadrado latino 6 x 5.....	100
Fig. IV.3.1D Mistura de venenos botrópicos Delineamento experimental: Quadrado latino 5 x 5.....	100
Comparação das potências hemorrágicas de venenos de <i>B. jararaca</i> em ensaios paralelos no rato. delineamento experimental: 3 x 3 em quadrado latino 6 x 6, 6 x 5 e 6 x 3.	
Fig. IV.3.1E .....	101
Fig. IV.3.1F.....	101
Fig. IV.3.1G .....	102
Fig. IV.3.2 - Efeito do AB-FUNED 881122 sobre o coeficiente angular da CDR-hemorrágica do veneno de <i>B. jararaca</i> 870502. Delineamento experimental: quadrado latino 6 x 6.....	103
Fig. IV.3.3 - Curvas de neutralização da atividade hemorrágica de veneno botrópicos e laquétrico por antivenenos.....	105
Fig. IV.3.4 – Relação entre desafio de veneno bruto e a quantidade de antiveneno para neutralização total da atividade hemorrágica .....	108
Fig. IV.3.5A - Correlação entre os volumes de AB-FUNED 881122 previsto e experimental para neutralização total do veneno de <i>B. jararaca</i> 870502 .....	110
Fig. IV.3.5B - Correlação entre os volumes de ABL-FUNED 900530 previsto e experimental para neutralização total do veneno de <i>B. jararaca</i> 870502 .....	112
Fig. IV.3.5C- Correlação entre os volumes de AB-FUNED 881122 previsto e experimental para neutralização total do veneno de <i>B. jararaca</i> 870502 .....	113

Fig. IV.5D Correlação entre os volumes de AB-FUNED 920928 previsto e experimental para neutralização total do veneno de <i>B. jararaca</i> Ref. Nacional Bra/Bot/ 002 .....	114
Fig. IV.3.5.E - Correlação entre os volumes de AB-FUNED 900928 previsto experimental para neutralização total do veneno de <i>B. jararaca</i> ref. FUNED 80103 .....	115
Fig. IV3.5F - Correlação entre os volumes de AB-FUNED 900928 previsto e experimental para neutralização total da mistura de venenos botrópicos .....	116
Fig. IV.3.6A – Dispersão de luz policromática visível pelos produtos da reação entre <i>B. jararaca</i> 870502 (53,7 µg/0,1 µl) e ABL-FUNED 900530 .....	118
Fig. IV.3.6B – Dispersão de luz policromática visível pelos produtos da reação entre <i>B. jararaca</i> 870502 (32,2 µg/0,1 µl) e ABL-FUNED 900530 .....	119
Fig. IV.3.6C – Dispersão de luz policromática visível pelos produtos da reação entre <i>B. jararaca</i> 870502 (15,3 µg/0,1 µl) e ABL-FUNED 900530 .....	119
Fig. IV3.6D – Dispersão de luz policromática visível pelos produtos da reação entre <i>B. jararaca</i> 870502 e ABL-FUNED 900530 em três níveis de concentração do veneno .....	122
Fig. IV.3.6E – Dispersão de luz policromática visível pelos produtos da reação entre <i>B. jararaca</i> 870502 e ABL-FUNED 900530 em proporção para neutralização total .....	123
Fig. IV.3.6F – Dispersão de luz policromática visível pelos produtos da reação entre <i>B. jararaca</i> 870502 e ABL-FUNED 900530 em proporção para neutralização total .....	124
Fig. IV.3.6.G - Dispersão de luz policromática visível pelos produtos da reação entre <i>B. jararaca</i> 870502 e ABL-FUNED 900530 em proporção para neutralização total .....	125
Fig. IV.3.6.H - Dispersão de luz policromática visível pelos produtos da reação entre <i>B. jararaca</i> 880103 e ABL-FUNED 920998 em proporção para neutralização total. ....	125
Fig. IV.3.7 - Aumento da densidade em relação ao NaCl 0,9 %, de soluções do veneno bruto de <i>B. jararaca</i> 870502 + ABL FUNED 900530 (Ag:Ac) e soluções de ABL puro (Ac) em função da concentração de proteína total .....	127
Fig. V.3.1A/V.3.1B – “Fac-similes dos registros nefelométricos da coagulação do fibrinogênio bovino pelo T-TLmm.....	165
Fig. V.3.2A – Velocidade de coagulação do fibrinogênio bovino (2 mg/mL) pelo enzima de <i>Lachesis muta muta</i> e outros venenos crotalídeos em estado bruto em função da molaridade do tampão fosfato de sódio pH 7,40. ....	170
Fig. V.3.2B – Influência do tempo de incubação prévia a 37 oC em tampão fosfato de sódio pH 7,4, na velocidade de coagulação fibrinogênio bovino (2 mg/mL) pelo veneno bruto (2mg) de <i>Lachesis muta muta</i> .....	171

Fig. V.3.3A1 – Velocidade de coagulação do fibrinogênio bovino pela enzima tipo-trombina de <i>Lachesis muta muta</i> (0,225 µg/mL) em função as concentração de substrato. Tampão fosfato de sódio 0,04 M – pH 7,40 – 37oC – 24/09/93.....	171
Fig. V.3.3A2 – Dispersão de luz em função da concentração de fibrinogênio bovino. Após o registro de velocidade os tubos foram mantidos a 37oC com leituras a cada 15 min., até a estabilização. ....	171
Fig. V.3.3B1 – Velocidade de coagulação do fibrinogênio bovino pela enzima tipo-trombina de <i>Lachesis muta muta</i> (0,225 µg/mL) em função as concentração de substrato. Tampão fosfato de sódio 0,04 M – pH 7,40 – 37oC – 28/09/93.....	172
Fig. V.3.3B2 – Dispersão de luz em função da concentração de fibrinogênio bovino. Após o registro de velocidade os tubos foram mantidos a 37oC com leituras a cada 15 min., até a estabilização. ....	172
Fig. V.3.3C1 – Velocidade de coagulação do fibrinogênio bovino pela enzima tipo-trombina de <i>Lachesis muta muta</i> (0,225 µg/mL) em função as concentração de substrato. Tampão fosfato de sódio 0,04 M – pH 7,40 – 37oC – (agrupamento de 3 experimentos c/ replicatas) .....	172
Fig. V.3.3C2 – Gráfico de Hill para os dados da Figura V.3.3C1.....	172
Fig. V.3.3D – Relação hiperbólica entre a velocidade de coagulação do fibrinogênio bovino pela enzima tipo-trombina de <i>Lachesis muta muta</i> (0,225 µg/ml) e o quadrado da concentração do substrato.....	173
Fig. V.3.3E1 – Velocidade de coagulação do fibrinogênio bovino pelo veneno bruto de <i>Lachesis muta muta</i> (2,5 µg/mL) em função as concentração de substrato. Tampão fosfato de sódio 0,04 M – pH 7,40 – 37oC – 28/09/93 .....	174
Fig. V.3.3E2 – Dispersão de luz em função da concentração de fibrinogênio bovino. Após o registro de velocidade os tubos foram mantidos a 37oC com leituras a cada 15 min., até a estabilização. ....	174
Fig. V.3.3F1 – Velocidade de coagulação do fibrinogênio bovino pelo veneno bruto <i>Crotalus d. terrificus</i> (5 µg/mL) em função as concentração de substrato. Tampão fosfato de sódio 0,04 M – pH 7,40 – 37oC – 28/09/93 .....	174
Fig. V.3.3F2 – Dispersão de luz em função da concentração de fibrinogênio bovino. Após o registro de velocidade os tubos foram mantidos a 37oC com leituras a cada 15 min., até a estabilização. ....	174
Fig. V.3.4A1 – Velocidade de coagulação do fibrinogênio bovino (2,5 mg/ml) pela enzima tipo-trombina de <i>Lachesis muta muta</i> em função da concentração da enzima. Tampão fosfato de sódio 0,04 M – pH 7,40 – 37oC .....	175
Fig. V.3.4.A2 - Dispersão de luz após coagulação de 2,5 mg/ml de fibrinogênio bovino por quantidades crescentes do enzima tipo-trombina de <i>L. muta muta</i> . Após o registro	

de velocidade os tubos foram mantidos a 37oC com leituras a cada 15 min., até a estabilização.....	175
Fig. V.3.4B1 – Velocidade de coagulação do fibrinogênio bovino (2,5 mg/ml) pelo veneno bruto de <i>Lachesis muta muta</i> em função das concentração do veneno. Tampão fosfato de sódio 0,04 M – pH 7,40 – 37oC.....	176
Fig. V.3.4B2 – Dispersão de luz após coagulação de 2,5 mg/ml de fibrinogênio bovino por quantidades crescentes do enzima tipo-trombina de <i>L. muta muta</i> . Após o registro de velocidade os tubos foram mantidos a 37oC com leituras a cada 15 min., até a estabilização.....	176
Fig. V.3.4C - Comparação da potência coagulante entre veneno bruto e enzima tipo-trombina de <i>Lachesis muta muta</i> em estado puro.....	177
Fig. V.3.4D1 – Velocidade de coagulação do fibrinogênio bovino (2,5 mg/ml) pelo veneno bruto <i>C. d. terrificus</i> em função das concentração do veneno. Tampão fosfato de sódio 0,04 M – pH 7,40 – 37oC .....	178
Fig. V.3.4D2 – Dispersão de luz após coagulação de 2,5 mg/ml de fibrinogênio bovino por quantidades crescentes do veneno de <i>C. d. terrificus</i> . Após o registro de velocidade os tubos foram mantidos a 37oC com leituras a cada 15 min., até a estabilização. ....	178
Fig. V.3.4E1 – Velocidade de coagulação do fibrinogênio bovino (2 mg/ml) pelo veneno bruto de <i>B. jararaca</i> em função das concentração do veneno. Tampão fosfato de sódio 0,04 M – pH 7,40 – 37oC .....	179
Fig. V.3.4E2 – Dispersão de luz após coagulação de 2 mg/ml de fibrinogênio bovino por quantidades crescentes do veneno do veneno bruto de <i>B. jararaca</i> . Após o registro de velocidade os tubos foram mantidos a 37oC com leituras a cada 15 min., até a estabilização.....	179
Fig. V.3.5A - Neutralização da atividade coagulante da enzima tipo-trombina (0,112 µg) de <i>Lachesis muta muta</i> sobre o fibrinogênio bovino (2,5 mg/ml), pelo ABL-FUNED 900530. Tampão fosfato de sódio 0,04 M – pH 7,4 – 37oC. ....	179
Fig. V.3.5B - Neutralização da atividade coagulante da enzima tipo-trombina (0,225 µg) de <i>Lachesis muta muta</i> sobre o fibrinogênio bovino (2,5 mg/ml), pelo ABL-FUNED 900530. Tampão fosfato de sódio 0,04 M – pH 7,4 – 37oC. ....	180
Fig. V.3.5C - Neutralização da atividade coagulante da enzima tipo-trombina (0,337 µg) de <i>Lachesis muta muta</i> sobre o fibrinogênio bovino (2,5 mg/ml), pelo ABL-FUNED 900530. Tampão fosfato de sódio 0,04 M – pH 7,4 – 37oC. ....	181
Fig. V.3.5D – Quantidades de ABL-FUNED 900530 para neutralização total (pontos euteriáticos) da atividade coagulante do enzima tipo-trombina de <i>Lachesis muta muta</i> sobre o fibrinogênio bovino (2,5 mg/mL). Tampão fosfato de sódio 0,04 – pH 7,40 – 37oC.....	181

Fig. V.3.5E - Neutralização da atividade coagulante, sobre o fibrinogênio bovino (2,5 mg/mL) de quantidades equipotentes da enzima tipo-trombina (0,225 mg) e veneno bruto de <i>Lachesis muta muta</i> (3,3 µg), pelo ABL-FUNED 900530. Tampão fosfato de sódio 0,04 M – pH 7,4 – 37oC. ....	182
Fig. V.3.6A – Velocidade de coagulação do fibrinogênio bovino pelo enzima tipo-trombina de <i>Lachesis muta muta</i> (0,225 µg) em função da concentração do substrato, na presença do ABL-FUNED 900530. Tampão fosfato sódio 0,04 M – pH 7,40 – 37oC.....	183
Fig. V.3.6B – Velocidade de hidrólise do L-BAPNA (10 <sup>-3</sup> M) pela enzima tipo-trombina de <i>Lachesis muta muta</i> em função da concentração da enzima. Tampão tris-HCl 0,1 M – pH 8,10. ....	184
Fig.V.3.7A - Separação em Sephadex G-100 do enzima t-TLmm livre e complexado com anticorpos a nível de 64% de inibição da atividade coagulante sobre o fibrinogênio....	187

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

---

Quadro I.5.5A - Fundamentos da padronização de venenos e antivenenos .....	29
Quadro I.5.5B - Sistemática de padronização A1 – baseada em referência de veneno bruto.....	29
Quadro I.5.5C - Sistemática de padronização A2 – baseada em referência de veneno bruto.....	30
Quadro I.5.5D - Sistemática de padronização – baseada em referências de componentes do veneno em estado puro. (proposta de Jerne).....	30
Tab. III.3.1.A - Comparação dos parâmetros das curvas de letalidade dos venenos de <i>B. jararaca</i> e <i>C. D. terrificus</i> , obtidas em camundongos CF1, 18 a 22 g, pela via intraperitoneal (período 1986-1987).....	47
Tab. III.3.1B - Comparação dos parâmetros das curvas de letalidade dos venenos de <i>B. jararaca</i> e <i>C. D. terrificus</i> , obtidas em camundongos CF1, 18 a 22 g, pela via intraperitoneal (período 1995-1999).....	48
Tab. III.3.1C - Relações entre as doses efetivas para 10 atividades biológicas da Referência Nacional Bra/Bot/001 Butantan ( <i>B. jararaca</i> ) e a Referência Interna FUNED L: 8801-3 ( <i>B. jararaca</i> ).....	51
Tab. III.3.3A - Comparação dos coeficientes angulares das curvas de proteção do antiveneno bothrópico contra 3 DL <sub>50</sub> de veneno de <i>B. jararaca</i> , em 3 etapas do processamento do plasma hiperimune do cavalo. ....	54
Tab. III.3.3B – Comparação dos coeficientes angulares das curvas de proteção aos venenos (5 DL <sub>50</sub> ) de <i>B. jararaca</i> e <i>C. d. terrificus</i> pelos respectivos antivenenos, em três etapas do processamento do plasma hiperimune do cavalo.....	55
Tab. 3.3C - Ensaio biológico simulado de antiveneno bothrópico - Procedimento β.....	57
Tab. III.3.4 - Equivalentes antigênicos do Bra/Bot/001 e L:8801-3 FUNED para 15 µL de dois antivenenos bothrópicos.....	60
Tab.III.3.5 - Equivalentes antigênicos de alguns venenos bothrópicos em relação ao antiveneno AB 870914-576 FUNED .....	61
Quadro III.4.2A – Potência de um antiveneno, como definido por várias farmacopéias.....	73
Tab. IV.3.5A - Previsão do consumo de AB-FUNED 881122 para neutralização total de 53,7 µg/0,1 ml de venenos botrópicos, através da transformação para dose equihemorrágica de <i>B. jararaca</i> 870502 .....	110

Tab. IV.3.5B - Previsão do consumo de ABL-FUNED 900530 para neutralização total de 53,7 µg/0,1 ml de venenos botrópicos, através da transformação para dose equihemorrágica de <i>B. jararaca</i> 870502 .....	112
Tab. IV.3.5C - Previsão do consumo de AB-FUNED 881122 para neutralização total de 50,0 µg/0,1 ml de venenos botrópicos, através da transformação para dose equihemorrágica de <i>B. jararaca</i> 870502 .....	113
Tab. IV.3.5D- Previsão do consumo de AB-FUNED 920928 para neutralização total de 50,0 µg/0,1 ml de venenos botrópicos, através da transformação para dose equihemorrágica de <i>B. jararaca</i> Ref. Nacional Bra/Bot/002. ....	114
Tab. IV.5.3E - Previsão do consumo de AB-FUNED 920928 para neutralização total de 50,0 µg/0,1 ml de venenos botrópicos, através da transformação para dose equihemorrágica de <i>B. jararaca</i> Ref. FUNED 880103 .....	115
Tab. IV.3.5F - Previsão do consumo de AB-FUNED 920928 para neutralização total de 50,0 µg/0,1 ml de venenos botrópicos, através da transformação para dose equihemorrágica da mistura de venenos bothrópicos.....	116
Tab. IV.3.5G – Previsibilidade do consumo de AB-FUNED 920928 para neutralização total de 50,0 µl/0,1µl de venenos botrópicos, para neutralização total da atividade hemorrágica, segundo a espécie bothrópica .....	117
Tab. V.3.1 – efeito da adição parcelada da enzima sobre a velocidade de coagulação do fibrinogênio bovino em tampão fosfato 0,04 M, pH 7,40 .....	168
Tab. V.3.6A – Efeito do ABL 900530 sobre a velocidade de hidrólise do BAPNA pela enzima tipo-trombina de <i>L. muta muta</i> em condições de atividade coagulante totalmente inibida .....	185
Tab. V.3.6B – efeito da adição de enzima livre ao complexo Ez-Ab apresentando 69% de inibição na atividade coagulante sobre fibrinogênio bovino .....	186

# **ESTUDOS E PROPOSIÇÕES PARA A PADRONIZAÇÃO DE VENENOS E ANTIVENENOS OFÍDICOS DE INTERESSE MÉDICO PARA O BRASIL**

## **I - INTRODUÇÃO GERAL**

### **I.1 - CONSIDERAÇÕES SOBRE A COMPLEXIDADE E VARIABILIDADE DE VENENOS OFÍDICOS.**

Os venenos ofídicos são os mais complexos e variáveis de todos os venenos animais. As proteínas perfazem cerca de 90 % do peso seco total e entre elas existem enzimas (fosfolipases, hialuronidases, proteases de diversas especificidades, fosfatases, colagenases, nucleases, l-aminoácido-oxidases, nucleotidases, etc), proteínas ativas farmacologicamente apresentando ou não atividade enzimática (crotoxina, cardiotoxinas,  $\alpha$  e  $\beta$  neurotoxinas, etc) e, proteínas e enzimas que liberam agentes auto-farmacológicos. Em virtude da multiplicidade de propriedades bioquímicas, os venenos ofídicos são capazes de afetar toda classe de constituintes dos seres vivos (proteínas, lipídios, ácidos nucleicos, substância fundamental amorfa e membranas celulares), causando alterações da coagulação sanguínea, lesões estruturais e disfunções nos sistemas cardiovascular, respiratório, renal e neuromuscular. Componentes não protéicos também estão presentes nos venenos, como lipídeos, carboidratos, nucleosídeos, nucleotídeos, aminoácidos, aminas (serotonina, noradrenalina, metiltryptofano, bufotenina), cátions metálicos (cálcio, zinco, magnésio, sódio, potássio, cobre, manganês), ânions como o fosfato e citrato, etc. Maiores detalhes a respeito da complexidade de composição dos venenos ofídicos podem ser encontrados nas excelentes revisões de Russell (1967), Jimenez-Porras (1970), Lee (1972), Iwanaga & Suzuki (1979), Karlsson (1979) e Bieber (1979).

A variabilidade de composição bioquímica dos venenos, entre indivíduos de uma mesma espécie, de acordo com a idade, sexo e fatores zoo-geográficos, ou mesmo, em um único indivíduo da espécie dependendo de sua idade, das mudanças sazonais e de hábito alimentar, têm sido objeto de muitas investigações , recentemente revistas por Chippaux *et al* (1991). Os registros mais comuns referem-se a variações quantitativas de um mesmo componente como os pró-coagulantes de *Bothrops*, que ativam os fatores II e X da cascata da coagulação de mamífero (Furtado, 1991), mais ubíquos no recém-nato, que na serpente-mãe. Ainda dessa natureza, é a variação do teor de neurotoxinas ( $\alpha$  e  $\beta$ ) entre indivíduos das várias espécies de *Naja* (Boche *et al.* 1981). Ocorrem também dentro da mesma espécie, variações marcantes que se constituem na presença ou ausência completa de um componente. Exemplos clássicos dessa modalidade são: a presença de crotamina no veneno de *C. d. terrificus* de algumas regiões da América do Sul, enquanto falta em indivíduos de outras regiões (Schemberg, 1959a e b); ausência de um fator hemorrágico específico em espécimes de *T. flavoviridis* da ilha de Okinawa (Sadahiro and Omuri-Satoh (1980) ; ausência de enzima do tipo trombina em *Bothrops erytromelas* (Nahas *et al.* 1979). Verifica-se, portanto, que complexidade e variabilidade de composição são características constantes dos venenos ofídicos. A causa desses fenômenos certamente reside na constituição genética de cada espécie (ou população zoogeograficamente delimitada) como atestam os estudos de Chippaux (1982), que encontrou quatro distintos padrões eletroforéticos das proteínas do veneno de animais de uma mesma ninhada de *Bitis gabônica* e também, os estudos de Mebs & Kornalick (1984), que mostraram em ninhadas de *Crotalus adamanteus* a falta de uma toxina básica em metade dos indivíduos. Trabalhos mais acurados em termos de química de proteínas (Faure & Bon, 1987) descreveram que venenos de espécimes individuais de *C. d. terrificus* apresentam diferentes proporções de isoformas de crotoxina, isto é, crotoxinas com variações na estrutura primária de seus componentes. Evidentemente, que para cada região zoogeográfica e as espécies de importância médica nela presentes, o problema de complexidade e da variabilidade

dos venenos ofídicos, tomam aspectos particulares. Para as espécies brasileiras de *Bothrops* e *Crotalus*, um colaborador (Rodrigues, 1991) fez revisão recente das propriedades e composição dos venenos.

## **I.2 - CONSIDERAÇÕES SOBRE A COMPLEXIDADE E VARIABILIDADE DOS ANTIVENENOS (SOROS HIPERIMUNES)**

O sistema imune é capaz de estabelecer um enorme repertório de anticorpos ( $10^8$  a  $10^{10}$ ) e, expressá-los na forma de receptores na superfície do linfócito B, antes de seu primeiro contato com antígenos provenientes do meio externo. Entretanto, esses anticorpos, provenientes da expressão de sequências genéticas pré-estabelecidas, são de afinidade relativamente baixas. Quando o antígeno entra em contato com o sistema imune, estimula o “mecanismo de mutação somática”, que gera anticorpos de afinidades mais altas, ao mesmo tempo que estimula seletivamente a expansão dos clones de células que os produzem, determinando uma resposta imune mais eficiente (French et al, 1989). Assim, mesmo a resposta imune a um hapteno como o DNP (dinitrofenil) induziu à formação de uma mistura de IgGs (12 por focalização isoelétrica) anti-DNP cujas afinidades variaram entre  $10^{-4}$  a  $10^{-11}$  M (Roitt, 1994). Para a ciclosporina que é um undecapeptídeo cíclico, Quesniaux et al, 1990, obtiveram do camundongo 63 monoclonais capazes de reconhecer uma região determinante antigênica principal e outra secundária, porém com grande variação quanto aos aminoácidos especificamente envolvidos na ligação. Fizeram ainda, pela mesma técnica aplicada aos monoclonais, isto é, o deslocamento de ligação por competição com análogos modificados da ciclosporina (Elisa competitivo), a importante observação de que exatamente o mesmo repertório de especificidades foi encontrado nos diversos antisoros policlonais do camundongo (Quesniaux et al, 1990).

## **I.2.1 – FATORES DESFAVORÁVEIS À PADRONIZAÇÃO DE VENENOS E ANTIVENENOS**

A partir dessas considerações e daquelas expressas na seção I.1, a expectativa seria que, usados como imunógenos, os venenos ofídicos deveriam gerar misturas de anticorpos, de complexidade isotípica e variabilidade, ainda maiores. Contribuem para essa expectativa: a) os venenos ofídicos são constituídos por proteínas de alto peso molecular apresentando cada uma, várias superfícies determinantes; b) os processos de detoxificação e os adjuvantes utilizados, frequentemente agravam a questão da variabilidade e complexidade pela desnaturação parcial e/ou incompleta das proteínas (Boquet, 1979); c) as assim denominadas “misturas antigênicas”, com as quais se faz o inóculo para imunização, são em geral, misturas de venenos de todo um gênero, procurando atender ao mesmo tempo, as variações zoogeográficas, sazonais e ontogênicas; d) cada lote ou partida de antiveneno corresponde à misturas de plasmas hiperimunes de vários animais, que diferem entre si geneticamente e, às vezes, até em passado imunológico.

O fato de que a primeira tentativa de estabelecimento do “Padrão Internacional de Antiveneno” anti-*Naja* em 1957 (Christensen, 1966), tenha falhado, justamente por apresentar curvas de neutralização dos venenos de *Naja*, quantitativamente dissimilares das subsequentes partidas comerciais de antiveneno anti-*Naja*, ilustra de modo drástico, a questão da variabilidade dos antivenenos. Cabe aqui mencionar que esta primeira tentativa de estabelecer um Padrão Internacional de Antiveneno, foi também a única, muito embora a produção de antivenenos de várias especificidades tenha continuado em todo o mundo. O reconhecimento explícito da impossibilidade de padronização absoluta de antivenenos, de modo que as estimativas de potência fossem independentes das condições experimentais como preconizado por Jerne & Wood (1949), deve-se a Christensen (1979). De modo análogo, Schottler (1958) já havia

chamado a atenção que as referências para veneno devem ser feitas em grande quantidade, devido à impossibilidade de substituí-los por outra preparação idêntica em qualidade.

### **I.2.2 – HOMOLOGIA ANTIGÊNICAS – FATORES FAVORÁVEIS À PADRONIZAÇÃO DE VENENOS E ANTIVENENOS.**

A precedência da discussão dos fatores desfavoráveis à padronização, isto é, a complexidade e variabilidade do sistema veneno-antiveneno, serve aos propósitos de quem pretende contribuir nessa área do conhecimento, mas de certo modo desvia a atenção da realidade de que não necessitamos de antivenenos sequer espécie-específicos. A ocorrência de homologias bioquímicas, imunológicas e farmacológicas para os venenos ofídicos foram e são expectativas sensatas, desde a época de Calmette (1894), especialmente na sequência família → gênero → espécie. A hipótese de Calmette em 1894 de que o antiveneno anti-*Naja*, fosse efetivo contra todos os venenos neurotóxicos, supunha um exagerado grau de homologia que não se verificou, mas a ocorrência de reatividade cruzada (neutralização cruzada) entre espécies foi se firmando com o tempo como uma realidade da imunoterapia do acidente ofídico (Horowitz & Dart, 1995). Vital Brazil (1914) foi pioneiro na produção de soros hiperimunes monoespecíficos e poli-específicos, demonstrando o alto grau de reatividade cruzada dentro do gênero *Bothrops*.

Segundo Boquet (1979), a verificação de coincidências de homologia funcional e imunológica para venenos de uma mesma família e gênero, tomou grande espaço nas publicações especializadas de 1920 a 1961, sem porém deixar de manter sua presença até o momento de sua revisão. Os métodos imunoquímicos utilizados foram a neutralização de atividades bioquímicas ou tóxicas, imunoprecipitação, imunodifusão e imunoeletroforese em gel. Data de 1925 a cunhagem do termo “Mosaico de Antígenos”, por Nicole & Raphael (citado por Boquet, 1979),

procurando figurar pictoricamente a noção que fragmentos estruturais das proteínas aparecem repetitivamente nos venenos de famílias e gêneros. De especial importância para a nossa região, foi a demonstração por Schemberg (1961) da presença de mais de 30 antígenos nos venenos de distintas populações de *B. jararaca*, utilizando o método de imunodifusão. A combinação desses antígenos permite a existência de mais de 50 padrões de venenos individuais. Mais tarde, em 1963, o mesmo autor encontrou para o *B. neuwiedi*, 5 grupos principais de composição antigênica (Schemberg, 1963). Em 1989, Dias da Silva et al. publicaram um estudo bastante abrangente sobre reatividade cruzada no gênero *Bothrops* e, de grande importância prática para a escolha da mistura antigênica destinada à produção de antiveneno para uso terapêutico. Neste, 10 antivenenos monoespecíficos foram estudados combinatorialmente contra os venenos das espécies de *Bothrops* correspondentes, pelos métodos de ELISA (veneno bruto), imunodifusão dupla, precipitação quantitativa, inibição da atividade hemolítica indireta e pela determinação de DE50 no ensaio de proteção de letalidade no camundongo. Os resultados indicaram reatividade cruzada praticamente completa, porém de intensidade variável, em todas as metodologias, permitindo estabelecer que a mistura de *B. alternatus*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*, usada como imunógeno, resulta em antiveneno capaz de conferir proteção anti-letal contra qualquer dos 10 venenos Bothrópicos do estudo.

Os primeiros investigadores a sugerir que, determinantes antigênicos presentes em componentes tóxicos de um veneno ofídico encontram-se também representados em componentes não-tóxicos, foram Githens & Butz (1929). Esses autores, estudando quantitativamente a neutralização da atividade letal de venenos crotalídeos da América do Norte, mostraram que o consumo de antiveneno era sempre proporcional à D.M.M. (dose mínima mortal). O mesmo fenômeno ocorre para os venenos de *Bothrops* brasileiros (vide seção III-3-5 do presente trabalho). Apesar da importância prática do isolamento e caracterização de antígenos

não-tóxicos, para uso na imunização preventiva ou produção de antiveneno, como também para ser evitado na confecção de ELISAs que pretendem quantificar toxinas, esse fenômeno não tem sido explorado para venenos ofídicos. Coube a Chavez-Olórtegui et al (1996, 1997) e Moreira-Ferreira (1998) a detecção, isolamento e a demonstração do valor como imunógeno e protetor, de uma proteína não tóxica do veneno de *Tityus serrulatus*, que apresentou alto grau de homologia estrutural com as toxinas do mesmo veneno.

Em resumo da seção I.2.2, podemos afirmar que a ocorrência de homologias antigênicas entre os venenos ofídicos é um fator favorável, sem o qual os antivenenos seriam ainda mais complexos e a exigência de antivenenos para espécies ou mesmo variedades, restringiriam o exercício da imunoterapia do acidente ofídico. A plena exploração desta vantagem, além da coleção de informações sobre reatividade cruzada, implicaria em um maior conhecimento da estrutura das proteínas envolvidas e de seus determinantes antigênicos.

### **I.2.3 – MODELOS IMUNOQUÍMICOS EM TOXINOLOGIA**

A partir de 1955, com a determinação da estrutura primária completa da insulina por F. Sanger, foi iniciada uma era onde se tornou possível relacionar a estrutura de uma proteína com suas funções enzimáticas, tóxicas, regulatórias, imunogênicas, antigênicas, etc. Esta revolução, foi 20 anos mais tarde continuada e ampliada consideravelmente: a) pela biologia molecular, que permitiu a determinação da estrutura primária de proteínas pela sequência do c-DNA, e ainda a produção em massa de proteínas e mutações dirigidas; b) pela tecnologia dos hibridomas, que permitiu a produção de anticorpos dirigidos contra um único determinante antigênico; c) pela síntese de peptídeos em estado sólido; d) pelo aprimoramento dos estudos de difração de raios X na determinação da estrutura espacial de proteínas ou complexos protéicos em estado cristalino,

como também de outros métodos físicos aplicáveis. O impacto sobre a imun química, resultou não só na elucidação de: estruturas e da relação estrutura-função das várias classes de imunoglobulinas; do mapeamento epitópico da superfície de antígenos; da estrutura das regiões de contato entre antígeno e anticorpo e das ligações químicas envolvidas, como também de seus aspectos cinéticos e termodinâmicos. Para tal, a ciência imunológica compartilhou modelos estruturais de proteínas com a bioquímica clássica, como a lisozima, o citocromo c, a neuraminidase, etc, que são amplamente utilizados como exemplos, nos livros-texto de imunologia (Roitt, 1994).

A partir de 1960, de modo crescente, muitos componentes dos venenos ofídicos foram isolados, propiciando aos investigadores examinar suas propriedades estruturais e imunológicas, não só como um meio de melhorar a qualidade terapêutica dos antivenenos pela compreensão das relações antigênicas entre venenos, mas também para identificar nessas moléculas, os grupamentos responsáveis pela atividade tóxica, imunogênica e antigênica (Boquet, 1979). Assim, os toxinologistas de venenos ofídicos desenvolveram vários modelos próprios para o estudo da relação estrutura-função de proteínas como: toxinas curaremiméticas ou  $\alpha$ -toxinas; toxinas de ação pré-sináptica como  $\beta$ -bungarotoxina e crotoxina; cardiotoxinas ou citotoxinas; fosfolipases  $A_2$  (PLA<sub>2</sub>) e toxinas com estrutura de PLA<sub>2</sub>; dendrotoxinas; miotoxinas, fatores hemorrágicos; enzimas do tipo-trombina; ativadores do fator X da coagulação, etc, etc. Esses modelos já mencionados em parte por Boquet em 1979, foram amplamente revistos por Menez (1991), sob o aspecto da especificidade e reatividade cruzada de anticorpos policlonais e monoclonais, como também de suas capacidades neutralizantes sobre várias toxinas correspondentes aos modelos acima mencionados.

As toxinas curaremiméticas de cadeia curta como as de cadeia longa são, sob todos os aspectos as toxinas melhor conhecidas (Menez, 1992): a) as estruturas tridimensionais (“three

finger-shaped structure”) foram modeladas a partir de dados de difração de raios X da erabutoxina b; b) seu sítio de ligação ao receptor nicotínico neuromuscular, foi localizado principalmente nas alças II e III, face côncava da toxina, por estudos de competição para ligação das toxinas naturais com variantes genéticos e quimicamente modificados; c) o anticorpo monoclonal M $\alpha$ 2-3 obtido contra a toxina  $\alpha$  de *Naja nigricolis* teve seu epítipo alvo identificado, o qual inclui o sítio de ligação com o receptor nicotínico na face côncava da molécula, o que lhe confere *in vitro*, a propriedade de reconhecer e neutralizar todas as toxinas curaremiméticas de cadeia curta. Os anti-idiotipos anti M $\alpha$ 2-3 são capazes de ligar-se com alta afinidade ao receptor nicotínico, causando *miastenia gravis*. O M $\alpha$ 2-3 liga-se à toxinas  $\alpha$  com KD da ordem de  $10^{-8}$  M, enquanto o KD para ligação das toxinas com o receptor nicotínico é da ordem de  $10^{-11}$  M. O que permite uma explicação para o fato de este anticorpo somente retardar a morte dos camundongos, não tendo capacidade protetora; d) o anticorpo monoclonal M $\alpha$ -1, também obtido contra a toxina  $\alpha$  de *Naja nigricolis*, impede a ligação da toxina ao receptor nicotínico *in vivo* e *in vitro*, como também acelera a dissociação da toxina já ligada. Seu epítipo alvo foi localizado na alça nº 1, e é composto por aminoácidos localizados no eixo da molécula acessíveis pelo lado côncavo (oposto ao sítio toxofórico). O KD para a toxina  $\alpha$  é de  $0,4 \cdot 10^{-9}$  M, sendo capaz de acelerar *in vitro* a cinética de dissociação da toxina marcada com o receptor nicotínico, enquanto o excesso de toxina fria ou de receptor são inefetivos. Em ratos intoxicados pela toxina  $\alpha$  e mantidos sob respiração artificial, o anticorpo M $\alpha$ 1 causou retorno da respiração espontânea em  $78 \pm 8$  min, comparado a  $940 \pm 42$  minutos dos animais controle; e) a maioria dos monoclonais obtidos contra a  $\alpha$ -toxina não apresentou propriedades neutralizantes; f) antivenenos policlonais contra a toxina  $\alpha$  são também capazes de acelerar a dissociação da toxina do receptor nicotínico, não sendo entretanto esta uma atividade comum a todas as preparações. g) Chuang et al. (1989) preparou um anticorpo monoclonal contra a  $\alpha$ -bungarotoxina, apresentando plena capacidade neutralizante

*in vivo* e *in vitro*. h) a fusão da erabutoxina obtida da serpente marinha *Laticauda semifasciata*, com um superantígeno bacteriano (proteína A estafilocócica), por meio de seus cDNAs, permitiu a confecção de um plasmídeo que transfectado em *E. coli* produziu grande quantidade da proteína híbrida. Este híbrido apresentou imunogenicidade muito superior à toxina nativa e as mesmas propriedades antigênicas. Os anticorpos policlonais obtidos não só impediram a ligação da erabutoxina a marcada ao receptor nicotínico, como também conferiram completa proteção ao camundongo.

Outro modelo toxinológico bem estudado é constituído pelas fosfolipases  $A_2$  e toxinas com estrutura de  $PLA_2$ , sendo especialmente importante para nós no Brasil, a crotoxina, tanto por razões históricas, quanto zoogeográficas e epidemiológicas. Muitos estudos se dedicaram à caracterização imunológica da crotoxina nativa, de seus componentes ácido (CA) e básico ou fosfolipásico (CB), como também da crotoxina reconstituída. Hamashiro et al. (1978) foram os primeiros a verificar que o antisoro obtido em coelhos contra a unidade básica era capaz de neutralizar a atividade hemolítica da sub-unidade, do complexo (crotoxina) e do veneno bruto de *C. d. terrificus*. A inibição da atividade fosfolipásica pelo mesmo antisoro, foi demonstrada no mesmo laboratório por Da Silva e Bier (1982). Utilizando como imunógeno a unidade básica da crotoxina em adjuvante completo de Freund ou  $Al(OH)_3$ , dos Santos et al. (1988), confirmaram a capacidade da sub-unidade básica neutralizar a atividade tóxica da crotoxina, mas também mostraram que os animais imunizados tornaram-se resistentes ao veneno bruto, e que esta imunidade era efetiva por 3 meses. Mais recentemente, Choumet et al (1992) obtiveram seis anticorpos monoclonais anti-CA e oito anti-CB, os quais foram estudados quanto a sua capacidade de ligação às citadas proteínas, por meio de ELISA competitivo, e também quanto à capacidade de inibir as atividades fosfolipásicas e letal. Três anticorpos monoclonais anti-CB, apresentando KD da ordem de nanomolar em relação às cinco isoformas de CB, mostraram-se

capazes de inibir tanto a atividade letal, quanto fosfolipásica, permitindo também o mapeamento ectópico destas regiões. Uma discussão mais recente, sobre mapeamento ectópico em fosfolipases de venenos ofídicos, foi publicada por Stiles & Choumet (1997) apresentando exemplos onde os estudos lograram resultados positivos do ponto-de-vista da aplicabilidade, isto é, coincidência de inibição de atividade fosfolipásica e tóxica por um único monoclonal, e outros menos favoráveis. A obtenção de anticorpos monoclonais contra a toxina  $\gamma$  de *Naja nigricolis* (cardiotoxina,  $\beta$ -bungarotoxina, notexina, mojave-toxina, dentrotoxinas, miotoxinas, ativador do fator X da *Vipera russeli*, está descrita na revisão de Menez (1991), nem sempre acompanhada de sucesso neutralizante.

Em resumo das discussões do seção I.2.3, poderíamos esperar em futuro próximo uma considerável simplificação dos antivenenos e da imunoterapia do acidente ofídico, baseada no conhecimento da estrutura das proteínas dos venenos ofídicos, seus grupamentos ativos, seus determinantes antigênicos e na produção de anticorpos monoclonais neutralizantes e de grande afinidade. Para tal, seria necessário o levantamento do que poderia ser denominado “repertório antigênico comum” para gênero ou espécie, de modo a garantir alto grau de reatividade cruzada, mesmo para os monoclonais que viessem a ser adicionados ao antiveneno policlonal. Segundo Sullivan (1987) e Lomonte et al (1992), a grande especificidade que permite aos anticorpos monoclonais se ligarem a determinantes antigênicos bastante particulares, pode torná-los inefetivos como agentes terapêuticos únicos em um caso específico de acidente ofídico. Assim, a substituição do antiveneno clássico por mistura de monoclonais poderia requerer, em alguns casos, um número impraticável.

#### **I.2.4 – PROBLEMAS IMUNOQUÍMICOS NA MENSURAÇÃO DE ANTICORPOS EM ANTIVENENOS**

Usualmente, o teor de anticorpos é determinado frente a antígeno puro ou padronizado (Harlow & Lane, 1988), medindo-se a quantidade de anticorpo ligado. Entretanto, o resultado desta medida depende da afinidade da ligação e da estequiometria da reação. Segundo Van Oss (1992), as reações antígeno-anticorpo são essencialmente não-estequiométricas, ou melhor dizendo, não apresentam estequiometria fixa, a qual depende: a) da concentração de antígeno e anticorpo (fenômeno zonal); b) da policlonalidade e valência dos anticorpos; c) da multivalência dos antígenos, de seu tamanho, e do espaço entre determinantes antigênicos; d) dos fenômenos de restrição de ligação decorrentes de competição e impedimentos espaciais; e) da dependência positiva da afinidade com a diluição de antígeno e anticorpo. A dependência da afinidade antígeno-anticorpo na concentração é muito intensa para antígenos multivalentes e anticorpo policlonal, sendo descrito o aumento de  $1,7 \cdot 10^7$  para  $6,5 \cdot 10^{11}$   $\text{LM}^{-1}$  com uma diluição de apenas 100 vezes, para a albumina bovina e IgG caprina (Van Oss & Walker, 1987). Uma das explicações para este fenômeno, é que em diluições muito altas, somente se ligam os anticorpos de maior afinidade, como menor interferência de bloqueios espaciais e restrição competitiva por outros anticorpos de menor afinidade. Estas considerações são aplicáveis ao problema da neutralização do veneno ofídico pelo antiveneno, uma vez que a inativação funcional do antígeno é univocamente dependente da ligação do anticorpo. Para o veneno de *B. jararaca*, considerando para efeito de aproximação, uma massa molecular média de 50 Kdaltons, teríamos nas misturas de incubação nos ensaios de proteção letal do camundongo, que é o método oficial para atribuição de uma potência neutralizante ao antiveneno, uma concentração de proteína antigênica da ordem de  $10^{-5}$  M. Esta concentração coincide com a de ovoalbumina utilizada na reação de precipitação em meio líquido (Kabat & Mayer's, 1961). Trata-se, portanto, de uma macrotécnica onde as concentrações de proteína antigênica são superiores a mg/ml. Se levarmos em conta a

característica de mosaico antigênico, por exemplo, dos venenos bothrópicos, é possível que alguns determinantes atinjam concentrações superiores a  $10^{-5}$  M. Este fato contrasta com as avaliações feitas por Kamiguti et al (1991) em pacientes envenenados por B. jararaca, que encontrou concentrações plasmáticas de veneno bruto de  $10^{-10}$  a  $10^{-8}$  M (cálculo admitindo também massa molecular média de 50 Kd) através de ELISA. Esta disparidade considerável das concentrações de antígeno e, conseqüentemente, de anticorpo, entre as reações utilizadas para padronização de antivenenos e, as condições físico-químicas reais no plasma ou interstício do paciente acidentado, não têm sido sequer consideradas na literatura especializada no assunto.

As curvas de ligação antígeno-anticorpo monoclonal obtidas por radioimunoensaio seguem o formato esperado pela lei de ação de massas (Berzofsky & Schechter, 1981; Ménez, 1991). Choumet et al (1992) apresentaram curvas de ligação (ELISA), curvas de inibição de atividade fosfolipásica  $A_2$  e curvas de neutralização de atividade letal da crotoxina com vários anticorpos monoclonais. Estas curvas seguiram a função básica esperada pela lei de ação de massas, isto é, curvas (% resposta controle x log da concentração do monoclonal) sigmoidais e simétricas, sendo as curvas de neutralização análogas das curvas de ligação, evidentemente para os anticorpos plenamente neutralizantes. Entretanto, para a neutralização de um antígeno puro por soro policlonal ou a neutralização de uma atividade biológica (toxina ou enzima) em um antígeno complexo como um veneno bruto também por soro policlonal, as curvas podem tomar aspectos peculiares.

As enzimas são antígenos bem estudados, devido a maior facilidade de obtê-las em estado puro e ensaiá-las in vitro com precisão. Segundo Cinader (1957); Lee & Sehont (1971); Arnon & Geiger (1977), os anticorpos podem ligar-se a determinantes antigênicos na molécula da enzima, não causando qualquer alteração funcional, inibição parcial, inibição total ou mesmo ativação, sendo os mecanismos mais prováveis o bloqueio espacial (para substratos de grande massa

molecular) e a alteração de conformação. Para as enzimas, até a revisão de Arnon (1977) não são mencionados casos de anticorpos contra o centro ativo. Como salientado na seção seção I.2.3, para as toxinas curaremiméticas e crotoxina, já foram obtidos anticorpos monoclonais dirigidos contra determinantes do centro “ativo ou toxofórico”.

Outra consequência da ligação de um anticorpo a um antígeno, manifesta-se sobre a molécula do anticorpo como foi descrito por Weintraub et al. (1973) para a gonadotrofina coriônica humana e IgG policlonal. Neste caso foi demonstrada por meio de radioimunoensaio cooperatividade positiva, isto é, a ligação de uma molécula de antígeno favorecia a ligação de outra à mesma molécula de anticorpo. Assim, podemos antever para as reações entre veneno bruto e antiveneno ofídico, todas as possíveis intercorrências apresentadas na seção I.2.4 para antígenos e anticorpos de todas as especificidades, a saber: variações de estequiometria e afinidade com a concentração, restrição competitiva de ligação; restrição de ligação por impedimentos espaciais; cooperatividade para ligação do anticorpo, etc. Considerando que a repercussão da ligação do anticorpo sobre a capacidade funcional do antígeno, depende da especificidade deste anticorpo, e que desta ligação pode resultar ativação, inibição ou mesmo nenhuma alteração, devemos esperar relações bastante complexas para descrever o que poderíamos denominar de atividade específica do antiveneno. Em assunto correlato, Jerne (1951) comentando a literatura do final do século passado até os seus dias, sobre a neutralização da toxina diftérica pela antitoxina (soro hiperimune), reafirmou o conceito implícito na “Lei dos Múltiplos de Proporção”, distinguindo-o das curvas de neutralização onde não existe proporcionalidade constante entre a quantidade de atividade inativada e a quantidade de anticorpo adicionado. A experiência com venenos e antivenenos ofídicos, tanto de viperídeos quanto elapídeos (Tu, 1991; Schottler, 1952; Christensen, 1966, 1967, 1979) têm mostrado a inaplicabilidade da “Lei dos Múltiplos de Proporção” para a relação “quantidade de veneno

neutralizado e quantidade de antiveneno consumido para tal”. Como explicação, a hipótese mais popular é a existência nos venenos de componentes ativos minoritários e/ou pouco antigênicos, que acumulando-se sem neutralização passariam a dominar o modo de ação do veneno nas doses mais altas, causando aumento do consumo de antiveneno (elevação do coeficiente angular da relação). Apesar dessa hipótese não explicar o desvio oposto da “Lei dos Múltiplos de Proporção”, ou seja, a redução do coeficiente angular da relação, as explicações de ordem imunoquímica aqui apresentadas nesta seção I.2.4 não tem sido aventadas e sua participação no fenômeno, investigadas. Do mesmo modo, as inovações introduzidas por Sullivan & Russell (1984), isto é, o uso dos fragmentos F(ab) de IgG (T) de cavalo, purificada do soro hiperimune por cromatografia de afinidade, não tiveram na literatura especializada a atenção merecida. Além das vantagens farmacocinéticas (aumento do volume de distribuição e redução da meia-vida) defendidas pelos seus autores, esta medida acarretaria simplificação imunoquímica e conseqüentemente, maior padronizabilidade aos antivenenos.

### **I.3 - FUNDAMENTOS DO PROCESSO DE PADRONIZAÇÃO DE VENENOS E ANTIVENENOS OFÍDICOS**

A partir das considerações feitas nas seções anteriores, sobre a complexidade e variabilidade qualitativa, quantitativa, funcional e imunoquímica de venenos e antivenenos ofídicos, fica patente não só a necessidade de padronização, como também o grau de dificuldade da tarefa. Segundo Domingues do Carmo (1995), três são os fundamentos da padronização de venenos e antivenenos:

**A)** uniformização dos processos de obtenção de veneno;

**B)** uniformização dos processos da produção de antiveneno;

C) uniformização das metodologias experimentais para a caracterização e aferição das propriedades funcionais de venenos e antivenenos.

O autor citado discute amplamente os três itens, Nosso interesse, prende-se mais exatamente ao ensaio quantitativo das propriedades funcionais do par veneno-antiveneno.

## **I.4 - ENSAIOS QUANTITATIVOS**

**I.4.1 - O propósito de um ensaio (determinação) quantitativo de qualquer natureza é determinar a massa de uma substância especificada, contida em uma dada amostra de matéria.** Para atingir este propósito, em amostras complexas, é necessário medir uma propriedade extensiva, característica da substância que relaciona a intensidade da propriedade mensurada com sua massa. Na prática, esta função pode ser determinada por intermédio de “padrões” ou “substâncias de referência”. Entretanto, a presença na amostra, como nos padrões, de contaminantes ou modificadores da propriedade característica, distorcem a verdadeira função que relaciona esta propriedade à massa. Nesta situação, o propósito de avaliar a massa de um material especificado contido na amostra, não é realizável com exatidão. Mais realisticamente, deve-se objetivar a determinação de quão ativa ou potente é a amostra em produzir a propriedade característica, em comparação ao padrão.

#### **I.4.2 - ENSAIOS BIOLÓGICOS**

As preparações biológicas são capazes de detectar e quantificar diversos tipos de substâncias químicas, por intermédio da resposta biológica evocada sobre estas. Consideradas como uma medição, as respostas biológicas estão mais sujeitas à variação que as medidas físico-químicas, sendo causas para tal, a sua complexidade mecanística, o polimorfismo genético e a grande sensibilidade das preparações biológicas às modificações ambientais. As funções matemáticas relacionando a dose à resposta em ensaios biológicos, não são necessariamente mais complexas que em ensaios físico-químicos, embora os mecanismos moleculares subjacentes o sejam. A cadeia de acontecimentos moleculares, fisiológicos e/ou morfológicos, intermediária entre a aplicação de um estímulo à célula e a resposta biológica final, torna-a mais susceptível a agentes modificadores que aquelas baseadas em reações químicas simples e obviamente, também que respostas decorrentes de alterações físicas. Estes agentes modificadores podem incidir sobre qualquer nível da cadeia mecanística, atuando sinérgica ou antagonisticamente.

A característica que faz os ensaios biológicos imprescindíveis, mesmo levando em conta as desvantagens acima mencionadas, o maior dispêndio de recursos materiais e habilidades profissionais, é que exceto para enzimas, trata-se da única avaliação funcional a qual algumas proteínas podem ser submetidas.

### I.4.3 – CRITÉRIOS DE VALIDADE

Os critérios de validade fundamental e de validade estatística, como formulados por Jerne e Wood (Jerne & Wood, 1949) e os princípios de delineamento experimental e análise, como apresentados no clássico livro texto de Finney (Finney, 1964) constituem um corpo de conhecimento, que tem sido aplicado com sucesso, à padronização biológica de hormônios peptídicos, vitaminas e antibióticos. O termo “padronização biológica” implica em que a substância padronizada, seja qualitativa e quantitativamente comparada ao Padrão Internacional, sobre a mesma preparação biológica, e que, portanto, sua capacidade em produzir o efeito biológico esperado seja previsível a nível mundial.

O principal requisito químico para um Padrão Internacional não é seu grau de pureza, mas sua estabilidade. Do ponto de vista funcional ou farmacológico, o requisito é que produza sempre a mesma resposta (qualitativamente) não dependendo esta, da espécie ou linhagem animal sobre a qual é feito o ensaio. Historicamente, a padronização biológica moderna, desenvolveu-se a partir da descoberta da insulina. Em um artigo intitulado “A unidade de insulina”, Lacey (Lacey, 1967) focalizou a evolução mútua dos padrões internacionais de insulina e das preparações farmacêuticas, a fim de atender ao critério de similaridade funcional ou farmacológica (critério A<sub>3</sub> de Jerne e Wood). O critério de similaridade afirma que as preparações farmacêuticas “padrão” e “teste” devem se comportar como se fossem diluições de um mesmo constituinte ativo em um meio inerte (Jerne & Wood, 1949). O significado deste critério em termos farmacológicos é que a resposta biológica seja a mesma e produzida pelo mesmo mecanismo, ídem, para as influências de contaminantes modificadores da resposta. Parafraseando o critério A<sub>3</sub>, em termos matemáticos significa que a mesma função deve relacionar a dose à resposta, tanto para o “padrão” quanto para a preparação “teste”. Com o objetivo de definir inequívoca e universalmente (válida por toda extensão da função), a relação numérica entre as potências das

duas preparações, funções lineares devem ser obtidas diretamente ou por meio de uma transformação adequada das variáveis. Para uma variável dependente (resposta biológica-variável estocástica) diretamente proporcional ao logaritmo da dose (variável independente ou determinística), o critério de similaridade é preenchido pela aceitação estatística de paralelismo entre as duas curvas dose-resposta (padrão e teste). Neste caso, a relação numérica entre as potências, é definida como o anti-logaritmo da distância entre as curvas. Quando a variável dependente é diretamente proporcional à dose em sua escala aritmética original, a aceitação estatística de igualdade de interceptos atestam a similaridade. A relação de potências neste caso é definida pelo quociente dos coeficientes angulares (Finney, 1964).

#### **I.4.4 - APLICABILIDADE DO ENSAIO BIOLÓGICO À PADRONIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS FARMACOLOGICAMENTE COMPLEXAS.**

A unicidade farmacológica é a característica de uma substância ou material, que permite a aplicação com sucesso da metodologia do ensaio biológico na sua padronização, mesmo com a presença de mais de um constituinte ativo. Este de fato, é o caso dos hormônios peptídicos, vitaminas e antibióticos. Os venenos ofídicos, e seus respectivos antivenenos ainda constituem um desafio à metodologia da padronização biológica. Exceto pelos estudos de Kondo (Kondo et al, 1960, 1965a, 1965b) sobre a atividade hemorrágica do *Trimeresurus flavoviridis* e de Domingues do Carmo (Domingues do Carmo, 1995) sobre a atividade hemorrágica de venenos Bothrópicos, não temos notícia de outras tentativas de aplicar ortodoxamente os princípios do ensaio biológico à padronização de venenos e antivenenos.

Existem duas classes de fenômenos que complicam a padronização biológica de venenos ofídicos: A) os efeitos perturbadores podem ser minimizados pela uniformização dos métodos de coleta e processamento, e pela formação de grandes partidas, quer de veneno, quer de antiveneno,

nas quais as particularidades de espécimes individuais ficam diluídas. As influências sazonais geográficas na composição do veneno e o polimorfismo genético dos animais imunizados são exemplos. B) A pluralidade de constituintes ativos nos venenos e antivenenos, a existência de interações químicas e farmacológicas entre estes, e a necessidade de duas preparações de referência (uma para o veneno e outra para o antiveneno), estão compreendidas nesta classe. A possibilidade de transpor este segundo tipo de efeito perturbador fica de modo ideal, condicionado ao conhecimento da composição e propriedades de venenos e antivenenos. Assim, o que é complexo poderia ser desmembrado em seus componentes, quimicamente através de fracionamentos e/ou funcionalmente através de ensaios específicos.

As complexidades bioquímicas e farmacológicas dos venenos ofídicos, são fatos bem estabelecidos e a longo tempo, como atestam os extensos artigos de revisão das décadas de 70 e 80 já mencionados. A consequência imediata da explicitação deste conhecimento, aliado à melhor compreensão da fisiopatologia e controle clínico do acidente ofídico a partir desta época, foi que não mais a caracterização toxicológica dos venenos e a padronização de antivenenos, poderia se apoiar somente nas determinações do efeito letal (DL50 do veneno) e efeito protetor (DE50 do antiveneno). Este ponto, enfatizado por Ownby (1990) tem sido uma necessidade há muito reconhecida e defendida por investigadores pioneiros como Schotter (1952), Kondo et al (1965a,b) e Christensen (1966).

O simpósio da Organização Mundial da Saúde sobre Venenos e Antivenenos, ocorrido em Zurique em 1979 (WHO OFFSET public., 1981) e a criação do “Centro Colaborativo Para o Controle de Antivenenos” (CCCA), junto à “Escola de Doenças Tropicais da Universidade de Liverpool” (U.K.), lançou uma campanha mundial para uma caracterização mais ampla e mais significativa do ponto de vista clínico, tanto das propriedades lesivas dos venenos, como também do poder dos antivenenos em neutralizá-las. O artigo assinado por Theakston e Reid (1983)

propôs um conjunto de métodos para a caracterização de venenos e antivenenos, tais como: toxicidade letal; atividade coagulante sobre fibrinogênio bovino puro; idem sobre plasma humano citratado; hemorragia cutânea em ratos; necrose cutânea em ratos, e atividade defibrinogenante *in vivo*, em camundongos. Este trabalho teve grande importância na campanha da OMS, por divulgar métodos que previamente se encontravam dispersos e não uniformizados. Também, em resposta a esta campanha, foram publicados por investigadores brasileiros alguns trabalhos no assunto: Sanchez et al. (1992); Leite et al. (1992) e Ferreira et al. (1992a,b), caracterizando um número significativo de venenos de crotalíneos. Estes estudos, propiciaram uma avaliação quantitativa do problema da variabilidade, concentrada nas espécies e atividades biológicas de interesse médico mais imediato. O artigo de Sanchez et al. (1992) caracterizou venenos de treze espécies de crotalíneos de relevância médica para a América do Sul. Além das seis atividades biológicas preconizadas pelo CCCA, foram determinadas: DL50 IP; DL50 ICV; atividade proteolítica sobre caseína e efeito edematogênico na pata de camundongo. Não foram encontradas correlações estatísticas significativas entre quaisquer pares de atividades, para uma série de dezesseis venenos bothrópicos. Isto significa que a determinação de uma das propriedades de um veneno ofídico não permite a previsão de quaisquer outras. Em outras palavras, os venenos devem ser caracterizados de modo abrangente, se é que se pretende determinar a capacidade dos antivenenos em neutralizar seus efeitos.

## **I.5 - CONSIDERAÇÕES E PROPOSTAS PARA A ELABORAÇÃO DE UMA SISTEMÁTICA DE PADRONIZAÇÃO APLICÁVEL AO PAR VENENO-ANTIVENENO.**

**I.5.1 – Esta seção apresenta um conjunto de idéias, proposições e críticas que surgiram de prolongadas discussões durante o ano de 1997, entre este autor, Célia de Fátima Barbosa e Raquel Joane Rodrigues, no Departamento de Controle Biológico da FUNED-MG.**

O termo sistemática neste contexto, tem o significado de conjunto inter-relacionado de métodos e procedimentos e não de taxonomia. O par veneno-antiveneno refere-se à situação já estabelecida na prática da soroterapia do acidente ofídico, e legalizada pelas monografias em várias farmacopéias, ou seja, de um lado o antiveneno para gênero, disponível comercialmente, e do outro, todo o conjunto de venenos individuais e misturas destes, originários de espécimes pertencentes ao gênero, dentro de uma circunscrição zoogeográfica.

### **I.5.2 - SISTEMA DE REFERENCIAMENTO.**

A questão fundamental de ordem prática é decidir entre o uso de somente veneno de referência ou também antiveneno de referência. Pelo fato do antiveneno não apresentar atividade direta sobre a preparação biológica, decorre a obrigatoriedade do veneno ser a referência para o antiveneno e para si próprio, uma vez que o parâmetro mensurado seja sempre sua atividade (Ferreira-Alves, 1988). A desconsideração deste fato já ocasionou no passado, a tentativa fracassada de estabelecimento de antiveneno-padrão para o gênero *Naja*, já mencionado na seção I.2.1.

A utilização de componentes puros dos venenos, como referência para a padronização de antivenenos, conhecida na literatura como sugestão de Niels Jerne e já posta em prática por

Kondo et al (1995b), tornaria o componente “veneno” mais simples do ponto de vista bioquímico e farmacológico, menos sujeito à variabilidade dentro e entre espécies do gênero, como também ao longo do tempo. Neste sistema, o problema da substituição de um padrão ou referência de veneno por um novo, estaria minimizado. Entretanto, a possibilidade de estabelecer um padrão de antiveneno contra o qual fossem aferidos outros lotes do mesmo antiveneno, por método biológico ou de imun química clássica, continuaria remota. O fato de que os antígenos obtidos do veneno, ainda que em estado de pureza apresentam vários determinantes antigênicos; que as misturas ditas antigênicas, mais propriamente imunogênicas, são complexas e correspondem a uma mistura de venenos para o gênero; que os lotes de antivenenos são formados por ajuntamento de plasmas de vários animais geneticamente distintos e que ao longo do tempo as misturas imunogênicas e os animais imunizados são substituídos; tornam improvável que o critério de similaridade (Critério A<sub>3</sub> de Jerne, 1949) possa ser satisfeito. Atualmente, caso utilizássemos como padrão de antiveneno, conjuntos de repertórios de anticorpos monoclonais, um para cada elemento ou toxina do veneno do gênero, obtidos da espécie da qual provem o plasma hiperimune e, identificados aqueles com atividade neutralizante, poder-se-ia através de ensaios de competição, determinar o teor dos anticorpos realmente importantes em quaisquer novas partidas de antiveneno. A exequibilidade desta idéia pode ser aquilatada no trabalho de Quesniaux et al (1990), o qual encontrou correspondência entre um repertório de anticorpos monoclonais para a ciclosporina e as populações de anticorpos presentes em antisoros de uma população de camundongos.

Em resumo, no veneno reside a atividade biológica e, portanto, deverá cumprir o papel de padrão funcional para todo o conjunto de efeitos farmacológicos, bioquímicos e lesivos característicos do gênero. Guarda também na composição e estrutura de suas proteínas, todo o

repertório imunogênico e antigênico, o que o credencia também como referência para o antiveneno.

### **I.5.3 – CRITÉRIO ZOOGEOGRÁFICO - EPIDEMIOLÓGICO - VENENOS DE REFERÊNCIA NACIONAL**

Vital Brasil (citado por Raw et al. 1991) foi pioneiro na proposição do critério zoológico epidemiológico, demonstrando as vantagens de um único antiveneno bothrópico, induzido pela hiperimunização do cavalo por mistura de venenos do gênero, extraídos de animais de várias procedências, onde a proporção de cada veneno dependia da prevalência de acidentes ofídicos causados por aquela espécie. O *Bothrops jararaca*, pela sua maior ubiquidade, como também por seu temperamento agressivo, causa a maioria dos acidentes, sendo portanto, o seu veneno utilizado em maior proporção. Pela mesma razão foi escolhido como veneno de referência para o gênero. O mesmo critério foi estendido ao gênero *Crotalus* pela grande extensão territorial que ocupa no Brasil, recaindo a escolha de veneno de referência, obviamente sobre o *Crotalus durissus terrificus*.

Na prática, todos os estudos posteriores que demonstraram a complexidade e variabilidade dos venenos ofídicos e o alto grau de reatividade imunológica cruzada (vide seções I.2.1 e I.2.2) vieram a apoiar o critério zoo-geográfico. De dez antivenenos bothrópicos monoespecíficos, estudados por Dias da Silva et al. (1989), cinco neutralizaram mais eficientemente a atividade letal sobre o camundongo, do veneno homólogo, e os outros cinco, de venenos heterólogos, confirmando o acerto do direcionamento imposto por Vital Brasil. Os procedimentos para a elaboração de referências para venenos ofídicos, aplicando o critério zoo-geográfico, foram estabelecidos internacionalmente pela OMS (WHO offset Publication nº 58, 1981, pág. 22) e

aplicados em 1987 pelo Instituto Butantã para a elaboração das primeiras Referências Nacionais, para *Bothrops* (Bra. Bot. 001) e para *Crotalus* (Bra. Crot. 001).

A discussão desta seção, como conduzida até aqui, permite-nos entender o critério zoológico-geográfico-epidemiológico como um método de padronização de substâncias complexas através de mistura não dirigida, ou seja, sem caracterização ou quantificação prévia de seus componentes. Com este procedimento logra-se diluir características individuais e concentrar características comuns à espécie e ao gênero em venenos de referência, misturas imunogênicas e lotes de antivenenos. Ao mesmo tempo, reduz a possibilidade que epitopos mais raramente representados nos venenos individuais não estejam ausentes nas misturas imunogênicas, e conseqüentemente, a ausência das imunoglobulinas idiotípicas no antiveneno. A desvantagem deste critério, de metodologia muito simples e pouco dispendiosa, é que fica muito mais difícil a substituição de uma Referência Nacional já esgotada por outra com as mesmas propriedades funcionais e antigênicas. O mesmo problema incide sobre o estabelecimento de Referências Secundárias, para uso interno nos Institutos Soroprodutores.

Não devemos, entretanto, julgar que o Critério Zoo-Geográfico-Epidemiológico seja somente uma estratégia de como obter grandes quantidades de veneno, ao mesmo tempo minimizando sua variabilidade, e garantindo representatividade antigênica e imunogênica. A questão epidemiológica, já mencionada, conjugada ao problema de identificação da espécie causadora do acidente, deixaria inevitavelmente limites de tolerância muito estreitos para o erro diagnóstico e implementação terapêutica, caso a opção fosse feita para antivenenos monoespecíficos. Os quatro antivenenos, anti-crotálico, anti-bothrópico, antibothrópico-crotálico (soro antiofídico) e anti-elapídico, produzidos inicialmente no Brasil pelo Instituto Butantã, permitiram de maneira adequada superar as dificuldades da identificação da serpente agressora, quer diretamente, quer pelo quadro clínico. Com a evolução da observação clínica e dos estudos

fisiopatológicos, bem como melhor treinamento e divulgação entre os médicos, da distinção entre o quadro do acidente crotálico e bothrópico, o assim denominado soro antiofídico tornou-se desnecessário.

O aparecimento de métodos imunoquímicos para o diagnóstico etiológico do acidente ofídico, isto é, o ELISA Bothrópico e ELISA Crotálico, não mudaram a situação, porque ainda não é possível distinguir com esse método, os diferentes venenos de espécies bothrópicas, e, a distinção bothrópico-crotálica é feita clinicamente.

#### **I.5.4 - CARACTERIZAÇÃO AMPLA DE VENENOS E ANTIVENENOS.**

O critério zoo-geográfico epidemiológico, tem sido aplicado no Brasil, até o presente momento, com a caracterização mínima aceitável para o veneno e o antiveneno, isto é, a potência em causar e prevenir a letalidade, respectivamente.

Na seção I.4.4, abordamos o que seria uma caracterização ampla de venenos e antivenenos, referindo-nos à campanha lançada em 1979 pela OMS através da CCCA, que afinal contempla as recomendações de muitos investigadores experientes no ramo. Infelizmente, não foi ainda implementada, ou melhor, incorporada à tarefa rotineira de padronização de venenos e antivenenos.

Como critério a ser incorporado à sistemática de padronização, a “Caracterização Ampla” é fundamental, pois baseia-se no conhecimento de todo o perfil bioquímico e farmacológico do veneno de um gênero. Como Referência, fica implícita a adoção do veneno bruto ou total, o que garante que interações químicas, bioquímicas e farmacológicas, entre os componentes, não sejam perdidas. Assim, a “Caracterização Ampla” é perfeitamente compatível com o modo como o critério zoo-geográfico-epidemiológico vem sendo implementado e, permite um aperfeiçoamento quanto ao preparo de referências de veneno e misturas imunogênicas. Este aperfeiçoamento consistiria na “Padronização de Substâncias Complexas Por Misturas Dirigidas” ou ‘BLENDING’, a exemplo do que já é praticado para o café, leite, vinhos e bebidas destiladas. Estas são substâncias complexas, cujos lotes são analisados individualmente, segundo vários parâmetros, e depois misturados em proporção adequada, para manter índices organolépticos ou químicos pré-estipulados ou tradicionais do produto final.

Esse processo embora mais trabalhoso do que a mistura não dirigida, seria perfeitamente aplicável à formulação dos venenos de referência, misturas imunogênicas e antivenenos no seu

produto final ou acabado. Evidentemente, o número de lotes anuais de venenos e antivenenos, deveria ser reduzido, e o seu tamanho aumentado, para compensar o dispêndio. Os ganhos decorreriam da continuidade ou menor variação de propriedades, entre subseqüentes lotes de antiveneno, ou, quando da substituição de uma referência de veneno.

Mesmo na ausência da mistura dirigida, a caracterização ampla traria maior segurança à soroterapia do envenenamento ofídico e permitiria troca e acúmulo de experiência médica mais confiável.

## **I.5.5 - SUMÁRIO: SISTEMÁTICA DE PADRONIZAÇÃO**

### **Quadro I.5.5A**

#### **FUNDAMENTOS DA PADRONIZAÇÃO DE VENENOS E ANTIVENENOS**

- A. Uniformização dos processos de obtenção dos venenos, formulação de Referências e misturas antigênicas;**
- B. Uniformização dos processos de produção do antiveneno;**
- C. Uniformização das metodologias experimentais para a caracterização e aferição das propriedades imunoquímicas e funcionais de venenos e antivenenos;**
- D. Os critérios adotados para A, B e C devem permitir o estabelecimento de uma “Sistemática de Padronização” que torne previsível a capacidade neutralizante dos atuais antivenenos para o gênero, sobre todas as atividades dos venenos de espécimes individuais, de todas as espécies daquele gênero, pertencentes à região zoo-geográfica.**

### **Quadro I.5.5B**

#### **SISTEMÁTICA DE PADRONIZAÇÃO**

**A<sub>1</sub> - Baseada em referência de veneno bruto.**

O veneno de Referência Nacional deverá cumprir o papel de padrão funcional para todo o conjunto de atividades farmacológicas, bioquímicas e lesivas, características do gênero, permitindo caracterização qualitativa e quantitativa de:

- Nova Referência Nacional para gênero
- Referências Secundárias para gênero ( padrões internos)
- Misturas Antigênicas para gênero
- Referências para Espécies
- Venenos de Espécimes Individuais

### Quadro I.5.5C

#### **SISTEMÁTICA DE PADRONIZAÇÃO**

**A<sub>2</sub> - Baseada em referência de veneno bruto.**

O veneno de Referência Nacional deverá cumprir a função de padrão imunogênico e antigênico, através de reações de soro-neutralização e/ ou de métodos imunoquímicos, para:

- Nova Referência Nacional para gênero
- Referências Secundárias para gênero (padrões internos)
- Misturas antigênicas para gênero
- Referências para espécies
- Venenos de espécimes individuais

### Quadro 1.5.5D

#### **SISTEMÁTICA DE PADRONIZAÇÃO**

**B - Baseada em Referências de componentes do veneno em estado puro. (Proposta de Jerne).**

A referência deverá cumprir as funções de padrão funcional, imunogênico e antigênico em todos os níveis para a classe de atividade (farmacológica, bioquímica ou lesiva) por ela representada.

## **II - OBJETIVOS GERAIS.**

Estudar a aplicabilidade dos critérios de validade do ensaio biológico ao problema da padronização biológica de venenos e antivenenos ofídicos, através da análise de dados de letalidade no camundongo, atividade hemorrágica em ratos e coagulação do fibrinogênio bovino *in vitro*.

- Verificar experimentalmente a exequibilidade do uso de padrões secundários e substituição de padrões.
- Investigar para venenos e antivenenos ofídicos, a aplicabilidade da “Lei dos Múltiplos de Proporção” na neutralização e seus aspectos imunquímicos (especialmente a concentração de antígeno e anticorpos utilizados).
- Desenvolver micrométodos adequados para o estudo funcional das proteínas do veneno.

## **III - ESTUDOS DE LETALIDADE DO VENENO E EFEITO PROTETOR DO ANTIVENENO, NO CAMUNDONGO.**

### **III.1 - INTRODUÇÃO**

#### **III.1.1 - USO TRADICIONAL DOS ENSAIOS DE LETALIDADE.**

A ocorrência do efeito letal de venenos ofídicos injetados em animais de experimentação, e o impedimento deste efeito pelo antiveneno, constitui a resposta biológica mais tradicionalmente usada no ensaio biológico destas substâncias.. As razões para tal podem remontar à crenças místicas, míticas ou a mera especulação filosófica sobre o papel das serpentes neste mundo, mas, mais provavelmente refletem a facilidade de observação e registro da resposta.

No final, do século passado e início deste, período onde surgiu a soroterapia do envenenamento ofídico, ensaios biológicos mais complexos que o de letalidade, destinados à rotina da soroprodução, seriam tão impraticáveis em São Paulo, quanto em Paris. Todavia, passada a época heróica, estabelecidos os quadros fisiopatológicos e clínicos, critérios de avaliação clínica e laboratoriais, procedimentos de soroimunoterapia e outros de suporte geral ao paciente envenenado, continua a mencionada resposta, ser a única utilizada no Brasil e outros países, na caracterização de venenos e antivenenos.

A injeção do veneno de *Crotalus durissus terrificus* no camundongo mata o animal por parada respiratória, decorrente do bloqueio neuromuscular pré e pós-sináptico (Vital Brasil, 1966, 1971; Chang & Lee, 1977; Bon et al. 1979). No caso humano, na vigência de inoculação de grande carga de veneno e ausência de atendimento médico, este mecanismo de morte torna-se possível, não correspondendo, entretanto, à realidade atual, onde a maioria dos pacientes recebe o antiveneno crotálico poucas horas após o acidente. Nesta situação, a rhabdomiólise é o principal problema clínico até o terceiro dia, mesmo na presença da soroterapia, podendo vir a ocasionar insuficiência renal aguda.

Para o gênero *Bothrops*, a disparidade entre o mecanismo de morte do camundongo e a fisiopatologia do acidente humano, ainda é maior porque cerca de 70% dos acidentados não morrem mesmo na ausência de tratamento. O camundongo tendo recebido dose letal de veneno bothrópico, morre em curto espaço de tempo, por insuficiência circulatória aguda, decorrente de vasodilatação periférica intensa, lesões vasculares pelas hemorragias, incoagulabilidade do sangue, perda de plasma para o interstício e embolismo pulmonar agudo. No paciente humano, geralmente picado nos membros inferiores: a dor, o edema, as lesões vasculares e hemorragias locais, seguidas de vasculite e trombose venosa, com possibilidade de completa estagnação circulatória, síndrome compartimental, necrose, gangrena e até mesmo necessidade amputação;

as lesões hemorrágicas sistêmicas e difusas e o desenvolvimento de síndrome inflamatória sistêmica por liberação de citocinas e fator de necrose tumoral, com possibilidade de necrose do córtex renal; são os principais problemas, mesmo não acontecendo choque cardiovascular intenso e duradouro.

A descrição fisiopatológica acima é, sem dúvida, sumária e sem intercalação de citações a cada afirmativa para não alongar o texto, pois o que se pretendeu foi explicitar o argumento e não substanciá-lo exaustivamente. As publicações no assunto com respeito à fisiopatologia do acidente ofídico causado por serpentes brasileiras são muito numerosas, cabendo aqui algumas citações para ilustração: Azevedo & Teixeira, 1938; Amorim & Mello, 1952; Rosenfeld, 1971; Amaral et al. 1985, 1986; Rezende et al. 1989; Azevedo-Marques et al. 1985, 1987; Cupo et al. 1988; Barraviera, 1990; Barraviera, 1989; Voronov et al. 1999).

O mesmo questionamento pode ser transposto para os viperíneos e elapíneos africanos e asiáticos. Segundo Reid e Theakston (1983), o principal problema clínico após o envenenamento por grandes elapídeos como as *Najas*, não está ligado à paralisia respiratória, sendo de todo semelhante aos crotalíneos. Certamente, o mesmo questionamento não pode ser estendido aos acidentes com *Micrurus* e *Bungarus* (Brasil & Fontana, 1983; Chang & Lee, 1963). Rememorando neste ponto, o assunto introduzido nas seções I.4.4 e I.5.5 que tratam de caracterização ampla de venenos e antivenenos, caberia a pergunta: por quais razões os venenos e antivenenos ofídicos continuam a ser caracterizados unicamente pelo ensaio de letalidade? A resposta mais frequentemente obtida em contatos pessoais durante congressos e simpósios do ramo é: “Não dispomos de instalações, equipamento, biotério, pessoal, material de consumo, e mesmo quantidade suficiente de venenos de referência para a caracterização ampla. Por outro lado, o mecanismo de ação letal dos venenos é a sua atividade biológica mais significativa e representativa de todo o conjunto de atividades”. Especulando sobre essa resposta, talvez

cheguemos à conclusão de que, o fato deste problema de saúde pública ser no Brasil, Ásia e África, um acidente de trabalho que acomete trabalhadores rurais, explique a primeira parte da resposta, isto é, as dificuldades materiais. A segunda parte da resposta indica um estado de resignação, para o qual, nossas concepções políticas, míticas, místicas e filosóficas tenham aplacado nossas consciências científicas.

### **III.1.2 - DOSE LETAL MEDIANA - PROBITOS**

A idéia de que fosse possível determinar a dose mínima letal (DML) de um tóxico, isto é, a dose justamente necessária para matar todos os animais de uma espécie, a partir da qual um pequeno decréscimo não mataria mais nenhum, prevaleceu durante os primórdios da toxicologia e toxinologia. Este parâmetro (DML) obtido com número muito pequeno de animais, em geral dois, ignorava a distribuição de tolerâncias individuais de um tóxico na população. Trevan (1927) em sua publicação clássica “The Error of Determination of Toxicity”, descreveu a distribuição estocástica das tolerâncias individuais para ocorrência de letalidade após administração de dose única de um tóxico, construindo as curvas de mortalidade-dose, a que denominou “curvas características”. Estas curvas, que correspondem à distribuições normais ou log-normias acumuladas, permitiram a definição do parâmetro “Dose Letal Mediana” (DL50), isto é, a dose que mata 50 % de um grupo de animais. Permitiram também, mesmo aqueles pouco informados em estatística, visualizar que o parâmetro DL50 ocorre na região central da curva, onde mais provavelmente se localiza a tolerância de um animal qualquer, tomado ao acaso de uma amostra e, que nesta região, a taxa de variação de letalidade em função da dose é máxima. O parâmetro DL50, sugerido por Trevam para exprimir quantitativamente a toxicidade aguda teve ampla aceitação, mas persistia a questão da não linearidade entre a letalidade e a dose, o que determinava o consumo de grande quantidade de animais para o esboço da curva característica.

A linearização da função de distribuição normal, por conversão das frequências relativas em valores de abscissa (número de desvios-padrão) já fora utilizada por Fechner (1860) para a análise da capacidade do ser humano em discriminar dois estímulos sensoriais, em função da diferença de intensidade entre eles. Gaddum (1933) aplicou a transformação de Fechner à análise dos dados de ensaios biológicos quantais, entre eles o de letalidade, propondo a transformação das percentagens de ocorrência em “Desvios Normais Equivalentes” (DNE) em relação ao ponto central. Bliss (1934a) a respeito da mesma transformação para linearização da curva normal acumulada, propôs a divisão do intervalo sob a curva, de 0,01 % a 99,99 % em unidades denominadas “Probitos” (unidades de probabilidade), 0,01 % correspondendo à probito 0, 50 % a 5 e 99,99 % à 10. Cinco meses depois este mesmo autor (Bliss, 1934b), após ler o artigo de Gaddum, corrigiu sua proposição inicial, aceitando o ponto referencial da escala de probitos, como proposto por Gaddum, isto é,  $DNE=0$ . O termo probito foi então definido como:  $Probito = DNE + 5$ . A partir deste ponto, muitos autores, o próprio C. I. Bliss, R. Fischer, J. O Irwin desenvolveram toda a teoria estatística, métodos computacionais e tabelas, para o uso do probito na análise de ensaios biológicos quantais. A partir de 1942, D. J. Finney começa estudar o método, fazendo também aperfeiçoamentos, o que resultou no desenvolvimento pleno do método, como o conhecemos de seu texto “Probit Analysis”, editado em 1947, 1952, 1962 e 1971.

Para um toxicologista experiente como Gerhard Zbinden (Zbinden, 1973) a determinação da DL50 é uma “execução ritual em massa de animais”, na maioria das vezes desnecessária. Este autor chama a atenção para o grande número de influências, de idade, sexo, peso, linhagem, manejo e ambientação dos animais, como da própria concentração, dose e velocidade de injeção das substâncias-teste, no valor numérico da DL50. Em toxicologia geral, o ensaio de toxicidade aguda, do qual a DL50 é o parâmetro expressado, visa apenas a classificação toxicológica da substância em uma escala quantitativa ampla. O consumo de grande contingente de animais e a

obtenção de valores precisos, não são, portanto, necessários. Outro aspecto, é que a DL 50 é um parâmetro que não tem *a priori*, qualquer significado mecanístico ou descritivo quanto ao modo de ação da droga. A injeção de doses escalonadas em grupos pequenos de animais, o registro de sinais de toxicidade, descrição anátomo-patológica das lesões, como também sua duração e reversibilidade, são dados descritivos de maior significado em toxicologia. Evidentemente, os questionamentos de Zbinden, também são válidos em toxicologia, e de fato os estudos de fisiopatologia e anátomo-patologia formam a base do estudo do mecanismo da ação lesiva das toxinas protéicas.

Para o controle biológico de venenos e antivenenos ofídicos, requer-se maior precisão e conseqüentemente, sacrifício de maior número de animais na determinação da DL50, o que é basicamente correto, pois a Farmacopéia estabelece limites de precisão para a potência antiletal do antiveneno. Em um editorial intitulado “To be or not to be ...the LD50”, Findlay Russell (Russell, 1966), um toxinologista experiente, editor do *Toxicon*, referiu-se a 24 métodos distintos para a determinação de 11 tipos de doses letais ainda incluindo a DML e outras de origem menos pretensiosa, mas não menos obscura, em 200 artigos submetidos na última década. Neste editorial, aponta como causa, a falta de familiaridade dos investigadores com a metodologia própria ao ensaio biológico, ao mesmo tempo em que apresenta um reclame do clássico artigo de Trevam (1927).

No Brasil, a determinação da DML no pombo, foi substituída pela DL50 como parâmetro de letalidade para o cálculo da potência do antiveneno em 1987, sessenta anos após Trevam, uma demonstração do poder da autoridade e dos valores afetivos em ciência.

## III.2- MATERIAIS E MÉTODOS

### III.2.1 - ANIMAIS E AMOSTRAGEM

Animais: camundongos albinos, CF1 (originariamente obtidos do Centro Pan-americano para Febre Aftosa - OPAS - OMS no início da década de 1980), de ambos os sexos, pesando entre 18 e 22 g, criados no Biotério da FUNED-MG.

Amostragem: o lote de animais, isto é, o conjunto de camundongos de um só sexo dentro da pesagem especificada, de tamanho suficiente para a execução do experimento planejado, era recebido do biotério e utilizado no mesmo dia.

Todo o lote era subdividido em classes de peso com intervalo de 1 grama, a partir das quais, por sorteio, os animais eram alocados nos diferentes grupos experimentais, com representação equitativa de cada classe, de modo a garantir uniformidade de peso médio: a atribuição de um tratamento ou dose a cada caixa contendo o grupo experimental, também era feita por sorteio.

### III.2.2 - VENENOS E ANTIVENENOS

Venenos Brutos FUNED: foram utilizados venenos brutos liofilizados, fornecidos pelo Serpentário da Fundação Ezequiel Dias e processados segundo as normas gerais da OMS (WHO offset pub 1981). Cada lote é caracterizado pelo nome da espécie e o número do lote, que corresponde à data de sua expedição, seguida do número de ordem do lote no ano. *Bothrops alternatus* : lote nº 88 03 25 01 (88=ano; 03= mês; 25=dia; 01=ordem).

Referência FUNED: idem, porém constituem lotes maiores, em cuja composição entraram número maior de venenos de espécimes individuais, abrangendo animais dos dois sexos, várias

idades e procedências. O lote, além de seu número é caracterizado por sua DL50 em µg/20g de camundongo. Observação: a partir de 1997, as referências FUNED para venenos, bem como as misturas imunogênicas, passaram a ser constituídas para durar pelo menos por um ano, e designadas: exemplo: VRF-B.j./99.

Referências Nacionais: as referências nacionais utilizadas neste estudo foram:

- a) Referência Nacional para *Bothrops*, constituído de mistura de venenos de *B. jararaca* de várias procedências no país e rotulado Bra/Bot/000 (número da referência);
- b) Referência Nacional para *Crotalus*, constituído de mistura de venenos crotamina-positivos de *C. d. terrificus* e rotulado Bra/Crot/000.

As referências nacionais são produzidas pelo Instituto Butantã, liofilizados em ampolas fechadas sob atmosfera de nitrogênio, sendo analisadas novamente pelo INCQS, quanto ao conteúdo protéico e potência letal (DL50).

Antivenenos: na grande maioria dos experimentos foi utilizado o produto final, envasado em ampolas que consiste predominantemente em um concentrado do fragmento F(ab)<sub>2</sub> de imunoglobulina G, obtido após digestão por pepsina, do plasma hiperimune do cavalo. O teor de proteína total é determinado pelo método do nitrogênio protéico ou MicroKjedahl. Todas as especificações do produto final devem atender atualmente à MS/SVS (Portaria nº 174, 1996), e anteriormente à Portaria 35, 1974, MS/SNMF, anexo IV. Exemplo: Soro Anticrotálico:

AC FUNED - 89 04 12 - 16 (89=ano; 04= mês; 12=dia; 16= nº de ordem)

Observação: em alguns experimentos, utilizou-se o antiveneno no estágio de plasmas combinados ou diafiltrados, sendo então o fato explicitado na apresentação dos resultados.

### III.2.3 - PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Curvas de letalidade: cinco grupos de 8 a 10 animais foram usados de rotina, sendo injetadas por via IP a solução de veneno dissolvido em salina isotônica em doses espaçadas geometricamente com fator 1,20 para *Bothrops* e 1,50 para *Crotalus*. A posição aproximada da DL50 e o coeficiente angular eram estimados em experimento piloto, com dois grupos de animais, de modo a permitir com maior probabilidade, a obtenção de dois pontos experimentais acima e dois abaixo da DL50. A letalidade era registrada 24 e 48 h após a injeção.

Ensaio de Proteção pelo Antiveneno: no procedimento  $\alpha$ , a curva de letalidade foi construída pela variação da dose do veneno, sendo a dose do antiveneno mantida fixa, em geral 1 ml, sem diluição. Este delineamento caiu em desuso e correspondia a uma adaptação do método de Vital Brasil (DML no pombo) para o camundongo.

Curva de Proteção pelo Antiveneno: corresponde ao delineamento  $\beta$ , onde a dose de veneno (desafio) é constante (5DLs50 pela portaria 174 MS/SVS, 1996), e a curva de proteção construída pela variação da dose do antiveneno em escala geométrica. O veneno era incubado previamente por 30 min a 37°C com o antiveneno diluído em salina, nas concentrações adequadas para permitir a injeção de volume constante a cada grupo de dose. Cinco grupos de 8 a 10 animais foram utilizados de rotina.

O número de sobreviventes foi verificado às 24 e 48 h após a injeção.

### **III.2.4 - ANÁLISE ESTATÍSTICA - MÉTODO DOS PROBITOS.**

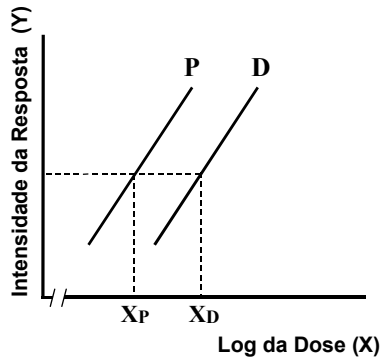
A frequência relativa ( $P_i$ ), número de mortos ou número de sobreviventes pelo número de animais em cada dose de veneno ou antiveneno constitui uma estimativa da probabilidade de ocorrência, ou seja, da área sob a curva de distribuição acumulada das tolerâncias individuais, de  $-\infty$  até a dose considerada. Esta frequência ( $P_i$ ) é transformada em probito, cuja relação com o log dose é linear. Como a relação entre  $P_i$  e probito ( $y$ ) não é linear, e a variância de  $P_i$  depende do próprio valor, ou posição da curva, a regressão entre  $y$  e  $x$  ( $x = \log$  dose) é ponderada pelo inverso da variância de  $P_i$ . Na prática, a regressão entre probito empírico e  $x$ , obtida inicialmente sem ponderação, fornece valores provisionais de probitos esperados e de coeficientes de ponderação que, iterativamente, convergem até a obtenção de uma linha de regressão (probitos calculado -  $\log$  dose), cuja soma dos quadrados dos desvios ( $X^2$ ) em relação aos probitos empíricos, seja mínima (Finney, 1971). A DL50 para a curva de letalidade, a ED50 (dose efetiva mediana) para a curva de proteção ou sobrevivência, são obtidas das equações de regressão e expressadas corriqueiramente com seus limites de fidelidade.

### **III.2.5 - CRITÉRIOS DE VALIDADE ESTATÍSTICA E CRITÉRIOS DE VALIDADE FUNDAMENTAL.**

Para as curvas de letalidade e de proteção, bem como outra regressão qualquer de variável quantal, os critérios de validade estatística e fundamental, quer dizer do próprio ensaio, confundem-se, e, são satisfeitos pela obtenção de regressão linear e de coeficiente angular significativo, a partir de amostras aleatoriamente tomadas de uma população. O desvio de linearidade, quando significativo, traduz heterogeneidade da distribuição de tolerâncias, invalidando o ensaio. Para os ensaios paralelos, devido à concomitância e igualdade de tratamento experimental dado aos grupos em comparação, a obtenção de paralelismo entre as

linhas de regressão é fundamental. Este critério ( $A_3$  de Jerne), conhecido como critério de similaridade, afirma que duas preparações, Padrão e Desconhecido, não podem ser consideradas farmacologicamente similares, apresentando coeficientes angulares distintos. Outro aspecto é, sendo as preparações Padrão e Desconhecido, constituídas da mesma substância ativa, a relação entre suas potências farmacológicas é dada por um número ( $R$ ), que decorre do quociente das concentrações desta substância. Na ausência de paralelismo, o valor de  $R$  depende do nível de dose ( $x$ ) e de resposta ( $y$ ) em que é feita a comparação, carecendo, pois, de significado físico. O diagrama abaixo, ilustra este critério. A fórmula para  $R$  é obtida da subtração das duas regressões lineares, e sua estimativa foi expressa com seus limites de fidedade segundo o teorema de Fieller (Finney, 1971).

**FIG. III.2.5 - Definição de Potência Relativa para Respostas Proporcionais ao Log da Dose**



**Log R = X<sub>P</sub> - X<sub>D</sub>**  
**para doses equipotentes, isto é:**

$$Y_P - Y_D = 0$$

$$\text{Log R} = \frac{\bar{Y}_P - \bar{Y}_D}{bc} + (X_P - X_D)$$

$\bar{Y}_P, \bar{Y}_D$  = valores médios para a resposta ao Padrão e Desconhecido  
 bc = coeficiente angular comum

As comparações dos coeficientes angulares foram feitas, para um par ou para múltiplas linhas de regressão, calculando a soma dos quadrados devido à regressão, considerando os diferentes coeficientes angulares e considerando um coeficiente angular médio comum.

$$\text{Regressão Comum} = \frac{[(Sxy)_1 + (Sxy)_2 + \dots + (Sxy)_n]^2}{(Sxx)_1 + (Sxx)_2 + \dots + (Sxx)_n}$$

$$\text{Desvio de Paralelismo} = \left[ \frac{(Sxy)_1^2 + (Sxy)_2^2 + \dots + (Sxy)_n^2}{(Sxx)_1 + (Sxx)_2 + \dots + (Sxx)_n} \right] - \text{Regressão} > X^2 \text{ g.l.}$$

### III.2.6 - OUTROS MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Regressão Linear Simples (Draper-Smith, 1966; Delaunois, 1973): os parâmetros da regressão da variável dependente ou variável estatística (y) na variável determinística (x), foram calculados utilizando os programas de regressão linear comuns às calculadoras eletrônicas.

Equações normais de regressão:

$$Y_i = \bar{y} + b(x_i - \bar{x})$$

$$a = \frac{\sum y_i}{n} - b \frac{\sum x_i}{n}$$

$$b = \frac{\frac{\sum x_i y_i - b \sum x_i \cdot \sum y_i}{n}}{\frac{\sum x_i^2 - (\sum x)^2}{n}} = \frac{S_{xy}}{S_{xx}}$$

Coeficiente de Correlação Linear (Pearson) e Coeficiente de Determinação:

A associação entre duas variáveis estatísticas y e x, foi avaliada pelo coeficiente de correlação linear, denominado coeficiente de Pearson:

$$r = \frac{\sum (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2} \cdot \sqrt{\sum (y_i - \bar{y})^2}} = \frac{S_{xy}}{\sqrt{S_{xx} \cdot S_{yy}}}$$

O coeficiente de terminação  $R = r^2$  corresponde à fração da variância total ( $S_{yy}$ ), que depende unicamente da regressão de y em x, ou seja, ao grau de ajuste entre o modelo proposto e a realidade observada.

Estimativa de valores de  $y_0$  e  $x_0$ :

A partir das equações de regressão e de correlação, calculou-se:

ordenada correspondente  $y_0 = (\bar{y} - b\bar{x}) + bx_0$  e,

abscissa correspondente  $x_0 = \frac{y_0 - \bar{y}}{b}$ , que foram utilizados na estimativa da relação entre equivalentes antigênicos de dois venenos de referência para um conjunto de antivenenos.

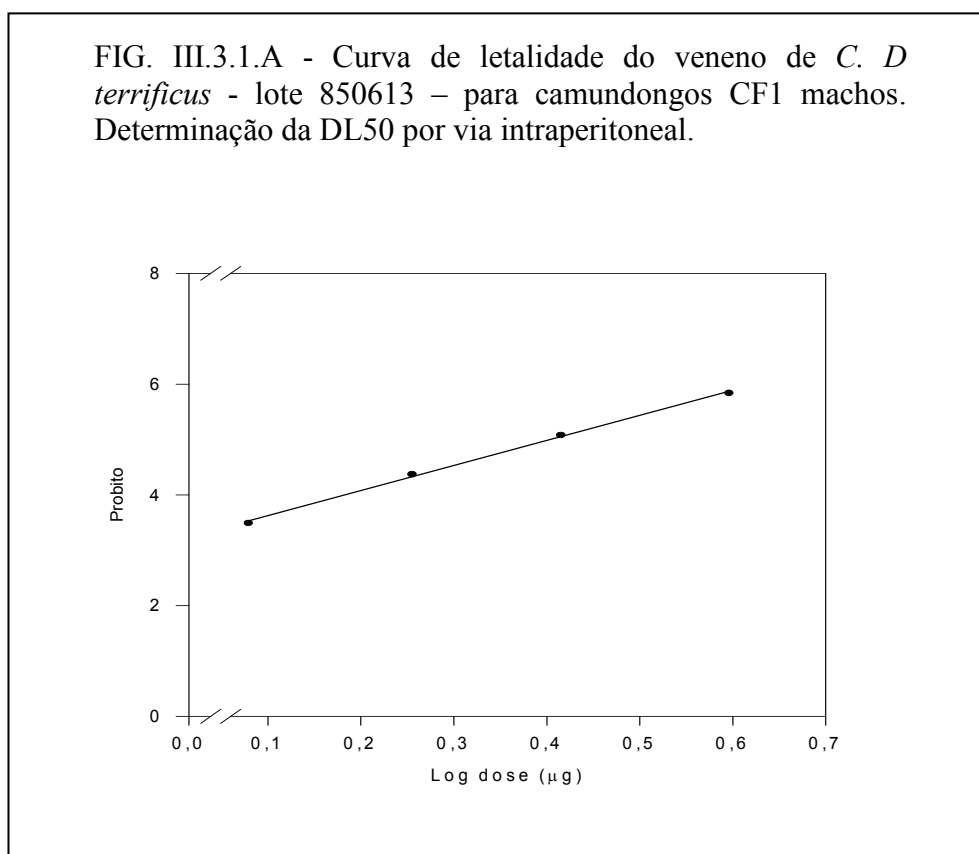
Média aritmética e seus limites de confiança:

$$P\left(-\frac{t\alpha}{2} < \frac{\bar{y} - \mu}{s} \sqrt{N} < \frac{t\alpha}{2}\right) = 1 - \alpha$$

### III.3 - RESULTADOS

Os experimentos relatados nesta seção foram realizados no Serviço de Controle Biológico de Qualidade, Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento e Divisão de Imunobiológicos da FUNED-MG, a partir de 1986, em associação com Célia de Fátima Barbosa, Raquel Joane Rodrigues, Thais Viana de Freitas, Eládio Florez Sanchez, Professor Carlos Ribeiro Diniz e David Toledo Velarde.

#### III.3.1 - CURVAS DE LETALIDADE.



Fonte de variação	G.L.	Soma dos Quadrados	X <sup>2</sup> Crít.
Regressão	1	16,62	3,84
Desvio de Linearidade	2	0,037	5,99
Total	3	16,657	

DL50 i.p. = 2,52 µg/20g de camundongo (2,07 – 3,08) p α 0,05

A figura III.3.1.A apresenta uma curva de letalidade, do veneno de *C. d. terrificus*, para o camundongo, por via intraperitoneal. Esse ensaio, de regressão altamente significativo, e desvio

de linearidade praticamente nulo, permite o cálculo da DL50, parâmetro esse que é utilizado para o cálculo da potência neutralizante do antiveneno, segundo a Portaria nº 174 MS/SVS, 1996. As curvas de letalidade para os venenos bothrópicos são em tudo análogas, exceto que o coeficiente angular Probit-log dose é em média três vezes superior. Este fato permite que 3 DLs50 de veneno bothrópico causem, seguramente, a morte de todos os animais na amostra, enquanto para o veneno crotálico 5DLs50 são necessárias. A citada Portaria, a Farmacopéia Brasileira e muitas outras preconizam 5 DLs50 indistintamente.

Com o intuito de estudar a aplicabilidade dos ensaios paralelos de letalidade à padronização de venenos, ou seja, verificar se diferentes lotes provenientes de uma mesma espécie preencheriam o requisito mínimo de similaridade farmacológica, comparou-se os coeficientes angulares obtidos no trabalho de rotina do serviço de controle biológico no período 1986-87 (Tabela III.3.1.A) e período 1995-99 (Tabela III.3.1.B). Os venenos de *C. d. terrificus* apresentaram maior uniformidade de coeficiente angular, não ocorrendo desvio de paralelismo significativo, nas duas comparações. Para os venenos de *B. jararaca*, a dispersão foi sempre maior, não podendo o paralelismo ser aceito na comparação do período 1995-99. Deve-se notar, que a variabilidade dos coeficientes angulares foi apreciável mesmo em repetições da curva de letalidade de um determinado veneno, em diferentes ocasiões, representadas nas figuras em diferentes linhas.

Mais sensível para detecção de desvio de paralelismo é o delineamento onde dois venenos são comparados simultaneamente sobre grupos experimentais retirados do mesmo lote de camundongos.

TAB. III.3.1.A - Comparação dos parâmetros das curvas de letalidade dos venenos de *B. jararaca* e *C. D. terrificus*, obtidas em camundongos CF1, 18 a 22 g, pela via intraperitoneal (período 1986-1987).

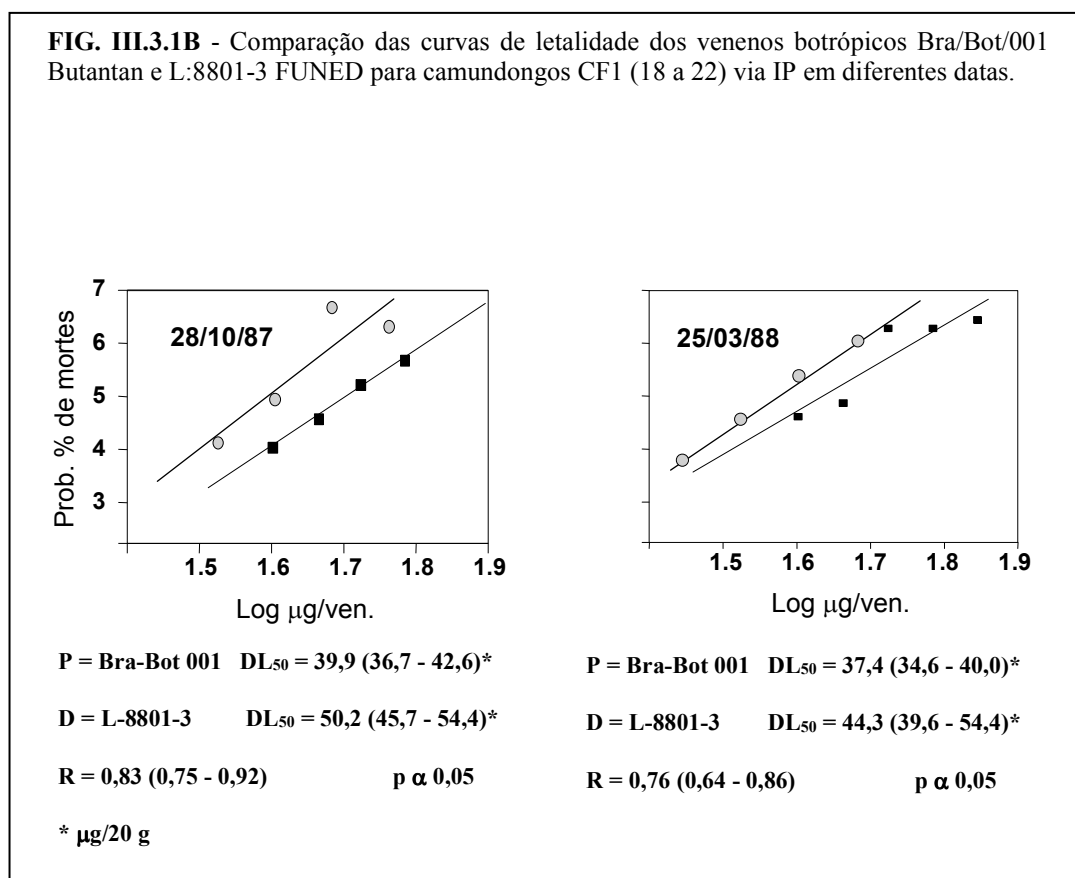
<b>B. jararaca</b>			<b>C. D. terrificus</b>		
<b>Lote</b>	<b>DL<sub>50</sub> µg/20 g</b>	<b>Coefficiente angular b</b>	<b>Lote</b>	<b>DL<sub>50</sub> µg/20g</b>	<b>Coefficiente angular b</b>
<b>87026</b>	53,3	16,1	300585A	2,0	3,6
	48,7	16,4			
	48	17,7			
<b>850801</b>	74,8	21,6	<b>010886</b>	1,9	5,9
	64,1	15,9			
	85,2	13,5			
<b>860710</b>	53,9	12,6	<b>860402</b>	1,7	4,3
	60,0	11,8		2,4	8,4
	60,2	13,1		1,5	3,9
<b>860401</b>	44,1	18,0	1,8	4,9	
	44,7	11,0	1,6	5,1	
	45,2	13,8			
	45,3	12,0			
<b>BRA-BOT 001</b>	41,7	16,0			
	38,6	9,4			
<b>X<sup>2</sup> Desvio de paralelismo = 9,8</b>			<b>X<sup>2</sup> Desvio de paralelismo = 9,8</b>		
<b>X<sup>2</sup> Crít. 14 g.l. p α 0,05 = 23,7</b>			<b>X<sup>2</sup> Crít. 6 g.l. p α 0,05 = 12,6</b>		

TAB. III.3.1.B - Comparação dos parâmetros das curvas de letalidade dos venenos de *B. jararaca* e *C. D. terrificus*, obtidas em camundongos CF1, 18 a 22 g, pela via intraperitoneal (período 1995-1999).

<i>B. jararaca</i>			<i>C. D. terrificus</i>		
Lote	DL <sub>50</sub> µg/20 g	Coeficiente angular b	Lote	DL <sub>50</sub> µg/20g	Coeficiente angular b
Bra/Bot/003	35,8	13,4	<b>Bra/Cot/001</b>	1,81	4,8
Bra/Bot/004	35,1	8,4	Bra/Cot/001	1,50	4,4
Bra/Bot/004	30,6	10,0	Bra/Cot/ 001	1,60	4,2
RF Bj 920105	68,1	15,6	RF Crot 931201	1,83	3,4
RF Bj 920105	75,2	12,4	VRF Crot 98	2,14	4,5
RF Bj 920105	60,7	15,7			
VRF Bj 97	54,5	6,7			
VRF Bj 97	55,0	11,0			
VRF Bj 97	42,1	6,9			
<b>M. Im. F. Bot 99</b>	59,0	8,3			
X <sup>2</sup> Desvio de paralelismo = 26,7			X <sup>2</sup> Desvio de paralelismo = 3,04		
X <sup>2</sup> Crít. 9 g.l. p α 0,05 = 16,92			X <sup>2</sup> Crít. 4 g.l. p α 0,05 = 9,50		

M. Im. F. Bot 99 – Mistura imunogênica Bothrópica FUNED para 1999.

A Referência Nacional para Bothrops (Bra/Bot/001) e a referência FUNED para Bothrops (L:8801-3) foram comparadas simultaneamente em duas ocasiões (Fig. III.3.1.B). Em ambas, o  $X^2$  obtido para desvio do paralelismo esteve abaixo de 0,1 % do valor crítico de 3,84 ( $p < 0,05$ , 1 g.l.), sendo a hipótese de paralelismo aceita com segurança, e relações de potência letal, universais e inequívocas matematicamente, foram calculadas. Para verificar se a similaridade de potência letal sobre o camundongo poderia também ser estendida para todo o rol de atividades biológicas comuns aos venenos bothróticos, os dados obtidos em colaboração com Sanchez et al. (1992), para o mesmo par de referências foram utilizados.



Dez atividades biológicas foram comparadas em termos do quociente das doses equi-efetivas dos dois venenos:

- DL50 ICV, onde a solução de veneno foi injetada na cisterna magna do camundongo;

- DL50 IV, idem na veia da cauda;
- DMH e DMN correspondem à dose mínima hemorrágica ( $\mu\text{g}/\text{lesão } 1 \text{ cm } \phi$ ) e dose mínima necrosante ( $\mu\text{g}/\text{lesão } 0,5 \text{ cm } \phi$ ), obtidas após injeção intradérmica do veneno no dorso de ratos (Kondo et al, 1960);
- DMC-F e DMC-P correspondem à concentração de veneno ( $\text{mg}/\text{L}$ ), que coagula uma solução de fibrinogênio bovino a  $2 \text{ g}/\text{L}$  em  $60 \text{ s}$  a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , ou plasma humano citratado-padrão nas mesmas condições (Theakston & Reid, 1983);
- DMD, determinada in vivo no camundongo, após injeção endovenosa como a mínima dose capaz de tornar o sangue total incoagulável, por defibrinogenação, após  $60 \text{ min}$  (Theakston & Reid, 1983);
- DMP, ou dose mínima proteolítica medida sobre a caseína (Kunitz, 1946) e definida como a concentração de veneno capaz de fazer uma alteração de  $0,5\text{UA } 280\text{nm}$  em solução de caseína a  $1 \%$  em Tris-HCl  $0,05 \text{ M}$  pH8,0;
- DEd30 %, ou dose edematogênica capaz de aumentar o peso da pata traseira do camundongo em  $30 \%$  em relação à pata controle contralateral.

O exame dos quocientes das doses equi-efetivas (Tab. III.3.1.C) mostrou ampla variação, ao invés de uma relação constante, esperada caso os dois venenos se comportassem como diluição um do outro.

Analogamente, dois venenos de *C. d. terrificus*, um crotamina-positivo segundo a técnica de Schemberg (1959) {DL50  $2,02 (1,80 - 2,27)\mu\text{g}/20\text{g}$ ,  $b = 8,30 \pm 3,7$ , FUNED s/n} e outro crotamina-negativo { DL50  $2,58(2,15 - 3,12)\mu\text{g}/20\text{g}$ ,  $b = 5,15 \pm 2,8$ , FUNED 850613} foram comparados durante o mesmo ensaio, não se obtendo desvio significativo de paralelismo ( $p < 0,05$ ). Embora esta seja uma diferença bioquímica bem estabelecida para os venenos crotálicos, o ensaio de letalidade apenas mostrou um coeficiente angular um pouco mais alto para

o veneno crotamina-positivo. Compilando os dados de Sanchez et al (1992) para 5 venenos de *C. d. terrificus*, segundo as dez atividades já mencionadas, verificamos que estes apresentaram variações de até 8 vezes nas DMC - F e 3,8 vezes nas DMC-P.

**TAB. III.3.1.C** - Relações entre as doses efetivas para 10 atividades biológicas da Referência Nacional Bra/Bot/001 Butantan (*B. jararaca*) e a Referência Interna FUNED L: 8801-3 (*B. jararaca*)

<b>Atividade Biológica</b>	<b>R</b>
<b>DL50 ICV</b>	<b>0,96</b>
<b>DL50 IV</b>	<b>1,47</b>
<b>DL50 IP</b>	<b>0,81</b>
<b>DMD</b>	<b>1,26</b>
<b>DMC-P</b>	<b>0,33</b>
<b>DMC-F</b>	<b>0,66</b>
<b>DMP</b>	<b>1,15</b>
<b>DMH</b>	<b>1,13</b>
<b>D. Edema 30%</b>	<b>1,53</b>
<b>DMN</b>	<b>0,99</b>

$$R = \frac{\text{DE Bra/Bot/001 Butantan}}{\text{DE L:880-3 FUNED}}$$

### **III.3.2 - ALTERAÇÃO DA CURVA DE LETALIDADE PELO ANTIVENENO - PROCEDIMENTO $\alpha$**

O delineamento experimental denominado  $\alpha$  consiste na comparação das curvas de letalidade do veneno na ausência e na presença de dose fixa de antiveneno. Este método, já em desuso, visava a obtenção direta da potência neutralizante do antiveneno por ml, sem diluição. A Tabela III.3.2. exemplifica alguns resultados obtidos para *C. d. terrificus* e *B. jararaca*. Observa-se, além do aumento da DL50 um grande aumento do coeficiente angular das curvas de letalidade, particularmente para o veneno crotálico. A noção de que a DL50 na presença de 1 ml

de antiveneno, pudesse ser comparada à DL50 do veneno puro para o cálculo da potência neutralizante, não levava em conta o fato de que a níveis mais altos ou mais baixos de letalidade, o valor calculado diferiria apreciavelmente.

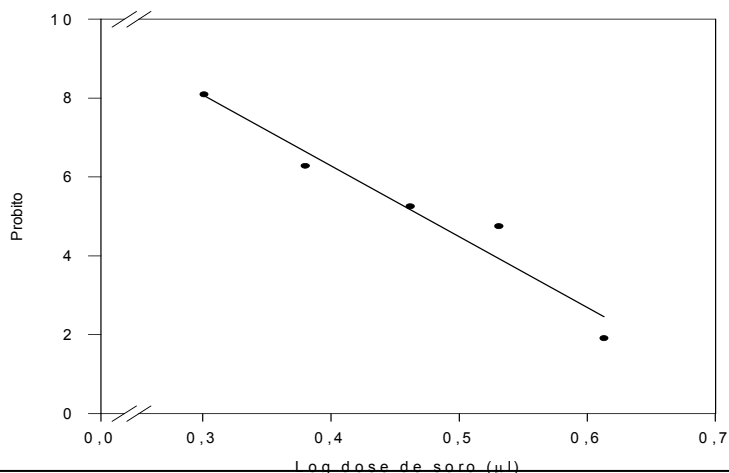
**FIG. III.3.2** - Atividade neutralizante do antiveneno crotálico pelo procedimento  $\alpha$  - camundongos CF1 de 18 a 22 g.

<i>C. d. terrificus</i>	Veneno	Ven . + 1 ml AC
via IV		
DL <sub>50</sub> : $\mu$ g/20g	2,3 (2,0-2,4)	1660
b (probito /log $\mu$ g ven .)	17,1	102,4
via IV		
DL <sub>50</sub> : $\mu$ g/20g	2,0 (1,5-2,6)	1720
b (probito /log $\mu$ g ven .)	3,6	104,3
<i>B. jararaca</i>	Veneno	Ven . + 1 ml AB
via IV		
DL <sub>50</sub> : $\mu$ /g20g	47,4 (43-53)	2520
b (probito /log $\mu$ g ven .)	12,1	26,1

### III.3.3 - CURVAS DE PROTEÇÃO (PROCEDIMENTO $\beta$ ) - COMPARAÇÃO ENTRE CURVAS DE PROTEÇÃO PARA DIFERENTES ANTIVENENOS CROTÁLICOS E BOTHRÓPICOS.

A figura III.3.3.A exemplifica uma curva de proteção contra o efeito letal de 5DLs50 (desafio) de veneno ofídico, pré-incubado com antiveneno em concentrações crescentes (procedimento  $\beta$ ). O encontro de regressão significativa e ausência de desvio significativo de linearidade validam o ensaio, permitindo o cálculo de uma dose efetiva mediana (DE50), usada pelas Instituições soroprodutoras para o cálculo da potência neutralizante do antiveneno, em mg de veneno neutralizado por ml de antiveneno.

**FIG. III.3.3A - Soroneutralização “in vitro” de 5DL<sub>50</sub> do veneno de *C. D. terrificus* (Ref. Nacional Bra/Cot – 001) pelo soro AC 891214-77 (FUNED). Determinação da ED<sub>50</sub> por via intraperitoneal, camundongos CF1 machos.**



Fonte de variação	G.L.	Soma dos Quadrados	X <sup>2</sup> Crít.
Regressão	1	19,96	3,84
Desvio de Linearidade	3	1,26	7,81
Total	4	21,22	

DE<sub>50</sub> = 3,08 µl (2,82 – 3,37) p α 0,05

A DE<sub>50</sub> tem nesse trabalho o significado corriqueiro, de que é a dose de antiveneno que protege 50 % dos animais de uma dose plenamente letal do veneno. A interpretação de que o veneno restante, não neutralizado, é equivalente a uma DL<sub>50</sub>, pretendemos disputar mais adiante.

Com o propósito de verificar a exequibilidade de um antiveneno de referência para *Bothrops* e *Crotalus*, foram inspecionados os coeficientes angulares das curvas de proteção realizadas na FUNED, nas três fases da produção do antiveneno: 1º Plasmas combinados; 2º Diafiltrado (concentrado de imunoglobulinas após digestão péptica do plasma, separação por precipitação com sulfato de amônio e eliminação do sal por diafiltração); 3º Produto acabado (solução estéril, apirogênica e submetida a todos os controles químicos e biológicos (Portaria nº 174, 1996 MS/SVS e Portaria nº 35, 1974 MS/SNFMF, anexo III).

**TAB. III.3.3A** - Comparação dos coeficientes angulares das curvas de proteção do antiveneno bothrópico contra 3 DL<sub>50</sub> de veneno de *B. jararaca*, em 3 etapas do processamento do plasma hiperimune do cavalo.

Lote	Plasmas	Diafiltrado	Produto Acabado
AB 861119-70	7,0	12,3	8,3
AB 861201-74	12,9	8,1	8,3
AB 861203-75	5,8	4,8	5,3
AB 870112-03	11,7	13,4	
AB 870204-10	6,8	6,3	8,0
AB 870318-21	7,3	5,3	8,3
AB 870128-07	15,0	9,3	11,1
AB 870313-19	10,7	5,6	8,0
AB 870408-27	11,0	10,5	20,5
AB 870316-20		6,6	
AB 861117-69			14,5
AB 870313-19PA			5,2
AB 870114-04			9,1
Desvio de Paralelismo p α 0,05	X <sup>2</sup> = 14,7 X <sup>2</sup> crit = 15,5	X <sup>2</sup> = 20,6 X <sup>2</sup> crit = 16,9	X <sup>2</sup> = 39,7 X <sup>2</sup> crit = 18,3
<b>b ± s</b>	<b>9,8 ± 4,87, 8 ± 3,79, 7 ± 4,4</b>		

**TAB. III.3.3.B** – Comparação dos coeficientes angulares das curvas de proteção aos venenos (5 DL<sub>50</sub>) de *B. jararaca* e *C. d. terrificus* pelos respectivos antivenenos, em três etapas do processamento do plasma hiperimune do cavalo.

DATA	TIPO	Especificidade	Nº de Lotes	X <sup>2</sup> desvio de paralelismo	X <sup>2</sup> crít. p α 0,05
1988	Plasmas combinados	Anti-bothrópico	26	105,9*	37,7
	Diafiltrados		27	102,7*	38,9
	Produto acabado		13	14,5	21,0
1988	Plasmas combinados	Anti-crotálico	29	50,0*	41,3
	Diafiltrados		25	21,0	36,4
	Produto acabado		11	18,9*	18,3
1989	Plasmas combinados	Anti-bothrópico	30	80,0*	42,6
	Diafiltrados		35	67,7*	48,6
	Produto acabado		25	46,6*	35,2
1989	Plasmas combinados	Anti-crotálico	29	84,1*	41,3
	Diafiltrados		42	100,9*	61,0
	Produto acabado		05	13,7*	9,5

\* - denota desvio de paralelismo significativo

As curvas de proteção dos plasmas combinados e diafiltrados são realizadas contra desafio de veneno de referência FUNED, enquanto o produto acabado é aferido em relação à referência nacional vigente. Vê-se pela análise das Tabelas III.3.3.A e B, que de 1986 a 1989 a admissão estatística de uniformidade de coeficientes angulares nos vários conjuntos de lotes de antivenenos comparados, foi possível em apenas dois dos quinze. O significado da admissão de paralelismo ou uniformidade de coeficientes angulares para um conjunto de curvas de proteção, é que estas admitiriam um coeficiente angular médio comum, sem elevação significativa da soma dos quadrados dos desvios ao longo das linhas de regressão. Caso dispuséssemos de uma referência nacional para quaisquer dos antivenenos, seria pouco provável que o coeficiente angular de sua curva de proteção estivesse próximo à média dos coeficientes angulares em um determinado conjunto de lotes de antivenenos. Nesta situação, grande parte dos lotes de antivenenos seria rejeitada por não satisfazer o critério de similaridade. As causas para a variação do coeficiente angular das curvas de proteção de um mesmo lote de antiveneno, em experimentos realizados em

diferentes datas contra o mesmo padrão de veneno, incluem variações sazonais das tolerâncias do camundongo ao veneno, diferenças de nutrição, higiene e manejo que possam ocorrer durante o ano, superpostas à sempre presente, variação amostral. O ensaio paralelo apresentado na Tabela III.3.3.C, onde grupos experimentais amostrados do mesmo lote de camundongos, recebendo o desafio do mesmo veneno, e, onde os desconhecidos foram diluições do padrão simulado, demonstra que a variação amostral pode ser controlada e os resultados esperados, obtidos. Em duas repetições deste tipo de experimento, uma com outro antiveneno bothrópico, e outra com antiveneno crotálico, obtiveram-se limites de confiança para as relações de potência que incluíram o valor real.

Três antivenenos FUNED, o AB-960703-33, o AB-960422-15 e o AB-960708-34 foram submetidos a uma segunda determinação de atividade protetora, contra a mesma referência de veneno (Bra/Bot/004), três anos após a determinação inicial. Comparando-se os coeficientes angulares das curvas de proteção entre a primeira e segunda determinações, encontrou-se somente para o AB-960422-15, um desvio de paralelismo no limite da significância a nível de  $\alpha$  0,05. Embora o número deste tipo de comparações seja pequeno, a evidência é de que a grande variabilidade dos coeficientes angulares das curvas de proteção de antivenenos decorra de diferenças qualitativas entre eles.

**TAB.III 3.3C** - Ensaio biológico simulado de antiveneno bothrópico - Procedimento  $\beta$

Desafio: 3 DL<sub>50</sub> - *B. jararaca* (L: pool )  
 Camundongos: CF1 - 18 a 22 g - 12/dose  
 Via de inoculação: Intraperitoneal , após incubação da mistura veneno/ antiveneno a 37 ° C por 30 min., 0,5 mL  
 Preparações: A = Soro AB 851106-33 (padrão simulado)  
 B = Soro AB 851106-33 (desconhecido I)  
 C = Soro AB 851106-33 (desconhecido II dil. 1:1)

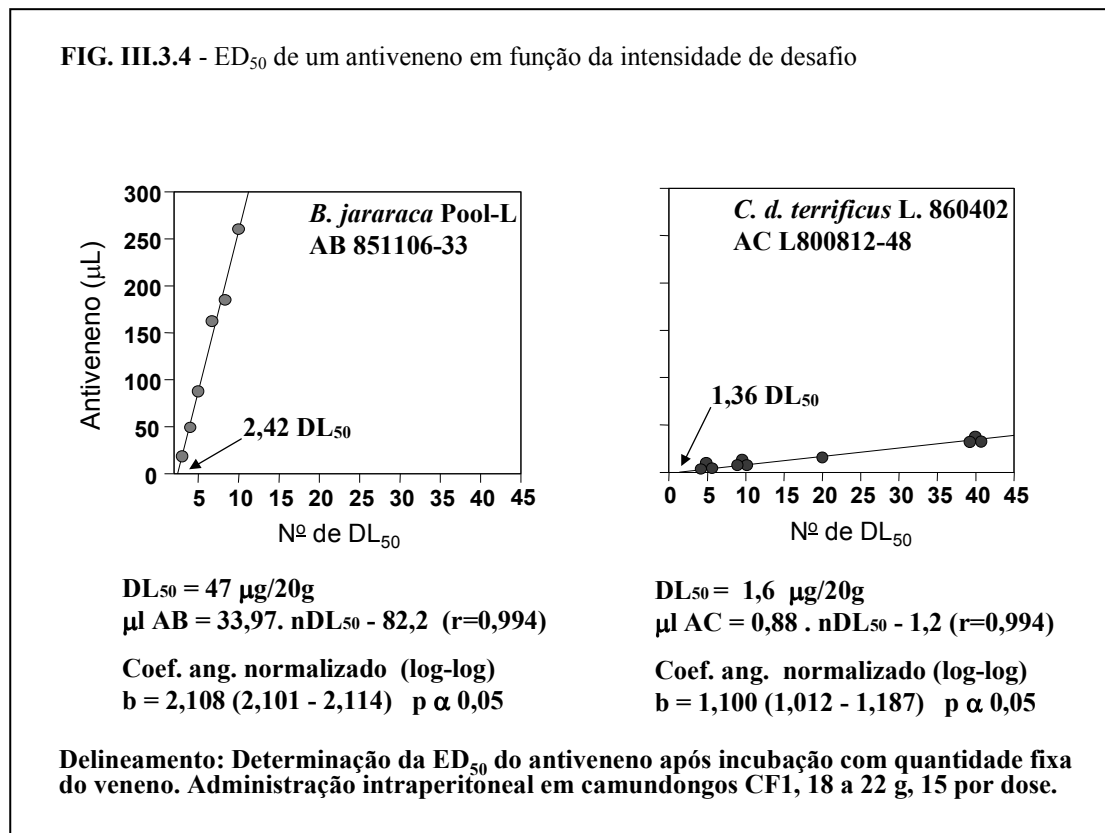
A		B		C	
$\mu$ L	% mortos	$\mu$ L	% mortos	$\mu$ L	% mortos
35	0,0	35	7,7	70	0,0
29	7,7	29	7,7	58	0,0
24	38,5	24	30,8	48	0,0
20	61,5	20	61,5	40	7,7
16	84,6	16	69,2	32	69,2

**Análise de Variância**

Fonte de Variação	G.L.	X <sup>2</sup>	X <sup>2</sup> crítico p $\alpha$ 0,05
Regressão	1	31,66	3,84
Desvio de paralelismo	7	3,60	5,99
Desvio de linearidade		1,91	14,10

Relações de Potência	Limites de Confiança
B/A	0,85 - 1,16
C/A	0,49 - 0,74

### III.3.4 - RELAÇÃO ENTRE ED<sub>50</sub> E DESAFIO - LEI DO MÚLTIPLOS DE PROPORÇÃO - EQUIVALENTES ANTIGÊNICOS.



A “Lei dos Múltiplos de Proporção”, comentada por Jerne (1951), afirma para um antisoro ávido, que se a quantidade  $y$  de soro neutraliza  $x$  de antígeno, então  $2y$  neutralizariam  $2x$ , e assim por diante. A Figura III.3.4., sumariza experimentos onde a relação entre o desafio ( $n^o$  de DLs50 do veneno) e a DE50 do antiveneno foram estabelecidas para *B. jararaca* e *C. d. terrificus*, dentro de limites de exequibilidade do experimento decorrentes do volume a ser injetado. A situação é distinta daquela apresentada por Jerne para o soro anti-diftérico e toxina diftérica, em que o ponto de titulação, a DE50, por razões já discutidas no seção III.1.2., fica bastante aquém da neutralização total, que ocorreria na DE100. Outra diferença é que a curva de letalidade, geralmente inicia-se após doses de veneno bastante significativas em relação à DL50 (vide Figura III.3.1A), isto é, a tolerância natural do camundongo é alta. Estas duas diferenças somadas correspondem a uma quantidade de veneno constante  $x_0$ , tal que  $y = a + b(x_i - x_0)$ . De

modo que para  $y = 0$ ,  $x_i =$  intersecção com a abscissa será dada por  $a/b + x_0$ . Neste ponto, o parâmetro  $a/b$  é determinado somente pela diferença  $x_i - x_0$ , que tende a zero quando  $x_0$  se aproxima de zero. Portanto, a intersecção com a abscissa é o estimador de  $x_0$ . Voltando à Tabela III.3.4.A, verificou-se um ajuste linear muito exato para a relação desafio - DE50 tanto para *Bothrops* quanto *Crotalus*. O coeficiente angular normalizado (log - log) mede a taxa de crescimento relativo entre as grandezas de ordenada e abscissa, sendo esperado valor unitário caso o sistema antígeno-anticorpo obedeça a lei dos múltiplos de proporção. Observou-se que veneno de *C. d. terrificus* e o AC se aproximaram desta situação, enquanto a quantidade de AB duplicou com o incremento unitário da concentração do veneno de *B. jararaca*.

A equação da reta nº DLs50 de veneno (desafio) -  $\mu$ l antiveneno é portanto uma estimativa inequívoca da potência neutralizante do antiveneno, dentro dos limites experimentais da função, isto é, as concentrações de antígeno e anticorpo utilizadas. Dentre destes limites, podemos utilizar esta equação para calcular o que denominamos “Equivalentes Antigênicos” entre dois venenos em relação a um mesmo antiveneno. As quantidades de I) Bra/Bot/001 e II) B.j.L:8801-3 FUNED, neutralizadas por 15  $\mu$ l de dois antivenenos bothrópicos, ou seja, seus equivalentes antigênicos, estão apresentados na Tabela III.3.4. O AB:880229-10 distinguiu perfeitamente os dois venenos (antígenos) tanto em massa (I/II = 1,28), quanto em nº de DLs50 (I/II = 1,64). Já o AB:880307-12 forneceu equivalentes antigênicos em massa praticamente iguais (I/II = 1,04), enquanto diferenciou-os em nº de DL50 (I/II = 1,33). Nessa mesma Tabela, as comparações em sentido vertical permitiram verificar que a partir do Bra/Bot/001 como antígeno, seria atribuída diferença de capacidade neutralizante aos dois antivenenos, enquanto a partir do B.j.L:8801-3 estes seriam praticamente equipotentes. A relação observada entre a DL50 e o equivalente antigênico, foi que o veneno de DL50 mais alta apresentou os menores. Não foram feitas observações nesse sentido para os venenos de *C. d. terrificus* e o AC.

**TAB. III.3.4** - Equivalentes antigênicos do Bra/Bot/001 e L:8801-3 FUNED para 15 µL de dois antivenenos bothrópicos

Veneno Antiveneno	Bra/ Bot/ 001		L:8801-3	
	DL <sub>50</sub> 37,4 µg/20g		DL <sub>50</sub> 48,0 µg/20g	
	5 DL <sub>50</sub>	10 DL <sub>50</sub>	5 DL <sub>50</sub>	10 DL <sub>50</sub>
<b>AB 880229-10</b>				
<b>ED<sub>50</sub> (µL)</b>	3,8 (2,9 - 4,6)	15,5 (14,3 - 16,7)	10,6 (9,8 - 11,7)	33,3 (28,9 - 38,1)
<b>Eq n° DLs 50</b>	9,78		5,97	
<b>µg ven.</b>	366		286	
<b>AB 880307-12</b>				
<b>ED<sub>50</sub> (µL)</b>	4,5 (4,2 - 4,8)	20,6 (18,3 - 29,5)	9,7 (8,5 - 11,0)	31,7 (29,9 - 33,6)
<b>Eq n° DLs 50</b>	8,26		6,20	
<b>µg ven.</b>	309		298	

### III.3.5 - RELAÇÃO ENTRE AS DL<sub>50</sub> DE VENENOS DE ESPÉCIES BOTHRÓPICAS E OS SEUS EQUIVALENTES ANTIGÊNICOS FRENTE A UM ANTIVENENO BOTRÓPICO.

Para os cinco primeiros venenos listados na Tabela III.3.5., foram realizadas duas curvas de proteção, uma a nível de 5DL<sub>50</sub> de desafio e outra a 10DL<sub>50</sub>, frente a um único antiveneno, e as respectivas DE<sub>50</sub> calculadas. A partir da relação DE<sub>50</sub> (µLAB) - Desafio, foram obtidos os equivalentes antigênicos para neutralização de 100 µl de AB. Para os venenos de *B. moojeni* e *B. atrox*, o experimento a nível de 10DL<sub>50</sub> de desafio mostrou-se impraticável no camundongo, devido o volume de antiveneno demandar vários mililitros, sendo os equivalentes mostrados na Tabela III.3.5 obtidos por extrapolação através da equação apresentada na Figura III.3.5. Observou-se uma relação inversa e significativa ( $r=0,748$ ) entre os valores das DL<sub>50</sub> em µg de veneno, e os equivalentes antigênicos em n° de DL<sub>50</sub>. A relação das DL<sub>50</sub> dos diferentes

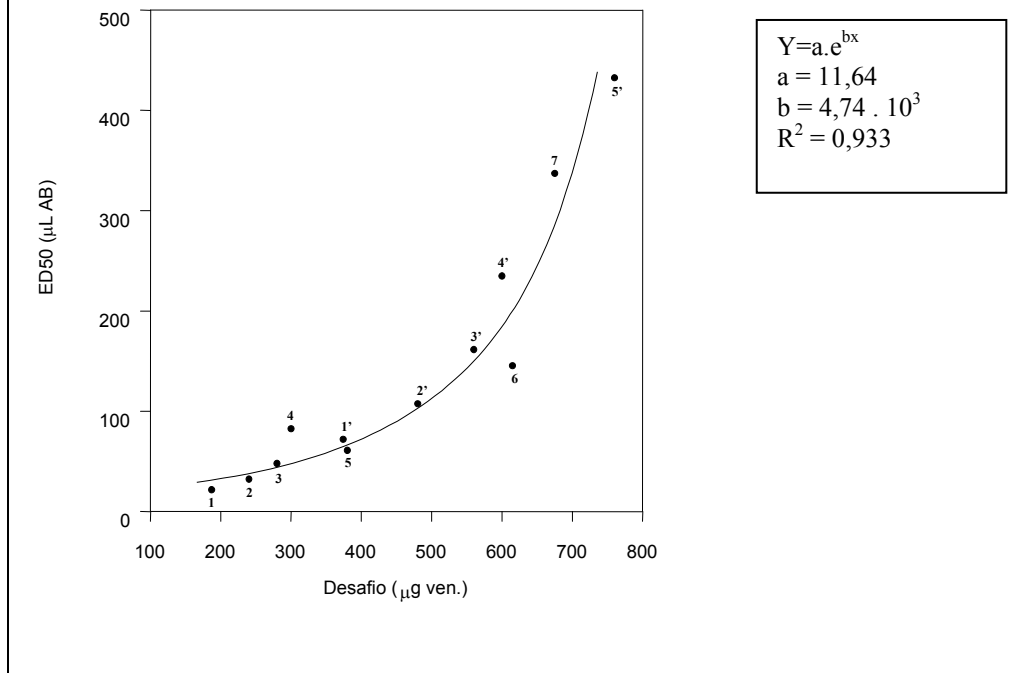
venenos, com os equivalentes antigênicos expressos em massa de veneno, mostrou-se bifásica, devido à variação concomitante da DL50 e do coeficiente angular da relação DE50 - Desafio.

**TAB.III.3.5** - Equivalentes antigênicos de alguns venenos bothrópicos em relação ao antiveneno AB 870914-576 FUNED

Nº	Veneno Lote	DL <sub>50</sub> µg/20g lim. p α 0,05	Equivalentes p/ 100µL AB	
			nº DL <sub>50</sub>	µg ven.
1	<i>Bra-Bot</i> 001	37,4 (35 - 40)	12,8	478
2	<i>B. jararaca</i> 180486	48 (44 - 52)	9,5	456
3	<i>B. neuwiedi</i> 100486	56 (50 - 55)	7,3	408
4	<i>B. alternatus</i> 080486	60 (50 - 70)	5,6	334
5	<i>B. jararacussu</i> 160186	76 (66 - 87)	5,5	420
6	<i>B. moojeni</i> 051186	123 (117 - 134)	~ 4,9	~ 608
7	<i>B. atrox</i>	135 (123 - 149)	~ 4,8	~ 651

Os resultados apresentados na seção III.3.4, mostraram que a DE50 de um antiveneno é uma função linear da quantidade do veneno utilizado como desafio. No experimento agora em questão, sete diferentes venenos bothrópicos foram usados em dois níveis de desafio. A proporcionalidade entre DE50 e Desafio persistiu ainda, porém mostrando uma relação mais complexa (Figura III.3.5.). O consumo de antiveneno mostrou depender exponencialmente da concentração do antiveneno com taxas de variação  $bx$ , que foram de 0,89 a 3,2. A taxa média de variação, 2,04, foi bastante próxima daquela obtida para a relação DE50 do AB851106-33 - Desafio de *B. jararaca* Pool 1, mostrada na Figura III.3.4.

**FIG. III.3.5** – Relação entre a DE50 do antiveneno AB 870914-576 FUNED e o desafio, para sete venenos bothrópicos.



n = nº do veneno na tabela III.3.4, 5 DL50

n' = nº do veneno na tabela III.3.4, 10 DL50

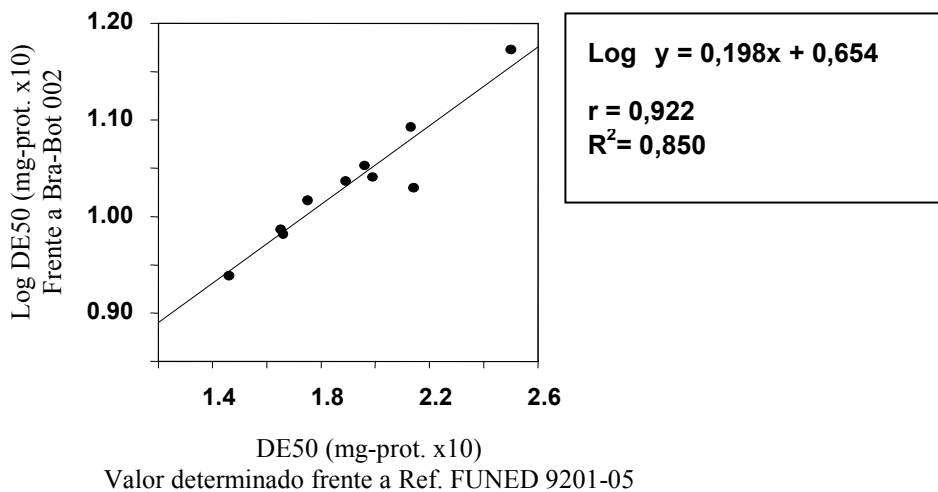
### III.3.6 - SUBSTITUIÇÃO DE VENENOS DE REFERÊNCIA - USO DE REFERÊNCIAS INTERNAS.

Os venenos de Referência Nacional, particularmente o bothrópico, têm seu uso restrito aos ensaios do produto acabado dos antivenenos, que devem atender às especificações legais, junto ao INCQS. Para a avaliação nas etapas intermediárias de produção, são empregados os venenos de Referência Internos. Apesar das referências serem preparadas a partir de grande número de espécimes de procedências diversificadas dentro da circunscrição zoogeográfica, constatam-se diferenças nos seus perfis de atividade biológica (vide Tabela III.1.3C). Como consequência, são verificadas diferenças significativas nos valores da DE50 de um mesmo antiveneno, quando se empregam diferentes venenos de referência (vide Tabela III.3.4). O uso de

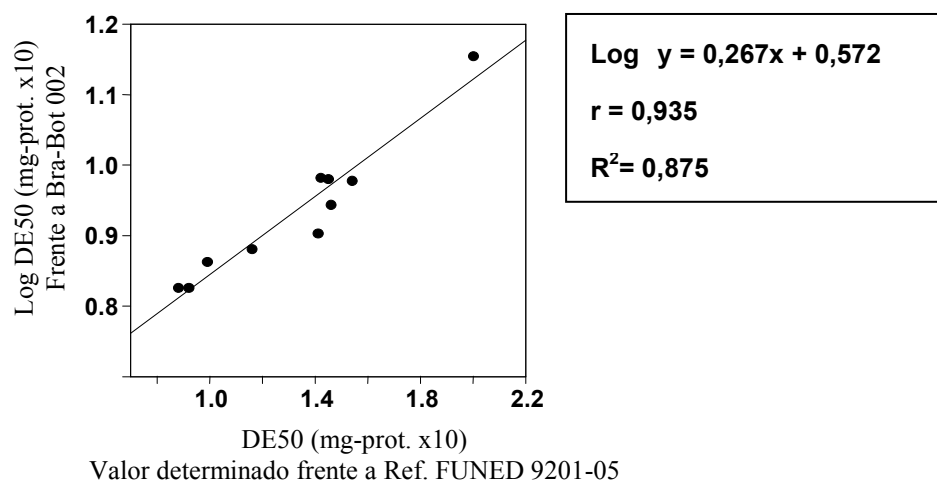
quantidades letalmente equipotentes de dois venenos no desafio, não garante a equivalência antigênica, ou seja, neutralização pela mesma quantidade antiveneno. Em outras palavras, a DL50 tem utilidade como módulo de toxicidade aguda para o delineamento correto das curvas de proteção, mas em si, não é um módulo de antigenicidade, embora guarde relação com este. O estabelecimento da equivalência antigênica entre dois venenos de referência, é um requisito fundamental, quando da substituição ou, uso concomitante de duas referências. Não dispondo no trabalho rotineiro na FUNED de pelo menos duas DE50, para cada lote de antiveneno, determinadas em dois níveis de desafio do mesmo veneno, não pudemos calcular os equivalentes antigênicos como definidos na seção III.3.4. Ao contrário, dispúnhamos de duas DE50 para cada lote de antiveneno bothrópico, e ambas determinadas contra desafio de 5 DLs50 de dois venenos de referência e portanto contra massas distintas de proteína, já que estes diferiam em DL50. Entretanto, pelo fato das DE50 guardarem proporcionalidade ao desafio de veneno (vide Figura III.3.4), pudemos através do coeficiente angular da correlação “DE50 Ref I/DE50 Ref II” para um conjunto de antivenenos, estimar a relação média entre os equivalentes antigênicos das duas referências. O fato dos venenos bothrópicos serem mais complexos que os crotálicos, o número anual de lotes produzidos maior, a mistura imunogênica conter venenos de cinco espécies e, principalmente demandar maior consumo de veneno de referência, justifica que os estudos tenham se iniciado por esse gênero.

As Figuras III.3.6A-C mostram as relações entre as EDs50 contra referência FUNED e EDs50 contra Referência Nacional vigente, em três períodos. A ordenada em escala logarítmica denota o fato da DE50 do veneno de DL50 mais baixa, apresentar uma relação exponencial com a DE50 do veneno de DL50 mais alta.

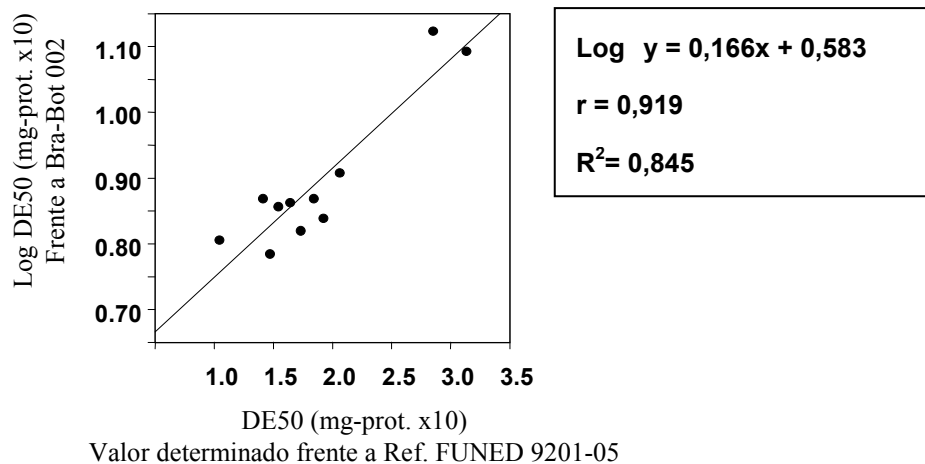
**FIG.III.3.6A** - Correlação entre as DE<sub>50</sub> (mg prot.) de antivenenos bothrópicos produzidos pela FUNED-MG (1993 - 1994) em relação aos desafios de 5 DL<sub>50</sub> da Referência Nacional Bra/Bot/002 e Referência FUNED 9201-5



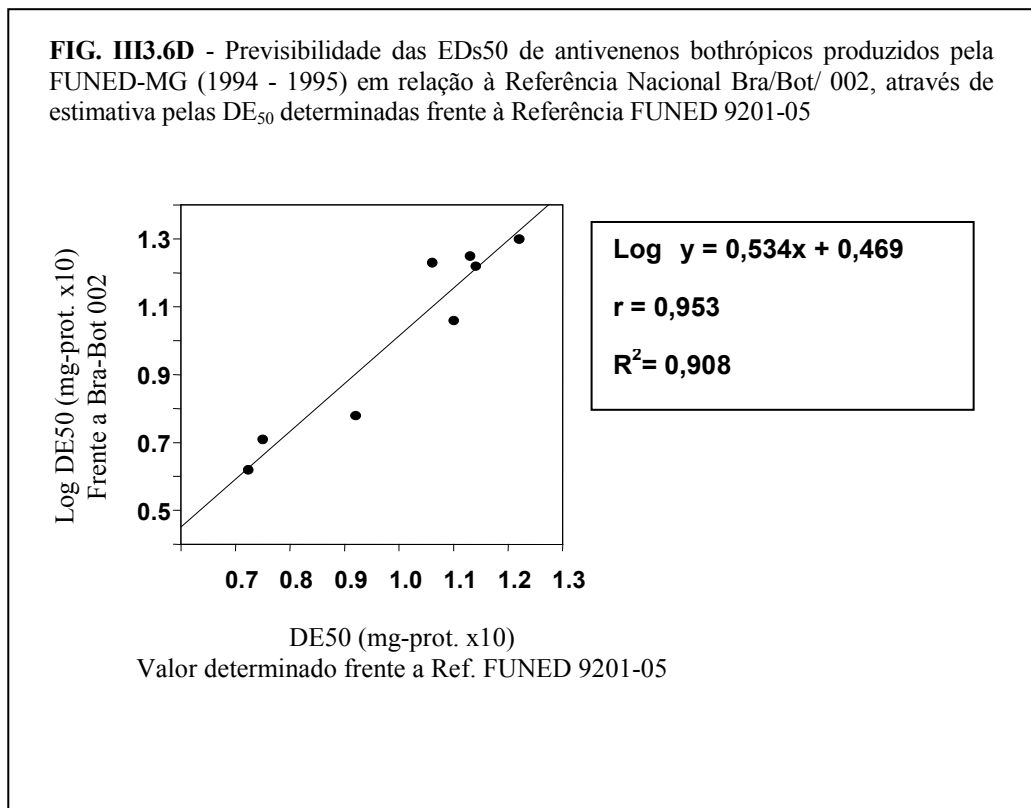
**FIG.III.3.6B** - Correlação entre as  $DE_{50}$  (mg prot.) de antivenenos bothrópicos produzidos pela FUNED-MG (1995 - 1996) em relação aos desafios de 5  $DL_{50}$  da Referência Nacional Bra/Bot/004 e Referência FUNED 9201-5



**FIG.III.3.6C** - Correlação entre as  $DE_{50}$  (mg prot.) de antivenenos bothrópicos produzidos pela FUNED-MG (1996 - 1997) em relação aos desafios de 5  $DL_{50}$  da Referência Nacional Bra/Bot/004 e Referência FUNED 9701-01



As correlações obtidas foram altamente significativas, tendo as somas dos quadrados dos desvios devido à regressão superados os 80 % das somas de quadrados total em cada caso. Sendo o coeficiente angular uma relação entre os equivalentes antigênicos entre os dois venenos, pudemos utilizar a equação das linhas de regressão, para prever as DE<sub>50</sub> frente à Referência Nacional, a partir de dados obtidos com a referência FUNED. Assim, a partir da equação da Figura III.3.6A foram estimadas as DE<sub>50</sub> frente a 5DLs<sub>50</sub> de Bra/Bot/002, para um outro conjunto de lotes de antivenenos produzidos no período 1994-95. A Figura III.3.6D mostra que os dados previstos apresentaram correlação muito forte ( $r=0,953$ ) com as DE<sub>50</sub> determinadas experimentalmente frente à Bra/Bot/002. Observação: Expressando as DE<sub>50</sub> em  $\mu\text{l}$ , obtivemos coeficientes de correlação mais baixos, pelo fato dos diferentes lotes diferirem bastante na concentração de proteína.



### III.4 - DISCUSSÃO E CONCLUSÕES PARCIAIS.

#### III.4.1 - CRITÉRIOS DE VALIDADE ESTATÍSTICA E CRITÉRIOS DE VALIDADE FUNDAMENTAL.

A metodologia do “Ensaio Biológico”, entendida como os princípios para o correto delineamento e análise de experimentos, é plenamente utilizável para a caracterização de venenos e antivenenos ofídicos, no que diz respeito à obtenção das relações dose-resposta. Entretanto, o objetivo de “Padronização Biológica” de venenos e antivenenos ofídicos, em termos de expressar previsivelmente suas potências farmacológicas, por comparação com Padrões, continua um desafio (vide itens I.4.3. e I.4.4). Para atender formalmente aos objetivos propostos à este trabalho, como para propiciar a discussão, transcrevemos os “Princípios de Validade para o Ensaio Biológico”, segundo Jerne & Wood (1949):

##### A) Crítérios de Validade Fundamental:

- A<sub>1</sub>. As diferenças entre os vários grupos de dose são totalmente causadas ou pela variação nas doses ou pelo erro de amostragem; em outras palavras, sendo a mesma dose administrada a todo elemento de ensaio, os resultados de cada grupo serão amostras aleatórias da mesma população.
- A<sub>2</sub>. A resposta esperada U é uma função da dose z, tal que  $U = F(z)$ . Pelo menos na faixa de doses usada, U deve ser uma função estritamente monotônica de z.
- A<sub>3</sub>. Se a substância responsável pela resposta característica na “Preparação Padrão” é chamada “Constituinte Efetivo”, então a resposta provocada pela “Preparação Teste” é devido unicamente à presença nesta do mesmo “Constituinte Efetivo” sem modificações induzidas por qualquer outra substância. Desta maneira, a preparação menos potente comporta-se como

se fosse uma diluição da outra em meio completamente inerte. Este critério é, também, chamado de “Critério de Similaridade”.

B) Critérios de Validade Estatística:

- B<sub>1</sub>. As medidas das doses das Preparações-Padrão e Teste foram suficientemente precisas, de tal modo que os erros de mensuração na dose (z) são desprezíveis face ao erro de amostragem e erros experimentais na resposta U.
- B<sub>2</sub>. Existe pelo menos uma função y da resposta U, e uma função x da dose z, tais que: a) a cada valor de U e z dentro dos limites do ensaio corresponda um e um único valor real do metâmetro da resposta y e do metâmetro da dose x, respectivamente; b) a transformação de U em y é independente da transformação de z em x; c) os valores de y e x assim obtidos satisfazem os critérios B3 e B6 inclusive.
- B<sub>3</sub>. As funções assim definidas são conhecidas e permitem que y e x sejam computados.
- B<sub>4</sub>. A relação de Y (valor esperado ou ideal de y) com x é exatamente expressa pela equação linear:  $Y = a + bx$ , na qual a e b são constantes a serem avaliadas a partir dos dados do ensaio.
- B<sub>5</sub>. Para cada valor de x, dentro da faixa de doses usada, a distribuição de frequência de y é exatamente normal.
- B<sub>6</sub>. A variância de y é independente de Y. Critério de homocedasticidade.
- B<sub>7</sub>. Satisfazendo os critérios B<sub>1</sub> a B<sub>6</sub>, o processo matemático aplicado aos dados deve levar rigorosamente ao valor exato e único da estimativa de potência e seus limites de confiança.

Uma discussão ampla dos critérios de validade estatística pode ser encontrada em Finney (1968), e foge do escopo deste trabalho, porém deve ser mencionado que todas as relações obtidas foram estritamente monotônicas e as transformações linearizantes (log x; log y e probítica) utilizadas, atendem aos critérios. A normalidade de distribuição das tolerâncias individuais, como também a homogeneidade da população de camundongos e/ou correção do

método de amostragem, foram validados pela rejeição do desvio de linearidade nas regressões probíticas. O critério  $B_1$  aplica-se ao experimentador, e seu instrumental. Os erros de medição da dose, 0,5 ml de solução em seringa de 1 ml graduada ao centésimo, não ultrapassaram a 2 %. Mais importantes podem ser os erros da injeção intraperitoneal, por perdas nas paredes abdominais anterior, posterior e/ou por refluxo. Este tipo de erro é controlado por treinamento do pessoal técnico. Na FUNED ao final da década de 1980, fizemos aferição da técnica de injeção comparando entre os técnicos a média e o desvio-padrão dos logaritmos dos tempos de sobrevivência do camundongo após injeção de 10 DLs50 de veneno (Rodrigues, 1991).

Os critérios de validade fundamental  $A_1$  e  $A_2$  são satisfeitos pela obtenção de regressão linear significativa, diretamente ou por transformação linearizante. Assim, os parâmetros calculados a partir das equações de regressão, entre eles as DLs50 e DEs50 e análogos foram considerados válidos.

A aplicação do critério de similaridade como formulado por Jerne (critério  $A_3$ ), adequado à preparações contendo um único constituinte ativo, mostrou-se imprópria, persistindo a questão de abandonar completamente este paradigma ou adaptá-lo à situação de multiplicidade de constituintes ativos.

O fato do coeficiente angular das curvas de letalidade serem sensíveis à presença do antiveneno (Tabela III.3.2), em concentrações não completamente neutralizantes, invalida o procedimento  $\alpha$  para o ensaio do antiveneno e ao mesmo tempo, credencia este parâmetro da regressão para detectar diferenças qualitativas entre venenos. Os resultados obtidos pela comparação dos coeficientes angulares de vários lotes de venenos bothrópicos mostrou-se contraditório, enquanto os coeficientes angulares dos venenos crotálicos apontou para uma possível “homogeneidade qualitativa”. A comparação das referências Bra/Bot/001 e FUNED L-8801-3, em duas ocasiões, por meio de curvas de letalidade feitas concomitantemente, satisfaz o critério de similaridade. Entretanto, a comparação de dez atividades destas referências (vide

Tabela III.3.1C), mostrou a insuficiência do critério  $A_3$  para substâncias com múltiplos constituintes ativos, e, que o paralelismo das curvas de letalidade havia sido mera coincidência.

O procedimento  $\beta$ , que é sem dúvida o mais utilizado em todo o mundo para caracterização de antivenenos, fornece as curvas de proteção, cujos coeficientes angulares dependem do antiveneno, da referência de veneno e do nível de desafio utilizado. Como pré-requisito para esta análise, demonstramos através de ensaios simulados (Tabela III.3.3C), que o paralelismo das curvas de proteção pode ser obtido no caso de real similaridade entre antivenenos, a despeito da flutuação amostral do parâmetro. Neste quesito, o critério  $A_3$  não pode ser à “piori” satisfeito, pela flagrante heterogeneidade dos coeficientes angulares das curvas de proteção pelo antiveneno. Nesta situação, teria sido muito valiosa a comparação de pelo menos um par de antivenenos, quanto às suas doses efetivas em neutralizar todo o rol de atividades do veneno de referência, como um teste para o critério de similaridade, baseado somente na proteção letal.

Laing et al (1992) compararam três antivenenos Bothrópicos provenientes do Instituto Butantã, FUNED e Instituto Vital Brasil, quanto às doses neutralizantes para veneno de B. jararaca, segundo sete atividades biológicas preconizadas por Theakston & Reid (1983). Encontraram grandes diferenças de potência quando as doses efetivas foram expressas em termos do teor de proteína total ou teor de IgG.

### III.4.2 – “LEI DOS MÚLTIPLOS DE PROPORÇÃO”; EQUIVALENTES ANTIGÊNICOS; PREVISIBILIDADE DA CAPACIDADE DE NEUTRALIZAÇÃO DE ANTIVENENOS.

Os antisoros de grande avidéz pelo antígeno são capazes de neutralizá-lo, numa faixa extensa de concentrações, mantendo constante a proporção entre si, de modo que uma relação linear é obtida, entre a quantidade de antígeno (em geral uma toxina pura) e a quantidade de anticorpos para neutralização total (Jerne, 1951). Este fenômeno, denominado “Lei dos Múltiplos de Proporção”, somente é possível se os complexos antígeno-anticorpo forem praticamente indissociáveis e a estequiometria dos complexos independente da concentração absoluta de ambos. A experiência com venenos de ofídios e seus respectivos antivenenos no ensaio de proteção letal, tem revelado relações retilíneas em uma faixa de concentração de veneno, mostrando em seguida deflexões positivas ou negativas do coeficiente angular, como também retas em toda extensão de doses (Schottler, 1954; Christensen, 1966, 1967, 1979). Ownby (1990), em um editorial a respeito da uniformização dos ensaios utilizados para verificar a capacidade neutralizante de antivenenos, emitiu a opinião de que a “Lei dos Múltiplos de Proporção” não é aplicável ao par veneno-antiveneno ofídico. A importância prática desta questão é que, se a relação DE50 – Desafio, for linear, então a equação para a regressão é uma estimativa universal e inequívoca da potência neutralizante do antiveneno em relação àquele veneno. Se as imunoglobulinas presentes no antiveneno apresentarem grande avidéz pelos antígenos do veneno, então os complexos resistirão à diluição, e a potência neutralizante do antiveneno, obtida na faixa de concentrações das curvas de proteção (aproximadamente 0,5 mg/ml de veneno bothrópico), poderia ser extrapolada para as concentrações realmente encontradas no plasma de pacientes acidentados (ng a µg/ml). Infelizmente, não dispomos de ensaios de letalidade, suficientemente sensíveis para a verificação desta hipótese. A despeito destes questionamentos, a Figura III.3.4, mostra que a neutralização do veneno de *C. d. terrificus* pelo antiveneno crotálico se aproximou

do que seria esperado pela citada lei, isto é, coeficiente angular normalizado unitário. O conjunto veneno-antiveneno bothrópico fugiu flagrantemente do esperado, mostrando um consumo de antiveneno que dobrou a cada incremento unitário da concentração do veneno. A comparação entre as duas situações fica entretanto prejudicada, porque 40DLs50 de veneno crotálico pouco ultrapassam em massa de antígeno, a 1DL50 de veneno bothrópico. O crescimento do consumo de antiveneno bothrópico na taxa observada permite-nos inferir que a disponibilidade de epitopos por unidade de massa de antígeno, aumenta em função do aumento da concentração do próprio antígeno e/ou anticorpo.

Esta interpretação, apoia-se em fatos já estabelecidos (vide seção I.2.2) de que os venenos bothrópicos contêm um mosaico de antígenos. A presença de epitopos em proteínas não tóxicas do veneno, com identidades parciais aqueles presentes nas proteínas tóxicas e, portanto, apresentando menores afinidades pelo paratopo em comum, poderia gerar o fenômeno observado. Assim, para os venenos bothrópicos de DL50 mais alta, esperaríamos maior consumo de antiveneno para neutralização. A Figura III.3.5 mostrou que para sete diferentes venenos bothrópicos a DE50 variou exponencialmente com a massa do antígeno (veneno), chegando até à taxa de  $DE50 \cong \text{Desafio Exp. } (3,2)$ .

A constatação de uma relação linear DE50-desafio em alguns casos, permite por outro lado, duas aplicações práticas, uma definição inequívoca e universal da potência de um antiveneno em relação a um padrão de veneno, já mencionada e, o cálculo da equivalência antigênica entre dois venenos, indispensável para a substituição de padrão ou referência.

### III.4.2A - POTÊNCIA DE UM ANTIVENENO

A potência ou atividade específica de um antiveneno expresso em mg de veneno, neutralizados por mililitro de antiveneno, cujo cálculo é feito com base na DE50 obtida contra 5DLs50 de desafio, segundo a Farmacopéia Brasileira, a Farmacopéia Internacional e outras.

Quadro III.4.2A

#### Potência de um Antiveneno, como Definida por Várias Farmacopéias

Desafio: Dose  $nDL_{50}$  do veneno, fixa por camundongo

Antiveneno: Doses crescentes - procedimento  $\beta$

para  $ED_{50}$  do antiveneno temos: % de sobreviventes = % mortos = 50%

$$\frac{\text{ven. neutralizado (mg)}}{ED_{50} \text{ antiveneno (mL)}} = \frac{\text{ven. injetado (mg)} - \text{ven. que matou 50\% dos animais (mg)}}{ED_{50} \text{ antiveneno (mL)}}$$

normalizando o numerador pela  $DL_{50}$  do veneno

$$\frac{\text{n}^\circ \text{ de } DL_{50} \text{ neutralizadas}}{ED_{50} \text{ antiveneno (mL)}} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de } DL_{50} \text{ injetados} - 1}{ED_{50} \text{ antiveneno (mL)}}$$

ou alternativamente

$$\text{Potência} = \frac{\text{mg ven.}}{\text{mL antiveneno}} = \frac{(\text{n}^\circ \text{ de } DL_{50} \text{ injetados} - 1) \cdot DL_{50} \text{ (mg ven.)}}{ED_{50} \text{ antiveneno}}$$

O raciocínio para o cálculo, parte da identidade expressa no Quadro III.4.2A de que, a quantidade de veneno neutralizado é igual à quantidade de veneno injetado, subtraída a quantidade de veneno restante a nível da DE50, que equivaleria a 1DL50. A pressuposição de que o veneno restante após adição de 1DE50 do antiveneno, seja qualitativamente idêntico ao veneno bruto, está implícita. A identidade também pressupõe que a relação DE50-Desafio seja linear com intersecção unitária na abcissa. As pressuposições de igualdade qualitativa e que a quantidade de veneno restante seja 1DL50, são incorretas. A partir de pelo menos duas DE50 obtidas a dois níveis de desafio, o valor real da intersecção com a abcissa pode ser determinado (vide seção III.3.4), e a equação utilizada com propriedade (Barbosa e Ferreira-Alves, 1988).

### **III .4.2B - SUBSTITUIÇÃO DE REFERÊNCIA PARA VENENOS**

Tendo sido verificada a impraticabilidade do estabelecimento de um antiveneno de referência, a escolha naturalmente recai sobre o veneno que apresenta propriedades mais favoráveis para ser credenciado como referência. Este deve cumprir as funções de padrão funcional, imunogênico e antigênico. O papel de padrão funcional é exercido duplamente, na caracterização comparativa de outros venenos e na quantificação das propriedades neutralizantes do antiveneno. Na seção III.3.4 e III.3.5 deste trabalho, procuramos explorar o encontro de uma relação linear DE50-Desafio, o que possibilitou o cálculo de equivalentes antigênicos entre dois venenos. Os venenos mais potentes, ou seja, os de menor DL50, apresentaram os equivalentes antigênicos mais altos em número de DL50 neutralizadas. Postulando, para efeito de raciocínio, que dentro de um mesmo gênero, o veneno de DL50 baixa seja constituído basicamente de proteínas tóxicas, enquanto o veneno de DL50 alta contenha toxinas bioquímica e antigenicamente homólogas, diluídas por proteínas não tóxicas e portadoras dos mesmos determinantes antigênicos, então, os equivalentes antigênicos, precisamente determinados para

um lote de antivenenos obtidos a partir de uma determinada mistura imunogênica, constituiriam um critério quantitativo para comparação de imunogenicidade.

Em bases puramente especulativas, poderíamos hipotetizar que o veneno de DL50 mais alta, seria o melhor imunógeno e, o de DL50 mais baixa, o melhor antígeno ou veneno padrão. Em apoio à hipótese acima está o fato de que as misturas imunogênicas bothrópicas, utilizadas na FUNED, têm DL50 altas (vide tabela III.3.1B) e, dão origem a antivenenos mais efetivos em neutralizar os venenos de baixa DL50 como as referências nacionais bothrópicas. Neste mesmo sentido, ainda com dados obtidos na rotina de controle biológico da FUNED, estão as três séries de comparações apresentadas nas Figuras III.3.6.A a C. Nessas, as DE50 frente às referências nacionais, Bra/Bot/002 com DL50 37,5 µg/20g e Bra/Bot/004 com DL50 32,9 µg/20g foram em média metade das DE50 frente a VRF B.j. 9201-5 com DL50 de 68 µg/20g. Observação: a hipótese acima não é inovadora, tratando-se de um reaquecimento das idéias inicialmente apresentadas por Githens & Butz em 1929, e mais tarde apoiadas experimentalmente e criticadas em suas limitações por Schottler (1951) em relação aos venenos e antivenenos das espécies bothrópicas brasileiras. Dias da Silva (1989) estudando as reações cruzadas entre dez venenos bothrópicos e seus respectivos antivenenos monoespecíficos, fez também observações favoráveis, de que os antivenenos contra veneno de *B. alternatus* (DL50 66 µg) e *B. insularis* (DL50 50 µg) foram em média 2,5 vezes mais efetivos em neutralizar a atividade letal de *B. jararaca* (DL50 33 µg) que o veneno homoespecífico. A idéia subjacente a esta hipótese, é que o veneno menos tóxico, apresente maior concentração de determinantes antigênicos por unidade de massa de proteína, o que faz sentido, pois consome maior quantidade de anticorpos para neutralização, e, portanto, seria melhor imunógeno. Uma investigação atual do fenômeno, deveria, entretanto, basear-se em metodologia imunoquímica e ensaios de neutralização sensíveis ao antígeno na

ordem de ng/ml, para excluir a produção de anticorpos de baixa avidéz (vide comentários no seção I.2.4).

Uma possibilidade imediata da aplicação do conceito de equivalência antigênica entre venenos, é na substituição de referências. Se a nova referência mostrar DL50 próxima, como tem sido o caso para as referências bothrópicas, um ajuste no desafio manteria a equivalência antigênica sem causar problemas ao ensaio de proteção da letalidade. Para o acompanhamento das fases intermediárias da produção dos antivenenos bothrópicos, as referências secundárias ou internas são um recurso necessário, porque o consumo de veneno é alto, cerca de 200 µg por camundongo e, o número anual de lotes é grande. O estabelecimento da equivalência antigênica entre a referência interna e a nacional, estabelecida por correlação (vide seção III.3.6) pode ser usada para obter estimativas da potência neutralizante dos diafiltrados, de modo que a diluição deste para o produto final a granel, resulta no produto envazado e acabado, com uma potência próxima da esperada frente ao veneno de referência nacional. Deve-se observar entretanto, que os altos coeficientes de correlação observados, somente foram possíveis por se tratar de dois venenos de referência obtidos a partir de um grande número de espécimes de *B. jararaca*. Fosse um dos venenos, referência para outra espécie bothrópica, ou mesmo, veneno de um único espécimen de *B. jararaca*, as correlações certamente não seriam tão altas (Rodrigues et al. 1997).

## **IV - ESTUDOS BASEADOS NA ATIVIDADE HEMORRÁGICA CUTÂNEA DE VENENOS BOTHRÓPICOS EM RATOS.**

---

### **IV.1 – INTRODUÇÃO**

#### **IV.1.1 - PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS DOS FATORES HEMORRÁGICOS.**

Os venenos de viperíneos e crotalíneos são capazes de provocar extravazamento de sangue, devido à destruição da membrana basal dos vasos da microcirculação, no local da picada e sistemicamente, de modo independente das alterações na coagulação (Ohsaka, 1976). Esta atividade reside em metaloenzimas, que não necessitam de cofatores endógenos, denominadas hemorraginas ou fatores hemorrágicos. Podem ser classificados segundo seu peso molecular, 20 Kd a 30 Kd, baixo peso molecular; 30 Kd a 60 Kd, médio peso molecular; 60 Kd a 100Kd, alto peso molecular, sendo esses últimos os mais ativos (Bjarnasson & Fox, 1989). Os fatores hemorrágicos purificados apresentam características moleculares em comum: muitos são glicoproteínas; apresentam íons metálicos essenciais para sua atividade ligados ao centro ativo, sendo que a maioria contem zinco, outros zinco e cálcio, e ainda outros unicamente magnésio; são inativados irreversivelmente por agentes quelantes; instáveis em valores extremos de pH; desnaturados pelo calor; alguns apresentam baixa atividade proteolítica sobre a caseína, estando em outros esta atividade ausente; a cadeia beta oxidada da insulina e o fibrinogênio são em geral substratos; não liberam bradicinina; podem hidrolizar substratos sintéticos da arginina; não são inibidos por inibidores de serino-proteases como fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) e o inibidor trípico do feijão soja (SBTI); e não apresentam atividade fosfolipásica (Maeno, 1962); Osaka, 1960; Ovadia, 1978; Mandelbaum et al, 1976; 1984; Nikai et al, 1984; Assakura et al, 1986; Sanchez et al, 1987; Yonaha et al, 1991; Borkow et al, 1993).

A característica bioquímica mais importante encontrada nos fatores hemorrágicos (Ht-a, Ht-c, Ht-d e Ht-e) obtidos do veneno de *Crotalus atrox*, e possivelmente extensível à maioria dos fatores hemorrágicos proveninetes de outras espécies é que estes se comportam como as metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs). Como a MMP-3 ou estromelisina obtida do fibroblasto humano são capazes de degradar a fibronectina, laminina, colágeno do tipo IV, nidogen (entactina) e gelatinas, todos esses componentes da matriz extracelular, sendo a ordem de atividade correspondente às potências hemorrágicas (Baramova et al, 1989; Bjarnarson et al, 1988).

Até 1989 haviam sido descritos 43 fatores hemorrágicos em 15 espécies (Bjarnarson & Fox, 1989) e a sequência de aminoácidos do Ht-d de *Crotalus atrox* determinada (Shanon et al, 1989). Perez et al (1984) e Martinez et al. (1989) foram pioneiros em obter os primeiros anticorpos monoclonais contra os fatores hemorrágicos do *Crotalux atrox* e estudar suas relações antigênicas com outros crotalídeos norte-americanos. Aproximadamente na mesma época, um anticorpo monoclonal foi obtido, capaz de neutralizar a atividade hemorrágica do veneno de *Echis carinatus* (Iddon et al, 1988). Atualmente, através de clonagem, os fatores hemorrágicos têm sua sequência primária determinada e são realizados estudos de homologia (Yamada et al. 1999; Jeon et al. 1999). Não obstante, as metaloproteases de venenos ofídicos estão muito aquém em termos da profundidade dos estudos de imun química molecular, que as toxinas curaremiméticas, fosfolipases tóxicas e cardiotoxinas (vide seção I.2.3), mesmo porque têm massa molecular muito mais alta.

De espécies brasileiras foram purificados e caracterizados os fatores hemorrágicos do veneno de *B. jararaca*, HF<sub>1</sub>, HF<sub>2</sub> e HF<sub>3</sub> (Mandelbaum et al. 1976). De *B. newiedi*, NHFa e NHFb (Mandelbaum et al, 1984); de *Lachesis muta muta*, LHF<sub>1</sub> (Sanchez et al. 1987) e LHF<sub>2</sub> (Sanchez et al, 1992). Todos mostraram ser glicoproteínas, sendo os bothrópicos de médio peso molecular e os laquéuticos de alto peso molecular. Através de ensaios de imunodifusão, Mandelbaum &

Assakura (1988), Mandelbaum et al (1984) e Assakura et al (1986) observaram identidade imunológica total entre HF<sub>1</sub>, HF<sub>2</sub>, HF<sub>3</sub>, NHFa E NHFb, quando utilizado o soro de cavalo anti *B. newiedi* e os soros anti-HF1 e anti-HF2 obtidos em coelho e anti-*B. jararaca* em cavalo. O soro anti-NHF(a,b) reconhece HF2 totalmente, e HF1 parcialmente. Estes fatos sugerem grande homologia entre os fatores hemorrágicos bothrópicos mencionados acima, mas, deve-se ressaltar que estes diferem amplamente em potência hemorrágica.

#### **IV.1.2 - PAPEL FISIOPATOLÓGICO DOS HFS E SUA RELAÇÃO COM A MORBIDADE E LETALIDADE ACIDENTE OFÍDICO.**

Para as espécies brasileiras de ofídios, a verificação de hemorragias locais e sistêmicas no paciente acidentado, é um caráter distintivo, que permite separar os acidentes bothrópico e laquético dos crotálicos e elapídicos, devido à ausência de fatores hemorrágicos nos venenos dos dois últimos gêneros citados. A discussão implícita no título desta seção é na verdade a justificativa para a inclusão dos estudos de atividade hemorrágica neste trabalho, devido à sua importância fisiopatológica. Entretanto, uma discussão detalhada do papel das hemorragias no envenenamento bothrópico, suas relações com a hemorragia, necrose e letalidade, tanto em animais de experimentação quanto ao paciente acidentado, foge ao enfoque deste trabalho e já foi apresentada recentemente por um colaborador (Dominguez do Carmo, 1996). Neste momento, faz-se necessária unicamente a explicitação dessa relevância, que ademais tornou-se clara com a utilização experimental de fatores purificados de: *Trimeressurus flavoviridis* (Osaka et al, 1960; Maeno, 1962); *Trimeressurus elegans* (Yamakawa et al, 1976; *Crotalus atrox* (Nikai et al, 1984; Ownby et al, 1978); *B. newiedi* (Queiroz et al, 1985a; *B. jararaca* (Queiroz et al, 1985b; Kamiguti et al, 1991b); *Crotalus viridis viridis* (Fabiano & Tu, 1981); *Echis carinatus* (Iddon et al, 1988, utilizando monoclonais anti-hemorrágicos.

#### **IV.1.3 - METODOLOGIAS PARA QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE HEMORRÁGICA DE VENENOS OFÍDICOS E SUA NEUTRALIZAÇÃO POR ANTIVENENOS.**

A injeção intradérmica de veneno no dorso de coelhos e a medição do diâmetro da lesão hemorrágica subsequente na pele evertida, foi utilizada por Kondo et al. (1960) para o estudo e purificação dos fatores hemorrágicos do *T. flavoridis*. A avaliação quantitativa da atividade anti-hemorrágica do antiveneno, com o objetivo de padronização deste também foi realizada por este método (Kondo et al, 1965a e b), injetando intradermicamente a mistura veneno-antiveneno após incubação.

Bonta et al (1970) propuseram a aplicação de um disco de papel de filtro de 5 mm de diâmetro, embebido em solução de veneno, por 3 minutos na superfície pulmonar de cães. A intensidade da hemorragia seria medida atribuindo à lesão escores de 0 a 3 a cada minuto imediatamente após a retirada do filtro de papel, até 10 min depois. Assim, o escore máximo possível para uma dose seria 33. Este método, em que pese a engenhosidade, parece nunca ter sido executado a não ser pelos proponentes.

Para Ownby et al (1984), a avaliação tanto da atividade hemorrágica, quanto de sua neutralização por antivenenos, deve ser feita em condições análogas ao acidente ofídico, tendo portanto estes autores, inoculado o veneno de *C. atrox* e *C. viridis viridis* no músculo da coxa traseira de camundongos e, logo após, o antiveneno por via endovenosa. A partir de um fragmento do músculo lesado, a hemoglobina era extraída e quantificada espectrofotometricamente. Sua objeção ao método de Kondo, é que as lesões hemorrágicas cutâneas têm muitas vezes perfis irregulares e intensidades variáveis de cor. Assim, duas lesões de mesmo diâmetro podem ter diferentes intensidades de cor, que representam diferentes

intensidades de hemorragia, não sendo entretanto, distinguíveis pelo método de Kondo. Mebs et al (1988) apoiaram o método de Ownby e citaram a maior sensibilidade e a possibilidade de avaliar também a mionecrose a partir de cortes histológicos. A esse respeito, transcrevemos aqui as considerações às quais chegamos, após detalhado exame da situação juntamente com Domingues do Carmo, nosso colaborador: “Considerando as hemorraginas como enzimas e a membrana basal capilar como seu substrato, deveríamos esperar uma relação linear entre a dose de enzima e a quantidade de produto formado, fixado o tempo de exposição, caso a concentração do substrato fosse saturante. Entretanto, nos métodos propostos, não se medem os produtos da hidrólise da membrana basal e sim a consequência de sua ruptura que é a hemorragia. Fatores como o fluxo sanguíneo por área e a atuação de mediadores químicos sobre as junções endoteliais, certamente podem interferir quando se quantifica a resposta através da hemoglobina extravazada. As soluções de veneno quando injetadas corretamente entre a epiderme e a derme (forma-se uma pápula com separação entre derme e epiderme, com depressões nos pontos onde o folículo piloso mantém aderência aos planos mais profundos) devem difundir-se lateralmente para atingir as alças capilares que apenas tangenciam este plano de clivagem. Deste modo, a organização anatômica sugere pouca ou nenhuma contribuição do fluxo sanguíneo à difusão lateral da solução de enzima na espessura da pele. A área ou diâmetro do espalhamento da enzima, passaria então a depender de sua concentração e difusibilidade horizontal na lâmina da pele. cremos portanto, que o diâmetro médio da lesão hemorrágica como proposto por Kondo et al, 1960, embora estes não tenham explicitado as considerações acima, seja o parâmetro da resposta biológica aos fatores hemorrágicos, que guarda relação mais direta com a dose ou concentração. Os limites impostos ao aumento progressivo da área de lesão, pela fixação da enzima ao substrato (a quantidade disponível cresce à medida do aumento da área) e pela absorção e transporte pelos vasos, responderiam pela não linearidade das curvas dose-resposta,

que de fato são do tipo curva de saturação. Em outras palavras, o ensaio de hemorragia cutânea assemelha-se aos ensaios de produção de halo em lâminas de gel”.

O método de Kondo et al (1960) é recomendado como padrão pela OMS (WHO, 1981) porém o uso do rato foi preconizado em substituição ao coelho. Dominguez do Carmo (1996) estudou formalmente as curvas dose-resposta da atividade hemorrágica de venenos bothrópico no dorso do rato, dentro dos princípios de validade formulados para o ensaio biológico (Jerne & Wood, 1949), demonstrando plena adequação da preparação biológica, embora menos sensível que o coelho. Demonstrou também, que a resposta biológica como definida (diâmetro médio da lesão), tem distribuição simétrica de frequência, que se aproxima da distribuição normal e que portanto, a aplicação de estatística paramétrica é segura.

## IV.2 - MATERIAIS E MÉTODOS.

---

### IV.2.1 - VENENOS OFÍDICOS.

Venenos brutos liofilizados, fornecidos pelo serpentário da Fundação Ezequiel Dias:

- *B. alternatus* 880325 e 921103
- *B. atrox* 890618 e 920716
- *B. jararaca* 870502 e 870820
- Referência FUNED B. j. 880103
- Referência FUNED B. j. 920105
- Ref. Nacional Bra/Bot/002
- *B. jararacussu* 870108 e 921002
- *B. moojeni* 880429 e 920523
- *B. neuwiedi* 891028 e 920915
- Mistura Imunogênica Bothrópica na proporção: *B. jararaca* 40 %, *B. moojeni* 14 %, *B. atrox* e *B. jararacussu*, 13 % cada, *B. alternatus* e *B. neuwiedi*, 10 % cada.
- *Lachesis muta muta* 881003 e 921020

### IV.2. 2. ANTIVENENOS.

- AB-FUNED 881122 e 920928 (mistura imunogênica formada de 50% de *B. jararaca* e 4 partes iguais de *B. alternatus*, *B. jararacussu*, *B. neuwiedi* e *B. moojeni*).
- AB-FUNED 931119 (mistura imunogênica formada de 40% de *B. jararaca*, 14% de *B. moojeni*, *B. jararacussu* e *B. atrox*, 13 % cada e *B. alternatus* e *B. neuwiedi*, 10% cada).
- ABL-FUNED 900530 (mistura imunogênica formada de 50% de *B. atrox* e 50% de *Lachesis muta muta*).
- AL - Butantã 8212001 (imunógeno 100% *Lachesis muta muta*)

### **IV.2.3 - ANIMAIS EXPERIMENTAIS.**

Foram utilizados ratos Holtzman e Wistar fêmeas, pesando entre 200 e 250 gramas, cedidos pelo Centro de Bioterismo do ICB-UFMG. A partir de cada lote selecionava-se para cada experimento 5, 6, 12 ou 18 animais que tivessem atingido a faixa adequada de peso. Até o momento das inoculações intradérmicas e após estas, os animais tinham pleno acesso à comida e água.

### **IV.2.4 - PREPARO DE SOLUÇÕES**

- Venenos: os venenos eram pesados em balança microanalítica, dissolvidos em salina a 0,9 %, de modo que 0,1 ml contivesse a dose desejada. As soluções eram preparadas em quantidade justamente suficiente para o experimento do dia.
- Incubações veneno-antiveneno: o volume final de cada incubação veneno-antiveneno era de 2 ml, isto é, suficiente para 20 inoculações. Para tanto, era preparada uma solução de veneno com o dobro da concentração final desejada. A todos os tubos em uma bateria, adicionava-se 1 ml da solução de veneno e depois doses crescentes de antiveneno. O volume era então completado para 2 ml com salina, incubado a 37° C por 30 min e após este período, os tubos eram mantidos em gelo até o momento da inoculação.

## IV.2.5 - ENSAIO DA ATIVIDADE HEMORRÁGICA E ANTI-HEMORRÁGICA NO RATO.

Delineamento experimental e alocação das doses pelos sítios de injeção.

O delineamento era realizado em quadrado latino (5 x 5 ou 6 x 6), onde se equivalem o número de doses, número de animais e sítios de inoculações. A alocação e o rodízio das doses pelos sítios de inoculação era feito de modo que cada dose ocupasse todas as posições possíveis e todas as posições recebessem todas as doses. Inicialmente era feito um mapa representando os animais e os sítios de inoculação. Cada animal portanto era um bloco dentro da organização do experimento, recebendo todas as doses de veneno e/ou veneno mais antiveneno. A distribuição visava a compensar a sensibilidade da pele em relação as diferentes posições.

Ex: mapa representando um quadrado latino 6 x 6, onde cada letra representa uma dose de veneno ou veneno mais antiveneno e os índices numéricos se referem a cada posição.

**RATO1**

A <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>
D <sub>4</sub>	E <sub>5</sub>	F <sub>6</sub>

**RATO 2**

B <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>
E <sub>4</sub>	F <sub>5</sub>	A <sub>6</sub>

**RATO 3**

C <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	E <sub>3</sub>
F <sub>4</sub>	A <sub>5</sub>	B <sub>6</sub>

**RATO 4**

D <sub>1</sub>	E <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>
A <sub>4</sub>	B <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>

**RATO 5**

E <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>
B <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	D <sub>6</sub>

**RATO6**

F <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>
C <sub>4</sub>	D <sub>5</sub>	E <sub>6</sub>

O experimento desenvolveu-se utilizando-se o método de KONDO et al. (1960) modificado pela utilização de ratos ao invés de coelhos. Os animais eram anestesiados por

inalação de éter e então o pelo do dorso raspado com aparelho de tosa. Não foi necessário depilar com navalha para retirada completa do pelo até a visualização da pele. Este procedimento reduz o tempo de anestesia, previne uma maior irritação da pele e possível liberação de agentes vasoativos que possam influir na resposta hemorrágica. Após tosados, os animais recebiam injeções de 0,1 ml, via intradérmica (i.d.) de soluções de concentrações crescentes de veneno para as curvas dose-resposta hemorrágicas. Para as curvas de neutralização, os animais recebiam uma dose fixa de veneno (controle ou desafio) e as demais injeções eram de misturas veneno (dose desafio) mais volume crescentes de antiveneno. Estas soluções eram então aplicadas com seringas tipo Tuberculina de 1,0 ml graduadas ao centésimo e equipadas com agulhas 13 x 0,38 mm, com o bisel voltado para cima de modo a não perfurar a pele. O sucesso da injeção i.d. era feito observando-se a formação de uma pápula circular na pele. Dezesesseis horas após a inoculação, os animais eram sacrificados por inalação de éter e retiradas as peles dos dorsos que eram extendidas sobre placas de vidro (10 x 10 x 0,1 cm) com o lado interno da pele ficando em contato com esta placa. Este conjunto era então colocado sobre uma caixa iluminadora de fundo escuro com o lado interno da pele e a placa de vidro voltados para o observador e desta forma as lesões eram visualizadas por transluminação. O contorno das lesões era copiado sobre as placas de vidro e depois medidos dois diâmetros, o maior e outro transversal a este, sendo então calculado o diâmetro médio das lesões hemorrágicas.

#### **IV.2.6 - MÉTODOS MATEMÁTICOS E ESTATÍSTICOS.**

Os métodos aplicados à análise da regressão linear simples e correlação, são os mesmos utilizados na seção III.2.5.

#### **IV.2.6A - ESTIMATIVA DE $Y_0$ E $X_0$ A PARTIR DAS EQUAÇÕES DE REGRESSÃO LINEAR.**

Os valores de  $x_0$  para diâmetro ( $\emptyset$ ) médio da lesão de 1 cm ou DMH (Kondo et al, 1960) foram calculados a partir da equação da CDR diâmetro médio da lesão - log dose veneno, e expresso com seus limites de confiança segundo o teorema de Fieller (Finney, 1971).

Para as tabelas da seção IV - 3 - 5, os procedimentos foram também análogos à seção III.2.5, porém com dupla estimativa em sequência. Os valores de  $\emptyset$  médio das lesões hemorrágicas ( $y_0$ ) produzidas por dose fixa de diferentes venenos bothropicos, foram transformados em seu equivalente de B. jararaca ( $x_0$ ) por interpolação na CDR do veneno utilizado como padrão em cada ciclo de comparação. As estimativas assim obtidas ( $x_0$ ) foram transportadas para as equações das curvas de equivalência “venenos e antivenenos” (curvas euteriáticas) e as quantidades de antiveneno para neutralização total calculadas. Para cada conjunto destas estimativas (valores previstos) foi investigada a correlação com o conjunto análogo de observações determinadas experimentalmente, entre o veneno da espécie bothrópica e o antiveneno em questão (Figs. IV. 3. 5A-F).

#### **IV.2.6B - NORMALIZAÇÃO DE COEFICIENTES ANGULARES:**

As relações de equivalência veneno-antiveneno para neutralização total (Figs. IV.3.4A - D) foram normalizadas pela transformação logarítmica de ordenada e abscissa. O coeficiente assim obtido foi denominado “coeficiente angular normalizado não corrigido”. Entretanto, a CDR diâmetro médio da lesão hemorrágica - dose de veneno, inicia-se em valores apreciavelmente altos em comparação com a dose mínima hemorrágica (DMH), ou seja, existe tolerância natural ou um limite mínimo detectável pelo método. Extrapolando a CDR  $\bar{\varnothing}$  médio da lesão - log dose para seu limite físico ( $\bar{\varnothing}$  médio  $\Rightarrow$  0) a dose mínima detectável era obtida como intersecção na abscissa. Assim, as relações de equivalência veneno - antiveneno, onde a dose mínima detectável foi subtraída de cada valor de abscissa, após transformação logarítmica, forneceram o “coeficiente angular normalizado corrigido”.

#### **IV.2.6C - CRITÉRIO DE SIMILARIDADE PARA O CASO EM QUE A RESPOSTA BIOLÓGICA É UMA FUNÇÃO LINEAR DA DOSE.**

O problema consiste em determinar as doses da preparação padrão (P) e da preparação desconhecida (D), que produzem a mesma resposta, isto é, são equipotentes. Sendo estas as doses  $z_P$  e  $z_D$ , podemos determinar a relação de potência R, através do quociente:

$$\mathbf{R = z_P/z_D, portanto, z_P = R \cdot z_D.}$$

Sendo as relações dose-resposta lineares, teremos:

$$\mathbf{Y_D = \bar{y}_D + b_D(z_D - \bar{z}_D) e}$$

$$Y_P = \bar{y}_P + b_P(z_P - \bar{z}_D).$$

Sendo  $z_P$  e  $z_D$  duas doses equipotentes, então produzirão respostas iguais,  $Y_P - Y_D = 0$ .

Subtraindo membro a membro as duas funções:

$$0 = \bar{y}_P - \bar{y}_D + [ (b_P(z_P - \bar{x}_P) - b_D(z_D - \bar{z}_D)) ]$$

$$\text{teremos, } \frac{(\bar{y}_P - b_P.z_P)}{a_P} - \frac{(\bar{y}_D - b_D.z_D)}{a_D} = b_P.z_P - b_D.z_D$$

onde  $a_P$  e  $a_D$  são valores de ordenada para  $z_P$  e  $z_D$  iguais a zero, isto é, as intersecções com a ordenada devem ser obrigatoriamente idênticas se a preparação desconhecida se comportar como diluição do padrão.

$$\text{Daí, } b_P.z_P = b_D.z_D = 0 \text{ ou } R = z_P/z_D = b_D/b_P.$$

Sendo  $a_P = a_D$ , a relação entre os coeficientes angulares é uma constante, e portanto, uma definição universal e inequívoca da relação de potências. Esta definição foi incluída nesta seção pelo seu valor conceitual.

#### **VI.2.6D - ANÁLISE ESTATÍSTICA.**

O requisito básico para a aplicação da análise de variância à comparação de parâmetros amostrais e à análise de regressão é a homocedasticidade. Este requisito foi confirmado por Dominguez do Carmo (1996) com respeito à distribuição de frequência da variável  $\emptyset$  médio da lesão a um nível fixo da dose de veneno. A uniformidade de variâncias ao longo da linha de

regressão foi confirmada por inspeção das observações em vários experimentos (vide fig. III. 3.1A).

Os delineamentos experimentais para a estimativa da regressão, corresponderam ao modelo fixo, isto é, os níveis da variável independente ou determinística foram fixados previamente e as observações analisadas para uma ou duas influências qualitativas, além do efeito da regressão (Scheffé, 1959).

#### **IV.2.7 - AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO ZONAL DA MISTURA VENENO-ANTIVENENO, ATRAVÉS DE DISPERSÃO DE LUZ.**

A) Nefelômetro: foi utilizado nefelômetro de ângulo fixo de leitura a  $90^\circ$ , um único feixe, com fonte emissora visível de filamento de tungstênio, apresentando pico de emissão a  $450 \text{ m}\mu$ . Como padrão foi utilizado papel vegetal opaco encapsulado em cubeta de vidro, o qual permitia a calibração do aparelho em 5 escalas de sensibilidade (100, 200, 300, 400 e 500 mV) por ajuste do ganho do amplificador.

B) Procedimentos: as soluções de veneno e antiveneno foram filtradas em ultrafiltro  $0,22 \mu$ , após a qual foram feitas as incubações, em duplicata, permanecendo a  $37^\circ$  por 30 min e então transferidas para refrigerador a  $4^\circ\text{C}$  por período em geral de 24 h antes da execução das leituras.

1<sup>a</sup> leitura: dispersão total (Dt) - A mistura de incubação após 24 horas, era submetida a ultrassom por 1 minuto e feita a leitura imediatamente;

2<sup>a</sup> leitura: dispersão do sobrenadante - A mistura de incubação era centrifugada a  $15000g$  a  $4^\circ\text{C}$  por 30 min, o sobrenadante aspirado e feita a leitura;

3<sup>a</sup> leitura: dispersão residual (R) - Ao sobrenadante, adicionou-se  $0,11 \text{ ml}$  de NaOH  $1,0 \text{ N}$  por ml, repetindo-se a leitura.

4ª leitura, determinação de proteína - 0,1 ml da mistura de incubação e 0,1 ml do sobrenadante após centrifugação, eram transferidos para solução de NaOH 0,1 N e feita a leitura de densidade óptica a 280m $\mu$ . A partir destes dados, calculou-se a quantidade percentual de proteína precipitada e remanescente em solução.

C) Análise das medidas nefelométricas: partículas de qualquer dimensão imersas em um meio líquido transparente causam mudança de direção dos raios luminosos devido às flutuações de densidade, e portanto, do índice de refração na massa líquida, causadas pelo movimento Browniano (Teoria de Smoluchowski-Einstein). Moléculas cujas dimensões estão abaixo de 1/20 do comprimento de onda do raio incidente, comportam-se como difusores pontuais e a intensidade dos raios dispersos é uniforme em qualquer ângulo de medição e em qualquer plano centrado na linha do raio incidente. As moléculas maiores, possuindo mais de um centro de difusão, podem dispersar o raio incidente com diferenças de fase, portanto causando extinção por interferência, especialmente nos ângulos de observação mais afastados do raio incidente. Por esta razão, a dispersão de luz é muito utilizada para o estudo de grandes moléculas e polímeros, podendo indicar sua concentração, massa molecular e formato (Tager, 1972; Vollmert, 1973; Longhurst, 1973; Tanford, 1961). Atualmente, a dispersão de luz monocromática, especialmente de finos feixes monocromáticos coerentes obtidos por fontes laser, é muito utilizada para quantificação da reação antígeno-anticorpo (Roitt, 1994) por sua extrema sensibilidade e capacidade de detectar mesmo a formação de complexos antígeno-anticorpo não precipitantes. A maioria destes métodos baseiam-se nas taxas ou velocidades de formação de complexos, e portanto, de incremento na dispersão de luz, medida a angulo fixo, em geral a 90°. Como exemplo, citamos o método de Hudson et al (1981).

As imunoglobulinas do soro de cavalo, mesmo após digestão péptica, como é o caso dos antivenenos ofídicos, desenvolvem com o antígeno em meio líquido uma reação que foi

denominada de “floculação” por Ramon (1922), e estudada quantitativamente por Pappenheimer & Robinson (1937). As características mais distintivas desta reação são: uma ampla zona de equivalência dentro da faixa de floculação, onde a quantidade formada de precipitado varia linearmente com a quantidade de antígeno adicionado; as transições abruptas para as zonas de excesso de anticorpo e antígeno; e, a transformação de flocos em complexos solúveis, tanto por excesso de antígeno, quanto anticorpo (Cohn & Pappenheimer, 1949; Cohn, 1952; Kabat & Mayer's, 1971).

Pelo fato dos venenos bothrópicos e seus antivenenos constituírem um sistema de múltiplos antígenos e anticorpos, a reação de floculação também depende de múltiplos sistemas de reação, nem sempre acontecendo na mesma velocidade. Assim, o registro contínuo das taxas de incremento da dispersão de luz mostrou-se complexo, errático, e portanto impraticável. Optamos por quantificar a reação em equilíbrio, 24 h após a incubação antígeno-anticorpo. Para tal tivemos que desenvolver critérios próprios de interpretação quantitativa, baseados nos conhecimentos clássicos das reações de imunoprecipitação e floculação.

A Fig. IV.2.7A representa o perfil clássico das curvas de floculação obtidas pelos autores citados. Na realidade, a curva obtida com um sistema de floculação poliespecífico, tem o mesmo formato, podendo apresentar bandas de equivalência mais largas, pelo fato de resultarem do somatório de várias outras (Fig. IV.2.7B).

Considerando:

$D_t$  = dispersão total (mV)

$F$  = dispersão pelos flocos ( $D_t$  – sobrenadante)

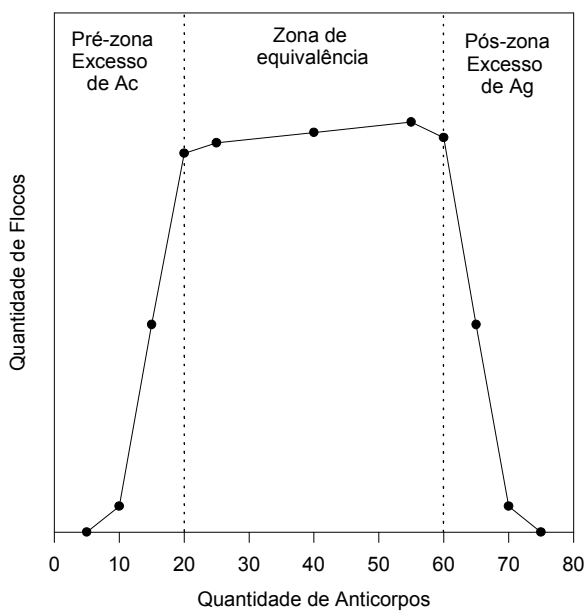
$CS$  = dispersão pelos complexos solúveis ( $S_{bnte} - R$ )

$R$  = dispersão residual ( $S_{bnte}$  em NaOH 0,1 N)

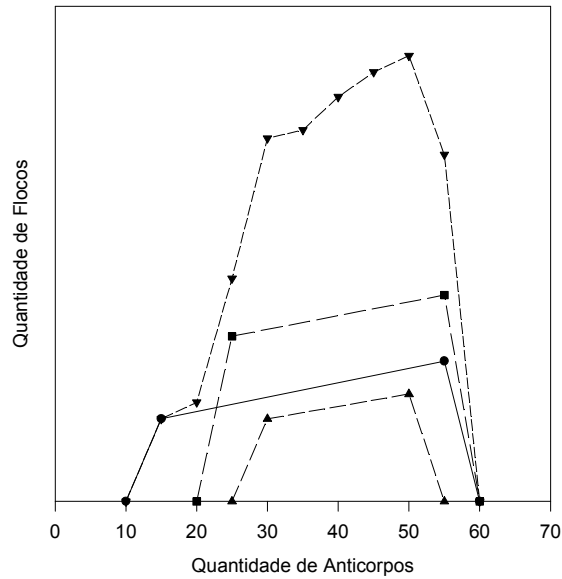
$R$  = Ag livre + Ac livre + outras proteínas

Equação de balanço:  $Dt = F + Cs + R$

**FIG.IV.2.7A -Curva de Flocculação – Antígeno puro / Anticorpos tipo H**



**FIG. IV.2.7B – Curva de floculação esperada – Sistema poliespecífico / Anticorpos tipo H**



Normalizando por  $Dt = F/Dt + Cs/Dt + R/Dt = 1$

Na zona de equivalência  $Ag$  e  $Ac$  livres = 0 e  $R$  = outras proteínas,

donde vem:

$R/Dt = C$ ; ou seja

**Na equivalência:  $F/Dt + CS/Dt = 1 - C$**

No excesso de  $Ag$ :  $\uparrow R/Dt$        $\downarrow CS/Dt$        $\uparrow F/Dt$

No excesso de  $Ac$ :  $\downarrow R/Dt$        $\uparrow CS/Dt$        $\downarrow F/Dt$

FIG.IV. 2.7C

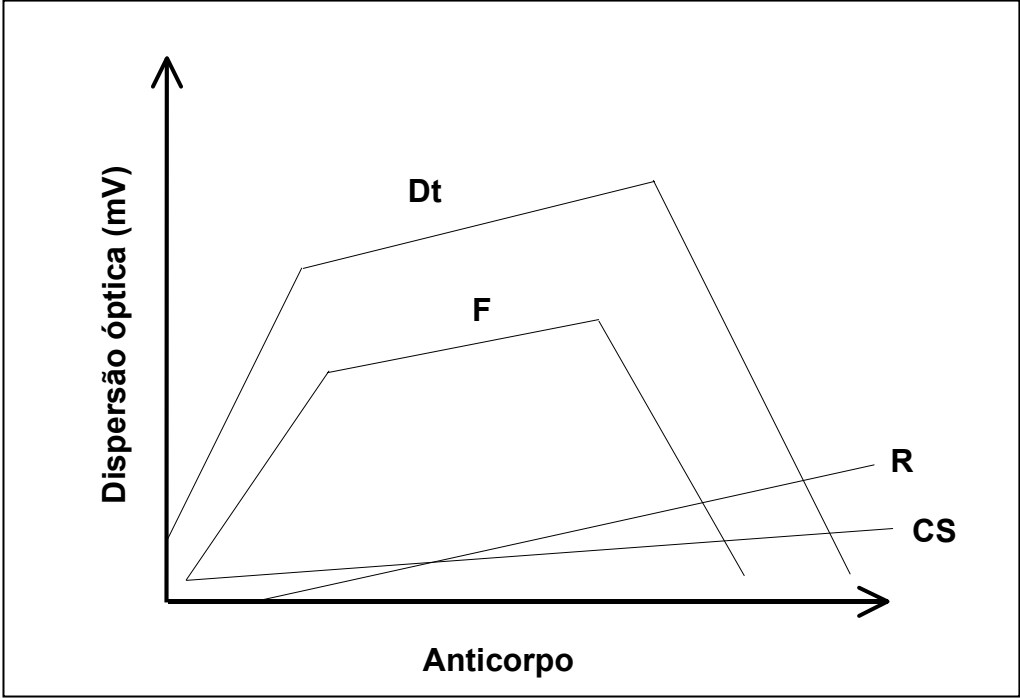
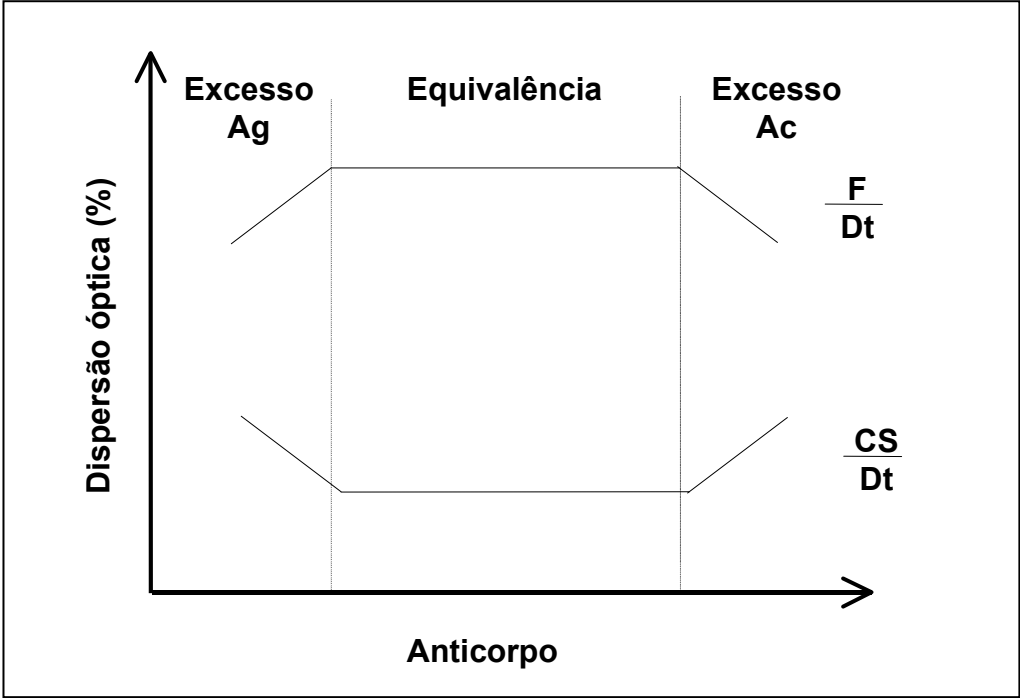


FIG.IV.2.7D



As figuras IV.2.7.C e D ilustram o comportamento esperados dos parâmetros medidos, sem e com normalização pela dispersão total. A abscissa está invertida em relação à figura clássica do comportamento zonal na imunoprecipitação e imunofloclulação, que partem de quantidade constante de anticorpo. Na condição presente, em que pretendíamos interpretar curvas de neutralização, partimos de quantidade constante de antígeno, ou desafio, porque o anticorpo de cavalo permite esta inversão.

#### **IV.2.8 - DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE DAS MISTURAS DE INCUBAÇÃO VENENO-ANTIVENENO.**

Utilizou-se densímetro Anton Paar, modelo DMA-602, com cubeta de 1,0 ml, termoestabilizada a  $20 \pm 0,01$  °C e que opera por ressonância acústica. A reprodutibilidade das medidas vai até a sexta casa após o grama. Cada determinação foi realizada em duplicata.

### IV.3 - RESULTADOS

---

Os dados apresentados nesta seção foram obtidos em associação com Luiz Carlos Timóteo Domingues de Carmo, Professor Carlos Ribeiro Diniz e David Toledo Velarde.

#### IV.3.1 - CURVAS DOSE-RESPOSTA DE ATIVIDADE HEMORRÁGICA E COMPARAÇÃO DE POTÊNCIAS ENTRE VENENOS POR ENSAIOS PARALELOS.

A fig. IV. 3. 1 A mostra a curva dose-resposta (CDR) para o veneno de *B. jararaca* nº 870502. Para esta curva foram agrupados 194 observações provenientes de um grande número de experimentos independentes e heterogêneos quanto à data e faixa de doses utilizadas. Nela pode-se observar uma relação linear entre o diâmetro ( $\varnothing$ ) médio das lesões hemorrágicas e o logaritmo da dose de veneno, entre 0,8 e 1,85 cm de  $\varnothing$  médio (região 1). Após o valor de 1,85 cm ocorreu mudança do coeficiente angular da reta (região 2). No gráfico da fig. V.3.1A as barras representam as variâncias ( $s^2$ ) dentro de cada nível de dose não excluídas as variações causadas pelas repetições em diferentes datas. A análise de variância da região 1, contendo 183 observações, mostrou regressão altamente significativa e desvio de linearidade muito pequeno, confirmando a adoção do modelo linear já sugerido pela inspeção visual. A mudança de coeficiente angular na região 2 da CDR também foi encontrada por Kondo et al (1960) para a atividade hemorrágica do *T. flavoviridis* (crotalidae), a partir de  $\varnothing$  médio de lesão 1,8 cm. Mais provavelmente, as CDRs de atividade hemorrágica representam em sua primeira região a ação dos HFs mais potentes, e na segunda, a interferência de enzimas fortemente proteolítica como a bothropasina (Mandelbaum et al, 1982); Queiroz et al, 1985a; Mandelbaum & Assakura, 1988).

As CDRs de *B. jararaca* para a referência FUNED 880530, Referência Nacional Bra/Bot/002 e a mistura de venenos bothrópicos (MVB), encontram-se nas fig. IV.3.1B, C e D, respectivamente. Cada uma destas corresponde a um único experimento em quadrado latino 6 x 5 ou 5 x 5, delineado exatamente para a obtenção de  $\Phi$  médios dentro da faixa linear. Em todos, a análise de variância e a inspeção visual mostrou um bom ajuste ao modelo linear.

As variâncias dentro da dose (erro amostral) das três últimas CDRs mostraram-se sensivelmente menores que a correspondente da fig. IV.3.1A, devido à diferença de delineamento. Na fig. IV.3.1A, a variância dentro da dose está inflada pelas contribuições “entre ratos”, “entre posições” e “entre diferentes experimentos” não eliminadas no cálculo. Os baixos valores para as variâncias “entre ratos” e “entre posições”, nas fig. IV.3.1B, C e D em comparação com a variância dentro da dose, refletem a padronização do animal e da técnica experimental. Em experimentos rotineiros, a adoção de uma análise mais simples, sem a computação “entre ratos” e “entre posições” não conduziria à elevação significativa da variância residual (erro amostral). Abaixo do gráfico de cada CDR está a equação de mínimos quadrados para a reta, necessária para o cálculo de interpolação e, parâmetros descritivos de uso corrente como DMH e coeficiente de ajuste linear (coeficiente de Pearson).

A comparação de potências hemorrágicas entre venenos, por meio de CDRs obtidas concomitantemente e em igualdade de condições, é o uso mais imediato de CDRs que preencham individualmente os critérios de validade fundamental e estatística. Sendo o  $\Phi$  médio da lesão hemorrágica proporcional ao log dose do veneno, o critério de similaridade exige o paralelismo. Nos experimentos ilustrados nas fig. IV.3.1E a G, dois venenos distintos

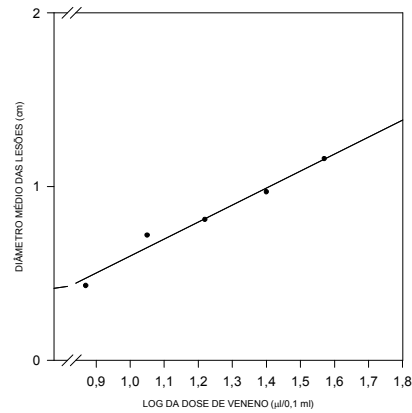


**FIG. IV.3.1C**

Ref. Nacional B.j. Bra/Bot/002

Delineamento experimental:

Quadrado Latino 6 x 5



Equação da reta:  $\varnothing(\text{cm}) = 0,97 \cdot \log(\mu\text{g de ven.}/0,1\text{ml}) - 0,36$ . Cada ponto representa a média de 5 determinações.  
DMH = 26,8 (20,2 - 35,7)  $\mu\text{g}/0,1 \text{ ml}$ .  $p < 0,05$ .  $r = 0,9963$ . Limite mínimo de detecção = 2,35  $\mu\text{g}$  de veneno

## ANÁLISE DE VARIÂNCIA

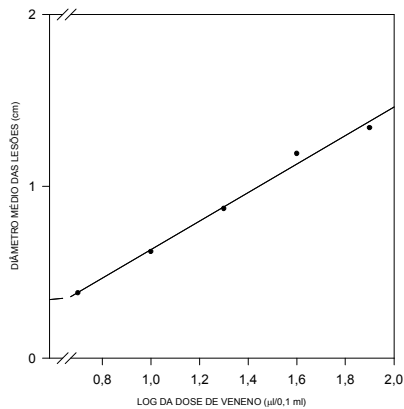
FONTE DE VARIAÇÃO	SOMA DE QUADRADOS	G. L.	QUADRADO MÍNIMO	F calculado	F crit ( $p < 0,05$ )
Entre ratos	0,1007	5	0,0201	0,35	2,90
Entre posições	0,1532	5	0,0306	0,53	2,90
Regressão	1,7509	1	1,7509	30,50	4,54
Desvio de linearidade	0,0466	3	0,1553	0,27	3,29
Dentro da dose	0,8603	15	0,0574		
Total	2,9117	29			

**FIG. IV.3.1D**

Mistura de venenos botrópicos

Delineamento experimental:

Quadrado Latino 5 x 5



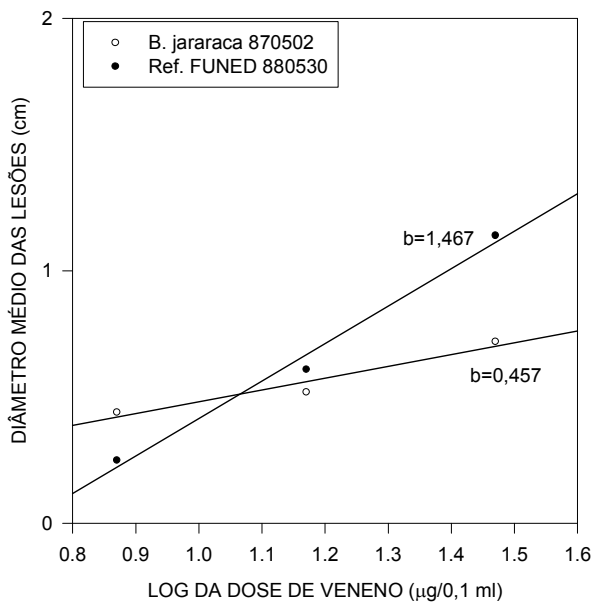
Equação da reta:  $\varnothing(\text{cm}) = 0,84 \cdot \log(\mu\text{g de ven.}/0,1\text{ml}) - 0,19$ . Cada ponto representa a média de 5 determinações.  
DMH = 27,4 (17,9 - 41,8)  $\mu\text{g}/0,1 \text{ ml}$ ,  $p < 0,05$ .  $r = 0,9820$ . Limite mínimo de detecção = 1,68  $\mu\text{g}$  de veneno.

## ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FONTE DE VARIAÇÃO	SOMA DE QUADRADOS	G. L.	QUADRADO MÍNIMO	F calculado	F crit ( $p < 0,05$ )
Entre ratos	0,3754	4	0,0938	0,96	3,26
Entre posições	0,0269	4	0,0067	0,07	3,26
Regressão	3,2002	1	3,2002	32,62	4,75
Desvio de linearidade	0,0212	3	0,0071	0,07	3,49
Dentro da dose	1,1767	12	0,0981		
Total	4,4625	24			

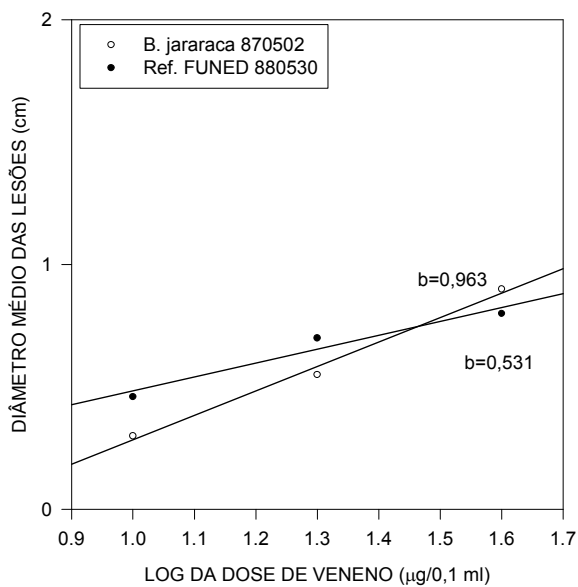
**COMPARAÇÃO DAS POTÊNCIAS HEMORRÁGICAS DE VENENOS DE *B. jararaca* EM ENSAIOS PARALELOS NO RATO. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL: 3 X 3. EM QUADRADO LATINO 6 X 6, 6 X 5 E 6 X 3.**

**FIG. IV.3.1E**



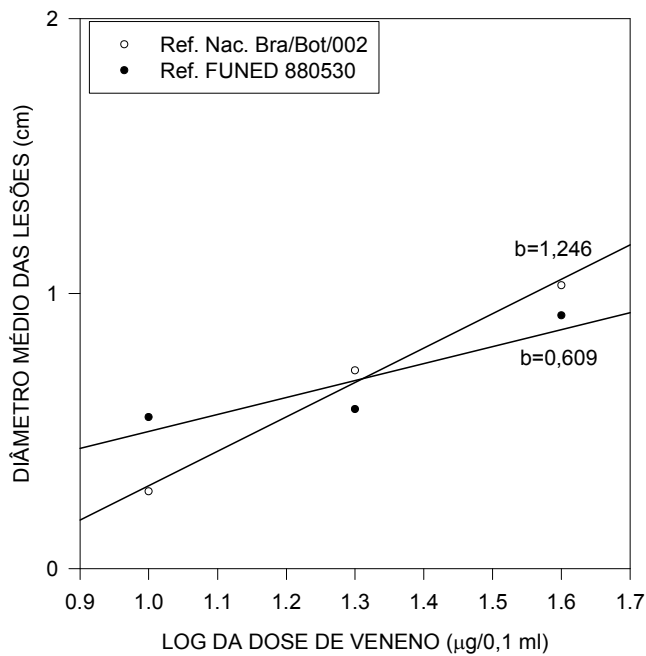
Fonte de Variação	G.L.	Quadrado Mínimo	F
Preparação	1	0,1167	2,91
Regressão	1	2,0124	50,26*
Paralelismo	1	0,5550	13,86*
Linearidade	2	0,0218	0,50
Entre ratos	5	0,0371	0,93
Dentro da dose	25	0,0400	
Total	35		

**FIG. IV.3.1F**



Fonte de Variação	G.L.	Quadrado Mínimo	F
Preparação	1	0,0041	0,10
Regressão	1	1,0123	25,24*
Paralelismo	1	0,0845	2,11
Linearidade	2	0,0143	0,36
Entre ratos	4	0,0747	1,86
Dentro da dose	20	0,0401	
Total	29		

FIG. IV.3.1G



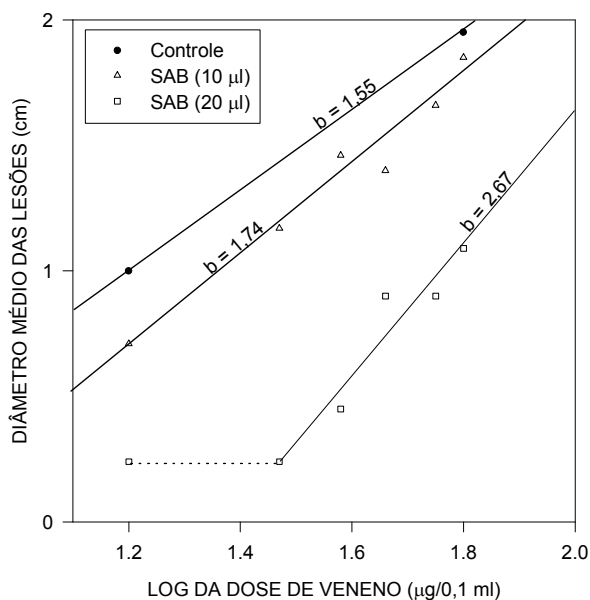
Fonte de Variação	G.L.	Quadrado Mínimo	F
Preparação	1	0,0001	0,002
Regressão	1	0,9274	16,95*
Paralelismo	1	0,1181	2,15
Linearidade	2	0,0259	0,47
Entre ratos	2	0,2184	3,99
Dentro da dose	11	0,0555	
Total	18		

foram ensaiados sobre os mesmos animais em três doses, sendo as regressões altamente significativas e os desvios de linearidade não significativos. Dos três ensaios, um não satisfaz nitidamente o critério de paralelismo, enquanto nos dois restantes, paralelismo pode ser aceito ao nível de  $\alpha 0,10$ . De fato, a inspeção visual mostrou cruzamento entre as linhas de regressão dentro da faixa experimental. Considerando que as variâncias residuais foram baixas e o delineamento correto, sem heterogeneidade significativa de sensibilidade entre animais, desvios significativos de paralelismo poderiam ser demonstrados por uma expansão de  $S_{xx}$  à custa de intercalamento de doses, já que a amplitude da abscissa está em seus limites.

### IV.3.2 - ALTERAÇÕES DA CDR DE ATIVIDADE HEMORRÁGICA DO VENENO PELO ANTIVENENO (PROCEDIMENTO $\alpha$ ).

No experimento mostrado na fig IV.3.2, a CDR hemorrágica do veneno *B.j.* 870502 (Fig. IV.3.1A) foi comparada a duas outras CDRs do mesmo veneno, nas quais cada dose foi incubada previamente com volume constante de antiveneno. Apesar da variância residual alta, o desvio de paralelismo pode ser detectado, devido à sua intensidade.

**FIG. IV.3.2** - Efeito do AB-FUNED 881122 sobre o coeficiente angular da cdr-hemorrágica do veneno de *B. jararaca* 870502. Delineamento experimental: quadrado latino 6 x 6.



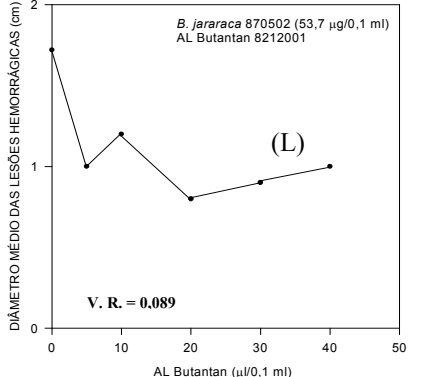
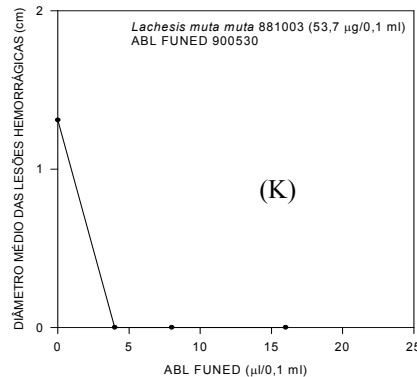
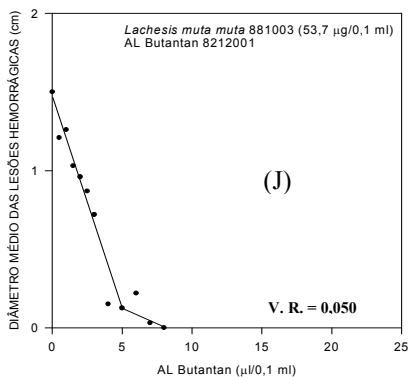
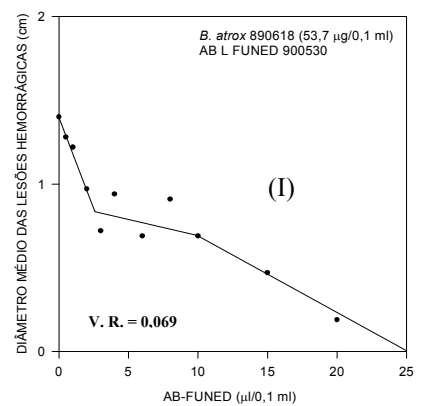
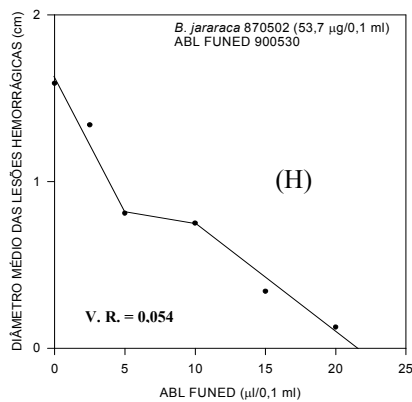
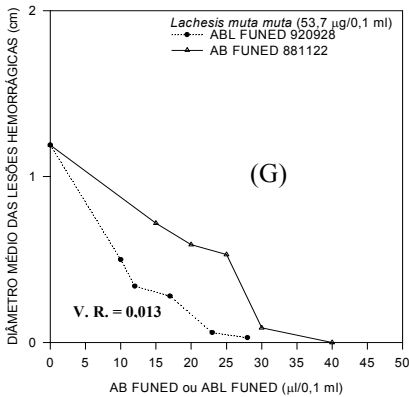
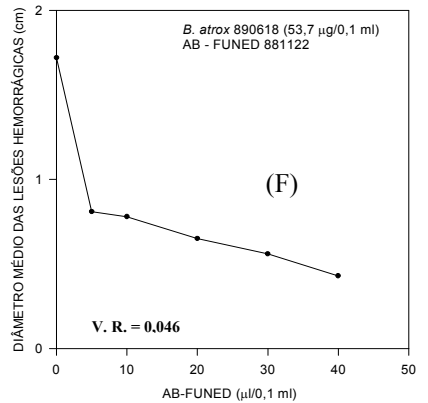
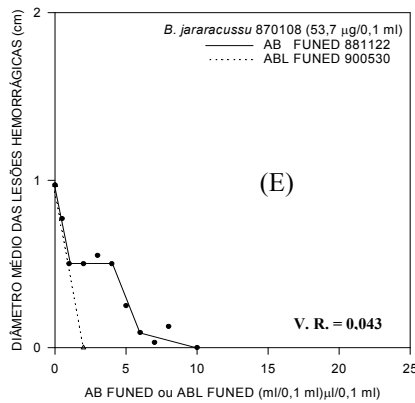
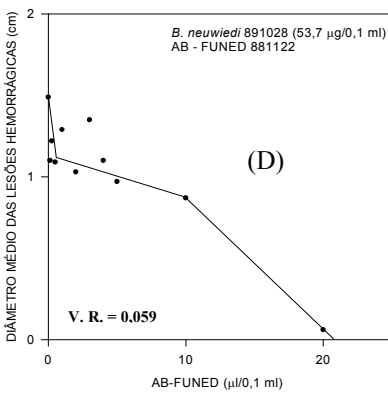
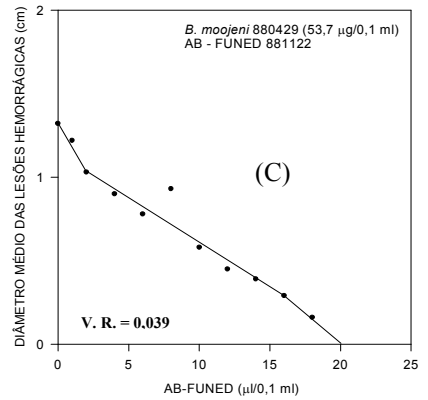
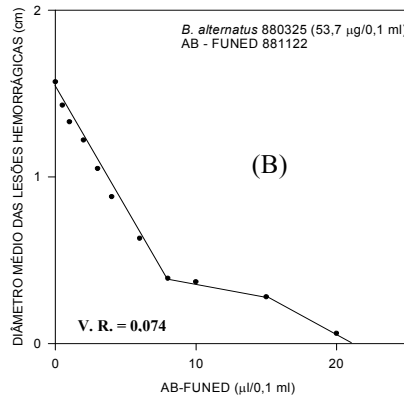
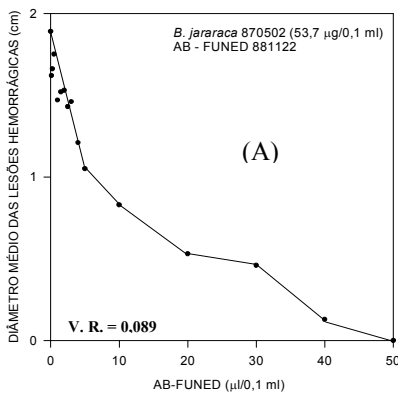
G.L.      Q.M.

Desvio de paralelismo	2	3,85*
Dentro da dose	225	0,1151

### IV.3.3 - CURVAS DE NEUTRALIZAÇÃO DE UM DESAFIO FIXO DE VENENO PELO ANTIVENENO (PROCEDIMENTO $\beta$ ).

A curva de neutralização de um antígeno biologicamente ativo por um soro hiperimune, corresponde ao estabelecimento empírico de uma relação entre a regressão da intensidade inicial da resposta com a dose ou concentração do soro. O nível de desafio foi escolhido em 53,7  $\mu\text{g}$  para o *B. j.* 870502, através da CDR (fig. IV.3.1A) no limite extremo da linearidade. O mesmo desafio, em massa, foi estendido arbitrariamente para os demais venenos. O experimento básico para a obtenção destas curvas foi o quadrado latino 6 x 6 ou 6 x 5, onde um ponto corresponde ao desafio e os demais à mistura prévia deste, com diferentes quantidades de antiveneno. Para as curvas apresentando mais de 6 pontos, dois ou três experimentos (6 x 6 ou 6 x 5), foram conduzidos em paralelo, sendo as respostas ao desafio agrupadas em uma única média. As curvas IV.3.3 A-L mostram os resultados para diferentes venenos e antivenenos. Cada ponto representa a média de 6 determinações. A análise de variância foi conduzida segundo o modelo mais simples, isto é, uma única variável de classificação, o que permitiu controlar a qualidade dos resultados e da técnica experimental pela variância “dentro da dose” ou variância residual (V. R.). Com a exceção da curva L, onde o AL-Butantã neutralizou apenas parcialmente o *B. j.* 870502, ocorreu nas demais redução progressiva mas não proporcional, do  $\Phi$  médio da lesão hemorrágica, em função da quantidade de antiveneno, até a extinção total da resposta. Morfologicamente, estas curvas se apresentaram heterogêneas e sem qualquer possível eixo de simetria. No intuito de facilitar a descrição, foram agrupadas em três classes:

**FIG. IV.3.3-Curvas de neutralização da atividade hemorrágica de venenos bothrópicos e laquétrico pelo antivenenos.**



- 1<sup>a</sup>: neutralização total da atividade hemorrágica sob consumo mínimo de antiveneno (volumes < 5 µl). O primeiro exemplo é a curva E2 onde 53,7 µg de um veneno de *B. jararacussu* 8701108 foram totalmente neutralizados por apenas 2 µl (175 µg de proteína) do ABL FUNED 900530. Em segundo lugar, a neutralização de 53,7 µg de *L. m. muta* 881003 por 4 µl do mesmo antiveneno (curva K) e a neutralização de 53,7 mg de *B. jararacussu* 91002 por 4 µl do AB 920928 (curva não mostrada). Nestas, o  $\Phi$  médio de partida e o valor zero, estão unidos, portanto sendo possível que o uso de doses menores de antiveneno pudesse mostrar uma linha mais complexa.
- 2<sup>a</sup>: Neutralização total da atividade hemorrágica sob consumo intermediário de antiveneno (volume > 5 µl e < 10 µl). O protótipo deste tipo é a curva J onde o veneno de *L. m.muta* foi inativado pelo AL-Butantã. Pode-se observar uma primeira região da curva, onde ocorre linearmente uma intensa redução do  $\emptyset$  médio da lesão ( até 87 % de redução) em função da quantidade de antiveneno. A seguir, uma segunda região de inclinação mais baixa até a inativação final da resposta. Outras curvas de neutralização desta classe não apresentadas na fig. IV.3.3 foram:

Veneno	Antiveneno
<i>B. moojeni</i> 920523	AB-FUNED 881122
<i>B. moojeni</i> 920523	AB-FUNED 920929
M.V.B.	AB-FUNED 920929
<i>B. moojeni</i> 889429	ABL-FUNED 900530

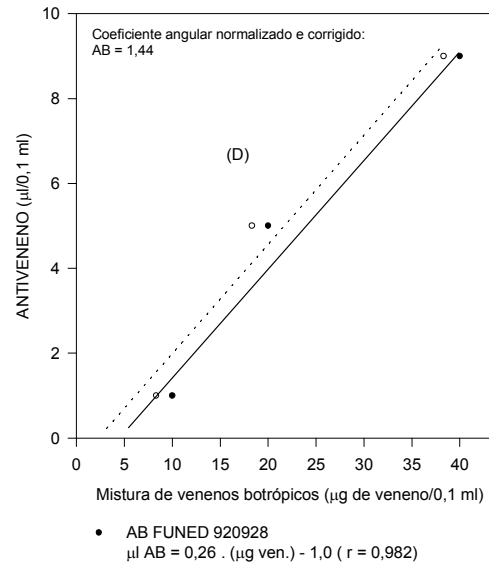
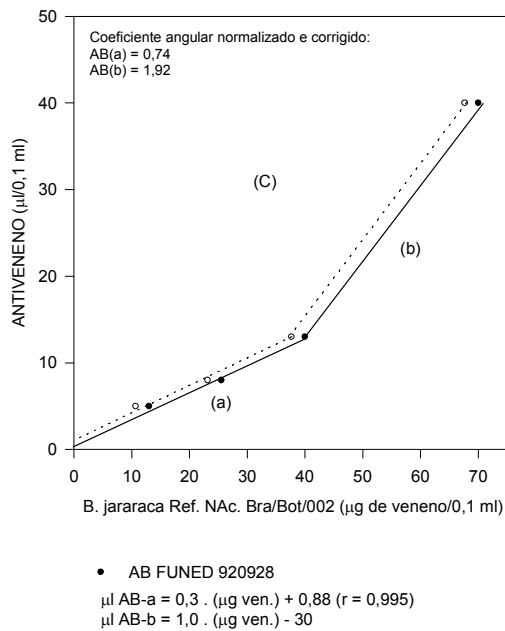
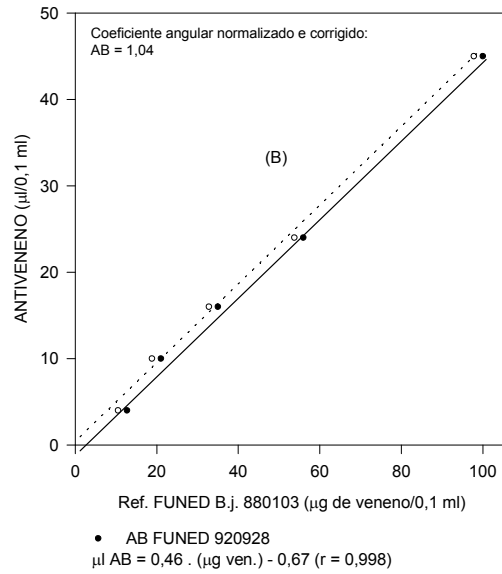
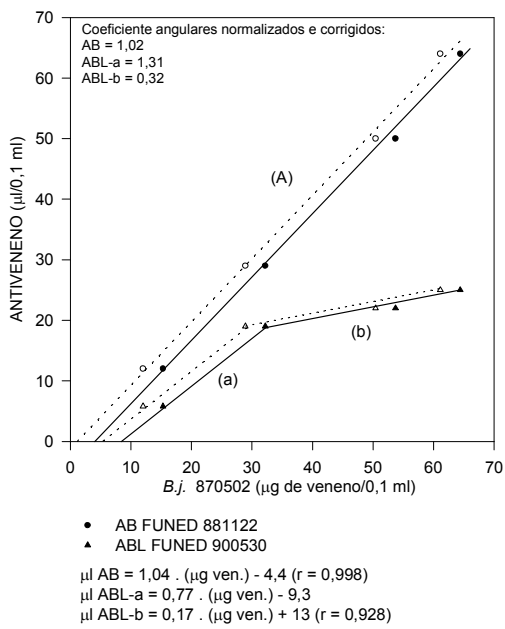
- 3<sup>a</sup>: neutralização total da atividade hemorrágica sob alto consumo de antiveneno (volumes > 10 µl): nesta classe enquadraram-se a maioria das curvas da fig IV.3.3 e são aquelas que apresentaram pelo menos três regiões: uma região inicial de declividade mais alta; uma região intermediária de menor declividade ou mesmo horizontal como na curva E; e, uma região final onde a inativação total era atingida.

#### IV.3.4 - RELAÇÃO ENTRE DESAFIO E A QUANTIDADE DE ANTIVENENO PARA NEUTRALIZAÇÃO TOTAL DA ATIVIDADE HEMORRÁGICA – “LEI DOS MÚLTIPLOS DE PROPORÇÃO”.

Estas foram aqui denominadas curvas “euteriáticas” ou curvas de equivalência ou funcional, porque em cada nível de desafio, a quantidade de antiveneno era justamente o suficiente para extinção da resposta biológica, não tendo, portanto, o significado de equivalência imunoquímica. O experimento padrão para a obtenção de cada ponto de equivalência foi o quadrado latino 6 x 6 com cinco doses de antiveneno e um controle de veneno puro. A diferença deste experimento para os da curva de neutralização, é que neste caso, as doses de antiveneno foram alocadas em torno da expectativa prévia para inativação total, com o objetivo de determinar precisamente este ponto e não o delineamento de toda a curva. Na fig. IV.3.4, pode-se verificar que três das cinco relações de equivalência funcional mostraram excelente ajuste linear, enquanto em dois casos, a inspeção visual indicou a existência de dois segmentos lineares designadas a e b. As equações para as relações lineares e os segmentos apontados, anotados abaixo de cada figura, foram utilizadas para o cálculo das expectativas de consumo de antiveneno a partir do equivalente de *B. jararaca* (vide secções IV.2.6 e IV.3.5).

Para cada valor de abscissa nestas figuras foi representado o seu valor corrigido pelo limite mínimo de detecção (símbolos vazios) e, a partir destes, recalculadas as regressões. Os coeficientes angulares normalizados destas curvas mostraram que os pares B. j. 870502 & AB-FUNED881122 e B. j. R.F880103 & AB-FUNED 920928, preencheram as expectativas da “Lei dos Múltiplos de Proporção”, dentro da faixa experimental de concentrações.

**FIG. IV.3.4 – Relação entre desafio de veneno bruto e a quantidade de antiveneno para neutralização total da atividade hemorrágica**



..... valores corrigidos pelo limite mínimo de detecção

#### **IV.3.5 - O VENENO DE *B. jararaca* COMO REFERÊNCIA PARA AFERIÇÃO DA POTÊNCIA ANTI-HEMORRÁGICA DOS ANTIVENENOS, FRENTE AOS VENENOS DAS ESPÉCIES COMPONENTES DA MISTURA IMUNOGÊNICA BOTHRÓPICA - SUBSTITUIÇÃO DE REFERÊNCIAS - EQUIVALÊNCIA ANTIGÊNICA.**

Para a situação enunciada pelo título desta seção, a referência de *B. jararaca* deveria cumprir as funções de padrão funcional e antigênico (vide quadros I.5.5B e I). Um dos acessos experimentais ao problema, seria nas curvas de neutralização (seção IV.3.3) partir sempre do mesmo  $\Phi$  médio de lesão, para os diferentes venenos bothróticos, supondo que esta igualdade pudesse significar quantidades iguais de fatores hemorrágicos a serem neutralizadas. A adoção desta abordagem, demandaria ensaios paralelos entre os diversos venenos e cálculo das doses equipotentes. Sabendo pelos resultados da seção IV.3.1 E, F e G, que o dispêndio adicional de animais e insumos não seria justificado, optamos pelo cálculo das doses equipotentes, simplesmente por interpolação de dados nas CDRs já disponíveis (vide seção IV.2.6A). Assim, para as tabelas IV.3.5A - F, os volumes de antivenenos para neutralização total de quantidade fixa de cada veneno, foram determinados em experimento 6 x 6 (5 doses e 1 controle). Estes volumes de antiveneno para neutralização total correspondem nas tabelas à coluna “Experimental” e, os  $\Phi$  médios das lesões obtidas sem antiveneno (controle = média de 6 determinações) à coluna sob o mesmo título. Os  $\Phi$  médios das lesões produzidas por cada veneno foram então interpolados na CDR do veneno de referência que consta do cabeçalho de cada tabela (fig. IV.3.1A-D), e os “equivalentes de *B. jararaca*”, obtidos. Com estes últimos valores (Eq. de *B. jararaca*), obteve-se na curva de equivalência funcional correspondente ao par veneno-antiveneno de cada tabela, uma estimativa de consumo de antiveneno para neutralização total de cada veneno, que foram

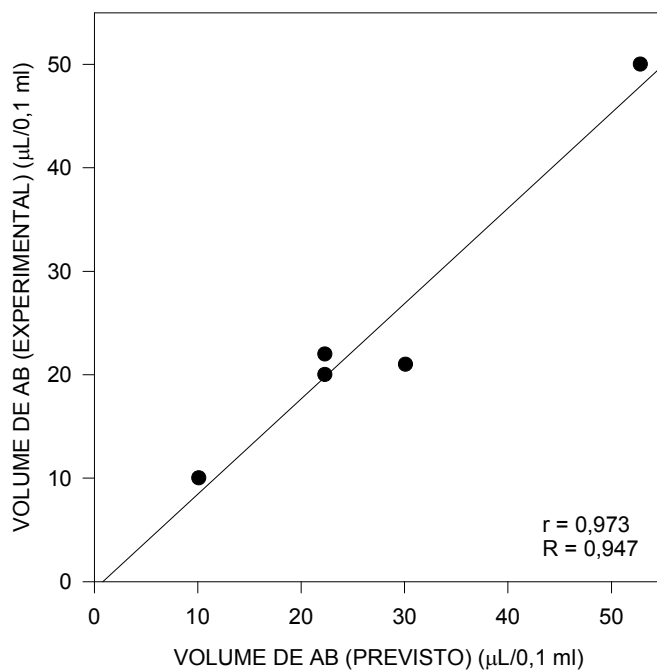
**TABELA IV.3.5A** - Previsão do consumo de AB-FUNED 881122 para neutralização total de 53,7 µg/0,1 ml de venenos botrópicos, através da transformação para dose equihemorrágica de *B. jararaca* 870502.

VENENOS	DIÂMETRO MÉDIO DAS LESÕES (cm)	EQUIVALENTE DE <i>B. jararaca</i> (µg)	µl DE AB-FUNED	
			PREVISTO	EXPERIMENTAL
<i>B. jararacussu</i> 870108	0,97	13,9	10,1	10
<i>B. moojeni</i> 880429	1,38	25,7	22,3	20
<i>B. alternatus</i> 880325	1,38	25,8	22,3	22
<i>B. neuwiedi</i> 891028	1,55	33,2	30,1	21
<i>B. jararaca</i> 870502	1,89	55,2	52,8	50
<i>B. atrox</i> 890618	1,73	43,4	40,7	>40*
<i>L. m. muta</i> 881003	1,18	19,2	15,6	40**

\*-neutralização parcial, não entra no cálculo da correlação

\*\*-apesar da neutralização ter sido total, este valor não entra nos cálculos por se tratar de gênero diferente

**FIG.IV.3.5A** - Correlação entre os valores de AB-FUNED 881122 previsto e experimental para neutralização total do veneno de *B. jararaca* 870502



então colocadas na coluna “Previsto”. A correlação entre os valores “Previstos” e os “Experimentais” foram então determinadas e ilustradas graficamente abaixo de cada tabela (fig IV.3.5A - F). O procedimento acima descrito não é o único possível ou adequado. Poderíamos, partindo dos volumes de antiveneno para neutralização total de cada veneno, entrar na curva de equivalência funcional daquele antiveneno com a referência de *B. jararaca* e calcular o equivalente antigênico em termos de massa da referência. Este último valor seria então correlacionado com a coluna de “equivalente de *B. j.*” para igual  $\Phi$  médio de lesão. Em todo o caso, os dois procedimentos são matematicamente e conceitualmente equivalentes, exceto nos casos das curvas de equivalência funcional com dois segmentos, onde pode ocorrer histerese.

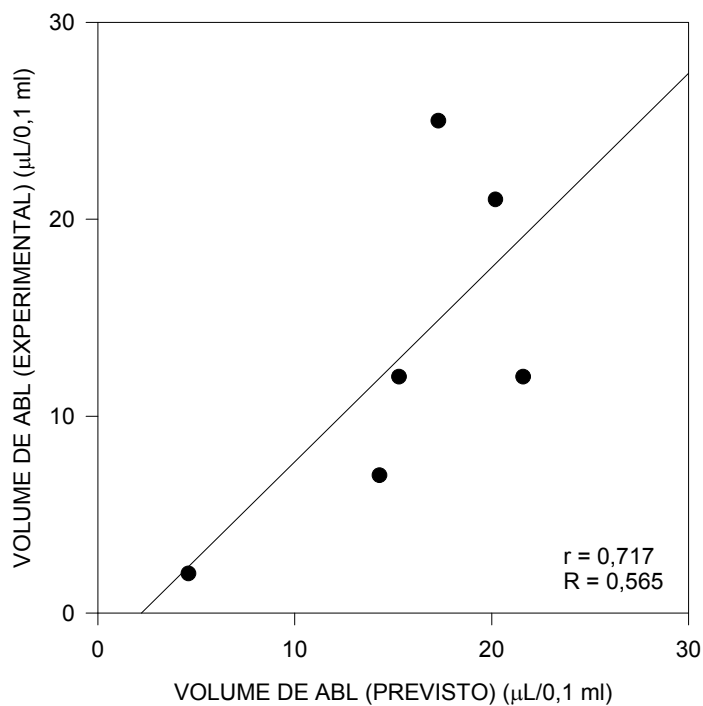
As fig. IV.3.5A e B contêm os resultados do 1º ciclo de comparações, porque o conjunto de venenos e o veneno de referência são os mesmos. O AB-FUNED 881122 (Fig. IV.3.5A), cuja mistura imunogênica não contém *B. atrox* (vide seção IV.2.2), conduziu a resultados excelentes em termos de previsibilidade de consumo de antiveneno (equivalência antigênica), permitindo um grau de acerto de 94,7 %, dado pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ). Ainda no 1º ciclo, o ABL-FUNED 920530 no qual o veneno de *B. atrox* corresponde a 50 % da mistura imunogênica, conduziu a uma previsibilidade insatisfatória (56 %) - fig. IV.3.5B). Para o 2º ciclo, o AB-FUNED 881122 e o *B. jararaca* 870502 foram mantidos, enquanto todo o conjunto de venenos bothrópicos foi substituído. A previsibilidade do consumo de antiveneno foi de apenas 40 % (Tabela e fig. IV.3.5C) . Deve-se notar que a partir do 2º ciclo, a massa de veneno utilizada foi arredondada para 50  $\mu$ g por volume de inoculação. O 3º ciclo (Tab. E fig. IV.3.5D) manteve o mesmo conjunto de venenos bothrópicos que o 2º ciclo, passando o antiveneno ao AB-FUNED 920928 (não

**TABELA IV.3.5B** - Previsão do consumo de ABL-FUNED 900530 para neutralização total de 53,7 µg/0,1 ml de venenos botrópicos, através da transformação para dose equihemorrágica de *B. jararaca* 870502.

VENENOS	DIÂMETRO MÉDIO DAS LESÕES (cm)	EQUIVALENTE DE <i>B. jararaca</i> (µg)	µl DE ABL-FUNED	
			PREVISTO	EXPERIMENTAL
<i>B. jararacussu</i> 870108	0,96	13,9	1,4	2
<i>B. moojeni</i> 880429	1,32	23,6	8,9	7
<i>B. alternatus</i> 880325	1,35	24,6	9,7	12
<i>B. neuwiedi</i> 891028	1,50	30,9	14,5	12
<i>B. jararaca</i> 870502	1,71	42,2	20,2	21
<i>B. atrox</i> 890618	1,40	26,6	11,2	25
<i>L. m. muta</i> 881003	1,32	23,6	8,0*	4*

\* - não usados na correlação

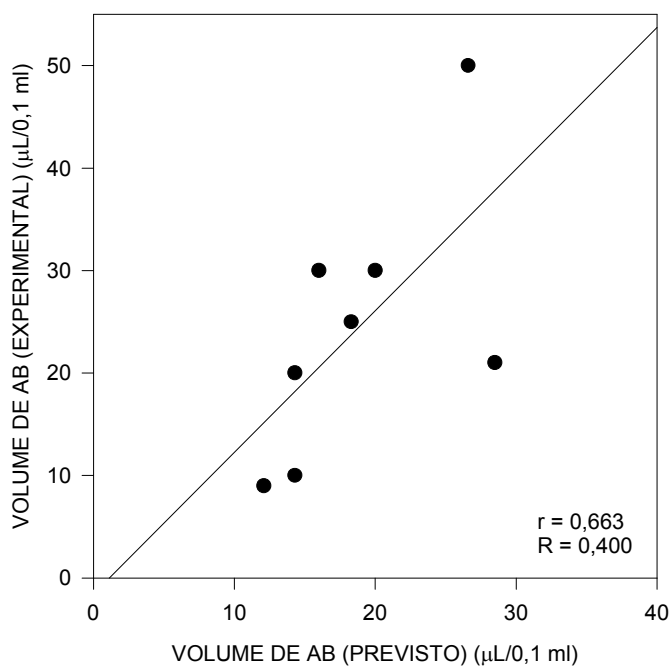
**FIG.IV.3.5** - Correlação entre os valores de ABL-FUNED 900530 previsto e experimental para neutralização total do veneno de *B. jararaca* 870502



**TABELA IV.3.5C** - Previsão do consumo de AB-FUNED 881122 para neutralização total de 50,0 µg/0,1 ml de venenos botrópicos, através da transformação para dose equihemorrágica de *B. jararaca* 870502

VENENOS	DIÂMETRO MÉDIO DAS LESÕES (cm)	EQUIVALENTE DE <i>B. jararaca</i> (µg)	µl DE AB-FUNED	
			PREVISTO	EXPERIMENTAL
<i>B. jararacussu</i> 921002	1,07	16,3	12,6	9
<i>B. moojeni</i> 920523	1,15	18,4	14,7	10
<i>B. alternatus</i> 921103	1,15	18,4	14,7	20
<i>B. atrox</i> 920716	1,21	20,1	16,5	30
<i>B. jararaca</i>	1,28	22,3	18,8	25
Ref. FUNED 920105				
<i>B. jararaca</i> 920412	1,33	24,0	20,6	30
<i>B. jararaca</i>	1,49	30,5	27,3	50
Ref. FUNED 880102				
<i>B. neuwiedi</i> 920915	1,53	32,3	29,2	21

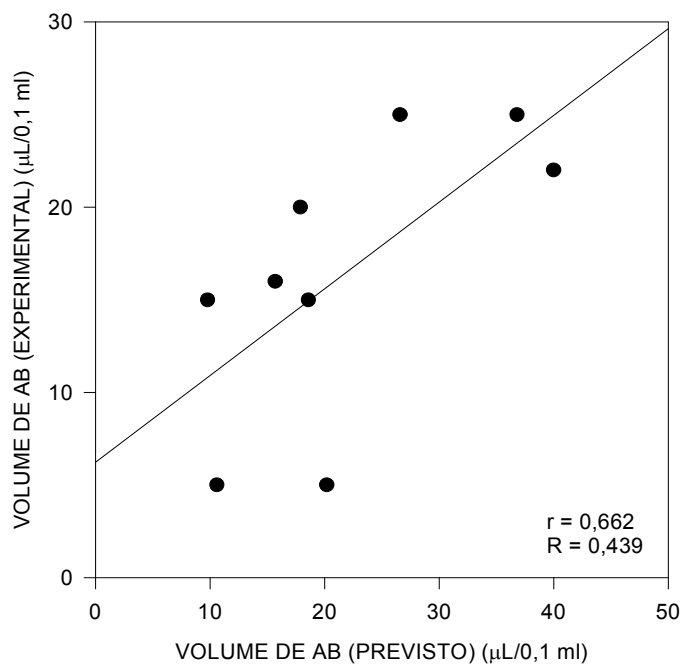
**FIG. IV.3.5C-** Correlação entre os valores de sab-FUNED 881122 previsto e experimental para neutralização total do veneno de *B. jararaca* 870502



**TABELA IV.3.5D** - Previsão do consumo de AB-FUNED 920928 para neutralização total de 50,0 µg/0,1 ml de venenos botrópicos, através da transformação para dose equihemorrágica de *B. jararaca* Ref Nacional Bra/Bot/002.

VENENOS	DIÂMETRO MÉDIO DAS LESÕES (cm)	EQUIVALENTE DE <i>B. jararaca</i> (µg)	µl DE AB-FUNED	
			PREVISTO	EXPERIMENTAL
<i>B. alternatus</i> 921103	1,07	29,8	9,8	15
<i>B. jararacussu</i> 921002	1,2	40,6	10,6	5
<i>B. jararaca</i>				
Ref. Nac. 002	1,25	45,7	15,7	16
<i>B.jararaca</i> 920412	1,27	47,9	17,9	20
<i>B. neuwiedi</i> 920915	1,29	50,2	18,6	15
<i>B. moojeni</i> 920523	1,34	56,6	20,2	5
<i>B. atrox</i> 920716	1,36	59,3	26,6	25
<i>B. jararaca</i>				
Ref. FUNED 880103	1,41	66,8	36,8	25
<i>B. jararaca</i>				
Ref. FUNED 920105	1,43	70,0	40,0	22

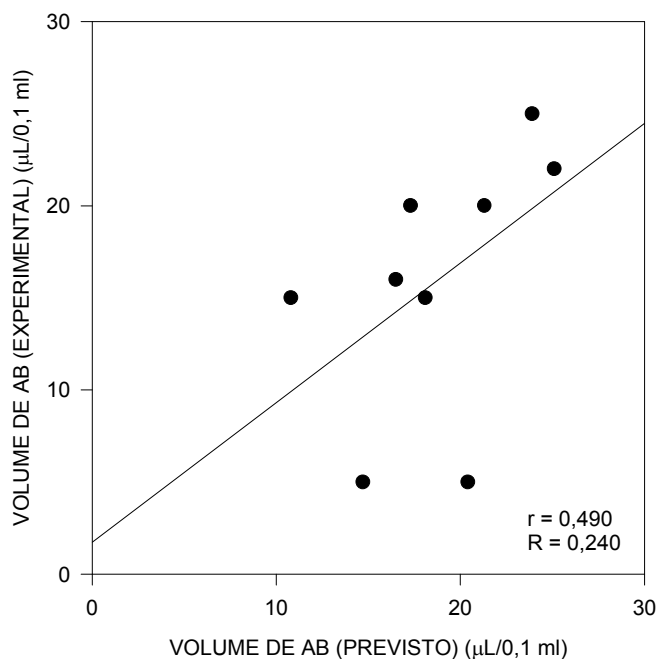
**FIG.IV.5.D** - Correlação entre os valores de AB-FUNED 920928 previsto e experimental para neutralização total do veneno de *B. jararaca* Ref. Nacional Bra/Bot/ 002



**TABELA IV.5.3E** - Previsão do consumo de AB-FUNED 920928 para neutralização total de 50,0 µg/0,1 ml de venenos botrópicos, através da transformação para dose equihemorrágica de *B. jararaca* Ref. FUNED 880103

VENENOS	DIÂMETRO MÉDIO DAS LESÕES (cm)	EQUIVALENTE DE <i>B. jararaca</i> (µg)	µl DE AB-FUNED	
			PREVISTO	EXPERIMENTAL
<i>B. alternatus</i> 921103	1,07	24,9	10,8	15
<i>B. jaracussu</i> 921002	1,2	33,4	14,7	5
<i>B. jararaca</i> 920412	1,27	39,1	17,3	20
<i>B. jararaca</i>				
Ref. Nac. 002	1,25	37,3	16,5	16
<i>B. neuwiedi</i> 920915	1,29	40,9	18,1	15
<i>B. moojeni</i> 920523	1,34	45,7	20,4	5
<i>B. atrox</i> 920716	1,36	47,8	21,3	20
<i>B. jararaca</i>				
Ref. FUNED 880103	1,41	53,5	23,9	25
<i>B. jararaca</i>				
Ref. FUNED 920105	1,43	56,0	25,1	22

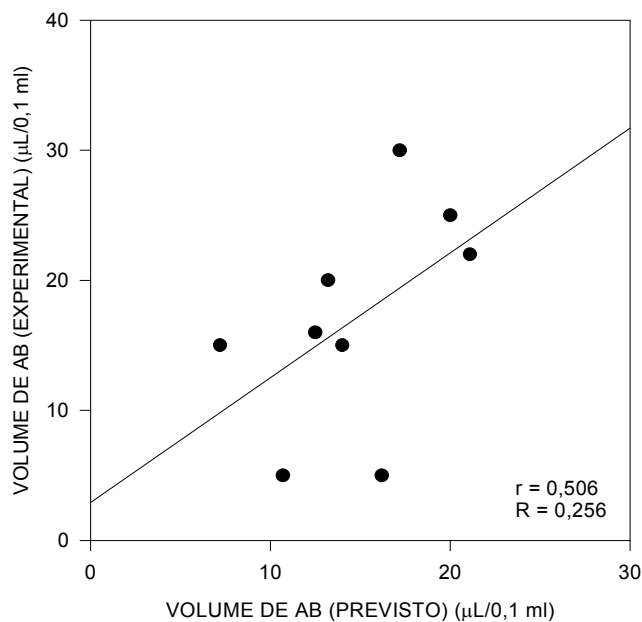
**FIG. IV.3.5.E** - Correlação entre os valores de AB-FUNED 900928 previsto e experimental para neutralização total do veneno de *B. jararaca* ref. FUNED 880103.



**TABELA IV.3.5F** - Previsão do consumo de AB-FUNED 920928 para neutralização total de 50,0 µg/0,1 ml de venenos botrópicos, através da transformação para dose equihemorrágica da mistura de venenos botrópicos

VENENOS	DIÂMETRO MÉDIO DAS LESÕES (cm)	EQUIVALENTE DE M.V.B. (µg)	µl DE SAB-FUNED	
			PREVISTO	EXPERIMENTAL
<i>B. alternatus</i> 921103	1,07	31,6	7,2	15
<i>B. jararacussu</i> 921002	1,2	45,2	10,7	5
<i>B. jararaca</i> Ref. Nac. 002	1,25	51,8	12,5	16
<i>B.jararaca</i> 920412	1,27	54,7	13,2	20
<i>B. neuwiedi</i> 920915	1,29	57,8	14,0	15
<i>B. moojeni</i> 920523	1,34	66,3	16,2	5
<i>B. atrox</i> 920716	1,36	70,0	17,2	30
<i>B. jararaca</i> Ref. FUNED 880103	1,41	80,3	20,0	25
<i>B. jararaca</i> Ref. FUNED 920105	1,43	84,8	21,1	22

**FIG. IV3.5F** - Correlação entre os valores de AB-FUNED 900928 previsto e experimental para neutralização total da mistura de venenos botrópicos.



produzido com *B. atrox* na mistura imunogênica) e o veneno de comparação a Ref. Nacional BRA-BOT-002. A previsibilidade foi 43,9 %. Para o 4º e o 5º ciclos (Tabs e fig IV.3.5E e F), o conjunto de venenos bothrópicos foi mantido, como também o AB-FUNED 920928, enquanto se utilizou o Ref. FUNED *B. jararaca* 880103 e a “Mistura de Venenos Bothrópicos” respectivamente, como venenos de comparação, obtendo-se 24 % e 25,6 % de previsibilidade.

Nos cinco ciclos de comparação, a correlação foi investigada entre colunas, porque se procurou medir a influência de veneno de referência em cada ciclo, na previsibilidade do consumo de um antiveneno bothrópico. Para responder em que montante o veneno de cada espécie contribuiu para a previsibilidade ou imprevisibilidade, foram pesquisadas as correlações por espécie, ou horizontalmente. Os resultados na tabela IV.3.5G mostraram que, em se usando uma referência de *B. jararaca* ou “Mistura Imunogênica Bothrópica”, somente os venenos de *B. alternatus* e *B. newiedi* foram neutralizados por quantidade previsível de antiveneno.

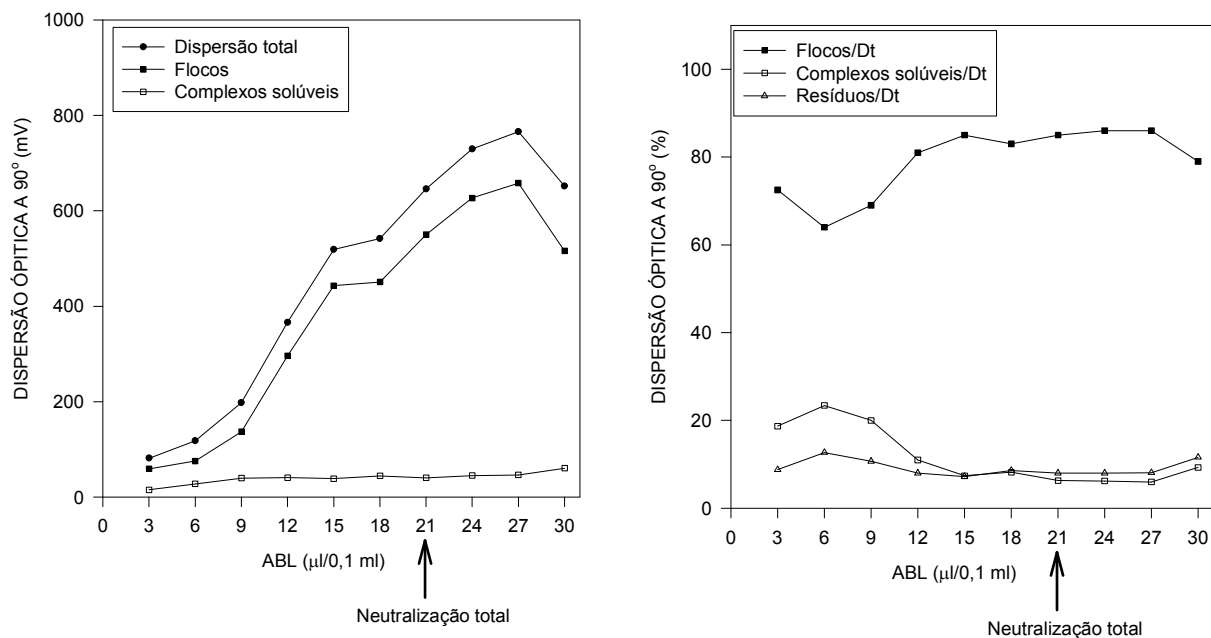
**TABELA IV.3.5G** – Previsibilzade do consumo de AB-FUNED 920928 para neutralização total de 50,0 µl/0,1µl de venenos bothrópicos, para neutralização total da atividade hemorrágica, segundo a espécie bothrópica

Veneno	Nº de comparações	Coefficiente de determinação R
<i>B. jararacussu</i>	6	0,29
<i>B. moojeni</i>	6	0,12
<i>B. alternatus</i>	6	0,78
<i>B. newiedi</i>	6	0,92
<i>B. atrox</i>	5	0,10
<i>B. jararaca</i>	14	0,12

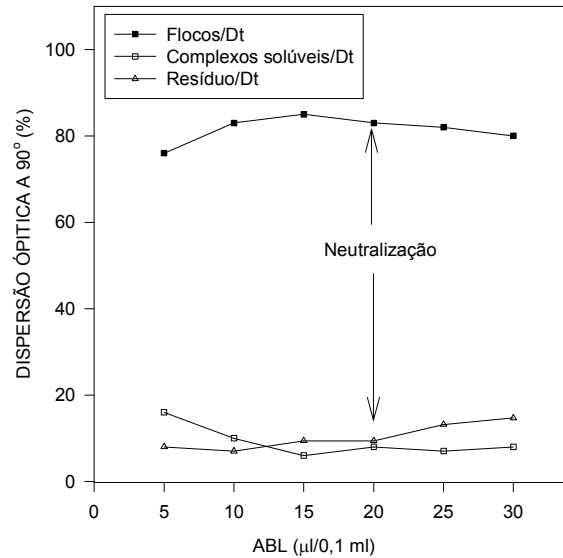
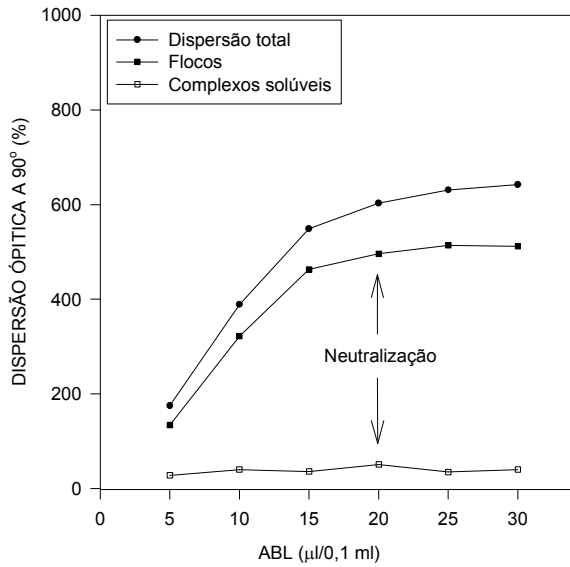
### IV.3.6 - DISPERSÃO DE LUZ PELOS PRODUTOS DA REAÇÃO VENENO-ANTIVENENO - AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO ZONAL DA MISTURA VENENO-ANTIVENENO.

Estes experimentos foram conduzidos na tentativa de esclarecer os desvios da “Lei dos Múltiplos de Proporção” ilustrados nas fig IV.3.4A-C. Infelizmente, a Ref. Nacional para *B. jararaca* Bra-Bot-002 extinguiu-se, não permitindo os estudos relacionados à fig. IV.3.4C. As fig.IV.3.6A-C apresentam as curvas de neutralização de quantidade fixa do *B. jararaca* 870502 pelo ABL-FUNED 900530, em três níveis de desafio a saber: 53,7  $\mu\text{g}/0,1$  ml

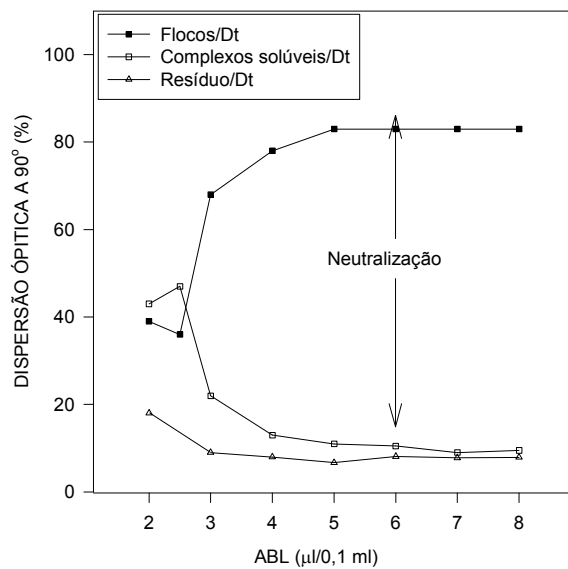
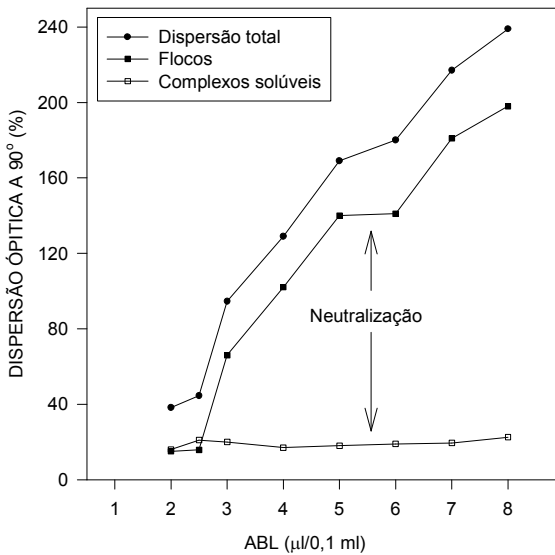
**FIG. IV.3.6A** – Dispersão de luz policromática visível pelos produtos da reação entre *B. jararaca* 870502 (53,7  $\mu\text{g}/0,1$   $\mu\text{l}$ ) e ABL-FUNED 900530.



**FIG. IV.3.6B** – Dispersão de luz policromática visível pelos produtos da reação entre *B. jararaca* 870502 (32,2 µg/0,1 µl) e ABL-FUNED 900530.



**FIG. IV.3.6C** – Dispersão de luz policromática visível pelos produtos da reação entre *B. jararaca* 870502 (15,3 µg/0,1 µl) e ABL-FUNED 900530.



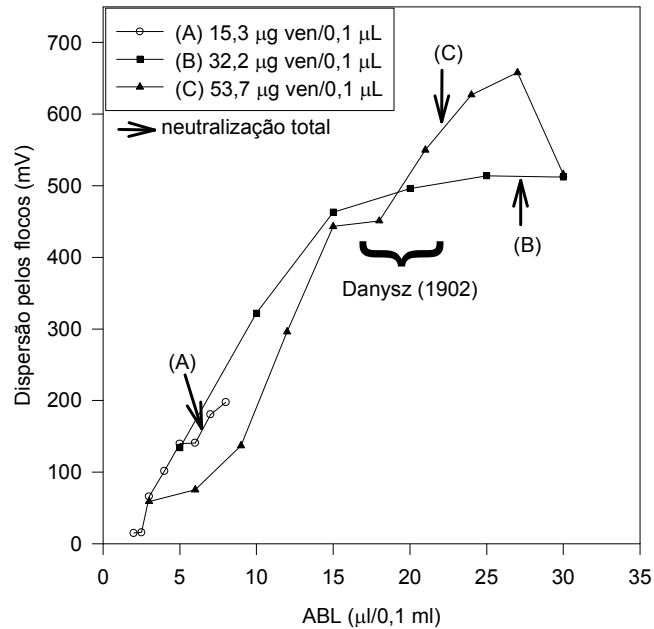
localizado no segmento b da curva de equivalência funcional; 32,2 µg/0,1 ml localizado justamente no ponto de inflexão e 15,3 µg/0,1 ml localizado no segmento a (vide fig. IV.3.4A). Estas, foram avaliadas nefelometricamente segundo descrição na seção IV.2.7. e também biologicamente, sendo os volumes mínimos para neutralização total indicados. No experimento realizado com 53,7 µg/0,1 ml, os flocos recolhidos por centrifugação foram lavados e injetados intradermicamente em ratos, não se observando qualquer lesão. A atividade hemorrágica remanescente permaneceu no sobrenadante até sua extinção no volume indicado. Amostras da mistura de incubação total (0,1 ml) e amostras do sobrenadante após centrifugação (0,1 ml), foram dissolvidas em NaOH 0,1 N, suas absorbâncias a 280 mµ determinadas, fornecendo uma avaliação da quantidade de proteína precipitada, por diferença. Na curva IV.3.6A a diferença tornou-se perceptível aos 9 µl de ABL com 2,8 %, atingiu um pico de 16 % aos 21 µl de ABL e decaiu até 7,1 % aos 30 µl. A curva de precipitação, em termos de quantidade de proteína avaliada por A280 mostrou-se então defasada da curva de floculação. Para a curva IV.3.6C com 15,3 µg de antígeno (veneno), a diferença tornou-se perceptível após 3,0 µl de ABL (0,5 %) e a partir de 5,0 µl flutuou em torno de 3 %, sem também acompanhar o perfil da floculação nefelométrica. A curva IV.3.6B não foi avaliada sob este parâmetro. As três curvas apresentadas nesta seção, isto é, as curvas de dispersão total e pelos flocos, mostraram perfil que se assemelha à descrição clássica das curvas de floculação, segundo autores já citados na seção IV.2.7. Somente a IV.3.6A foi desenvolvida até o ponto de excesso de anticorpos, a partir de 27 µl de ABL em relação aos 53,7 µg/0,1 ml de antígeno. Deve-se ressaltar a esse respeito, que na curva IV.3.6B não se chegou a esse ponto onde a floculação decresce com o excesso de anticorpos, embora a concentração de antígeno fosse 32,2 µg/0,1 ml (ponto de inflexão da curva de equivalência).

Admitindo provisoriamente a adequação do modelo de análise proposto na seção (IV.2.7) e ilustrado pelas fig. IV.2.7C e D, descreveríamos:

- a curva de neutralização de 53,7 mg (fig. IV.3.6A) apresentou a zona de equivalência dos 15 aos 27  $\mu$ l de antiveneno, como indicado pela relativa constância das proporções F/Dt, Cs/Dt e R/Dt, tendo a neutralização da atividade hemorrágica ocorrido dentro desta região;
- a curva de neutralização de 32,2  $\mu$ g (fig. IV.3.6B) apresentou zona de equivalência entre 10 e 25  $\mu$ l de antiveneno, idem;
- a curva de neutralização de 15,3  $\mu$ g (fig. IV.3.6C) apresentou zona de equivalência entre 5 e 8  $\mu$ l de antiveneno, ibidem.

Para melhor visualizar a dependência da curva de floculação na concentração de antígeno, as três curvas de dispersão devida aos flocos das figuras já citadas, foram colocadas no mesmo gráfico (fig. IV.3.6D). Nas regiões de excesso de antígeno e equivalência, a adição de mais antígeno causa diminuição do tamanho do complexo antígeno-anticorpo e, portanto, dissolução dos precipitados ou flocos, dependendo do tipo de anticorpo usado (Marchalonis, 1982). Este procedimento, corresponde no gráfico da fig. IV.3.6D a passar da curva B para a curva C abaixo do ponto de abscissa de 18  $\mu$ l de ABL por adição de mais 21,5  $\mu$ g de veneno. O resultado foi o esperado, com diminuição da intensidade de dispersão pelo flocos na faixa de abscissa que vai de 3 a 18  $\mu$ l de ABL.

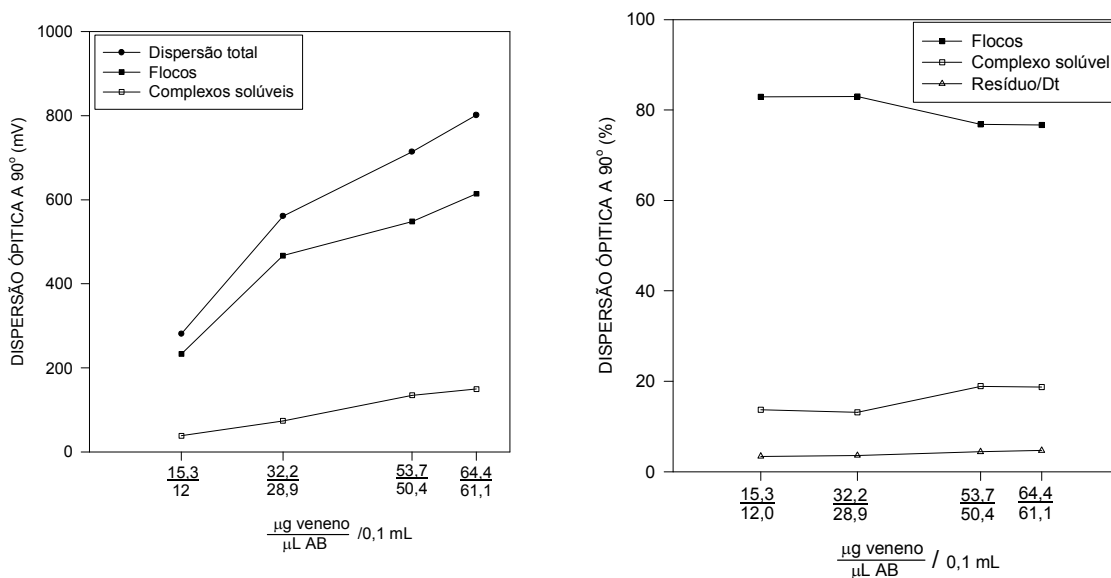
**FIG.IV3.6D** – Dispersão de luz policromática visível pelos produtos da reação entre *B. jararaca* 870502 e ABL-FUNED 900530 em três níveis de concentração do veneno.



A partir de 19  $\mu\text{l}$  de ABL, a adição de mais antígeno (adição simulada) provocou mais floculação, embora ainda dentro da zona de equivalência da curva B. Este fato pode ser visualizado pelo cruzamento da curva B pela C logo à direita do ponto de neutralização dos 32,2  $\mu\text{g}$  de veneno. A neutralização dos 53,7  $\mu\text{g}$  de veneno ocorreu com apenas a adição de mais 2  $\mu\text{l}$  de antiveneno. Este fenômeno de que uma mesma ou, praticamente a mesma, quantidade de antisoro neutralize quantidade dobrada de toxina, desde que adicionada de uma só vez, foi descrito por Danysz (1902) em relação à toxina diftérica.

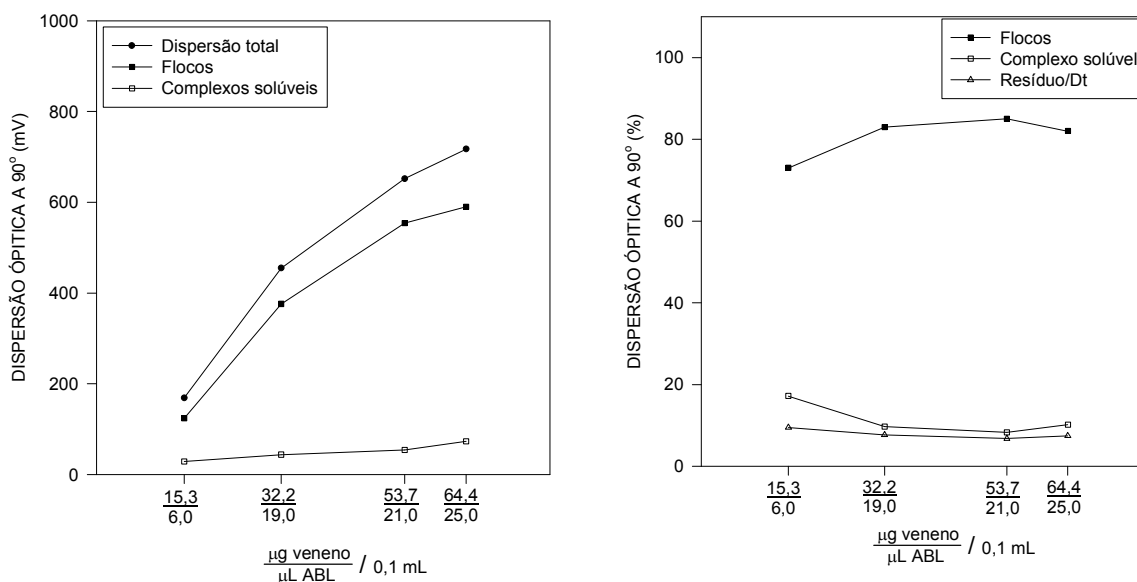
Das cinco curvas de equivalência funcional apresentadas na fig. IV.3.4, três foram submetidas aos estudos por dispersão de luz, mantendo-se as proporções na qual o volume

**FIG.IV.3.6E** – Dispersão de luz policromática visível pelos produtos da reação entre *B. jararaca* 870502 e ABL-FUNED 9005030 em proporção para neutralização total.



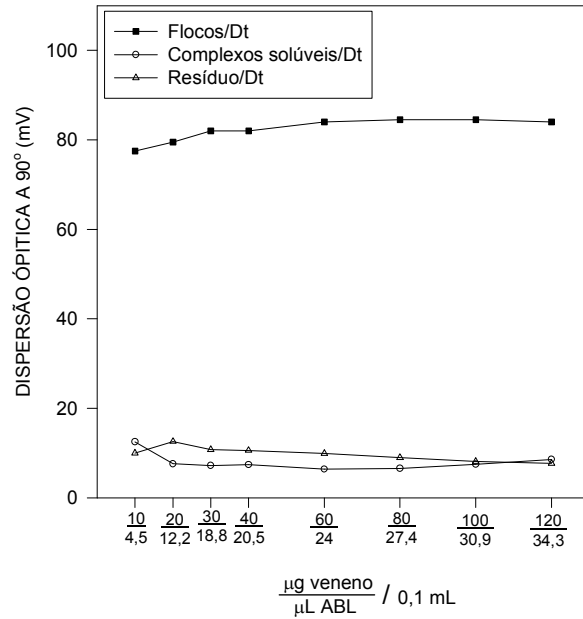
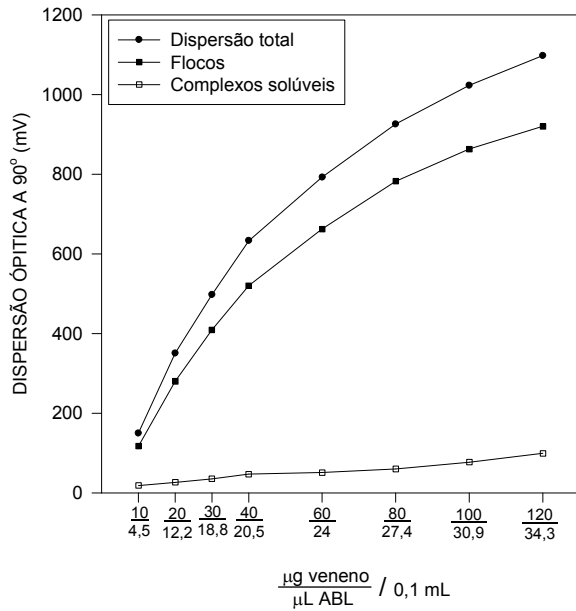
de antiveneno era o mínimo necessário para anular toda a atividade hemorrágica do veneno, ou proporções euteriáticas. A curva de equivalência funcional *B. jararaca* 870502-AB-FUNED 881122 (Fig IV.3.4A) que seguiu a “Lei dos Múltiplos de Proporção”, submetida aos estudos de nefelometria (Fig IV.3.6E), mostrou um perfil de que estivesse adentrando a região de excesso de anticorpos. O par *B. jararaca* 870502-ABL FUNED 900530 (Fig IV.3.4A), contrastando com o primeiro por não ter seguido a esperada linearidade, apresentou perfil nefelométrico de que perpassasse da região de excesso de antígeno até a região de excesso de anticorpos (Fig IV.3.6F). Devido ao pequeno número de pontos,

**FIG. IV.3.6F** – Dispersão de luz policromática visível pelos produtos da reação entre *B. jararaca* 870502 e ABL-FUNED 900530 em proporção para neutralização total.

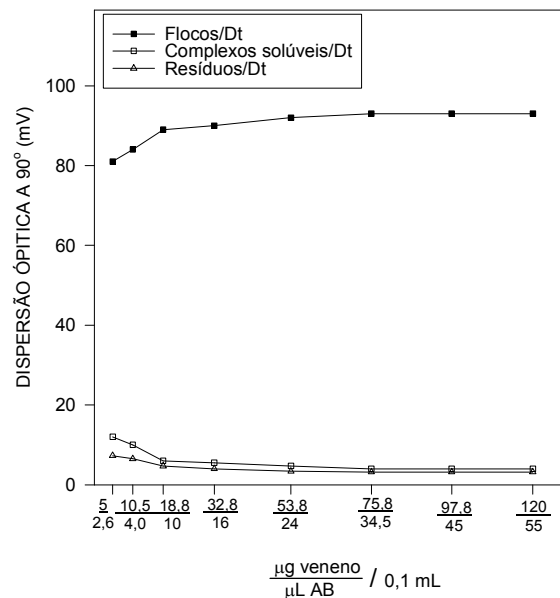
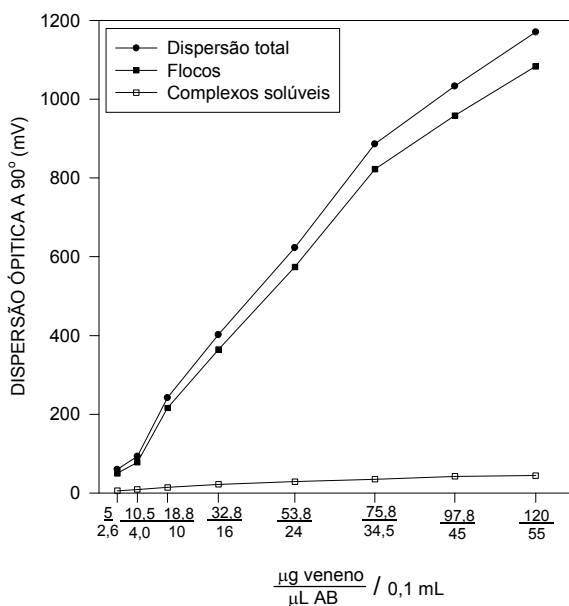


procurou-se fazer curvas mais amplas, o que não foi possível para o AB- FUNED 881122 e o Bra-Bot 002, cujos estoques haviam terminado. A repetição da curva entre *B. jararaca* 870502 e ABL-FUNED 900530, utilizando desta vez as proporções segundo a curva de equivalência funcional corrigido (vide fig. IV.3.4A), está representada nos gráficos da fig IV.3.6G, os quais indicaram que o primeiro ponto da curva de equivalência funcional (15,3 μl ven/6μl ABL), estava localizado no início da zona de equivalência e, os demais, permaneceriam nesta. Igual evidência foi encontrada nos gráficos da Fig IV.3.6.H, de que o primeiro ponto na curva de equivalência funcional entre a Ref. FUNED *B. jararaca* 880103 e AB-FUNED 920928 (Fig IV.3.4B), isto é 12,7 μg ven./4,5 μl de AB, se encontrasse no início da zona de equivalência, e os demais nela continuassem.

**FIG. IV.3.6.G** - Dispersão de luz policromática visível pelos produtos da reação entre *B. jararaca* 870502 e ABL-FUNED 900530 em proporção para neutralização total.



**FIG. IV.3.6.H** - Dispersão de luz policromática visível pelos produtos da reação entre *B. jararaca* 880103 e AB-FUNED 920928 em proporção para neutralização total.



#### IV.3.7 - DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE DAS MISTURAS VENENO-ANTIVENENO.

Com o objetivo de obter informações a respeito da mudança de inclinação da curva de equivalência funcional entre Bj. 870502 e ABL-FUNED 900530 (Fig IV.3.4A), misturas veneno-antiveneno foram feitas nas proporções para neutralização total, com três pontos no segmento a e quatro no segmento b, segundo as curvas não corrigidas. As densidades destas misturas foram determinadas após 24 h de incubação, juntamente com a determinação da densidade da solução salina fisiológica utilizada como solvente. Os resultados (fig IV.3.7) foram expressos em ordenada como o aumento da densidade em relação à salina fisiológica (NaCl 0,9 %). Os valores de abscissa correspondem à concentração total de proteína, veneno mais antiveneno para a curva com símbolos cheios, e somente antiveneno para a curva com símbolos vazios, sempre em igualdade de concentração de proteína. A relação entre concentração de proteína e aumento da densidade não se mostrou constante, havendo para ambas as curvas a partir do ponto crítico, indicado pela seta o aparecimento de concavidade, isto é, a taxa de incremento da densidade passou a aumentar continuamente. Este ponto crítico, corresponde à concentração de 32,2 ml de veneno/ 19,0 µl de ABL na curva de equivalência funcional da Fig IV.3.4A. A partir deste ponto as duas linhas começaram a divergir, havendo menor ganho de densidade para a mistura antígeno-anticorpo. Não se encontrando um modelo matemático que fornecesse bom ajuste aos pontos, procedeu-se à análise estatística, simplesmente calculando-se os quadrados dos desvios ponto a ponto, entre as duas curvas, abaixo e acima do ponto crítico. Os quadrados mínimos assim obtidos foram comparados com a variância entre replicatas, obtendo-se:

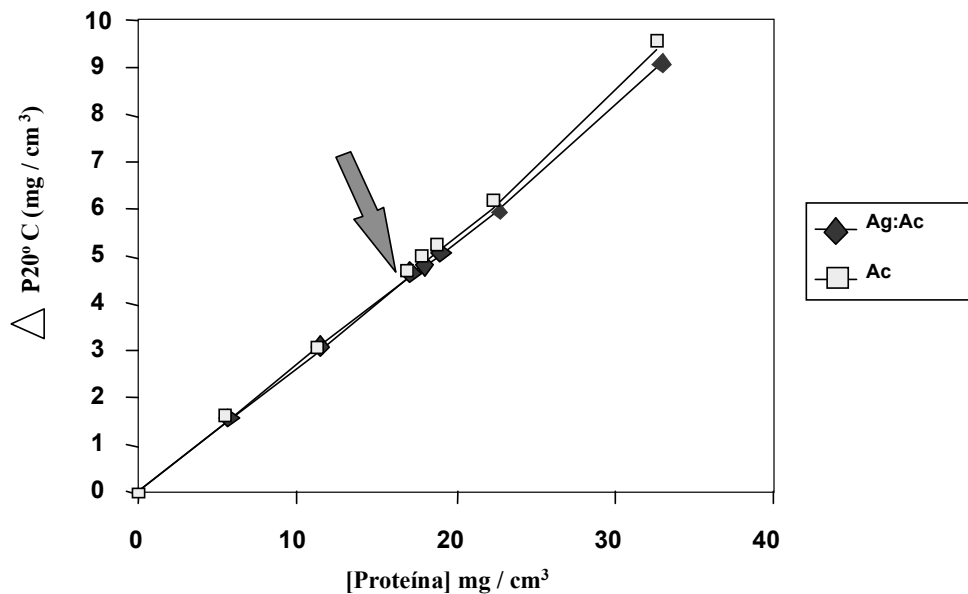
$$F_{3/7} = 3,16 - \text{abaixo do ponto crítico}$$

$$F_{4/7} = 982,87 - \text{acima do ponto crítico.}$$

As diferenças na primeira porção das curvas não foram significativas, enquanto na segunda porção, foram altamente significativas. Em grandezas físicas, a diferença máxima

observada no último ponto é de  $0,47 \text{ mm}^3/\text{g}$  de solução ou de  $0,45 \text{ mg}/\text{cm}^3$  de solução. Se pudéssemos extrapolar, admitindo massa molecular de  $4 \times 10^5 \text{ g}$  para os complexos antígeno-anticorpo, na mistura veneno-antiveneno, uma solução 1M a presentaria  $4,1 \text{ g}/\text{cm}^3$  a menos que solução de anticorpos de igual concentração.

**FIG. IV.3.7** - Aumento da densidade em relação ao NaCl 0,9 %, de soluções do veneno bruto de *B. jararaca* 870502 + ABL FUNED 900530 (Ag : Ac) e soluções de ABL puro (Ac) em função da concentração de proteína total.



## IV.4 - DISCUSSÃO E CONCLUSÕES PARCIAIS

---

### IV.4.1 - O ENSAIO DE ATIVIDADE DOS FATORES HEMORRÁGICOS DE VENENOS OFÍDICOS PELA INJEÇÃO INTRADÉRMICA NO DORSO DE RATOS.

Comparando-se as DMHs para *B. jararaca* obtidas no rato e no coelho, verifica-se que o coelho é de três a cinco vezes mais sensível. Um coelho permite até 40 determinações por animal, contra 5 ou 6 determinações por rato, o que consiste em vantagem a favor do uso do rato, pela maior disponibilidade nos biotérios e no custo. A julgar pelos dados de Kondo et al (1960), o coelho permite uma variação de doses mais ampla dentro dos limites de linearidade das CDRs, com incremento de até 30 vezes a dose inicial, ao passo que no rato o máximo conseguido foi de 17 vezes. Como o limite da faixa linear em termos da resposta biológica está em torno de 18 mm de  $\varnothing$  médio, as CDRs de maior coeficiente angular têm obrigatoriamente menor amplitude útil de abscissa. O parâmetro  $\lambda = s/b$ , isto é, a relação do desvio padrão entre doses (erro experimental) com o coeficiente angular, permite uma comparação de eficiência entre CDRs de diferentes ensaios biológicos (Finney, 1971), na realidade, entre CDRs de quaisquer naturezas. O valor de  $\lambda$  reportado por Kondo et al (1960) foi  $0,782 \div 3,98 = 0,196$ , enquanto obtivemos 0,205, 0,237, 0,247 e 0,373, o que coloca o ensaio de atividade hemorrágica no coelho, em franca vantagem quanto ao parâmetro de eficiência, devido aos coeficientes angulares mais altos. O camundongo é mais sensível que o rato e o coelho, podendo detectar a atividade hemorrágica de veneno de *B. jararaca* na ordem de nanograma. Entretanto, neste animal, as lesões hemorrágicas são difusas, o que restringe seu uso à mera detecção qualitativa.

Todos os critérios de validade estatística e os critérios  $A_1$  e  $A_2$  de validade fundamental (vide seção III.4.1) foram plenamente satisfeitos pelas CDRs de atividade hemorrágica cutânea no dorso de ratos, como primeiramente concluiu Domingues do Carmo (1996). O metâmero da

resposta biológica, isto é, o  $\phi$  médio da lesão revelou-se adequado. A medida das áreas das lesões por planimetria ou, por cálculo a partir do  $\phi$  médio, não conduziu a melhores resultados, o que não justifica o esforço extra.

#### **IV.4.2 - APLICAÇÃO DAS CDRS DE ATIVIDADE HEMORRÁGICA PARA COMPARAÇÃO DE POTÊNCIA ENTRE VENENOS OFÍDICOS.**

Na substituição de “Referências Nacionais” ou no estabelecimento de “Referência Interna”, também denominadas “Padrões Secundários”, a caracterização ampla deveria ser executada (vide seção I.5.4). Para os venenos bothrópicos, a comparação da potência hemorrágica deveria constituir um dos quesitos mais importantes, devido às suas relações com a lesão tecidual e letalidade dos venenos. Os três ensaios paralelos realizados com esta finalidade (fig. IV.3.1E - G) não mostraram resultados animadores, quanto à possibilidade do estabelecimento de uma relação de potências universal e inequívoca entre duas preparações de veneno-padrão (critério A<sub>3</sub>). Mesmo que alcançado este objetivo para os venenos-padrão, o significado de homogeneidade qualitativa seria duvidoso e muito mais para os venenos de espécimes individuais das várias espécies bothrópicas. Admitindo provisoriamente que o ensaio de atividade hemorrágica, como executado neste trabalho, isto é, nos limites do primeiro segmento da relação dose-resposta (vide fig. IV.3.1A) seja específico para os fatores hemorrágicos, a conclusão, ou melhor, a sugestão cabível seria a de incluí-lo nos trabalhos rotineiros de caracterização de venenos pelas Instituições soro-produtoras.

A aplicação deste ensaio em coelhos para a comparação das potências hemorrágicas de cinco preparações do veneno bruto de *Trimerisurus flavoviridis* por Kondo et al (1960), conduziu a CDRs absolutamente paralelas, o que mostra uma situação muito favorável.

### **IV.4.3 - APLICAÇÃO DO ENSAIO DE ATIVIDADE HEMORRÁGICA PARA A CARACTERIZAÇÃO DE ANTIVENENOS.**

#### **IV.4.3A - PROCEDIMENTO $\alpha$ .**

Neste tipo de ensaio, como também no ensaio de letalidade, a presença do antiveneno alterou substancialmente o coeficiente angular das CDRs, impossibilitando o cálculo da relação de potências. Por outro lado, como as doses de antiveneno foram baixas, fica reforçada a noção de que o coeficiente angular das CDRs é sensível às alterações de composição do veneno.

#### **IV.4.4 - PROCEDIMENTO $\beta$ OU CURVAS DE NEUTRALIZAÇÃO DE UM DESAFIO FIXO DE VENENO PELO ANTIVENENO.**

Gutierrez et al (1990) em um editorial no “Toxicon”, preconizando métodos para a uniformização a nível mundial da caracterização de antivenenos, recomendou que para cada tipo de resposta biológica fosse determinada a DE50 do antiveneno, isto é, a relação veneno/antiveneno na qual a atividade é reduzida à 50 % do seu valor obtido com o desafio de veneno. Em suas palavras: “Este valor é muito mais preciso que DE<sub>100</sub> na caracterização da capacidade neutralizante de antivenenos, desde que, a DE50 esteja localizada na porção linear da curva de neutralização, em contraste com a DE<sub>100</sub>”. Como justificativa experimental, citaram o artigo de Gutierrez et al (1985), no qual não apresentaram as curvas de neutralização, mas somente as DE50 já calculadas.

Em nosso entender, subjacente à recomendação de Gutierrez et al (1990), está a concepção de que a curva de neutralização do veneno pelo antiveneno seja uma expressão direta da “Lei de Ação das Massas”, ou seja, a DE100 seja atingida assintoticamente. A ligação e a

neutralização funcional de antígenos puros por anticorpos monoclonais neutralizantes, seguem a “Lei de Ação das Massas”, apresentando curvas (% de neutralização) & log [anticorpo], sigmoidais e simétricas (vide seção I.2.3, para citações). A neutralização da atividade hemorrágica do veneno bruto de *B. jararaca* pelo soro do *Didelphis albiventris*, idem (Rodrigues et al, 1987). As curvas de proteção letal do camundongo pelo antiveneno, contra um desafio fixo de veneno (vide seção III.3.3) se apresentadas na forma de % de sobreviventes & log dose de antiveneno, são sigmóides simétricas com a DE50, ocupando o centro da região linear (Trevan, 1927). Entretanto, tal formato de curva decorre de uma distribuição log normal das tolerâncias individuais e não é uma expressão direta da “lei da ação de massas”, ou curva de dissociação. No conjunto de curvas de neutralização da atividade hemorrágica pelos antivenenos, apresentado na Fig. IV.3.3, não encontramos qualquer ponto de simetria na ordenada ou abscissa que justificasse a adoção da DE50 como parâmetro descritivo ou representativo para as curvas.

Considerando:

- as massas moleculares ( $> 48$  Kd) dos fatores hemorrágicos já descritos para Bothrops e Lachesis (Mandelbaum & Assakura, 1988; Sanchez et al, 1987) e portanto, a possibilidade de oito determinantes antigênicos por molécula no mínimo;
- que os antivenenos são misturas de soros hiperimunes policlonais, induzidos por mistura imunogênica, contendo todo o repertório antigênico do gênero e/ou espécie;
- que o desafio corresponde à veneno bruto, sendo possível portanto, a interferência de outras proteínas, portadoras de epítomos com identidade total ou parcial; a expectativa, de fato, não seria de obtenção de curvas de neutralização simples como as curvas de dissociação de ácidos e bases fracas, geralmente usadas como tampões. Jerne (1951) já havia chamado a atenção para o fato.

A interpretação que damos à estas curvas, em bases puramente especulativas é:

- que estas se compõem de segmentos de reta devido à grande estabilidade dos complexos de antígeno polivalente com anticorpos policlonais (Marchalonis, 1982);
- que a primeira região destas, onde o  $\emptyset$  médio da lesão regride intensamente e de forma linear com a concentração de antiveneno, corresponda à situação onde anticorpos de várias especificidades possam se ligar ao antígeno, sem interações espaciais restritivas entre si;
- que os segmentos de baixa declividade, ou mesmo horizontais que vêm a seguir, são causados por interações espaciais restritivas entre anticorpos na superfície do antígeno e/ou na superfície de complexos já formados, impedindo a neutralização final por ligação de anticorpos a outro, ou outros epítomos;
- OBS 1) Nesta concepção está implícita a idéia de que a inativação funcional do antígeno ocorra por múltiplas ligações de anticorpos, que parece ser o acontecimento mais comum para antígenos com atividade enzimática (Arnon & Guiger, 1977), como também, pode

depreendida do fato de que os anticorpos monoclonais neutralizantes são minoria (Menez, 1992).

- OBS 2) As curvas de neutralização observadas, podem resultar do somatório de curvas de neutralização mais simples. Assim, um trajeto horizontal ou de baixa declividade na curva, pode resultar do somatório de um segmento com inclinação positiva com outro de inclinação negativa. Neste trabalho, obtivemos para a neutralização de 100 µg da Ref. Nac. Bra/Bot/002 pelo AB-FUNED 920928 (curva não mostrada), uma inativação até 25 ml do SAB/0,1 ml, concentrações maiores causando aumento da atividade hemorrágica, isto é, coeficiente angular positivo. A ativação de enzimas por anticorpos já é fenômeno conhecido (Cinader, 1957; Arnon & Geiger, 1977) e atribuído à modificações conformacionais favoráveis.
- que para a inativação final seria necessária a formação de complexos mais impedidos com ou sem mudança de conformação e rearranjo dos complexos já formados, sendo o potencial químico para tal, fornecido pelo avanço do sistema em direção ao excesso de anticorpos como também por um aumento de energia livre positiva no meio circundante aos complexos.

Expandindo a abscissa da curva de neutralização de *B. jararaca* 870502 pelo AB-FUNED 881122 (fig. IV.3.3A) teríamos uma figura de decaimento da atividade hemorrágica em três degraus. A correlação destas três fases com os três fatores hemorrágicos descritos para *B. jararaca* (Assakura et al, 1986), foi para nós, de início atrativa. Entretanto, estes mesmos autores demonstraram por imunoprecipitação em lâminas de gel, a identidade imunológica dos três Hfs para o soro de cavalo.

Ainda nesta seção IV.4.4, devemos discutir a aplicação das curvas de neutralização, para a comparação de potências entre antivenenos contra desafio do mesmo veneno. Assim, as curvas IV.3.3A, H e L seriam passíveis de comparação, pelo uso do mesmo veneno em igual quantidade. O exame das curvas mostra entretanto, que não seria possível formular e preencher qualquer critério de similaridade. Em comparação com as curvas de proteção anti-letal, também curvas de

neutralização de quantidade fixa de veneno, oferecem um aspecto altamente favorável que é a sensibilidade muito maior da resposta biológica. As respostas de letalidade (valores de ordenada), apresentam um retardo em relação à abscissa de cerca de 60 %, ou seja, a sobrevivência iniciou-se com doses de antiveneno que montam cerca de 60 % da dose para sobrevivência de toda a amostra. Nas curvas de neutralização da atividade hemorrágica, os retardos observados para o início da redução de  $\phi$  médio da lesão, estiveram entre 2 e 10 %.

#### **IV.4.5 - DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA ANTI-HEMORRÁGICA DOS ANTIVENENOS, POR ENSAIOS DIRETOS EM VÁRIOS NÍVEIS.**

O ensaio ou determinação quantitativa indireta é aquele onde a partir de um nível pré-determinado de resposta ( $y_0$ ), calcula-se o valor de abscissa ( $x_0$ ) que se procura, ou, no caso de determinação comparativa os valores  $x_P$  e  $x_D$  equipotentes. Para tal, faz-se necessário que a relação  $y/x$  seja monotônica e determinável (critérios  $A_2$ ,  $B_2$  e  $B_3$  de Jerne & Wood, 1949). Para relações dose-resposta muito complexas ou erráticas, como é o caso das curvas de neutralização apresentadas nas fig. IV.3.3, o único parâmetro determinável com segurança é o ponto final. As determinações quantitativas baseadas neste princípio são denominadas ensaios diretos e geralmente realizados até um único nível, ou seja, o estabelecimento de um estado fisiológico crítico num animal, o volume para encher até a borda um recipiente geometricamente irregular, etc.

OBS - As titulações volumétricas de ácidos e bases fortes não geram relações complexas ou erráticas, no entanto é mais cômoda a determinação do ponto final. No presente caso, a determinação de ponto final em vários níveis fez-se necessária, porque o sistema de detecção apresentou um limite mínimo e o curso esperado para a relação desafio de veneno - volume de

antiveneno é teoricamente imprevisível. As curvas de equivalência funcional ou “euteriáticas”, geradas a partir dos volumes para neutralização total, mostraram-se relações muito precisas (fig. IV.3.4) em comparação com as curvas de neutralização das quais provêm, confirmando o acerto da escolha pelo ensaio direto.

Nas figuras IV.3.4A e B, as curvas de equivalência funcional entre *B. jararaca* 870502 com AB-FUNED 881122 e Ref. FUNED *B. jararaca* 880103 com AB-FUNED 920928, após correção dos valores de abscissa pelo limite mínimo de detecção biológica, atenderam precisamente a “lei dos múltiplos de proporção”. As demais, por terem apresentado coeficientes angulares corrigidos muito afastados da unidade ou pela existência de deflexões, desviaram-se da citada lei.

As equações lineares que definem a relação de equivalência funcional veneno-antiveneno, nos dois casos aparentemente favoráveis, seriam definições de potência neutralizante universais e inequívocas, para os pares veneno-antiveneno em questão ? A resposta é dada pelas curvas aparentemente não favoráveis, ou seja: não há garantias, de que a relação linear observada na faixa de concentrações antígeno-anticorpo permitida ao método usado, mantenha-se até outros níveis, como não a mantiveram vizivelmente duas das curvas. De um ponto de vista prático, a potência neutralizante do antiveneno que apresenta interesse seria aquela obtida na faixa de concentrações que o antígeno (veneno) ocorre no plasma dos pacientes acidentados (Vide seção I.2.4). Assim, o estudo das causas físico-químicas para as deflexões apresentadas pelas curvas de equivalência funcional, embora seja de interesse para a compreensão da metodologia utilizada, pode não trazer qualquer esclarecimento quanto às mesmas curvas, realizadas em concentrações de antígeno  $10^3$  a  $10^4$  mais baixas.

A deflexão positiva apresentada pela curva de equivalência funcional entre Bra-B0t-002 e AB-FUNED 920928 tem na literatura especializada uma explicação clássica que é a do “componente toxico minoritário pouco antigênico” (Tu, 1991; Schöttler, 1952; Christensen, 1966, 1967, 1979). Por esta idéia, os componentes tóxicos mais ubíquos seriam neutralizados por baixas doses de antiveneno devido a maior presença de anticorpos contra estes, permitindo a manifestação tóxica do componente minoritário, a partir de doses mais altas do veneno, o qual exigiria então, maiores volumes de antiveneno para sua neutralização. Esta explicação, até hoje sem apoio experimental, obviamente não faz sentido para as deflexões negativas das curvas de equivalência. A curva de equivalência funcional entre *B. jararaca* 870502 e o ABL-FUNED 900530, apresentou após 32,2 µg vem/0,1 ml (fig. IV.3.4A) uma redução do coeficiente angular de quatro vezes, ou seja, o antiveneno tornou-se abruptamente quatro vezes mais ativo em neutralizar a atividade hemorrágica. Mesmo com os prejuízos à interpretação, decorrentes do fato de se tratar de um sistema complexo, explicações plausíveis, deverão levar em conta uma alteração favorável na estequiometria média antígeno-anticorpo para neutralização, secundária a rearranjo de complexos, com inclusão de epitopos e paratopos antes não utilizados. À evidência que dispomos via nefelometria, indicou-nos que todas as proporções Ag:Ac antes e após o ponto crítica da curva já se encontravam na região de equivalência, isto é, sem antígeno ou anticorpos livres. O fato de que 32,2 µg de veneno estivessem totalmente neutralizados por 19 ml do ABL-900530 e que, para neutralização completa de 53,7 ml do mesmo veneno, bastassem mais 2,0 µl do antiveneno, permite-nos cogitar da disponibilidade de paratopos neutralizantes livres e/ou ligados à determinantes de menor afinidade, por sua vez localizados em antígenos sem atividade hemorrágica. Nas duas situações a adição de mais antígeno portador do epitopo de alta afinidade utilizaria os paratopos disponíveis e/ou deslocaria os de menor afinidade, sendo neutralizado sem maior requerimento adicional de moléculas de imunoglobulinas. Por outro lado, esta não é a

única possibilidade. Considerando que o bloqueio espacial da molécula de antígeno, especialmente em se tratando este de uma enzima, é o mecanismo de inativação funcional mais comum (Arnon & Geiger, 1977), ocorreria a possibilidade, em situações energeticamente favoráveis da formação de grandes complexos tridimensionais, envolvendo muitas unidades moleculares do antígeno e das imunoglobulinas, o que manteria o bloqueio espacial à substratos grandes, sem maior necessidade que a ocupação de dois determinantes antigênicos por molécula de antígeno. As moléculas de imunoglobulinas assim dispensadas, poderiam então participar de outros complexos com o mesmo antígeno, ou de complexos mistos e irregulares, não propriamente repetitivos ou poliméricos.

As evidências que dispomos para a formação de grandes complexos a partir do ponto crítico, vêm primeiramente dos estudos do aumento de densidade (fig. IV.3.7) e secundariamente, dos estudos nefelométricos.

O volume molar da água em estado líquido (18,1 ml/mol) é 50 % mais alto do que seria o volume molar da água totalmente compacta (12,5 ml/mol) (Desnoyers et al, 1965). As fortes interações dipolares, dependentes da orientação, entre as moléculas de água dão origem a um líquido no qual o estado menor energia livre, corresponde a uma densidade aquém da máxima, na qual o máximo de estabilização possa ser obtido das interações dipolo-dipolo. Assim, na água pura, a interação entre moléculas, intensamente dependente da orientação mútua, causa neste líquido uma organização muito distinta da que poderia ser ocasionada por interações moleculares totalmente aleatórias. A água líquida pode ser considerada como estruturada em “grupamentos oscilantes” de moléculas de água, orientadas e unidas por pontes de hidrogênio (Jencks, 1969). A viscosidade da água e, suas propriedades capacitivas, como o “tempo de relaxamento dielétrico” após aplicação de campo elétrico alternado, refletem seu elevado grau de organização interna. A adição de NaCl à água, causa redução de viscosidade e do “tempo de relaxamento dielétrico”(tempo para reorganização dos dipolos), ambas alterações indicadoras de uma

diminuição na estruturação interna das moléculas de água. OBS: o NaCl foi apresentado como exemplo, não por se tratar do sal mais ativo neste aspecto, mas, simplesmente por compor o veículo usado na diluição das misturas veneno-antiveneno.

O efeito dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  sobre a estrutura interna da água, pode ser descrita (Franck & Evans, 1945):

- devido à alta densidade de carga superfície do íon, forma-se na imediata vizinhança deste uma esfera de hidratação, composta de moléculas de água, altamente estruturada;
- entre a esfera de hidratação e os “grupamentos oscilantes” ocorre uma região onde as moléculas de água encontram-se desordenadas.

Na dissolução, a energia liberada pela quebra da rede cristalina e das pontes de hidrogênio água-água, é quase que totalmente utilizada para a formação das esferas de hidratação e para o aumento da entropia da região da “água desestruturada”, ocorrendo também uma moderada absorção térmica do meio (+0,93 Kcal/mol). O aumento unitário da “entropia parcial molal” é de 11,5 e.u. (Jenks, 1969). Como resultado destas modificações, a solução aquosa de NaCl é mais densa que a água pura, porque o sistema recebe um incremento de massa, mas, os volumosos “grupamentos ou aglomerados oscilantes” são transformados por influência do íon em água desestruturada, mais densa. Para cada unidade massa de NaCl adicionada a um determinado volume de água, o incremento de densidade é de 0,72 unidades/cm<sup>3</sup> de solução.

A contribuição da dissolução de proteínas na densidade de sua própria solução aquosa é um fenômeno mais complexo que o descrito acima, e que depende do próprio peso específico da proteína, de sua concentração na solução, de interações com íons em solução e, principalmente da sua influência sobre a estruturação das moléculas de água e o estado energético de todo o sistema. A maioria das proteínas tem volumes parciais específicos da ordem de 0,70 a 0,75 cm<sup>3</sup>/g

(Tanford, 1961), sendo portanto, esperada uma contribuição positiva para a densidade de suas soluções aquosas. Na fig. IV.3.7, no primeiro segmento da curva, isto é, antes do ponto crítico, a taxa de incremento de densidade por unidade de massa de proteína do ABL-FUNED 900530 adicionada, foi de 0,268 (valor idêntico para ABL + veneno), indicando uma expansão apreciável da solução com a dissolução da proteína. A causa desta expansão reside nas grandes dimensões da molécula de proteína (imunoglobulinas e seus complexos com antígeno, no caso), que exige abertura de grandes espaços entre os “grupamentos oscilantes” e íons solvatados na solução salina. Em seu estado nativo, os grupamentos polares N - H e C = O da cadeia peptídica, formam pontes de hidrogênio internas, responsáveis pela estrutura secundária da proteína, e não interagem com a água, a não ser com sua desestruturação, ou seja, desnaturação (Kauzman, 1959). As estruturas superficiais da molécula de proteína, acessíveis à interação com a água e íons solvatados são as cadeias laterais apolares, de polaridade intermediária e grupamentos ionizáveis. As cadeias apolares ou hidrofóbicas causam abertura de espaços entre as moléculas de água e a formação em torno delas de uma camada de solvatação altamente organizada pela orientação das moléculas de água e portanto de baixa densidade. Os grupamentos polares e os íons presentes na interface da molécula de proteína com o diluente, pelo seu maior tamanho, apresentam menor densidade de carga em sua superfície. Por esta razão, não são capazes de alterar a organização das moléculas de água do modo descrito para o  $\text{Na}^+$  e o  $\text{Li}^+$ , aproximando-se em comportamento, mais aos grupos hidrofóbicos. O dioxano, propanol propionato de sódio e sais de amônio quaternário com vários graus de substituição, todos causam aumento da viscosidade e do tempo de relaxamento dielétrico da água (Jencks, 1969). Em suma, a dissolução da proteína em água conduz ao aumento de viscosidade e aumento dos tempos de relaxamento dielétrico, refletindo um maior grau de estruturação ou interação entre as moléculas de água. Termodinamicamente, a dissolução de proteínas com alto teor de aminoácidos hidrofóbicos em água, como é o caso das imunoglobulinas (Cohen & Porter, 1964), ocorre com variação pequena

ou nenhuma de entalpia, acompanhada por um aumento positivo de energia livre relacionado às pontes de hidrogênio formadas com a maior estruturação da água e, obrigatoriamente, com intensa redução de entropia (Kausman, 1959). Esta situação energeticamente desfavorável, pela variação negativa de entropia e positiva de energia livre, e que torna o sistema instável limitando a solubilidade da proteína, pode ser minorada pela presença dos pequenos íons fortemente hidratados que ao interagir com os contra-íons de menor densidade de carga na superfície da proteína, forma uma região de transição. De qualquer modo, com o aumento da concentração de proteína em solução, torna-se mais provável a ocorrência de uma modificação que resulte em aumento da entropia e redução da energia livre positiva. Este de fato é o caso de muitas reações antígeno-anticorpo, estudadas termodinamicamente por vários autores e sumarizadas por Kauzman (1959). Voltando agora à fig. IV.3.7 a partir do ponto crítico indicado pela seta, que também corresponde ao ponto de deflexão da curva de equivalência funcional entre o *B. jararaca* 870502 e o ABL-FUNED 900530, verificamos que a taxa de incremento da densidade, por unidade de massa de proteína, cai para 0,150 pela presença do antígeno enquanto em igualdade de concentração de proteína do ABL somente, sobe para 0,317.

A explicação mais provável para estas observações é de que, a partir do ponto crítico de concentração de antígeno e anticorpo, complexos tenham se formado com exclusão de água de seu interior hidrofóbico. A formação de grandes complexos é compatível com as observações por nefelometria, vide fig. IV.3.6D, onde a partir do ponto crítico houve aumento da dispersão de luz pelos flocos e pelos complexos solúveis, estes últimos não mostrados na figura.

Neste caso, há uma forte possibilidade de que ligações hidrofóbicas tenham sido o fator principal em causar o aumento do tamanho dos complexos ou, em reorganizar complexos, formando outros também capazes de neutralizar o antígeno. Mesmo que a ligação química primária não tenha sido de natureza hidrofóbica, a formação de grandes complexos, com

transferência de grupos apolares da fase aquosa para seu interior, causaria aumento de entropia às custas da redução do número de pontes de hidrogênio da água, favorecendo a transformação.

A questão não se prenderia somente ao aumento da concentração de proteína, nem tampouco somente à estrutura de antígeno, uma vez que o *B. jararaca* 870502 frente ao AB-FUNED 881122 gerou a curva de equivalência funcional precisamente linear (vide fig. IV.3), embora as concentrações totais de proteína sejam comparáveis ponto a ponto com a curva entre este mesmo veneno e o ABL-FUNED 900530. A diferença entre os dois antivenenos está em que, a mistura imunogênica que deu origem ao ABL continha somente os venenos de *B. atrox* e *Lachesis muta muta*, e, o AB foi induzido por toda mistura imunogênica bothrópica (vide seção IV.2.2), que não continha qualquer dos dois primeiros venenos. Teria sido interessante sem dúvida, fazer as curvas de equivalência funcional entre os venenos de *B. atrox* e *Lachesis m. muta* contra o ABL. Outra interpretação que poderia ser dada à curva IV.3.4A, entre o *B. jararaca* 879592 e o ABL 900530, é que o número de pontos foi muito pequeno para se estabelecer a existência de dois segmentos de reta, e que na realidade o traçado seria hiperbólico, do tipo “curva de saturação”, o que significaria equilíbrio de dissociação, dependente de concentração. A mistura de incubação veneno-antiveneno, em seu nível de concentração mais alto (64,4 µg ven/2,19 mg antiveneno/0,1 ml), foi diluída cem vezes e após 24 horas injetada no camundongo (0,1 ml - intradermicamente), não se observando qualquer lesão hemorrágica. Pelo fato da diluição de cem vezes, ser mais ampla 15 vezes que a variação de concentração na própria curva, descartamos a possibilidade de dissociação dos complexos AG:Ac em faixa tão estreita.

Em resumo destas discussões sobre as possíveis causas imunoquímicas, termodinâmicas e cinéticas da não obediência à “lei dos múltiplos de proporção”, devemos admitir que, embora interessantes, certamente não se aplicarão às concentrações muito mais baixas de antígeno e anticorpo. Devemos admitir também, que a investigação experimental do fenômeno, esteve muito aquém do engenho teórico-especulativo utilizado na sua exegese. A única justificativa para este

exagero, é a de enfatizar e ressaltar a necessidade de se buscar metodologia mais sensível, para o estudo da inativação funcional dos antígenos responsáveis pela atividade dos venenos ofídicos.

#### **IV.4.6 - O VENENO DE *B. jararaca* COMO REFERÊNCIA PARA A AFERIÇÃO DA POTÊNCIA ANTI-HEMORRÁGICA DOS ANTIVENENOS BOTHRÓPICOS.**

As razões para que o veneno de *B. jararaca* seja a referência para todo o gênero *Bothrops*, já foram explicitadas (seção I.5.3), como também as razões para que o antiveneno bothrópico seja único, e produzido a partir da denominada mistura imunogênica bothrópica. Deficiências desta escolha são facilmente identificáveis e demonstráveis. Entretanto, outro sistema, padeceria dos mesmos problemas que decorrem das diferenças de repertório antigênico entre espécies e espécimes, agravados certamente por ser novo e desconhecido.

Como ensaio biológico, a mensuração da atividade hemorrágica de venenos ofídicos, mostrou-se mais sensível e consumiu menor número de animais que o ensaio de letalidade, permitindo avançar com os estudos até o nível dos venenos que compõem a mistura antigênica bothrópica, e que também provêm das espécies de maior importância epidemiológica. Estes venenos, ao contrário da Referência Nacional Bra/Bot/002 e VRF. *B. jararaca* 9201-05, comparados em sua equivalência antigênica (vide seção III.3.6), são misturas de venenos de poucos espécimes. Deste modo, a previsibilidade do consumo de um antiveneno bothrópico, para a neutralização da atividade hemorrágica dos diferentes venenos que compõem a mistura imunogênica bothrópica, através do seu equivalente de *B. jararaca*, torna-se muito desfavorável devido à concomitância de aumento de variabilidade e diferenças de repertório antigênico. Parte da responsabilidade pelos baixos índices de previsibilidade deve sem dúvidas, ser debitada aos erros de estimativa dos equivalentes antigênicos (vide seção IV.3.5).

A questão da utilidade destes dados para uma melhor escolha da mistura antigênica bothrópica e melhor veneno de referência, (melhor significando maior previsibilidade da capacidade de neutralização dos antivenenos para os venenos das espécies bothrópicas) não teria ainda uma resposta definitiva, mas algumas considerações:

- a mistura imunogênica parece estar adequada para *B. moogeni* e *B. neuwiedi* (vide fig. IV.3.5G);
- aumento do percentual de *B. jararacussu* na mistura imunogênica bothrópica não necessariamente traria maior previsibilidade, uma vez que *B. jararaca* constitui 50 % desta mistura e mostrou-se também imprevisível;
- a atividade hemorrágica dos venenos bothrópicos não permite prever as demais (Sanchez et al, 1992), de modo que a previsibilidade da capacidade neutralizante de antivenenos somente poderá ser avaliada com a implementação da caracterização ampla (vide seção I.5.4).

#### **IV.4.7 - MÉTODO NEFELOMÉTRICO.**

As estimativas para as dimensões da IgG são da ordem de 250-300 Å de comprimento por 40 Å de largura (Cohen and Porter, 1964), o que corresponde a 1/18 do comprimento de onda do pico de emissão da lâmpada utilizada. Com o aumento de tamanho pela formação de complexos esta relação aumenta, desviando o ângulo de dispersão máxima para valores menores que 90<sup>0</sup> em relação ao raio luminoso incidente. Entretanto, a leitura em ângulo fixo de 90<sup>0</sup>, é a mais utilizada para propósitos puramente quantitativos e a resposta nefelométrica é proporcional tanto à concentração das partículas quanto ao seu tamanho, até um limite, no qual a entrada de luz no meio dispersante começa a cair. Os parâmetros nefelométricos definidos na seção IV.2.7, pressupõem aditividade, uma vez que Dt foi definido como somatório de F + Cs + R. Esta pressuposição é razoável dentro dos limites em que a resposta nefelométrica é proporcional à concentração de partículas dispersantes. A definição de R, como dispersão residual, cujos componentes são a dispersão pelas moléculas de antígeno e anticorpo livres e por outras moléculas contaminantes do sistema que ocorrem em proporção constante à antígeno e anticorpo,

é teoricamente correta. Entretanto, a medição do parâmetro R está sujeita às ambiguidades de que:

- a adição de NaOH ao meio até 0,1 N, torna as soluções tanto de antígeno quanto anticorpo mais translúcidas, reduzindo suas intensidades de dispersão em 60 %;
- as proteínas antes participando dos complexos solúveis, continuam presentes após a adição de NaOH, levando à supraestimação da dispersão residual;
- as ligações hidrofóbicas entre antígeno e anticorpo podem não ser desfeitas pela adição de NaOH (Van Oss, 1992);

Deste modo, a mensuração da contribuição dos complexos solúveis (CS) à dispersão torna-se também ambígua, a primeira influência conduzindo à sua superestimação e as duas últimas ao oposto.

O tratamento lógico dado aos parâmetros nefelométricos na seção IV.2.7 seguiu o conhecimento clássico da imunoprecipitação, com uma adaptação para a floculação que foi admitir a relação  $F/Dt$  constante, a exemplo da constância do incremento na produção de flocos dentro da zona de equivalência, com a adição de mais antígeno (Cohn & Pappenheimer Jr, 1949; Cohn, 1952). A aplicação destes parâmetros nefelométricos, a um sistema imunoprecipitação bem conhecido como a ovoalbumina e soro de coelho, seria um bom teste, porque este apresenta um perfil de imunoprecipitação típico, com absoluta ausência de antígeno e anticorpos em solução na região de equivalência (Kabat Mayer's, 1971). Não havendo então complexos solúveis na zona de equivalência, a definição e a mensuração da dispersão residual seriam inambíguas.

A reação de antígeno com anticorpos do cavalo é mais complexa, coexistindo a reação de floculação e precipitação que dependem de IgG com a formação de complexos totalmente solúveis com IgG(T) (Sullivam, 1987). O fato de que as curvas nefelométricas obtidas no presente trabalho tenham apresentado os perfis teoricamente esperados, apesar da complexidade

do antígeno e anticorpo utilizado, incentiva a investigação posterior do método, e resolução das ambiguidades de medida. Outras características positivas do método são a simplicidade e reprodutibilidade. Após exposição padronizada ao ultrassom, as leituras nefelométricas são estáveis e absolutamente reproduzíveis, de modo a dispensar mais de uma leitura. A variabilidade entre amostras ou replicatas de uma mesma incubação (variância dentro da dose), mostrou-se independente do nível da resposta, aproximadamente 5 % em termos de coeficiente de variação, o que recomenda triplicatas para estudos mais precisos.

Para uma proteína pura em solução, a resposta nefelométrica é proporcional ao logaritmo da concentração. Em um sistema onde coexistam proteínas de ‘vários pesos moleculares em solução, complexos solúveis de várias diimensões e agregados ou flocos em suspensão, nenhuma relação quantitativa pode ser estabelecida. É necessário então que a quantidade total de proteína e a quantidade remanescente em solução após a centrifugação sejam determinadas.

## **V – ESTUDOS “IN VITRO” – CINÉTICA DA COAGULAÇÃO DO FIBRINOGENIO BOVINO PELA ENZIMA TIPO-TROMBINA DE *Lachesis muta muta*, EM CONDIÇÕES DE VELOCIDADE LIMITADA PELA ETAPA ENZIMÁTICA**

---

### **V.1 – INTRODUÇÃO**

#### **V.1.1 – CONSIDERAÇÕES SOBRE AS RELAÇÕES ENTRE O CONHECIMENTO SOBRE VENENOS OFÍDICOS E COAGULAÇÃO SANGUINEA.**

A antigüidade das interações do homem com os ofídios, é testemunhada desde as pinturas rupestres até os registros históricos das civilizações mais antigas. O temor às serpentes, desenvolvido pelo homem através dos tempos, estampou-se em sua cultura e em suas crenças míticas e religiosas. Embora acrescido pelo desconhecimento e preconceito a respeito dos ofídios e seu papel neste mundo, este temor ancestral certamente teve suas raízes objetivas na gravidade clínica de muitos acidentes ofídicos. Estes mensageiros da morte, embora involuntários em seu ofício, podem provocar situações extremamente aflitivas e aterrorizantes para o ser humano. Uma delas freqüentemente relatada pelo nosso povo no Brasil, como caso verdadeiramente acontecido, é que “Depois de ser picado por uma cobra bem pequena, o coitado começou a botar sangue pelos olhos, ouvidos, nariz boca e outros orifícios do corpo até morrer”. Basta consultar um dicionário em qualquer língua para se avaliar a importância, além da fisiológica, que o sangue tem para o homem, principalmente dentro de suas concepções religiosas. Assim é que, tão cedo como 1767 e 1781 F. Fontana publicou observações sobre a ação de venenos de ofídios europeus e sul-americanos, sobre a coagulação sangüínea, classificando-os em pró-coagulantes e anticoagulantes. Lamb (1901) e Noc (1904) atribuíram corretamente a capacidade dos venenos em coagular o sangue, torná-lo incoagulável ou dissolver o coágulo já formado, à presença de enzimas proteolíticas. Estas duas últimas observações, notáveis não só por sua precocidade

quanto sua correção, ocorreram dentro do período histórico onde os fatos e as idéias básicas sobre a coagulação sangüínea foram estabelecidos, Schmidt (1892) e Morawitz (1905).

Stoker (1980) resumiu as ações dos venenos ofídicos sobre a coagulação sangüínea: “Os vários venenos ofídicos, devido a suas proteases, podem afetar a coagulação sangüínea seja por ativar ou lesar plaquetas, fatores V, X, XIII, protrombina ou fibrinogênio; alguns venenos podem causar fibrinólise por ativação do plasminogênio ou por digestão proteolítica direta da fibrina”. O assunto é, portanto, muito vasto e multidisciplinar, o que tornaria muito onerosa e certamente sem propósito uma revisão geral introdutória, neste trabalho.

Em revisão recente, Ouyang et al. (1992) citaram 12 grandes revisões de 1954 a 1990. Em sua revisão de 1991, Kornalick citou 5 grandes revisões de 1970 a 1980. Seegers & Ouyang (1979) autores do capítulo 18 no clássico livro texto “Snake Venoms” listaram 51 grande revisões específicas no assunto, estendendo-se de 1846 a 1975, 27 destas no intervalo de 60-70. Kornalick (1991) avaliou que o número acumulado de publicações já monta a vários milhares.

A dianteira que o conhecimento da influência dos venenos ofídicos na coagulação do sangue tomou sobre as demais áreas correlatas, certamente pode ser entendida pela precocidade dos estudos, por sua vez motivada pelo grande interesse do homem nos fenômenos relacionados ao sangue. Não podemos esquecer também, a facilidade de obtenção e fracionamento deste tecido, a relativa simplicidade experimental na observação da coagulação e, o avanço do conhecimento enzimológico através da abordagem cinética desde o final do século passado. A partir de 1950 o aparecimento de suportes cromatográficos adequados para o fracionamento analítico e preparativo de proteínas e o advento do sequenciamento destas, conduziu à grande incremento nas publicações sobre o assunto, revisadas por Seeger & Ouyang (1979). Outro incentivo foram as aplicações práticas após 1970: RVV coagulante da *V. russeli* na determinação do fator X; Ecarina do *E. carinatus*, na determinação de protrombina; Ancrod do *A. rhodostoma*, na defibrinogenação terapêutica; Batroxobina do *B. atrox*, para o teste de formação de fibrina;

protease Trombica do *A. contortrix*, para o teste de formação de fibrina; Trombocitina do *B. atrox* para avaliar a capacidade agregante de plaquetas (Stocker, 1980).

Curiosamente, consultando bibliografias mais recentes sobre as proteases de venenos de venenos ofídicos que afetam a coagulação sanguínea, verifica-se que nenhuma delas tornou-se um modelo imunoquímico em toxinologia a exemplo das toxinas curariméticas, cardiotoxinas e crotoxina. É possível, nestes casos, que a abordagem clássica através de estudos estruturais e cinéticos, tenha sido considerada suficientemente esclarecedora. Também devem ser levados em conta:

- a existência da tripsina e da trombina que é são paradigmas das serino-proteases, muito bem estudados, inclusive como modelos imunoquímicos;
- que o papel destas proteases no acidente ofídico é benigno, a não ser em associação com as hemorraginas ou lesões hemorrágicas insuspeitas;
- que os esforços dos últimos 30 anos deste século, foram em grande parte, dedicados aos receptores de membrana.

#### **V.1.2 – ENZIMAS DO “TIPO-TROMBINA” – ENZIMA DO TIPO-TROMBINA DE *Lachesis muta muta*.**

Dentre as proteases obtidas dos venenos de serpentes, aquelas que atacam a estrutura do fibrinogênio são as mais intensamente estudadas. Três grupos de enzimas provenientes dos venenos podem ser distinguidos com respeito a sua ação no fibrinogênio (Kornalick, 1991; Stocker 1980):

- enzimas “tipo-trombina” as quais catalisam a liberação do fibrino-peptídeo A (FPA) ou fibrino-peptídeo B (FPB) ou ambos, das cadeias  $\alpha A$  e  $\beta B$  da molécula, na região amino-

terminal denominada “nó terminal amino-dissulfeto” (N-DSK) (Mosesson & Finlayson, 1976);

- enzimas fibrinolíticas, as quais diretamente retiram fragmentos principalmente das regiões carboxi-terminais das cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  das moléculas do fibrinogênio, tornando-os incoaguláveis pela trombina;
- enzimas que ativando diretamente o plasminogênio, causam fibrinólise.

As enzimas “tipo-trombina” ou “trombo-proteases” foram detectadas em 36 venenos da família Crotalidae (Stocker, 1978). Estas diferem em propriedades físico-químicas e especificidade de clivagem peptídica, mas têm como características comuns:

- são na maioria glicoproteínas com massa molecular entre 25 e 38 Kd;
- apresentam serina em seu centro ativo e mostram atividade esterásica e amidásica sobre substratos sintéticos;
- com a redução das ligações S-S não sofrem redução de massa molecular, indicando cadeia peptídica única.

O ANCROD, Obtida do *Calloselasma rhodostoma*, e a Batroxobina, obtida do *Bothrops atrox*, são as enzimas tipo-trombina melhor caracterizadas, pelo fato de terem sido usadas como agentes de defibrinogenação terapêutica. O Ancrod apresenta massa molecular de 35 Kd e um conteúdo alto de carboidratos (29%), o que lhe garante estabilidade e resistência à heparina. Hidroliza os substratos sintéticos BAEE, TAME, AME, AAME, BAPNA mas não o LYSME. Não hidroliza caseína, hemoglobina, insulina e glucagon. É inibida pelo DFP e TSF, embora menos sensível que a Trombina, o que aponta para seu caráter de serino-protease. Diferencia-se da Trombina por sua insensibilidade à inibição por heparina, Hirundina, SBTI e Aprotinina. Atua seletivamente sobre o fibrinogênio, hidrolizando o fibrinopeptídeo A da cadeia  $\alpha$  do fibrinogênio, o que permite a formação de monômeros de fibrina capazes de se polimerizar

ponta-a-ponta, formar rede, mas pela ausência do fator XIII ativo não sofrem ligações transpeptídicas. O polímero assim formado é facilmente disperso pela uréia e hidrolizado pelo sistema fibrinolítico.

O Ancrod não ativa qualquer outro fator de coagulação, não estimula a agregação e a liberação de fatores plaquetários como a Trombina e, também não ataca o fibrinogênio plaquetário (Kornalick, 1991).

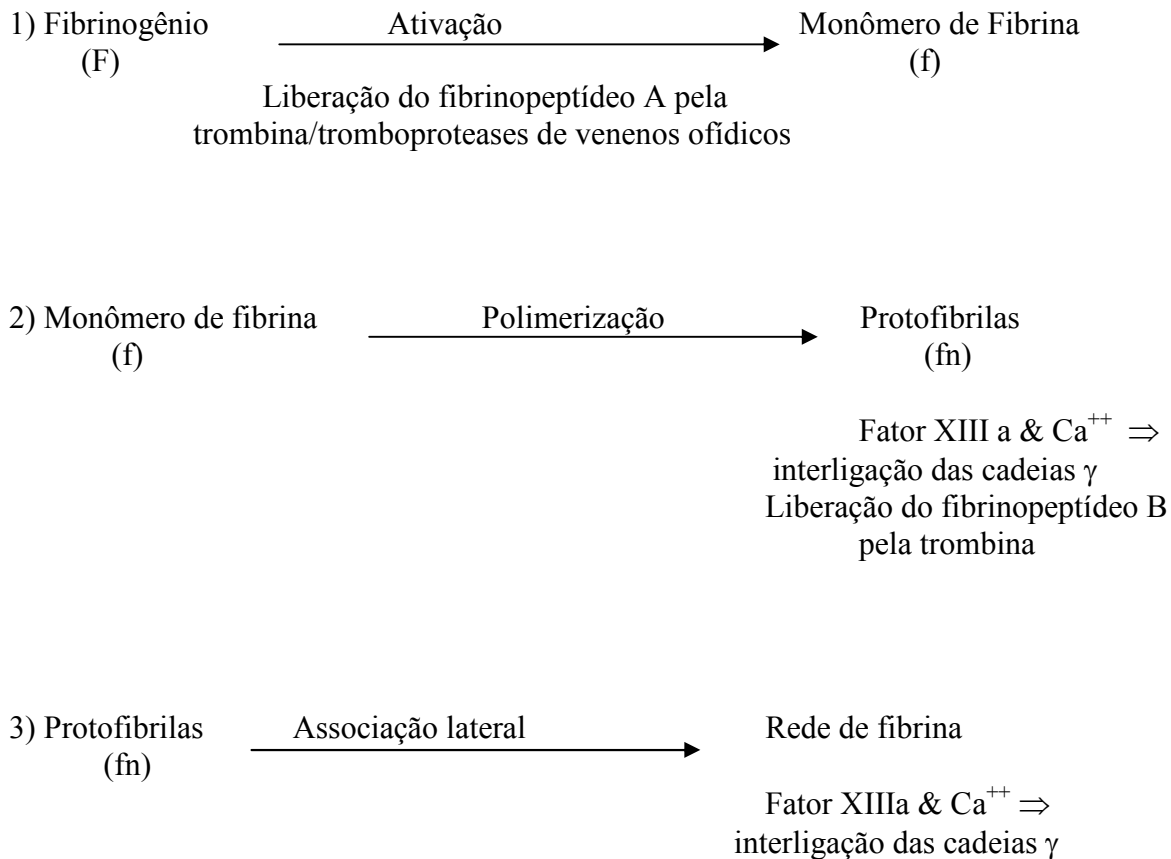
Batroxobina é o nome genérico que se dá à todas as enzimas “tipo-trombina” obtidas dos venenos bothrópicos, sendo a fonte mais comum o veneno de *B. atrox*. A especificidade catalítica sobre fibrinogênio, proteínas e substratos sintéticos é exatamente a mesma do Ancrod. Seu peso molecular é de 32 Kd e o conteúdo em carboidratos, menor que o Ancrod, o que o torna menos estável em solução. Com exceção da batroxobina de *B. moojeni* (Defibrase) que é capaz de ativar o fator XIII, todas as demais batroxobinas não afetam os outros fatores de coagulação e plaquetas (Stoker, 1980). A sua sensibilidade a inibidores é exatamente a mesma que o Ancrod.

Os venenos de *Bitis gabonica* e *Bothrops insularis* são possuidores de trombo-proteases com a propriedade muito particular de retirar da molécula do fibrinogênio, tanto o fibrinopeptídeo A e quanto B. A gabonase, também é capaz de ativar o fator XIII e portanto leva à formação de um coágulo firme com ligações transpeptídicas na rede de fibrina. A enzima do veneno de *B. insularis* tem massa molecular mais alta, 45 KD, é completamente inibida por heparina e PMSF, mas não é capaz de ativar o fator XIII (Kornalick, 1991).

Em 1989, Vidigal-Silveira et al. reportaram a purificação de uma trombo-protease do veneno de *Lachesis muta muta* proveniente de espécimes da região amazônica, apresentando carboidrato em sua molécula, capaz de liberar o fibrinopeptídeo A do fibrinogênio mas não o fibropeptídeo B, apresentando atividade amidásica e não ativadora do fator XIII. Em publicação posterior Magalhães et al. (1993), apresentaram, a completa seqüência de amino-ácidos desta

enzima, de massa molecular 25,656 Kd, com 62% de identidade seqüencial com a Batroxobina e 63% com o Ancrod.

### V.1.3 – CINÉTICA NÃO-ENZIMÁTICA DA COAGULAÇÃO DO FIBRINOGENÍO



O esquema acima apresentado por Hantagn et al. (1983), baseia-se na seqüência de três reações consecutivas: ativação, polimerização e associação lateral. Esta proposta apoia-se principalmente nas contribuições de Ferry (1952 a,b) Katz et al (1952) Scheraga & Laskowski (1957), Blombäck (1959), Doolittle (1973), Blombäck et al (1978) e Hantgan & Hermans (1979).

“In vitro” a clivagem proteolítica da cadeia A  $\alpha$  do fibrinogênio entre os amino-ácidos 16 e 17 (Arg-Gly) pela trombina ou tromboprotases de venenos ofídicos, constitui o evento de ativação inicial. O segundo passo envolve a polimerização dos monômeros de fibrina, através de

ligações não covalentes onde há sobreposições de metade do comprimento da molécula do fibrinogênio, formando um polímero linear de dupla-fita. Este crescimento linear predomina até que protofibrilas da ordem de 600 nm ( $\approx 26$  unidades) sejam formadas. A partir deste ponto as protofibrilas abruptamente iniciam o processo de associação lateral com aumento considerável de diâmetro até 20 a 30 protofibrilas. No momento da agregação lateral, uma fibrila ou um feixe em crescimento tem seus extremos associados a dois feixes distintos, criando uma estrutura de rede que é responsável pela formação do gel de fibrina (80% água e 20% proteína) A polimerização procede até o esgotamento dos monômeros de fibrina e a associação lateral cessa com a imobilização das protofibrilas no gel.

O fibrinopeptídeo B parece ser removido pela trombina, preferencialmente das protofibrilas em crescimento, o que acelera a velocidade e o grau de associação lateral. Entretanto a retirada do fibrinopeptídeo B não é requerida para a formação de gel, uma vez que este pode ser obtido pela ação das reptilases como a Ancrod (Shen et al. 1977).

Na presença do fator XIIIa e  $Ca^{++}$ , ocorre a etapa final de estabilização da rede de fibrina, que é a formação de ligações covalentes entre as cadeias  $\gamma$  do fibrinogênio/ (ligações transpeptídicas).

Hantgan et al (1983), revisaram criticamente a aplicação de técnicas de dispersão de luz para o estudo cinético das etapas de polimerização dos monômeros de fibrina e associação lateral de protofibrilas ressaltando os aspectos:

- a intensidade da luz dispersada pelo fibrinogênio e seus oligômeros (protofibrilas) em solução, é função da concentração, massa molecular e das dimensões dessas macromoléculas;
- à medida que o comprimento das protofibrilas aumenta, a intensidade de dispersão atinge um platô ( $>15$  unidades) o qual é proporcional à concentração e massa por unidade de comprimento do polímero;

- a partir de uma concentração crítica de protofibrilas de tamanho adequado no meio, inicia-se abruptamente a etapa de agregação lateral e formação de gel, que ocasiona intenso aumento na dispersão de luz, devido ao incremento no diâmetro das fibras;
- as velocidades de combinação do monômero e associação de protofibrilas podem ser bastante reduzidas pelo aumento da força iônica, de modo que, utilizando alta concentração de enzima, baixa concentração de substrato (fibrinogênio) e, alta concentração salina, a fase de crescimento de protofibrilas pode ser distinguida das subseqüentes fases de associação lateral e gelificação;
- as velocidades iniciais da reação de polimerização, obtidas através de dispersão de luz em cubetas de mistura por fluxo contínuo (stopped-flow), foram proporcionais ao quadrado da concentração de fibrinogênio, indicando cinética bimolecular.

#### **V.1.4 – MÉTODOS PARA O ESTUDO CINÉTICO DE TROMBINA E ENZIMAS DO TIPO-TROMBINA**

Pelo fato da trombina ser uma enzima análoga da tripsina, todos os substratos sintéticos cromogênicos para serino-proteases, contendo arginina ou glicina, podem ser utilizados para estudos cinéticos, com seguimento em tempo real por métodos titulométricos ou fotométricos. Entretanto para mapeamento do centro ativo, o próprio fibrinogênio, fragmentos do fibrinogênio e peptídeos menores contendo a seqüência de amino-ácidos em torno da ligação Arg-Gli (16-17) da cadeia A $\alpha$  devem ser utilizados (Sheraga, 1983).

A molécula intacta do fibrinogênio é o substrato que apresenta a maior constante catalítica (Kcat) e a menor constante de Michaelis (Km), tanto para a retirada do fibrinopeptídeo A quanto o B. O acompanhamento analítico da liberação desses peptídeos, de modo contínuo, é infactível até os dias de hoje. Desta maneira o estudo cinético da ação da trombina sobre o fibrinogênio

segue a metodologia clássica de interrupção da reação em vários tempos. A cromatografia líquida de alta pressão em colunas da sílica (fase-reversa), é então utilizada para dosagem dos fibrinopeptídeos A e B contra padrões obtidos por síntese (Martinelli & Sheraga, 1980; Shafer, 1982). Este método é corretamente utilizado para a caracterização das trombo-proteases de venenos ofídicos, quanto a sua especificidade em liberar o fibrinogênio A, B ou ambos. Entretanto os dados cinéticos publicados sobre estas enzimas referem-se exclusivamente à substratos cromogênicos sintéticos (Stocker, 1980; Kornalick, 1991).

O uso da dispersão de luz como método para registro cinético contínuo da atuação da trombina sobre o fibrinogênio, em condições de velocidade limitada pela etapa enzimática, está sujeito à restrição de que ambos fibrinopeptídido A e B são liberados, sendo o último retirado preferencialmente das protofibrilas em crescimento. Pelo fato de que os monômeros de fibrina obtidos em meio de alta força iônica. (0,5 M NaCl) polimerizam-se à mesma velocidade, quer sejam produzidos pela Ancrod (Fibrinopeptídeo A retirado) ou pela Trombina (Fibrinopeptídeos A e B retirados), Hantgan & Hermans (1979) puderam utilizar a relação entre a meia-vida para polimerização nestas condições e a concentração de Trombina, para o cálculo da velocidade máxima de liberação do Fibrinopeptídeo A. O valor obtido de  $1,2 \cdot 10^{-11}$  moles/unidade NIH de Trombina/L/s foi comparável ao obtido por Blombäck et al. (1977), de  $1,0 \cdot 10^{-10}$  moles/unidade NIH de trombina/L/s em meio de força iônica 0,15 M, onde esta etapa é mais rápida.

A associação lateral entre protofibrilas que conduz à formação de fibras e gelificação, é uma etapa muito sensível à inibição por alta força iônica do meio, não ocorrendo em NaCl 0,5 M. Em meio fisiológico ( $\approx 0,15$  M) esta etapa inicia-se abruptamente após a concentração de protofibrilas, entre 15 e 20 unidades de comprimento, atingir um valor crítico. A latência para este fenômeno constitui o clássico “tempo de coagulação do fibrinogênio”. A retirada do fibrinopeptídeo B pela Trombina, durante a fase de polimerização, reduz a intensidade da carga negativa que a molécula de fibrinogênio e as protofibrilas apresentam em pH fisiológico, (Ferry,

1952A) o que reduz a energia de ativação para a aproximação das protofibrilas e formação de fibras. Assim as latências para a etapa de associação lateral quando o fibrinogênio é ativado pela Trombina, é muito menor que após ativação pela Batroxobina ou Ancrod. A relação entre a latência para início da fase de associação lateral e a concentração de Trombina, é aproximadamente linear, sendo utilizada por Hantgan & Hermans (1979) para a estimativa da taxa de liberação do fibrinogênio B. A estimativa de  $2 \cdot 10^{-12}$  moles/unidades NIH de Trombina/L/s mostrou-se sessenta vezes abaixo da estimativa por método direto, obtido por Martinelli & Sheraga (1980) que foi de  $1,15 \cdot 10^{-10}$  moles/unidades NIH de Trombina/L/s.

A aplicabilidade da dispersão de luz ao estudo cinético em tempo real, da ação das trombo-proteases de venenos sobre o fibrinogênio, seria então uma consequência direta e favorável do fato de que somente o fibrinopeptídeo A é retirado. Entretanto o método não foi utilizado, ou mesmo sugerido por Hantgan & Hermans (1979, 1983) evidentemente por não coincidir com suas linhas de interesse.

#### **V.1.5 IMPORTÂNCIA CLÍNICA DAS ENZIMAS TIPO-TROMBINA NA FISIOPATOLOGIA DO ACIDENTE OFÍDICO.**

Há, na literatura especializada, o consenso de que o mero consumo de fibrinogênio pelas enzimas do tipo-trombina, constitui um aspecto relativamente benigno do acidente ofídico, a não ser que o paciente já apresente previamente lesões hemorrágicas, ou que estas, sejam causadas pelo próprio veneno através dos fatores hemorrágicos. A incoagulabilidade sangüínea por simples deficiência de fibrinogênio, sem consumo de plaquetas e dos fatores II, V, VIII, IX e X, sem o aparecimento dos produtos de degradação da fibrina pela plasmina, foi obtida pela infusão de Ancrod ou Batroxobina tanto em homens quanto animais, por grandes períodos e sem qualquer risco (Kornalick, 1991).

O veneno de *C. d. terrificus* contém uma trombo-proteases do tipo Ancrod e Batroxobina descrita por Raw et al. (1986), a qual é responsável pelas alterações de coagulação que incidem de 25% (Barraviera et al. 1989) a 31% (Kamiguti & Cardoso, 1989) no acidente crotálico. O quadro hematológico é benigno coincide exatamente com aquele descrito acima para a infusão endovenosa do Ancrod e Batroxobina. Nenhum consumo de plaqueta é observado, porém Barraviera (1990) apresentou resultados demonstrando que estas perdem sua capacidade de agregação.

No acidente bothrópico, a incidência de alterações na coagulação é de 36% (Kamiguti & Cardoso, 1989), os quais apresentam além da incoagulabilidade sangüínea decorrente da batroxobina, trombocitopenia moderada, redução dos níveis dos fatores II, V e VIII e ativação do sistema fibrinolítico (Kamiguti et al. 1986). Este quadro, decorre da presença nos venenos bothrópicos de proteases que ativam a protrombina via ativação do fator X (Furukawa & Hayashi, 1977); Nahas et al. (1979).

O acidente laquético, por ser mais raro, é menos conhecido quanto a seus aspectos fisiopatológicos, entretanto já sendo descritas a defibrinogenação sem ocorrência de trombocitopenia (Bolanõs et al. 1982), o que aponta para a enzima tipo-trombina como componente causador, no veneno.

Independentemente das particularidades e complexidades, que a propedêutica hematológica utilizada em cada caso de acidente ofídico venha revelar, a persistência de distúrbios de coagulação indica a presença de componentes ativos do veneno no plasma e portanto também à absorver do sítio de inoculação. Assim, no acidente botrópico a administração correta de antiveneno, após constatação de incoagulabilidade sangüínea por afibrinogenemia, conduz à restauração dos níveis de fibrinogênio até a metade do normal, em 6 horas (Rosenfeld, 1958). Este período decorre do tempo de meia renovação do fibrinogênio pelo fígado.

Em resumo, a maior importância clínica das enzimas tipo-trombina e dos outros componentes dos venenos produtores de distúrbios de coagulação, mesmo que não constitua agravante de hemorragia, está em permitir uma avaliação laboratorial do consumo de antiveneno (Reid & Theakston, 1983). Os tempos de coagulação, de protrombina, de tromboplastina parcial ativada, a contagem de plaquetas e o nível de fibrinogênio plasmático, são os parâmetros mais requisitos para o acompanhamento (Santos Amaral et al. 1980; Maruyama et al. 1990; Barraviera et al. 1989; Kamiguti et al. 1986).

#### V.1.5 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS EM RELAÇÃO AO ENZIMA TIPO-TROMBINA DE *Lachesis muta muta*.

---

Em virtude da disponibilidade desta enzima em forma pura na FUNED-MG e, de sua homologia com as demais trombo-proteases bothrópicas, foi nosso objetivo o desenvolvimento de um método para avaliação funcional do enzima sobre substrato natural (fibrinogênio), que apresentasse o conjunto de atributos:

- Sensibilidade ao reagente analisado  $> 10^{-8}$  M.
- Simplicidade metodológica e baixo custo de reagentes.
- Rapidez e reprodutibilidade.
- Sensibilidade ao efeito de anticorpos.
- Utilidade para estudos do mecanismo catalítico da enzima e efeito de inibidores.

## V.2 - MATERIAS E MÉTODOS

---

### V.2.1 – ENZIMA

A enzima tipo-trombina de *Lachesis muta muta* (T-TL) foi obtida do Prof. Arinos Magalhães (FUNED-MG) em estado de pureza segundo Vidigal-Silveira et al. (1989). O material liofilizado apresentando 1180 unidades NIH/mg sobre fibrinogênio humano, foi dissolvido em tampão Tris-HCl 0,02 M pH 7,50, a concentração final determinada pelo seu coeficiente de extinção molar a 280 nm e a adicionado igual volume de glicerol, tendo no final, sido obtida a concentração de 225 µg.mL. Esta solução foi aliqüotada em tubos Eppendorf contendo 1 mL cada e armazenados a -20°C.

### V.2.2 – SUBSTRATOS

Fibrinogênio Bovino Sigma fração I, tipo IV apresentando 95% de proteína coagulável com a composição:

- Proteína total 60% (0,57)= fração coagulável
- Citrato de sódio 15%
- Cloreto de sódio 25%

Devido à dificuldade de dissolução, uma determinada quantidade de fibrinogênio era pesada no dia anterior ao experimento, dentro de tubo plástico de fundo cônico (tipo Falcon) e um volume de tampão fosfato 0,4 M pH 7,4, dez vezes menor que o volume final pretendido, era adicionado sem qualquer agitação. No dia seguinte o tubo era retirado da cabine do refrigerador (4 °C) e agitado moderadamente por rotação. Após uniformização o material era centrifugado a

3.500 rpm em centrífuga clínica comum. As alíquotas eram tomadas do sobrenadante por micropipeta automática.

L-BAPNA – N $\alpha$  Benzoyl - L – Arginina p-Nitroanilida Sigma. Utilizado na concentração de 10<sup>-3</sup>M em tampão fosfato 0,04 M pH 8,0 ou tampão tris-HCl 0,02 M pH 8,1.

### V.2.3 – VENENOS E ANTIVENENOS

Os venenos foram obtidos em forma liofilizada do Serpentário da FUNED-MG e correspondem ao agrupamento dos venenos individuais de número pequeno de espécimes.

Venenos: *B. jararaca* 050287; *C. d. terrificus* 170491 e *Lachesis muta muta*, diluídos e armazenados do mesmo modo que a enzima.

Antiveneno: ABL FUNED 900530 – vide seção IV.2.2

### V.2.4 – INCUBAÇÕES

100 $\mu$ l da solução 10x de fibrinogênio em tampão fosfato 0,4 M pH 7,4 + volume adequado do mesmo tampão + antiveneno previamente diluído + água bidestilada em quantidade suficiente para o volume final de 1000 $\mu$ l, em tubo de vidro 75 x 10 mm (tubo de hemólise). Após uma hora de incubação a 37° C as soluções de fibrinogênio atingiam o máximo de transparência sendo então utilizadas.

Uma alíquota da solução estoque da enzima ou veneno era diluída 5 vezes em tampão fosfato e mantida em banho de gelo até o momento de seu uso para iniciar a reação.

## **V.2.5 – PROCEDIMENTOS PARA REGISTRO NEFELOMÉTRICO DA COAGULAÇÃO DO FIBRINOGENO.**

O nefelômetro utilizado e sua calibração já foi descrito na seção IV.2.7 e para registro cinético este foi acoplado à uma registrador potenciométrico com dez escalas de atenuação (10 a 100 mV para fundo de escala). Após uma hora de incubação à 37° C o tubo de hemólise contendo a solução de Fibrinogênio (1000 $\mu$ L) era transferido para o compartimento de leitura e a dispersão basal de luz compensada potenciometricamente para que todos os registros partissem do mesmo nível. A seguir a reação era iniciada por adição da enzima em volume fixado em 10  $\mu$ L, adicionado à cubeta por uma micro-colher colocada à ponta de uma vareta de PVC. Com a própria vareta a amostra era misturada por alguns segundos e o compartimento de leitura fechado, ao mesmo tempo que se dava partida ao arraste de papel do registrador. No caso dos experimentos de adição parcelada de enzima ou adição de inibidor, o compartimento de leitura era aberto segundos antes do início da fase de agregação lateral e gelificação, a nova amostra adicionada e misturada e, o compartimento fechado novamente.

Toda determinação foi realizada em duplicata e o resultado médio expresso.

Após as curvas de velocidade da reação em função da concentração de substrato, os tubos eram mantidos a 37° C com leitura repetidas à cada 15 minutos até a estabilização, para a obtenção da dispersão final.

## V.2.6 – PROCEDIMENTOS PARA ANÁLISE E APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

As velocidades das reações foram calculadas a partir da inclinação da parte retilínea do registro de dispersão de luz, durante a fase de agregação lateral de protofibrilas e gelificação e expressa em mV/s.

A partir da relação entre dispersão final (mV) e a concentração de fibrinogênio nas curvas de velocidade da reação em função da concentração de substrato, foi calculada a taxa de conversão de unidades mV/s para mol de fibrinogênio/s, o que permitiu calcular a constante catalítica (V/eo) da enzima tipo-trombina de *Lachesis muta muta*.

As funções lineares foram ajustadas por regressão linear simples e o coeficiente de correlação expresso. As funções hiperbólicas e sigmoidais foram ajustadas visualmente com o auxílio de “curvas francesas”. Nas curvas de neutralização os pontos foram unidos simplesmente, sem considerar qualquer modelo de relação.

## V.2.7 – SEPARAÇÃO DA ENZIMA LIVRE DA COMPLEXADA COM ANTICORPOS DO ABL – FUNED 900530

- Suporte cromatográfico: Sephadex G-100 – Fine – Pharmacia Fine Chemicals
- Temperatura de operação: 0<sup>0</sup> C
- Coluna: 30 cm x 0,8 cm
- Eluente: tampão tris-HCl 0,02 M pH 7,50 1% albumina bovina.
- Fluxo: 3 ml/cm<sup>2</sup> /hora
- Amostra de enzima: 4,38.10<sup>-10</sup> moles em 0,5 ml
- Amostra coletada: 0,25 ml

- Unidade de coagulação: 1 unidade equivale à quantidade de enzima que coagula a solução de fibrinogênio bovino (2mg/ml) em tampão fosfato 0,04 M pH 7,4, 37° C à velocidade de 2,1 mV/s = 0,225 µg do enzima puro.
- Unidade amidásica: 1 unidade equivale à quantidade de enzima que hidroliza  $1 \cdot 10^{-6}$  moles/min. de BAPNA, de uma solução  $10^{-3}$  M em tampão tris-HCl 0,02 M pH 7,50 a 37° C, medida como  $\Delta A$  410 nm.

### **V.3 – RESULTADOS**

---

Os resultados apresentados nesta seção foram obtidos em colaboração com Laudiene Sadala, Prof. Arinos Magalhães e Prof. Carlos Ribeiro Diniz.

#### **V.3.1 – REGISTRO NEFELOMÉTRICO DA COAGULAÇÃO DO FIBRINOGENIO BOVINO – DEMONSTRAÇÃO QUE A CINÉTICA ESTÁ LIMITADA PELA ETAPA ENZIMÁTICA.**

Os registros na fig. V.3.1A foram obtidos para uma curva de velocidade de coagulação em função da concentração do substrato. Em cada um destes, a intensidade de dispersão de luz (mV), foi continuamente registrada em função do tempo, após adição da enzima em to. Acompanhando o registro III pode-se identificar as etapas:

- Latência ou fase de registro praticamente vertical, neste caso com duração de 65 segundos, onde o incremento da dispersão de luz em função do tempo é muito pequeno – corresponde às fases de ativação e polimerização de Hantgan & Hermans (1979).
- Equilíbrio Dinâmico ou fase de registro onde se observa um grande incremento linear da intensidade de dispersão de luz em função do tempo-corresponde ao início das fases de agregação lateral e gelificação de Hantgan & Hermans (1979).
- Esgotamento de substrato ou fase onde a taxa de incremento da dispersão de luz em função do tempo, não se mantém mais, decrescendo assintoticamente para zero – não encontra correspondência no trabalho de Hantgan & Hermans (1979) porque estes utilizaram grandes quantidades de enzima para pequenas quantidades de substratos.

Nos registros I, II e III as fases lineares ou de equilíbrio dinâmico são menos duradouras porque o esgotamento de substrato é precoce. Nos registros IV, V, VI e VII, devido à maior concentração de substrato, as fases lineares são mais duradouras. As latências, que





correspondem ao popular “tempo de coagulação”, mostraram um comportamento caprichoso. Em tampão fosfato 0,02 M cresceram continuamente do registro I (0,25 mg Fb/mL) até o registro VII (3,0 mg FB/mL). Nos tampões 0,04 M e 0,06 M as latências encurtaram-se do registro I até o III, voltando novamente a crescer até o VII. Este fenômeno, observado em 8 curvas de velocidade da reação em função da concentração do substrato, certamente decorre da presença de citrato e cloreto de sódio na preparação comercial de fibrinogênio (vide seção V.4.1).

Com o objetivo de investigar a fase linear ou de equilíbrio dinâmico, foram realizados os experimentos ilustrados pela figura V.3.1B e Tabela (V.3.1). Nestes, a enzima foi adicionada em duas parcelas,  $x$  em  $t_0$  mais  $x$  em  $t_1$ ,  $x$  em  $t_0$  mais  $2x$  em  $t_1$ , etc. Inicialmente determinou-se a velocidade da reação (mV/s) adicionando-se as quantidades  $x$  e  $2x$  em  $t_0$ . Em seguida adicionou-se  $x$  em  $t_0$  e, abrindo-se o compartimento de leitura 30 segundos antes do início da fase de agregação lateral e gelificação, a partir da qual a rede de fibrina não pode ser mais tocada, misturou-se a segunda parcela, fechando-se novamente a entrada de luz (vide artefato indicado por  $t_1$  na fig. V.3.1.B).

Os resultados sumarizados na tabela V.3.1 mostraram que a velocidade de coagulação após adição da segunda parcela sempre se aproximou mais da velocidade observada com adição a um só tempo de quantidades  $2x$  e  $3x$ .

Outro experimento realizado para atingir o mesmo objetivo foi adicionar à cubeta um inibidor enzimático no momento  $t_1$ . O uso de benzamidas não se mostrou adequado devido a sua natureza catiônica que induz “per se” a precipitação do fibrinogênio. O antiveneno bothrópico-laquéico (ABL FUNED – 900530) em grande excesso, adicionado em  $t_1$  reduziu a inclinação da fase linear (0,09  $\mu$ g de t-TL mm em 2,5 mg/ml Fb) de 1,00 mV/s para 0,15 mV/s.

**TABELA V.3.1** - Efeito da adição parcelada da enzima sobre a velocidade de coagulação do fibrinogênio bovino em tampão fosfato 0,04 M, pH 7,40.

Data	Enzima	Momento da adição		Velocidade mV/s	Fibrinogênio mg/mL
		µg em t <sub>0</sub>	µg em t <sub>1</sub>		
24/11/93	t-TL mm	0,090	--	0,75	2,5
	"	0,270	--	1,91	"
	"	0,090	0,180	1,61	"
	"	0,090	0,270	2,53	"
24/11/93	t-TL mm	0,090	--	1,09	2,5
	"	0,090	--	1,20	"
	"	0,180	--	2,00	"
	"	0,090	0,090	2,30	"
13/09/93	<i>Crotalus d. t.</i>	2,5	--	0,46	2,0
	ven. bruto	5,0	--	0,74	"
		2,5	2,5	0,91	"
14/09/93	<i>B. jararaca</i>	2,5	--	0,43	2,0
	ven. bruto	5,0	--	0,98	"
		2,5	2,5	1,10	"

t<sub>0</sub>: início do registro;

t<sub>1</sub>: momento imediatamente anterior ao início da fase de agregação lateral.

### V.3.2 – ESCOLHA DO SISTEMA TAMPÃO, DO pH, DA MOLARIDADE E DO TEMPO DE INCUBAÇÃO PRÉVIA DO FIBRINOGÊNIO

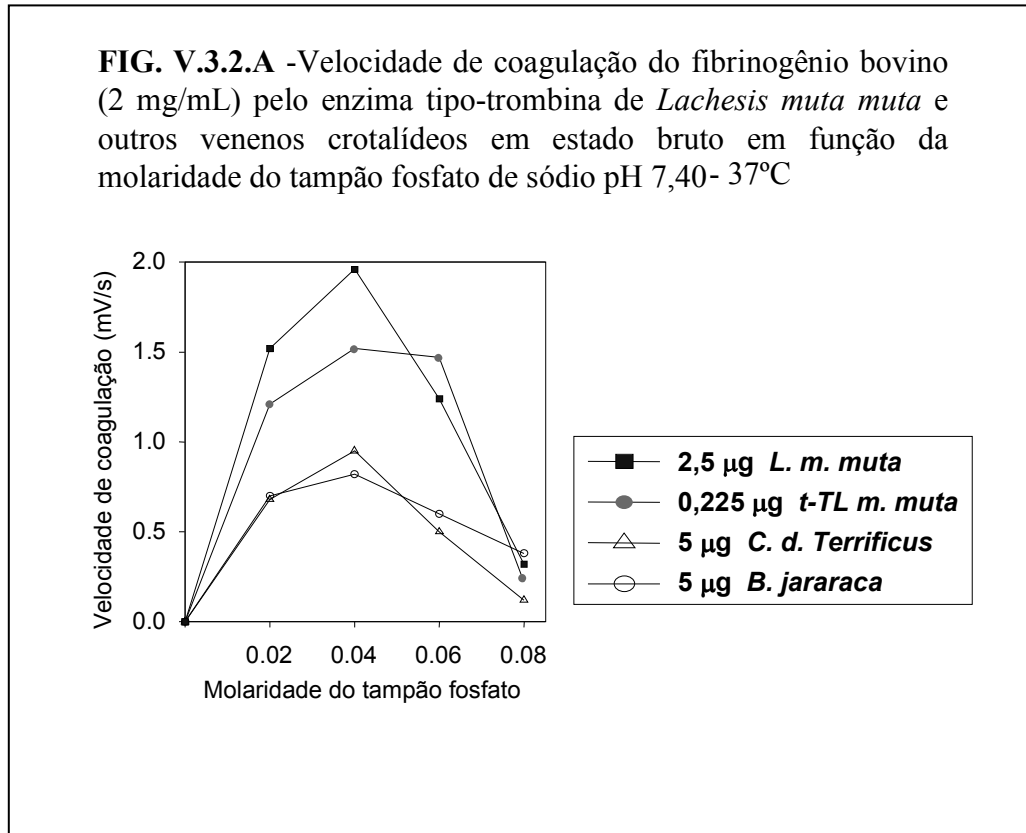
A concentração de cálcio afeta grandemente a estrutura do gel de fibrina. É fato bem conhecido que o cálcio encurta os tempos de coagulação do fibrinogênio na presença de trombina (Seegers & Smith, 1942). Este efeito não é atribuído a um aumento de velocidade de hidrólise de fibrinopeptídeos, mas mais provavelmente a um efeito nas reações de polimerização e gelificação. A rigidez e opacidade de gel aumentam quando formados na presença de cálcio (Okada & Blombäck, 1983).

No início de nosso trabalho, verificamos que o cálcio residual da água destilada, bem como o cálcio contaminante dos reagentes P.A. A.C.S., era suficientemente alto para afetar não

só a velocidade das fases de agregação lateral, como também para causar uma gelificação em fibras grosseiras, visivelmente não uniformes. Este acontecimento tornava o registro nefelométrico errático e, portanto, não confiável. O uso de citrato ou EDTA no tampão tris-HCl reduziu muito intensamente as velocidades de coagulação além de que não trouxe melhora na uniformidade do gel. Nesta situação o recurso geralmente utilizado nos trabalhos mais exatos de cinética (Martinelli & Scheraga, 1980; Hantgan & Hermans (1979) é a diálise prévia do fibrinogênio contra o próprio tampão onde será realizada a reação, evidentemente confeccionando-o com água e reagentes de baixa contaminação.

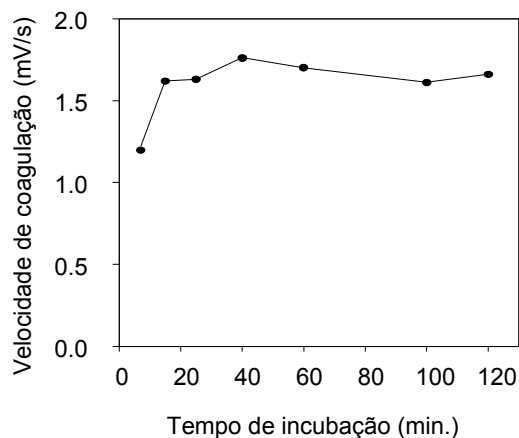
Devido nosso objetivo de desenvolver metodologia simples que pudesse eventualmente ser executada em qualquer laboratório na América do Sul, nas regiões tropicais da Ásia e também na África (regiões onde o acidente ofídico é endêmico); optamos por utilizar a preparação comercial de fibrinogênio sem diálise prévia, em tampão fosfato de sódio, que ademais é o tampão classicamente utilizado. Neste ponto deve-se salientar que o uso do nefelômetro não é essencial, podendo a reação ser acompanhada pelo desenvolvimento da turbidez em qualquer fotômetro no espectro visível. O uso do tampão fosfato permitiu obter soluções bastante translúcidas de fibrinogênio, sem qualquer preocupação com o controle dos níveis de cálcio contaminante no próprio fibrinogênio, na água e nos reagentes, devido às suas propriedades quelantes. Deste modo a solução de fibrinogênio manteve sua transparência e taxas de coagulação por até 48 horas após dissolução. A agregação lateral de protofibrilas e a concomitante gelificação, na presença de tampão fosfato, ocorreram com a deposição de fibras muito finas, produzindo um gel opalescente e brilhante, semi-translúcido, uniforme e de textura indetectável à vista desarmada. O registro cinético da intensidade de luz dispersa, obtido nestas condições mostrou-se sem ruído, contínuo e uniforme. O pH 7,40 foi pré-determinado por razões fisiológicas, sem levar em conta a indicação uniforme da literatura de um ótimo em torno de pH

8,0. A fig. V.3.2A mostra que na molaridade 0,04 para o tampão fosfato pH 7,40, a velocidade de coagulação foi máxima tanto para a enzima t-TL mm quanto venenos brutos.



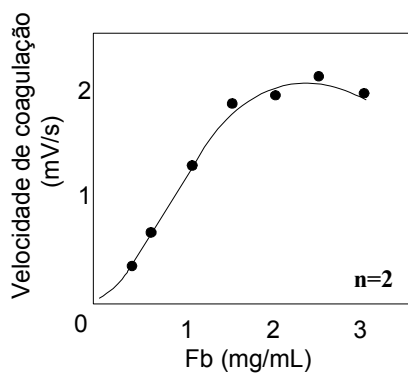
Após 30-40 minutos a 37° C, a partir do momento em que a solução de fibrinogênio bovino à 20 mg/ml – tampão fosfato 0,4 M, pH 7,40, foi diluída para 2,0 mg/ml – tampão fosfato 0,04 M pH 7,4, a transparência da solução de fibrinogênio como também a velocidade de coagulação atingem valores máximos (vide fig. V.3.2B). Sendo as soluções de fibrinogênio viscosas, o que impede o uso de agitação drástica para obter uniformização, sob pena de inclusão de bolhas de ar na massa líquida, a latência observada deve refletir o tempo necessário para que a concentração de fosfato na camada de solvatação das moléculas de fibrinogênio se reduza ao valor ótimo de 0,04 M.

**FIG. V.3.2.B** - Influência do tempo de incubação prévia a 37° C em tampão fosfato de sódio pH 7,4, na velocidade de coagulação fibrinogênio bovino (2 mg/mL) pelo veneno bruto (2 µg) de *Lachesis muta muta*.



### V.3.3 - INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO NA VELOCIDADE DE COAGULAÇÃO E NA QUANTIDADE DE PRODUTO FORMADO AO FINAL DA REAÇÃO.

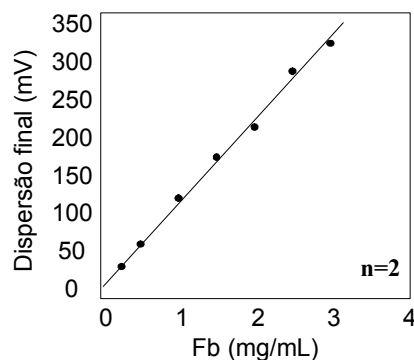
**FIG. V.3.3.A<sub>1</sub>** - Velocidade de coagulação do fibrinogênio bovino pelo enzima tipo-Trombina de *Lachesis muta muta* (0,225 µg/mL) em função da concentração de substrato. Tampão fosfato de sódio 0,04 M - pH 7,40 - 37° C - 24/09/93



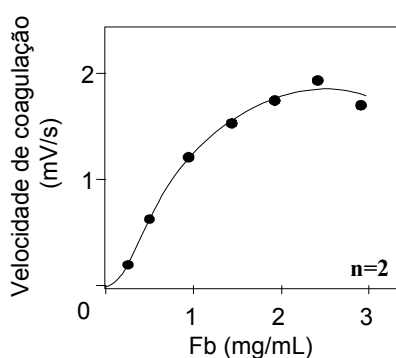
**FIG. V.3.3.A<sub>2</sub>** - Dispersão de luz em função da concentração de fibrinogênio bovino. Após o registro de velocidade os tubos foram mantidos a 37°C com leituras a cada 15 min., até a estabilização.

$$mV = 59993748 \cdot M^{-1}Fb + 2,97$$

$$r = 0,998 - R^2 = 0,996$$



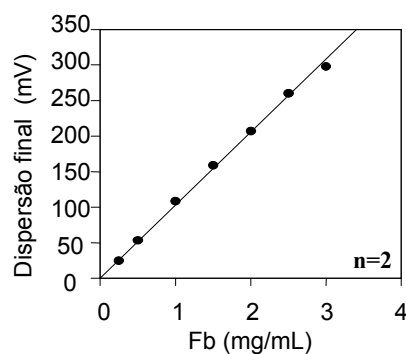
**FIG. V.3.3.B<sub>1</sub>** - Velocidade de coagulação do fibrinogênio bovino pelo enzima tipo-trombina de *Lachesis muta muta* (0,225 µg/mL) em função da concentração de substrato. Tampão fosfato de sódio 0,04 M - pH 7,40 - 37° C - 28/09/93



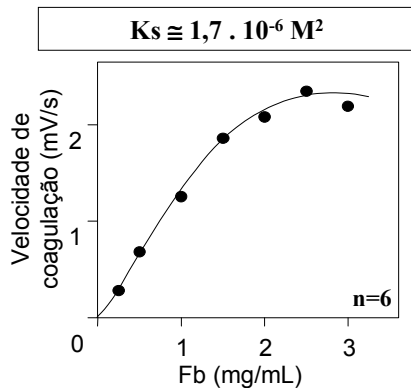
**FIG. V.3.3.B<sub>2</sub>** - Dispersão de luz em função da concentração de fibrinogênio bovino. Após o registro de velocidade os tubos foram mantidos a 37°C com leituras a cada 15 min., até a estabilização.

$$mV = 55653245 \cdot M^{-1} \cdot Fb + 3,0$$

$$r = 0,999$$



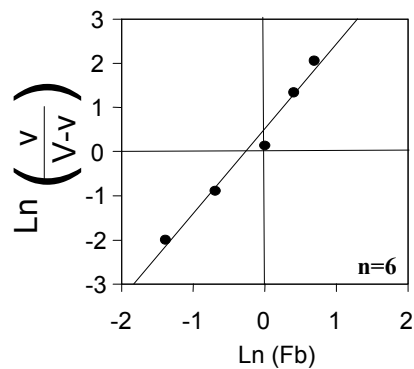
**FIG. V.3.3.C<sub>1</sub>** - Velocidade de coagulação do fibrinogênio bovino pelo enzima tipo-Trombina de *Lachesis muta muta* (0,225 µg/mL) em função da concentração de substrato. Tampão fosfato de sódio 0,04 M- pH 7,40 - 37° C - (agrupamento de 3 experimentos c/ replicatas)



**FIG. V.3.3.C<sub>2</sub>** - Gráfico de Hill para os dados da figura V.3.3.C<sub>1</sub>

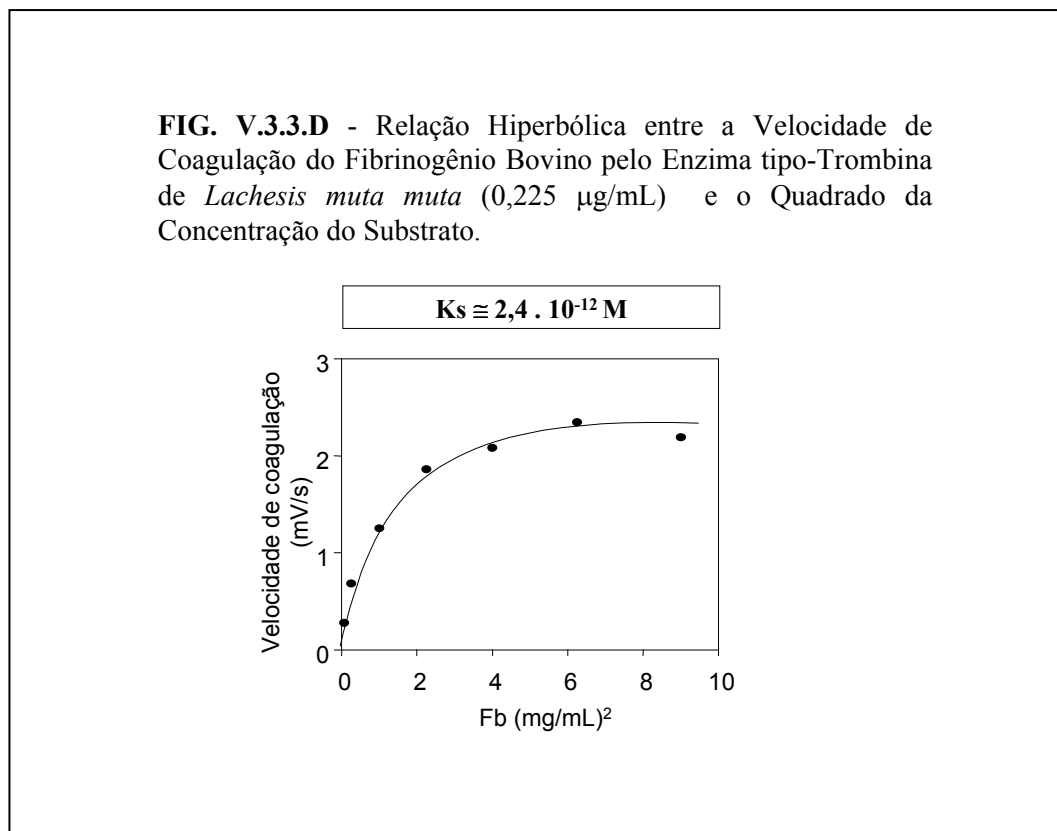
$$b = 1,92$$

$$r = 0,990$$

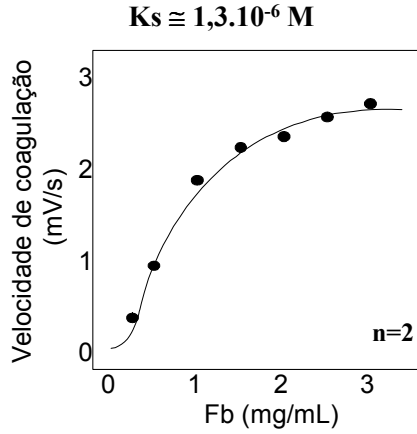


As figuras cinéticas V.3.3A1 e A2 foram feitas apenas com replicatas em cada ponto, com o objetivo de verificar a reprodutibilidade do padrão de relação sigmoidal obtido, entre a velocidade de coagulação e a concentração de fibrinogênio. Os dados das duas curvas mencionadas, mais os de uma terceira não mostrada, forma agrupadas na fig. V.3.3C1 que repetiu o mesmo padrão. Aplicando a transformação logística às medidas da fig. V.3.3C1 determinou-se a taxa normalizada da variação de  $v/[s]$ , conhecido como coeficiente de Hill. Este valor muito próximo de 2,0 coincide com a “ordem aparente para a reação de polimerização do fibrinogênio, determinada por Hantgam & Hermans (1979).

A fig. V.3.3.D mostra uma relação hiperbólica ou Michaeliana entre  $v$  e  $[s]^2$ . Os valores  $K_s$  apresentados, levaram em conta o peso molecular de 340 Kd para o fibrinogênio e que, apenas 65% da amostra pesada é fibrinogênio, e também que nesta está presente 5% de proteína não coagulável.

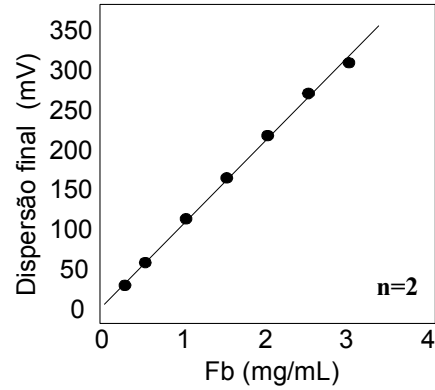


**FIG. V.3.3.E<sub>1</sub>** - Velocidade de coagulação do fibrinogênio bovino pelo veneno bruto de *Lachesis muta muta* (2,5 µg/mL) em Função da Concentração de Substrato. Tampão fosfato de sódio 0,04 M- pH 7,40 - 37° C.

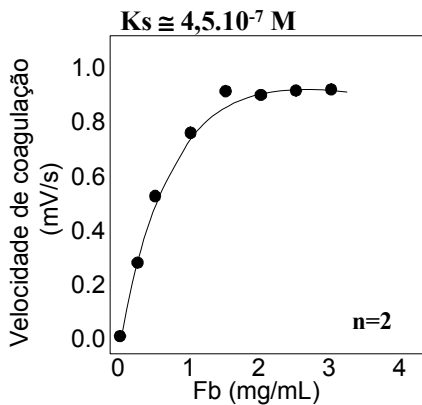


**FIG. V.3.3.E<sub>2</sub>** - Dispersão de luz em função da concentração de fibrinogênio bovino. Após o registro de velocidade os tubos foram mantidos a 37° C com leituras a cada 15 min., até a estabilização.

$mV = 103,1 \text{ mg Fb/mL} + 2,17$   
 $r = 0,999$

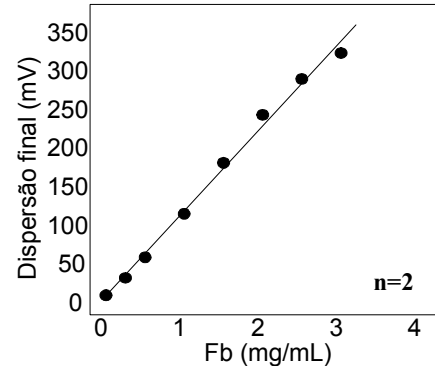


**FIG. V.3.3.F<sub>1</sub>** - Velocidade de coagulação do fibrinogênio bovino pelo veneno bruto de *Crotalus d. terrificus* (5 µg/mL) em Função da Concentração de Substrato. Tampão fosfato de sódio 0,04 M- pH 7,40 - 37° C.



**FIG. V.3.3.F<sub>2</sub>** - Dispersão de luz em função da concentração de fibrinogênio bovino. Após o registro de velocidade os tubos foram mantidos a 37° C com leituras a cada 15 min., até a estabilização.

$mV = 110,3 \text{ mg Fb/mL} + 1,43$   
 $r = 0,996$



Os gráficos nas figs. V.3.3E1 e F1 mostram que figuras cinéticas análogas podem ser obtidas com venenos brutos e que portanto podem ser utilizadas para detecção de trombo- proteases ou mesmo como guia em seu isolamento.

As figs. V.3.3.A2, B2, E2 e F2 mostram uma relação linear muito exata entre a concentração de fibrinogênio e a quantidade de produto final gerado pela reação. evidentemente o produto final está aqui definido pela grandeza mensurada (mV), e não pela quantidade de proteína determinada após centrifugação e lavagem da rede de fibrina como se feito na metodologia clássica para dosagem do fibrinogênio (Ware et al. 1947).

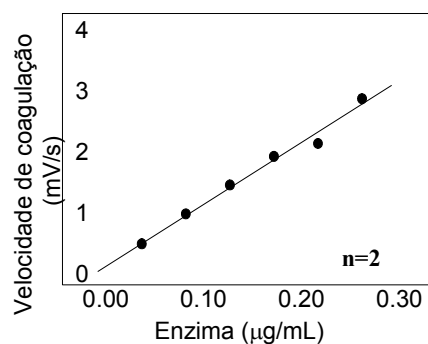
#### V.3.4. INFLUÊNCIA DA QUANTIDADE DE ENZIMA NA VELOCIDADE DE COAGULAÇÃO DO FIBRINOGÊNIO BOVINO E NA QUANTIDADE DE PRODUTO FORMADO AO FINAL DA REAÇÃO.

**FIG. V.3.4.A<sub>1</sub>** - Velocidade de coagulação do fibrinogênio bovino (2,5 mg/ml) pelo enzima tipo-Trombina de *L. muta muta*, em função da concentração do enzima. Tampão fosfato de sódio 0,04 M - pH 7,40 - 37°C.

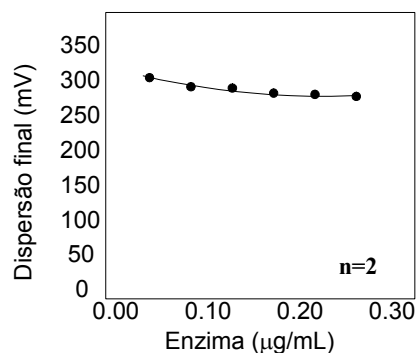
$$mV/s = 2594406081.M^{-1} Ez + 0,013$$

$$r = 0,993$$

$$V/eo \cong 280 M/M/min.$$

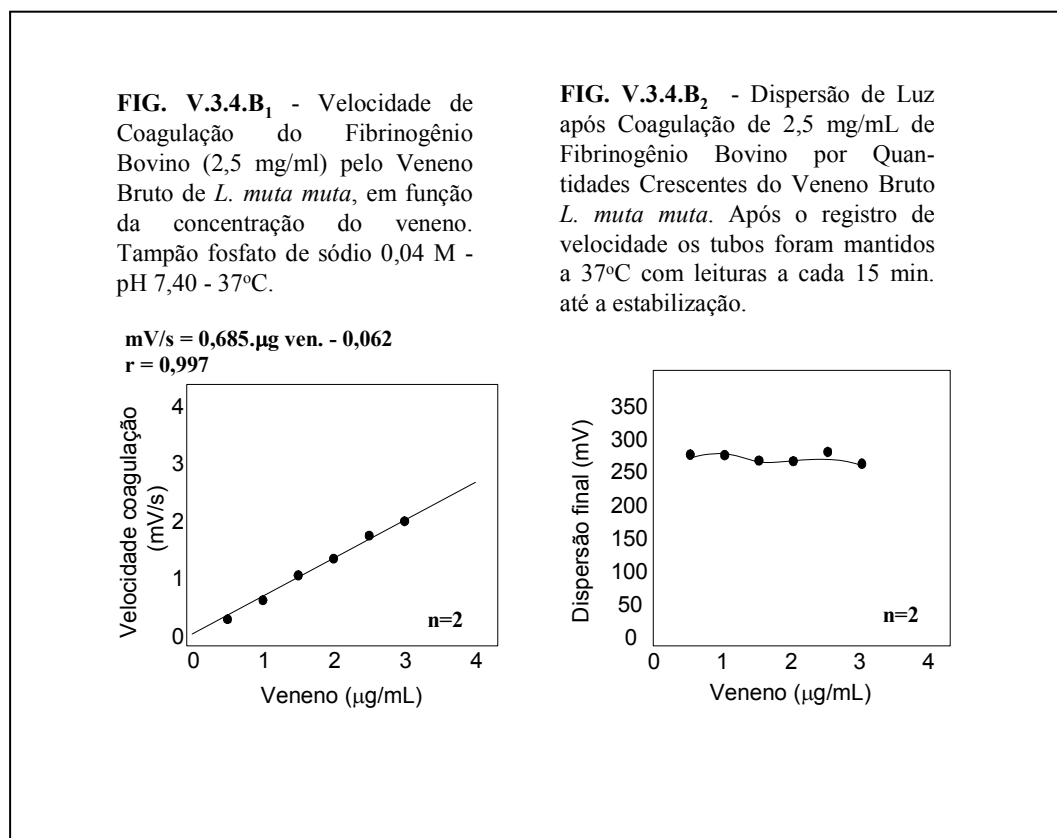


**FIG. V.3.4.A<sub>2</sub>** - Dispersão de luz após coagulação de 2,5 mg/mL de fibrinogênio bovino por quantidades crescentes do enzima tipo-Trombina de *L. muta muta*. Após o registro de velocidade os tubos foram mantidos a 37°C com leituras a cada 15 min. até a estabilização.

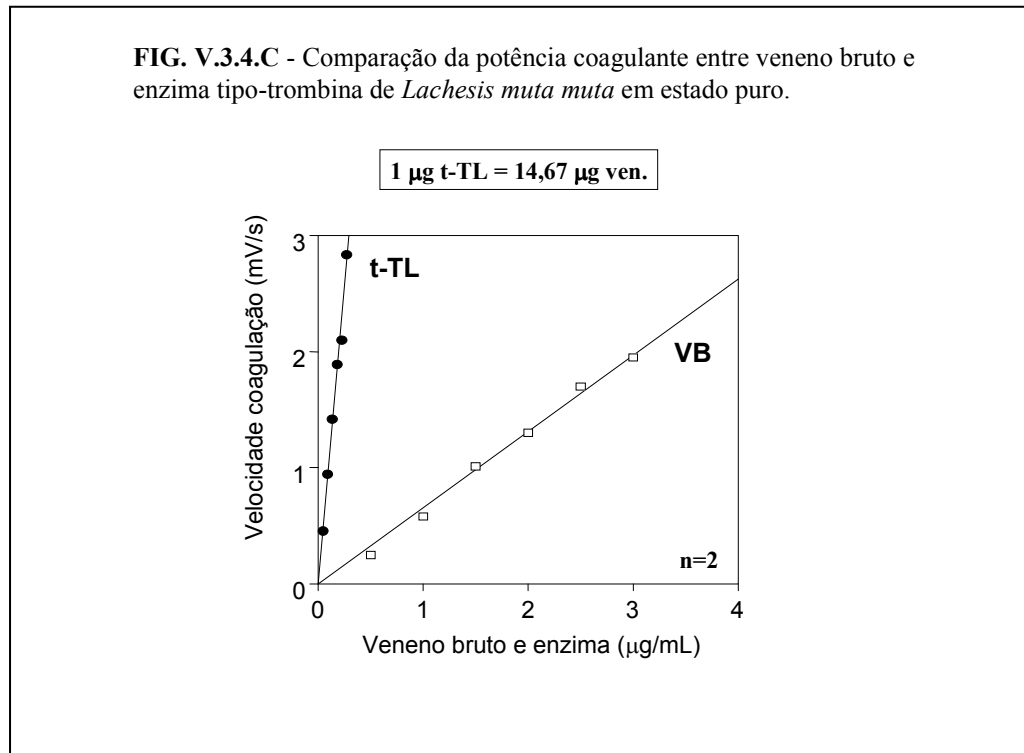


Admitindo o valor de  $K_s$  na fig. V.3.3.D ser uma estimativa adequada, verifica-se que a concentração de fibrinogênio utilizada nos experimento ilustrados nas figs, V.3.4.A foi apenas 4,7 vezes maior. Este fato ocasiona um desvio (infraestimação) de 17% na estimativa da velocidade máxima limite e, poderia eventualmente tornar imperceptíveis os períodos de equilíbrio dinâmico. Na presente situação entretanto, a quantidade adicionada de enzima foi muito baixa ( $1,7-10,5 \cdot 10^{-12}$  moles) em comparação com a quantidade total de substrato ( $4,54 \cdot 10^{-6}$  moles).

Para a menor concentração da enzima, o estado de equilíbrio dinâmico ocorreu do  $348^0$  segundo até o  $426^0$  s. enquanto para a maior concentração foi do  $53^0$  s. até o  $75^0$  s. da reação, permitindo uma medição segura de  $V$ . A estimativa de  $V/eo$  ou  $K_{cat}$ , de 4,7 moles/mol de enzima/L/segundo está corrigida pelo teor de fibrinogênio na amostra.



Segundo Hantgan & Hermans (1983) o fator preponderante para determinar o fim da polimerização e o início da agregação lateral das protofibrilas, é o próprio tamanho destas. Em meio força iônica mais alta, as protofibrilas crescem mais em comprimento, até que estas disponham de número suficiente de regiões de contato, necessários para

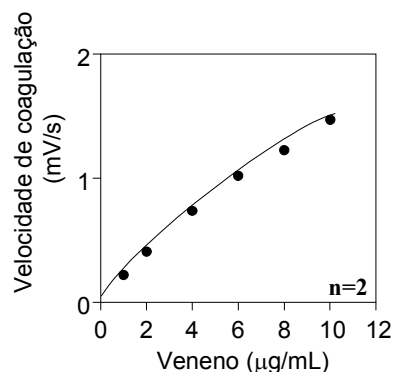


estabilização das fibras formadas por agregação lateral. O tamanho e diâmetro destas fibras é determinado pela própria velocidade de agregação lateral, isto é, seu crescimento cessa com seu aprisionamento na rede por conexões interfibras. Deste modo nas condições deste trabalho, onde as etapas de polimerização, agregação e gelificação são limitadas pela etapa enzimática inicial, poder-se-ia obter, segundo a velocidade de ativação do fibrinogênio, redes de fibrina com diferentes diâmetros de fibra, número de interconexões e portanto distintas capacidades em dispersar luz. As figuras de índice 2 nesta seção, de A2 até E2, mostraram na maioria, uma tendência para a diminuição da dispersão final, embora pouco significativa.

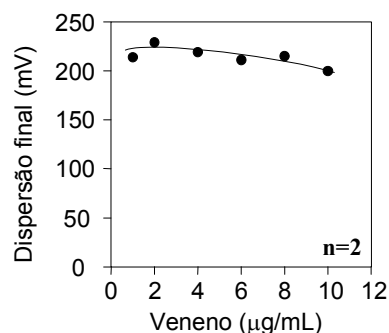
Uma utilidade imediata para as duas curvas de velocidade em função da concentração do enzima, figs,V.3.4 A1 e B1, já que estas apresentam intersecções com a ordenada muito próximas de zero, é a determinação do teor da enzima no veneno. A relação calculada para as potências (vide seção IV.2.6C) foi 14,67, ou seja, 1 $\mu$ g do t-TL mm. puro está contido em 14,67  $\mu$ g de veneno bruto de *Lachesis muta muta*.

As figuras V.3.3.D e E, mostram que o método de dosagem do enzima pode ser aplicado à outros venenos, mesmo os de bothrops, os quais possuem proteases que inativam funcionalmente a molécula do fibrinogênio. Evidentemente os dois exemplos mostrados não são diretamente comparáveis ao padrão de enzima puro, devido à economia de fibrinogênio praticada nestes últimos, certamente também causadora da não-linearidade na curva fig. v.3.3D1.

**FIG. V.3.4.D<sub>1</sub>** - Velocidade de coagulação do fibrinogênio bovino (2 mg/ml) pelo veneno bruto de *C. d. terrificus*, em função da concentração do veneno. Tampão fosfato de sódio 0,04 M - pH 7,40 - 37°C.



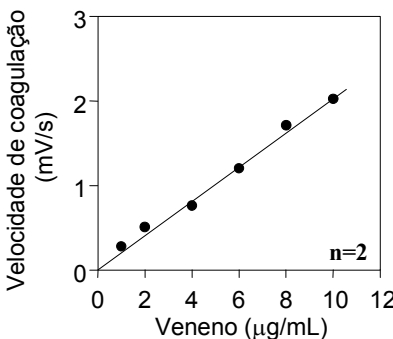
**FIG. V.3.4.D<sub>2</sub>** - Dispersão de luz após coagulação de 2 mg/mL de fibrinogênio bovino por quantidades crescentes do veneno *C. d. terrificus*. Após o registro de velocidade os tubos foram mantidos a 37°C com leituras a cada 15 min. até a estabilização.



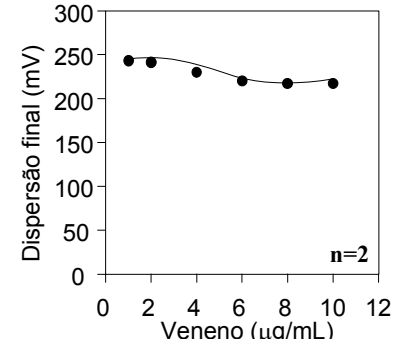
**FIG. V.3.4.E<sub>1</sub>** - Velocidade de coagulação do fibrinogênio bovino (2 mg/ml) pelo veneno bruto de *B. jararaca*, em função da concentração do veneno. Tampão fosfato de sódio 0,04 M - pH 7,40 - 37°C.

$$mV/s = 0,197 \cdot \mu g \text{ ven.} + 0,07$$

$$r = 0,996$$

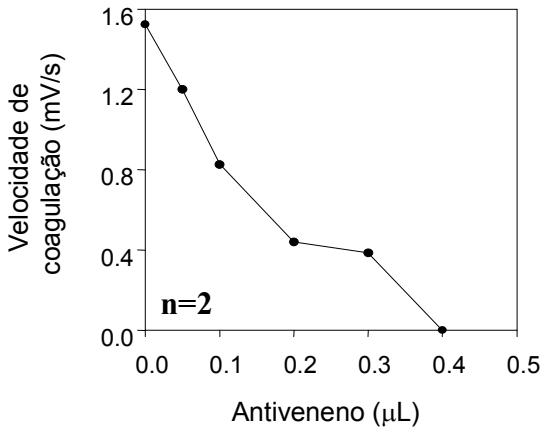


**FIG. V.3.4.E<sub>2</sub>** - Dispersão de luz após coagulação de 2,0 mg.mL de fibrinogênio bovino por quantidades crescentes do veneno bruto de *B. jararaca*. Após o registro de velocidade os tubos foram mantidos a 37°C com leituras a cada 15 min. até a estabilização.



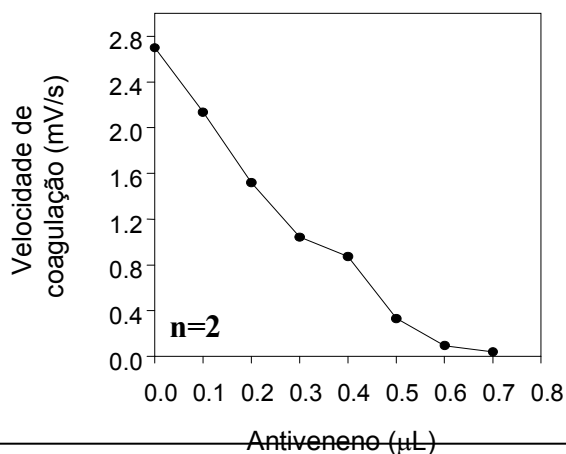
**V.3.5 - NEUTRALIZAÇÃO DA ATIVIDADE COAGULANTE DA ENZIMA TIPO-TROMBINA DE *Lachesis muta muta* PELO ABL FUNED 900530**

**FIG. V.3.5.A** - Neutralização da atividade coagulante da enzima tipo-trombina (0,112 μg) de *Lachesis muta muta* sobre o fibrinogênio bovino (2,5 mg/mL), pelo ABL-FUNED 900530. Tampão fosfato de sódio 0,04 M - pH 7,40 - 37°C.

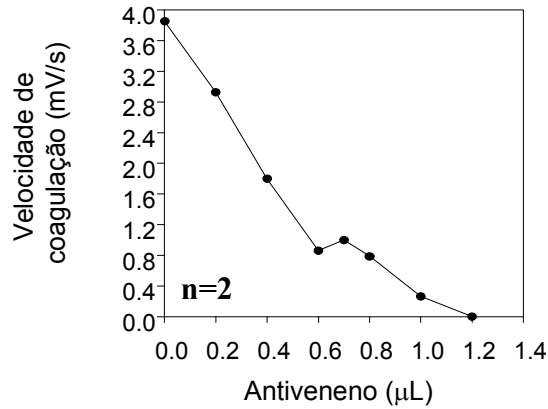


Para os experimentos de neutralização a solução de enzima foi incubada previamente com o antiveneno por 30 minutos a 37 °C. Três das quatro curvas de neutralização realizadas em diferentes níveis foram completamente delineadas e correspondem às figs. V.3.5A-C. No quarto nível, 0,450 µg de enzima, somente o ponto final da neutralização foi procurado. As curvas de neutralização da enzima tipo-trombina, apresentaram caracteres similares às neutralizações dos fatores hemorrágicos em veneno bruto (vide seçãoVI.3.3), ou seja: uma fase inicial onde a atividade decai de maneira intensa e aproximadamente linear com o aumento da quantidade de antiveneno; uma fase intermediária de baixa declividade; um fase final onde a atividade volta a responder ao aumento da quantidade de anticorpos.

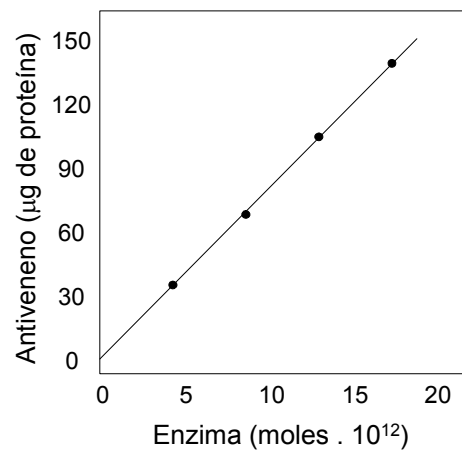
**FIG. V.3.5.B** - Neutralização da atividade coagulante da enzima tipo-trombina (0,225 µg) de *Lachesis muta muta* sobre o fibrinogênio bovino (2,5 mg/mL), pelo ABL-FUNED 900530. Tampão fosfato de sódio 0,04 M - pH 7,40 - 37°C.



**FIG. V.3.5.C** - Neutralização da atividade coagulante do enzima tipo-trombina (0,337  $\mu\text{g}$ ) de *Lachesis muta muta* sobre o fibrinogênio bovino (2,5 mg/mL), pelo ABL-FUNED 900530. Tampão fosfato de sódio 0,04 M - pH 7,40 - 37°C.



**FIG. V.3.5.D** - Quantidades de ABL - FUNED 900530 para neutralização total (pontos euteriáticos) da atividade coagulante do enzima tipo-Trombina de *Lachesis muta muta* sobre o fibrinogênio bovino (2,5 mg/ mL). Tampão fosfato de sódio 0,04 M - pH 7,40 - 37°C.

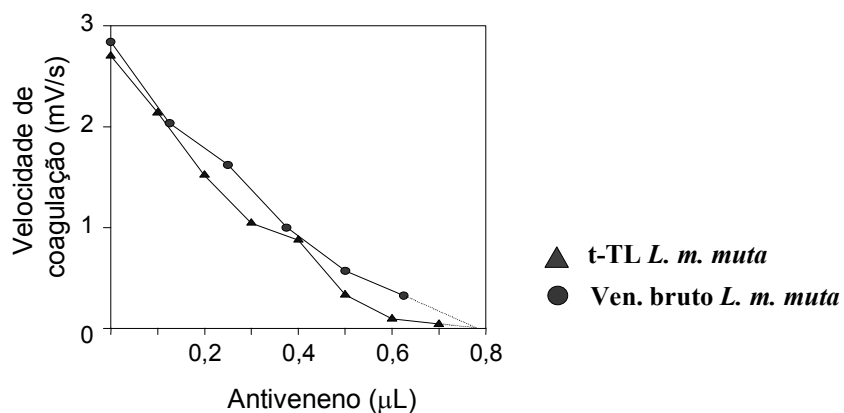


$$\text{Log } (\mu\text{g prot. SABL}) = 1,003 \text{ log (moles} \cdot 10^{12} \text{ t-TL)} + 0,891$$

Novamente, o parâmetro DE50 não foi aplicável à qualquer dessas curvas, enquanto as quantidades de antiveneno para neutralização total, apresentaram uma relação linear muito precisa com as massas (desafios) de enzima. O coeficiente angular normalizado mostrado na fig. V.3.5D deixa claro que a “Lei dos Múltiplos de Proporção” foi exatamente obedecida. A partir do coeficiente angular não normalizado a potência neutralizante do antiveneno para o enzima, foi calculada em 0,28 mg t-TLmm/mL ABL.

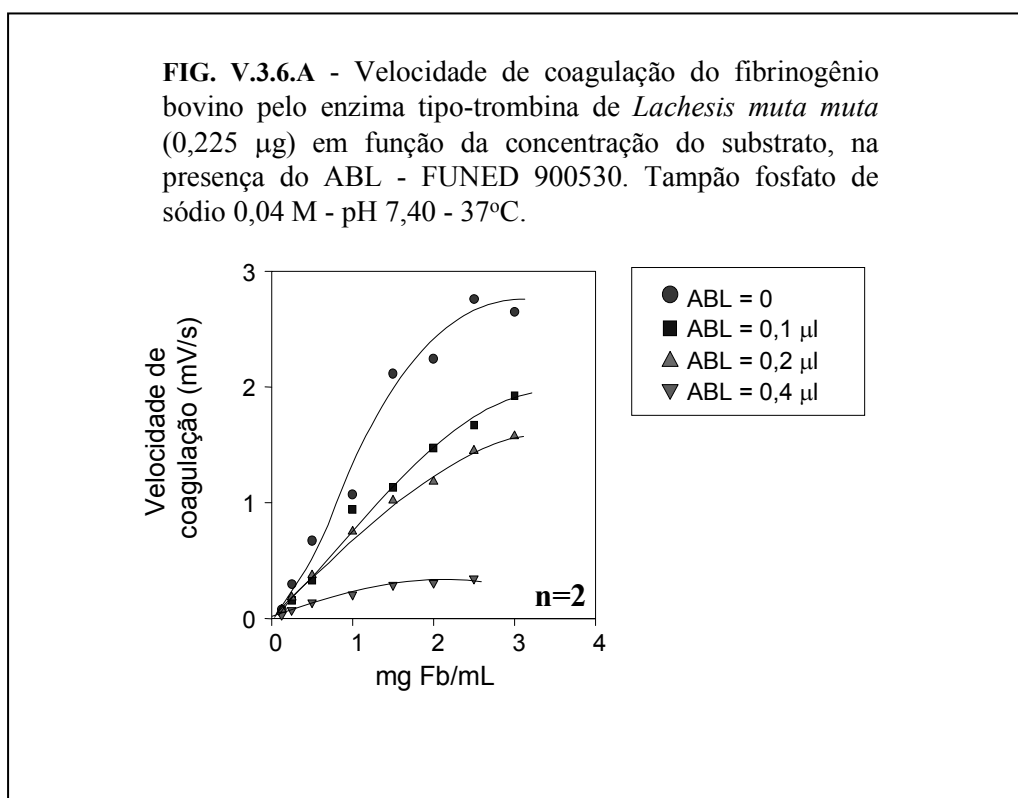
Nas duas curvas de neutralização mostradas na fig. V.3.5E, as quantidades 0,225 µg de enzima tipo-trombina 3,3 µg de veneno bruto de *Lachesis muta muta*, equipotentes em termos de velocidade de coagulação, foram calculadas a partir da relação na fig. V.3.4C. A correção da estimativa pode ser avaliada pela diferença dos valores de ordenada (apenas 4,9%) para antiveneno igual a zero, com também pela quase superposição das curvas que praticamente não diferem nas estimativas das quantidades de antivenenos para neutralização total.

**FIG. V.3.5.E** - Neutralização da atividade coagulante, sobre o fibrinogênio bovino (2,5 mg/mL), de quantidades equipotentes da enzima tipo-trombina (0,225 µg) e veneno bruto de *Lachesis muta muta* (3,3 µg), pelo ABL -FUNED 900530. Tampão fosfato de sódio 0,04 M - pH 7,40 - 37°C.



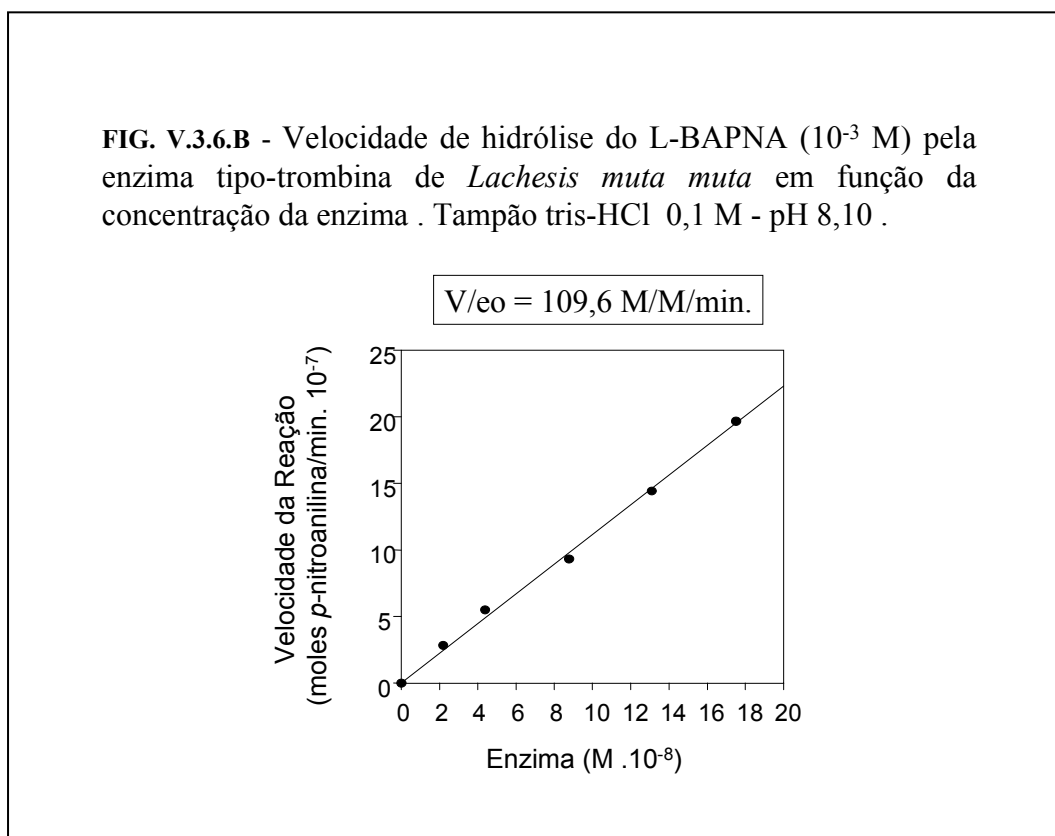
### V.3.6 – MECANISMO DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE COAGULANTE DA ENZIMA t-TLmm, PELOS ANTICORPOS PRESENTES NO ABL-900530

As quantidades de antiveneno ABL-FUNED 900530 utilizadas no experimento mostrado na fig. V.3.6A, correspondem aos valores de abcissa da fig. V.3.5B localizados na região da curva onde a atividade enzimática decaiu linearmente em função da concentração dos anticorpos. A fig. cinética obtida, do tipo “Inibição Não-Competitiva”, não permite inferências mecánísticas imediatas. Uma proteína de massa molecular 25,656 Kd, como a enzima em questão, pode apresentar em sua superfície determinantes antigênicos diferentemente localizados e diferentemente relacionados à função da molécula. A ligação de anticorpo a cada um deles, pode portanto repercutir distintamente sobre a capacidade funcional desta. A afinidade combinada, ou avides, de um conjunto de anticorpos presentes em um soro policlonal, pela molécula do antígeno polivalente geralmente é muito alta, superando facilmente  $10^{10}$  L/M, o que nos conduz a interpretar a atividade residual da enzima na fig. V.6.3A, como não devida à moléculas totalmente livres.



A curva de velocidade de hidrólise do BAPNA em função da concentração da enzima (fig. V.3.6B) foi realizada não só para aferição de técnica como também para avaliação do estado funcional da enzima. O valor de  $V/e_0$  obtido está aquém daquele citado por Vidigal-Silveira et al. (1989), de 144 M/M/min., e bastante aquém do encontrado por Magalhães (1992), de 203 M/M/min.

Para investigar o efeito do ABL, a atividade amidásica foi então medida em situação no qual a enzima se encontrava totalmente inibida pelos anticorpos presentes, quanto à sua capacidade de atuar sobre seu substrato natural.



No primeiro quadro da tabela V.3.6A figuram os dados e parâmetros utilizados para os resultados dos quadros abaixo. Os experimentos B e D do segundo quadro, deixam bem claro que na situação de inibição total da ação sobre o fibrinogênio, sob excesso de 6,5 vezes a quantidade euteriática de antiveneno (vide fig. V.3.5D), a atividade amidásica foi reduzida apenas

parcialmente. O terceiro quadro confirma a inibição parcial da atividade amidásica, ao mesmo tempo (experimento D) que mostra em concomitância a inibição completa da atividade sobre fibrinogênio e manutenção parcial da atividade amidásica.

**Tab. V.3.6A** - Efeito do ABL 900530 sobre a velocidade de hidrólise do BAPNA pelo enzima tipo- trombina de *Lachesis muta muta* em condições de atividade coagulante totalmente inibida.

**Enzima:**  $4,17 \cdot 10^{-8}$  M (1,12 µg/mL)  
**Substrato:**  $10^{-3}$  M Bapna em tampão fosfato 0,04 M - pH 8,0  
**E** <sub>410 nm</sub> p-nitroanilina = 10372  
**ABL FUNED 900530:** 49,8 µg / mol enzima .  $10^{-12}$

**A = Enzima puro**  $\Rightarrow 4,97 \cdot 10^{-7}$  moles pNA/min.  
**B = Enzima + ABL**  $\Rightarrow 3,28 \cdot 10^{-7}$  moles pNA/min.  
**C = A em Fb 0,5 mg/mL**  $\Rightarrow$  coagulação imediata  
**D = B em Fb 0,5 mg/mL**  $\Rightarrow$  n/coagulou.

**A = Enzima puro**  $\Rightarrow 4,34 \cdot 10^{-7}$  moles pNA/min.  
**B = Enzima + SABL**  $\Rightarrow 3,18 \cdot 10^{-7}$  moles pNA/min.  
**C = A em Fb 0,5 mg/mL**  $\Rightarrow$  coagulação imediata  
**D = B em Fb 0,5 mg/mL**  $\Rightarrow$  n/coagulou.  $3,33 \cdot 10^{-7}$  moles p-NA/min.

Para avaliar a posição zonal dos complexos Ag:Ac formados a partir do enzima t-TLm.m. e a ABL FUNED 900530, ao final da região linear da curva de neutralização (vide fig. V.3.5B), foi realizado o experimento mostrado na tabela V.3.6B. A incubação inicial E1 foi de 30 min. a 37° C como também as reincubações E2 e E3. A diferença  $E3 - C2 + E2$ , de 0,49 mV/s, foi altamente significativa face ao intervalo de confiança ( $p\alpha 0,05$ ) para médias de  $n=2$ , deixando claro que anticorpos antes ligados à enzima na amostra E1, passaram para ou foram compartilhados com as moléculas de enzima provenientes de C1. Em outras palavras não havia antígeno completamente livre em E1.

**TAB. V.3.6B** - Efeito da adição de enzima livre ao complexo Ez-Ab apresentando 69% de inibição na atividade coagulante sobre fibrinogênio bovino.

Enzima = tipo-Trombina de *Lachesis muta muta*

Anticorpo = ABL 900530 FUNED

n=2

Tampão fosfato 0,04 M pH 7,40

t. sm = 0,06 mV/s p α 0,05

$C_1 = 0,22 \mu\text{g Ez puro} \Rightarrow 2,5 \text{ mg Fb/mL} \Rightarrow 2,47 \text{ mV/s} = 100\%$

$C_2 = 1/2 C_1 + \text{tampão} \Rightarrow 2,5 \text{ mg Fb/mL} \Rightarrow 1,33 \text{ mV/s} = 54\%$

$E_1 = 0,22 \mu\text{g Ez} + \text{Ab} \Rightarrow 2,5 \text{ mg Fb/mL} \Rightarrow 0,76 \text{ mV/s} = 31\%$   
 $(2,6 \mu\text{g ABL 900530} \cdot \text{mol Ez} \cdot 10^{-12})$

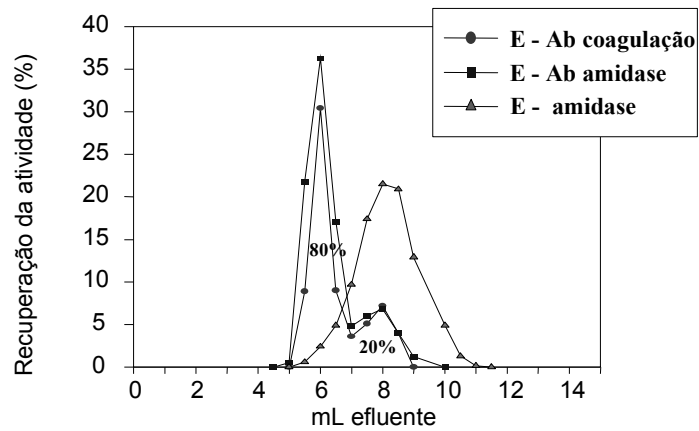
$E_2 = 1/2 E_1 + \text{tampão} \Rightarrow 2,5 \text{ mg Fb/mL} \Rightarrow 0,39 \text{ mV/s} = 16\%$

$E_3 = 1/2 E_1 + 1/2 C_1 \Rightarrow 2,5 \text{ mg Fb/mL} \Rightarrow 2,21 \text{ mV/s} = 90\%$

**A expectativa se houvesse antígeno livre em  $E_1$  seria:  $E_3 = C_2 + E_2$   
 $\Rightarrow 1,72 \text{ mV/s} = 70\%$**

Outra via de acesso à posição zonal dos complexos Ag:Ac a nível de inibição parcial do enzima, 64% ao final da região linear da curva de neutralização (vide fig. V.3.5B) foi a separação dos complexos por filtração em gel. A amostra inicial de enzima consistiu em 50 x 0,225 μg (50 unidades de coagulação – vide seção V.2.3), reduzida à 18 unidades pela complexação com anticorpo. Destas 18 apenas 70% ou seja, 12,6 unidades de coagulação foram recuperadas, distribuídas nos dois picos de atividade mostrados na fig. V.3.7A. A quantidade total de atividade amidásica introduzida na coluna foi de 22,1 unidades (vide seção V.2.3), avaliada já na presença de anticorpo. A recuperação foi de 98,5%, distribuídas simetricamente à atividade coagulante, indicando que não houve perda apreciável de enzima. A amostra de enzima puro apresentou uma banda cromatográfica muito alargada, certamente devido à presença de carboidrato na molécula (Vidigal – Silveira et al. 1989). A recuperação foi de 92% na presença de albumina, reduzindo-se à 56% na ausência desta.

**FIG. V.3.7.A** - Separação em Sephadex G-100 do enzima t-TLmm livre e complexado com anticorpos a nível de 64% de inibição da atividade coagulante sobre o fibrinogênio.



**Amostra de Enzima:**  $4,38 \cdot 10^{-10}$  moles

**SABL FUNED 900530:**  $2,6 \mu\text{g} / \text{mol enzima} \cdot 10^{-12}$

**Fibrinogênio bovino:** 2 mg/ml em tampão fosfato 0,04 M - pH 7,40 - 1% albumina

**BAPNA:**  $10^{-3}$  M em tampão tris-HCl 0,02 M - pH 7,50 - 4 horas

## V.4 – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES PARCIAIS

---

### V.4.1- PARÂMETROS CINÉTICOS

As velocidades de consumo de fibrinogênio bovino estimadas para os registros I (0,25 mg/ml Fb) e VII (3,0 mg/ml Fb) na figura V.3.1A, foram  $2,97 \cdot 10^{-9}$  e  $3,47 \cdot 10^{-8}$  moles /L/ min. respectivamente. A constante cinética para a polimerização do monômero de fibrina de  $5 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$  (Hantgan & Hermans, 1979), nos conduziria à velocidade de polimerização de 0,23 a 0,72 moles/L/  $\text{s}^{-1}$ , na faixa de concentração utilizada de fibrinogênio, caso a ativação do fibrinogênio fosse instantânea. Repetindo os mesmos cálculos, a partir da constante cinética para a agregação lateral de protofibrilas (Hantgan & Hermans, 1979), de  $1,2 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$  teríamos velocidades de agregação de 0,54 a 6,54 moles /L/ $\text{s}^{-1}$ . A velocidade em unidades de mV/s, esperada caso 0,25 mg/ml de Fb fossem ativados em 1 segundo, seria de 25,3 V/s na sua fase de agregação lateral, um valor  $10^5$  vezes o observado. Estes cálculos demonstram, sem dúvida que nas condições do presente ensaio, a etapa enzimática era o limitante da velocidade. Os experimentos ilustrados na fig. V.3.1B e tab.V.3.1 demonstraram experimentalmente a mesma afirmativa. A adição de anticorpos neutralizantes logo antes do início da fase de agregação lateral idem.

As relações precisamente lineares obtidas nas figs. V.3.3. A2 e B2 , entre [Fb] e dispersão final de luz (mV) , permitiram-nos calcular as velocidades de reação em termos do consumo de fibrinogênio. A linearidade verificada, demonstra o acerto de calibração do nefelômetro e da escolha do padrão de dispersão, uma vez que a dispersão de luz é uma função logística da opacidade da amostra, adquirindo coeficiente negativo após atingir valor máximo. Entretanto, a linearidade por si, não é prova da exatidão da relação, isto é, não é uma demonstração de que todo o fibrinogênio tenha sido consumido, podendo apenas significar consumo proporcional.

- Em condições de velocidade da reação limitada pela etapa enzimática, a quantidade de fibrina formada na unidade de tempo, avaliada pela intensidade de dispersão de luz, reduz-se à velocidade de ativação do fibrinogênio, isto é, à metade da velocidade de liberação do fibrinopeptídeo A. Estando a [Fb] aquém da saturação, a taxa de desaparecimento do substrato será afetada por:  $K_{cat}/K_s$ , [E] e  $[S]_0$ , ou seja:

$$\frac{-d [Fb]}{dt} = \frac{K_{cat} [Fb] (t)}{K_s} \quad \text{ou,}$$

$$[Fb] (t) = [Fb]_0 \cdot e^{-\frac{K_{cat} \cdot t}{K_s}} \quad \text{donde,}$$

$$\ln [Fb] (t) = \ln [Fb]_0 - \frac{K_{cat} \cdot t}{K_s}$$

$K_s$

O registro I da fig. V.3.1A tem os seguintes dados:

$$[Fb]_0 = 4,54 \cdot 10^{-7} \text{ M}$$

$$[Ez] = 8,77 \cdot 10^{-9} \text{ M}$$

$$\text{Latência} = 72\text{s}$$

$$K_s(\text{ap}) = 1,7 \cdot 10^{-6} \text{ M}$$

$$K_{cat} = 4,7 \text{ M/M/s}$$

Reduzindo  $K_{cat}$  para o nível de enzima e substrato utilizado no registro I, obtivemos uma constante de decaimento  $\frac{K_{cat}}{K_s}$  de  $0,0026 \text{ s}^{-1}$  e um  $t_{1/2}$  de 267s. Estes cálculos implicam que durante a fase de equilíbrio dinâmico, a partir de 72s a concentração de substrato estaria reduzida a 83% da inicial, erro este, que não conduz a uma mudança de ordem na estimativa de  $K_s$ .

Comparando para o registro I os valores da leitura em mV, em termos do percentual da leitura final, com a marcha calculada da reação em tempos até um período de meia vida, verificamos que a velocidade real foi, em média, 1,5 vezes mais alta. Entretanto, a 9 períodos de

meia vida a leitura representou 94% da final obtida em 18 períodos, a qual não é má estimativa, porém, indica que a reação em suas fases finais foi mais lenta, certamente em decorrência do aumento de viscosidade do meio pela gelificação.

Aplicando os mesmos cálculos para o registro II, onde  $[Fb]_0 = 9,08 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ , obtivemos que no início da fase de equilíbrio dinâmico,  $[Fb]$  (60s) ainda seria 99% de  $[Fb]_0$ . A marcha calculada da reação mostrou razoável compatibilidade com os valores experimentais a saber:

- $1^{\text{o}} t \frac{1}{2} \longrightarrow$  valor esperado 50%; valor obtido 39%
- $2^{\text{o}} t \frac{1}{2} \longrightarrow$  valor esperado 75%; valor obtido 79%
- $3^{\text{o}} t \frac{1}{2} \longrightarrow$  valor esperado 87,5%; valor obtido 86%.

Para os demais registros, a concentração de  $[Fb]_0$  se afastaria bastante da expectativa de uma cinética de 1ª ordem desde o início.

- A dificuldade em avaliar a exatidão do método reside em que não se dispõe na literatura de dados cinéticos de outras enzimas tipo-trombina em sua capacidade de ativar o fibrinogênio. As estimativas de  $K_s$  e  $K_{cat}$  obtidas por nós, foram da mesma ordem de grandeza que aquelas citadas por Martinelli e Scheraga (1980) para trombina bovina,  $9,2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$  e  $7,3 \text{ M/M/s}$ , respectivamente.

Considerando que a amostra da enzima tipo-trombina de *Lachesis muta muta* utilizada nesse trabalho, apresentasse apenas 50% da atividade máxima possível, como sugere a  $K_{cat}$  obtida sobre Bapna (vide fig. V.3.6B) e também, levando em conta que, o dado de Martinelli & Scheraga se refere à liberação do fibrinopeptídeo A (2 moles/mol de Fb), poderíamos, então, comparar as velocidades molares mais exatamente.

Utilizando o método, aqui proposto, pudemos avaliar  $K_{cat}$  da trombina bovina (trombina bovina- Sigma) ao nível de uma única concentração de enzima em  $5 \cdot 10^{-11} \text{ M}$  [ $1,0 \text{ NIH/L}$ ]/s, a partir de um ótimo de velocidade em tampão fosfato 0,1 M, pH 8,0 e 2,0 mg/ml de Fb bovino. Este valor é cerca de 7 vezes inferior à estimativa de Martinelli & Scheraga e idêntica à

estimativa de Blombäck et al (1977), levando em conta que dois moles de fibrinopeptídeo A correspondem a um mol de fibrinogênio.

Em resumo, desta seção V.4.1, podemos concluir:

- O método, aqui apresentado, para a avaliação cinética de trombo-proteases sobre fibrinogênio, em tempo real e sob registro contínuo da intensidade de luz dispersa, forneceu parâmetros comparáveis ao método que se baseia na interrupção da reação e dosagem do fibrinopeptídeo A. Neste momento, devemos reconhecer que a proposição ainda não foi investigada suficientemente, sendo desejável trabalhar com soluções de fibrinogênio em meio iônico completamente controlado e fazer comparações paralelas com outras trombo-proteases de seqüência homóloga.

## V.4.2- APLICAÇÕES DO MÉTODO

### V.4.2.1- DOSAGEM DA ATIVIDADE TIPO-TROMBINA EM VENENOS BRUTOS

As relações precisamente lineares mostradas nas figs. V.3.3.A1, B1 e E1, entre velocidades de reação e a concentração de enzima, independentemente de constituírem ou não uma estimativa exata de  $V/e_0$ , podem ser utilizadas para a dosagem da enzima. Preferencialmente, deve-se comparar a curva da enzima padrão com a da amostra, como ilustrado na fig. V.3.4.C. Satisfeitas as condições de validade fundamental, isto é, linearidade e igualdade de interseções, o ensaio pode ser simplificado passando-se a usar o próprio substrato como padrão.

A estimativa de equivalência: 1  $\mu$ gt. TL mm = 14,67  $\mu$ g de veneno bruto, permitiu calcular a ocorrência da enzima no veneno (m/m) em 6,8% e um provável fator máximo de purificação 14,67. O fator de purificação reportado por Vidigal-Silveira et al. (1989) de 19,2 vezes, é bastante compatível, levando-se em conta, que dois diferentes lotes do veneno de *Lachesis muta muta* foram utilizados. A quase superposição das curvas de neutralização de 0,225 $\mu$ g de t-TLmm e seu equivalente em veneno bruto (vide fig. V.3.5E) pelo ABL-FUNED 900530, atesta também a correção do método de dosagem.

A presença ubíqua de proteases de ação inespecífica no veneno de Crotalídeos, capazes de atuar sobre o fibrinogênio tornando-o incoagulável ou mesmo digerindo a fibrina é fato bem estabelecido (Stocker, 1980; Kornalick, 1991). Entretanto, a presença destas enzimas parece não ter impedido a obtenção de linearidade entre a velocidade da reação e a concentração dos venenos brutos de *Lachesis* e *B. jararaca*, possivelmente devido à grande afinidade e velocidade das trombo-proteases, que não permitem longo tempo de exposição do substrato, às outras enzimas. Mesmo nas leituras de dispersão final, feitas uma hora após o início da reação, nas maiores

concentrações de veneno bruto (vide figs. V.3.4.B2, D2 e E2 ) não houve tendência maior para queda da leitura, que na presença da enzima t-TLmm pura (vide fig. V.3.4.A<sub>2</sub>). O desvio de linearidade verificado entre a velocidade de coagulação do fibrinogênio e a concentração do veneno de *C. d. terrificus*, embora de pequena monta, foi flagrante, necessitando pois, reestudo.

Em resumo, podemos concluir:

- O método proposto, permite dosagem da atividade tipo-trombina presente em venenos brutos, contra padrão de enzima puro ou veneno de referência, com dispêndios reduzidos de tempo, fibrinogênio e veneno, quesitos que o qualificam para a atividade de rotina na caracterização de venenos no serpentário e principalmente para os levantamentos em venenos de espécimes individuais pertencentes à uma circunscrição zoo-geográfica.

#### V.4.2.2- QUANTIFICAÇÃO DA POTÊNCIA NEUTRALIZANTE DE ANTIVENENOS.

O coeficiente angular não normalizado da curva de equivalência funcional entre a enzima t-TL e o ABL-FUNED 900530 fig. (V.3.5D) é uma estimativa inequívoca da potência neutralizante do antiveneno. A questão de sua universalidade, isto é, se a relação se manterá até níveis de concentração de antígeno, 10, 100 ou número 1000 vezes maior, é neste ponto irrelevante, porque o ensaio foi realizado na faixa concentração plasmática de antígeno de veneno (ng/mL) que pode ocorrer no acidente ofídico (Kamiguti et al. 1991-a) . Obviamente, quanto se determinada a potência neutralizante do antiveneno através de um macrométodo, como o ensaio de letalidade, onde a concentração de antígeno na incubação com antiveneno “in vitro” chega a valores de mg/mL, a questão da universalidade da estimativa de potência é fundamental.

A comparação das estimativas de atividade específica neutralizante, de um antiveneno policlonal em dois limites de concentração, é bastante complexa. Em primeiro lugar os ensaios exequíveis em um e outro limite de concentração são distintos. A seguir devemos considerar o antígeno, seu peso molecular, número de determinantes antigênicos e presença destes em outras moléculas, seja com identidade total ou parcial. Assim poderíamos antever duas situações extremas:

- Antígeno polivalente, cujos determinantes antigênicos não estejam representados em outras proteínas do veneno, sequer com identidade parcial, em presença de antiveneno policlonal hiperimune, isto é, tendo ocorrido maturação de atividade. Para cada superfície determinante presente no antígeno, poderá ocorrer no antiveneno um repertório de paratopos apresentando afinidades semelhantes, mas diferentes graus de superposição à superfície, gerando restrições competitivas de ligação, como já demonstrado para monoclonais (Choumet et al. 1992, Stiles & Choumet, 1997). Neste caso a ligação dos diferentes paratopos à mesma superfície antigênica resulta em comprometimento equivalente da função da molécula do antígeno.

Considerando todas as superfícies antigênicas ligadas à anticorpo ao mesmo tempo a afinidade funcional ou avidéz seria muita alta, pois corresponde ao produto das afinidades individuais. Nesta situação a reação ocorrerá sempre no sentido de sua compleição, sendo apenas sua velocidade sensível à concentração dos reagentes, ou seja, a atividade neutralizante específica do antiveneno será independentemente da concentração do antígeno. Obtivemos neste trabalho uma evidência de que a enzima t-TLm.m. pudesse ser um antígeno do tipo aqui considerado (vide fig. V.3.5E), porque o consumo de antiveneno quantidades funcionalmente equivalentes do antígeno e do veneno, para neutralização total, foram praticamente os mesmos. Em outro experimento fizemos a neutralização da t-TL .m.m em concentração dez vezes a concentração mais alta da curva de equivalência funcional fig. V.3.5D, obtendo o mesmo resultado relativo. Neutralização à concentrações mais altas tanto da enzima pura quanto do veneno bruto não forma realizadas.

- Antígeno polivalente, cujos determinantes antigênicos estejam representados em outras proteínas do veneno (mosaico antigênico), com identidade total ou parcial. Neste caso, mesmo sendo o antiveneno hiperimune, ocorrerá maior consumo de anticorpos para neutralização de determinada atividade no veneno bruto que no antígeno puro. Este excesso de consumo poderá ser concentração dependente (Van Oss et al. 1987) quer pela oferta de epitopos ou paratopos de baixa afinidade de ligação, evidentemente relacionados ao antígeno que se pretende neutralizar.

Obs: Não consideramos, por simplificação as possíveis ocorrências de restrições não competitivas à ligação Ag:Ac, decorrentes de impedimentos espaciais e alterações de conformação do antígeno. Estas podem incidir e tornar mais complexas as duas situações figuradas.

Neste trabalho os dados apresentados na fig. III.5.3, onde se mostrou que a DE50 de antiveneno é uma função exponencial da massa de veneno bruto contida em uma DL50, são

compatíveis com esta segunda interpretação. A discussão feita na seção III.4.2B a partir das evidências iniciais de Githens & Butz (1929), mais tarde consubstanciadas por vários autores, de que os venenos ofídicos de menor toxicidade específica sejam os mais antigênicos, na realidade foi uma prévia do que na presente seção se discute. A ressalva de que a pretensa vantagem em se usar os venenos menos tóxicos porém mais antigênicos como imunógenos, deva ser confirmada pela verificação da potência neutralizante à concentrações compatíveis com as que ocorrem no acidente ofídico, deve ser também aqui reafirmadas.

Persistindo ainda na discussão do tipo de antígeno cujos epitopos façam parte do mosaico antigênico, devemos antever que, obviamente, a própria estimativa do antígeno por metodologia imunológica, estaria prejudicada. Através de ELISA para antígeno, Kamiguti et al. (1991-b), em placas cobertas pela fração de IgG anti-*B.jararaca* do soro de coelho, em seguida utilizadas para detecção de veneno bruto em plasma de rato (anticorpo de detecção = conjugado de fosfatase alcalina de fração IgG anti-*B.jararaca* veneno bruto) e detecção de fator hemorrágico de *B.jararaca* também em plasma de rato (anticorpo de detecção = conjugado de fosfatase alcalina do anti-fator hemorrágico de *B.jararaca*), foram obtidas as seguintes dosagens:

- Média de 874 ng/mL de veneno bruto e 41 ng/mL de fator hemorrágico, em animais que receberam injeção de 750 µg de veneno bruto de *B.jararaca*;
- Média de 1770 ng/mL de veneno bruto e 74 ng/mL de fator hemorrágico, em animais que receberam injeção de 650 µg de fator hemorrágico purificado.

A estimativa de 41 ng/mL de fator hemorrágico em 874 ng/mL de veneno bruto, ou seja, 5% é excelente, pois corresponde à ocorrência destas proteínas no veneno (Assakura, et al. 1986).

Por outro lado a ocorrência de 1770 ng/mL de veneno bruto em 74 ng/mL de fator hemorrágico é um absurdo, causado certamente pela maior oferta de epitopos dos fatores hemorrágicos, na

ausência de outros epitopos competidores, presentes no veneno bruto. Para o ELISA de duplo anticorpo (sanduíche), Harlow & Lane (1988) não recomendam anticorpos policlonais.

Outra possível interferência com as estimativas da atividade neutralizante de antiveneno e da concentração plasmática de antígenos tóxicos, pode vir do homólogo não tóxico, porém antigênico, das toxinas do *Tityus serrulatus*, descrito por Chaves-Olórtegui (1996).

Em resumo da secção V.4.2.2, podemos concluir:

- O método proposto, permite uma estimativa inequívoca da potência neutralizante do antiveneno para a atividade tipo-trombina do veneno de *Lachesis muta muta*, à concentração de veneno bruto de ocorrência possível no acidente ofídico.

Obs: Não dispomos de estimativas dos níveis plasmáticos de veneno no acidente laquético.

### **V.4.2.3 – MECANISMOS DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE COAGULANTE DA ENZIMA t-TLmm, PELOS ANTICORPOS PRESENTES NO ABL-900530**

As curvas de neutralização da enzima t-TLmm, mesmo se tratando de antígeno puro, não apresentaram em sua morfologia qualquer sugestão de uma curva do tipo associação-dissociação da enzima a um inibidor (vide figs. IV.3.3.5A, B e C). Para esclarecer este ponto, foi realizado o experimento ilustrado na tabela IV.3.6B, cuja conclusão foi de que não mais havia antígeno completamente livre, mesmo restando 30% da atividade coagulante da enzima. Esta conclusão, entretanto, não resultou de mensuração direta, mas de uma interpretação à luz do conhecimento clássico do fenômeno zonal, de que ao nível de 70% de inibição o sistema Ag:Ac se encontrava na zona de equivalência, e, que a adição de igual quantidade de antígeno livre, fez o sistema praticamente voltar à início da região de excesso de antígeno, com apenas 10% de inibição. A separação dos complexos Ag: Ac da enzima livre, por meio de Sephadex G-100 (fig. V.3.7A) , ao mesmo nível de inibição da atividade coagulante, praticamente repetiu a informação de que a maioria das moléculas da enzima encontravam-se complexadas com anticorpo. O fato de que a recuperação da atividade coagulante foi menor que a recuperação da atividade amidásica, indica que ocorreu rearranjo nos complexos Ag:Ac durante o processo cromatográfico. Esta possibilidade, associada ao comportamento anômalo da enzima t-TLmm em Sephadex ( aparenta massa molecular mais alta) torna o estudo cromatográfico do problema, menos confiável.

A permanência de cerca de 70% da atividade amidásica do enzima, na vigência de inibição total da atividade coagulante sobre fibrinogênio (vide tab. V.3.6A), sugere para essa última atividade, um mecanismo de bloqueio espacial, uma vez que a característica de serino-protease já é fato bem estabelecido para o T-TLmm (Magalhães et al. 1993) . De fato, a perda de 30% na velocidade amidásica, poderia significar que além de bloqueio espacial. Ocorreram alterações de conformação da molécula da enzima causando, em pequeno grau, deformação do

centro ativo. A cinética de atividade amidásica, na situação de plena inibição da atividade coagulante, teria sido muito útil para as interpretações. Uma avaliação da massa molecular dos complexos Enzima:Ac, também teria utilidade, porque a expectativa é de grande perda de mobilidade da molécula da enzima. Neste ponto deve-se lembrar que a batroxobina, apresentando 62% de homologia de seqüência com a t-TLmm sofre inibição completa de ambas atividades pelos anticorpos antibatroxobina obtidos em coelho (Stocker & Barlov, 1975). Seria de fato interessante estudar comparativamente a cinética das duas enzimas tanto sobre fibrinogênio quanto substratos sintéticos.

Em resumo, desta seção V.4.2.3, podemos concluir:

- A inibição da atividade coagulante da enzima t-TLmm pelos anticorpos presentes no ABL-FUNED 900530, se faz principalmente por mecanismo não competitivo, decorrente de bloqueio espacial do acesso ao substrato de alto peso molecular.

### V.1 – A APLICABILIDADE DOS CRITÉRIOS CLÁSSICOS DO ENSAIO BIOLÓGICO À PADRONIZAÇÃO DE VENENOS E ANTIVENENOS BOTHRÓPICOS E CROTÁLICOS.

- Quando corretamente delineados, em termos de amostragem, espaçamento de doses e execução, as relações dose-resposta para letalidade de venenos no camundongo, proteção letal de antivenenos no camundongo e hemorragia cutânea no rato, preenchem os critérios fundamentais de linearidade, monotonicidade e homogeneidade de variâncias, permitindo estimativas válidas de doses efetivas e coeficientes angulares.
- Nas comparações de potência letal de venenos, potência protetora ou anti-letal de antivenenos e potência anti-hemorrágica de antivenenos, o critério de similaridade não é preenchido, ou não tem significado, devido à pluralidade, complexidade e variabilidade nos constituintes efetivos de venenos e antivenenos.
- As relações entre velocidade de coagulação do fibrinogênio puro e a concentração de venenos brutos, são precisamente lineares e tem intersecção na origem, permitindo uma comparação válida da atividade tipo-trombina entre venenos.
- As relações entre desafio de veneno e DE50 do antiveneno no ensaio de proteção letal e as relações entre desafio de veneno e dose de antiveneno para neutralização total da atividade hemorrágica, são muito precisas. Quando apresentam um único segmento de reta, permitem uma definição inequívoca da potência neutralizante do antiveneno, em relação ao veneno de referência.
- A relação entre as quantidades de enzima tipo-trombina de *Lachesis muta muta* e as quantidades de antiveneno para neutralização total são precisamente lineares e apresentam

coeficiente angular normalizado unitário com interseção na origem, o que permite o cálculo inequívoco da potência neutralizante do antiveneno.

## **VI.2 – EXEQUIBILIDADE DO USO DE REFERÊNCIAS SECUNDÁRIO E SUBSTITUIÇÃO DE REFERÊNCIAS**

A substituição de venenos de referência, bem como o uso de referências secundárias, mantendo a equivalência antigênica com a referência vigente, é exequível desde que:

- As referências, tanto primárias quanto secundárias, sejam da mesma espécie e se componham de grande número de venenos de espécimes individuais.
- A equivalência antigênica com a nova referência ou referência secundária, seja estabelecida para um grande número de lotes de antiveneno.
- Não se pretenda estabelecer equivalência antigênica previsível, entre a referência e venenos de outras espécies do gênero, ou mesmo entre a referência e venenos de espécimes individuais homoespecíficos.

## VII – PROPOSIÇÕES DIRIGIDAS ÀS INSTITUIÇÕES SORO-PRODUTORAS E PESQUISADORES NA ÁREA.

---

- A caracterização ampla de veneno e antivenenos, como preconizada pela OMS, deve ser implementada.
- Os venenos de Referência Nacional para gênero devem ser utilizados não só como padrões funcionais, mas também como padrões de imunogenicidade e antigenicidade.
- Referências de componentes puros dos venenos, responsáveis pelas atividades mais relevantes destes, devem estar disponíveis para comparação e aferição da metodologia empregada sobre veneno total e, para propiciar o desenvolvimento de metodologia mais específica e sensível.
- O procedimento atual de atribuição de uma potência neutralizante ao antiveneno, somente torna previsível (previsibilidade grau-dependente) sua atuação sobre o veneno de referência. Esta ênfase deve ser transferida para os venenos de espécimes individuais de todo o gênero, cuja previsibilidade de neutralização pelo antiveneno, é o que realmente interessa para seu uso terapêutico.
- A exemplo do grande incentivo, na última, década ao desenvolvimento de micrometodologia imunoquímica, especialmente o ELISA para quantificação de antígeno e anticorpos, no sentido de diminuir o consumo de animais, barateamento e possível automação do controle de processos na produção do antiveneno, a pesquisa de micrometodologia, para avaliação funcional das moléculas responsáveis pelas diversas atividades dos venenos, deveria ser fomentada, para a plena aquisição dos objetivos pretendidos.
- Na execução de estudos de neutralização de atividades do veneno pelo antiveneno, o pesquisador deve estar atento às diferenças de concentração entre os níveis plasmáticos do

veneno total e/ou de seus componentes, que ocorrem no plasma do paciente acidentado, com as concentrações na qual a metodologia utilizada é exequível.

- Excetuando-se a DE50 protetora do antiveneno nos ensaios baseados em letalidade, o pesquisador deve verificar se o conceito de DE50 tem na curva de neutralização da atividade em estudo, o significado, pressuposto.
- No cálculo da potência neutralizante do antiveneno, baseada em dados de letalidade, pelo menos duas DEs50 devem ser obtidas, à dois níveis de desafio, e estimada a intersecção com a abcissa, que em geral não é 1 DL50.
- Com a disponibilidade de componentes puros dos venenos como antígenos, os pesquisadores devem tentar correlacionar a curva de neutralização funcional do antígeno com o comportamento zonal Ag:Ac, uma vez que o mecanismo principal da neutralização por anticorpos ocorre por bloqueio espacial, mais provavelmente da zona de equivalência para excesso de anticorpos. A nefelometria por dispersão de Laser é extremamente adequada para estes estudos.
- Com a obtenção de um anticorpo monoclonal plenamente neutralizante para um componente importante de um veneno ofídico, o pesquisador tem a chance de desenvolver um ELISA para anticorpo que permita avaliar no antiveneno, os anticorpos capazes de fazer restrição total e competitiva da ligação do monoclonal, portanto funcionalmente equivalentes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Amaral, C.F.S.; Da Silva, O.A.; Godoy, P. and Miranda, D. (1985) – Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *B. jararacussu* snake bite. *Toxicon* 23: 877-885.
- Amaral, C.F.S.; Rezende, N.A.; Da Silva, O.A.; Ribeiro, M.M.F.; Magalhães, R.A.; Reis, R.J.; Carneiro, J.G. and Castro, J.R.S. (1986) – Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos Bothrópico e Crotálico. Análise de 63 casos. *Rev.Inst. Med. Trop. São Paulo*, 28: 220-227.
- Amorim, M.F. and Mello, R.F. (1952) – Nefrose do néfron intermediário no envenenamento crotálico humano. Estudo anátomo-patológico. *Mem. Inst. Butantan* 24: 281.
- Arnon, R. and Geiger, B. (1977) – Molecular basis of immunogenicity and antigenicity. In: Glynn, L.E. & Steward, M.W.; eds. “*Immunochemistry: An advanced Textbook*”. Chap. 9; Wiley Inter-Science; London.
- Assakura, M.T. ; Reichel, A.P. and Mandelbaum, F.R. (1986) – Comparison of Immunological, Biochemical and Biophysical properties of three hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops jararaca*. *Toxicon*, 24(9): 943-946.
- Azevedo, A.P. and Teixeira, J.C. (1938) – Intoxicação por veneno de cobra: necrose simétrica da córtex renal. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 33: 23.
- Azevedo-Marques, M.M.; Cupo, P.; Coimbra, T.M.; Hering, S.E.; Rossi, M.A. and Laure, C.J. (1985) – Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. *Toxicon* 23: 631-636.
- Azevedo-Marques, M.M.; Hering, S.E. and Cupo, P. (1987) – Evidence that *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) envenomation in humans causes myolysis rather than hemolysis. *Toxicon* 25: 1163-1168.
- Baramova, E.N.; Shannon, J.D.; Bjarnarson, J.B. and Fox, J.W. (1989) – Degradation of extracellular matrix proteins by hemorrhagic metallo proteinases. *Arch. Bioch. Bioph.*, 275(1): 63-71.
- Barbosa, C.L. and Ferreira-Alves, D.L. (1988) – Proposta para definição de potência dos antivenenos bothrópico e crotálico. *Resumos da III Reunião Anual da FESBE*, p. 375.

- Barravieira, B. (1990) – Curso sobre acidentes com animais peçonhentos – Acidentes por serpentes do gênero *Crotalus*. *Arq. Bras. Med.* 64: 14-20.
- Barravieira, B.; Bonjorno Júnior, J.C.; Arakari, D.; Domingues, M.A.C.; Pereira, P.C.M.; Mendes, P.R.; Machado, J.M. and Meira, D.A. (1989) – A retrospective study of 40 victims of crotalus snake bites. Analysis of the hepatic necrosis observed in one patient. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 22: 5-12.
- Barravieira, B. (1990) Curso sobre acidentes com animais peçonhentos – Acidentes por serpentes do gênero *Crotalus*. *Arq. Bra. Med.* 64: 14-20.
- Berzofsky, J.A. and Schechter, A.V. (1981) – The concepts of Cross reactivity and specificity in Immunology. *Molecular Immunology* 18: 751-753.
- Bieber, A.L. (1979) – Metal and nonprotein constituents in snake venoms. In: Lee, C.Y.; ed. *Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer-Verlag-Berlin, Vol. 52, “Snake Venoms”, chap. 7, p. 295-308.
- Bjarnarson, J.B.; Hamilton, D. and Fox, J.W. (1988) – Studies on the mechanism of hemorrhage production by five proteolytic hemorrhagic toxins from *Crotalus atrox* venom. *Biol. Chem. Hoppe-seyler*, 369-121-129.
- Bjarnarsson, J.B. and Fox, J.W. (1989) – Hemorrhagic toxins of snake venoms. *J. Toxicol. – Toxin Rev.*, 79: 121-209.
- Bliss, C.I. The method of probits – A correction. *Science*, 79:409-410.
- Bliss, C.I. The method of probits. *Science*, 79:38-39.
- Blombäck, B (1958) Studies on the action of thrombotic enzymes on bovine fibrinogen as measured by N-terminal analysis, *Ark. Kemi* 12:321-335. (Citado por Hantgan et al. 1983).
- Blombäck, B.; Hessel, B. Hogg, D. & Claesson, G. (1977) Substrate specificity of thrombin on proteins and synthetic substrate. In: Chemistry and Biology of thrombin. R. L. Lundbald, J. W. Fenton and K. G. Mann eds. 275-290 Ann. Arbor Science, M. I. (Citado por Hantgan et al., 1983)
- Blombäck, B.; Hessel, B.; Hogg, D. and Therkildsen, L. (1978) A two-step fibrinogen-fibrin

transition in blood coagulation. *Nature* 275:501-506.

Boche, J.; Chippaux, J.P. and Courtois, B. (1981) – Contribution à L'étude des variations biochimiques des venins de serpents d'Afrique de L'ouest. *Bull. Soc. Path. Exot.* 74: 356-366. Citado por Chippaux (1991).

Bolños, R.; Rojas, O. & Flores, C. E. U. (1982) Aspectos Biomédicos de quatro casos de mordedura de serpente por *Lachesis muta* (Ophidia; Viperidae) en Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 30:53 (Citado por Kamiguti & Cardoso), 1989).

Bon, C.; Chanqueux, J.P.; Jeng, T.W. and Fraenkel, C. (1979) – Postsynaptic effects of crotoxin and of its isolated subunits. *Eur. J. Biochem.* 99: 471-481.

Bonta, I.L.; Vargafitig, B.B.; Bhargava, N. and De Vos, C.J. (1970) – Method for study of snake venom induced hemorrhages. *Toxicon*, 8: 3-10.

Boquet, P. (1979) – Immunological properties of snake venoms. In: Lee, C.Y.; ed. *Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer-Verlag-Berlin, Vol. 52, "Snake Venoms", chap. 19, p. 751-797.

Borkow, G.; Gutierrez, J.M. and Ovadia, M. (1993) – Isolation and characterization of synergistic hemorrhagins from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon*, 31(9): 1137-1150.

Brazil, V. (1914) – Le defense contre L'ophidisme. 2 nd ed.; Pocaí & Weiss; São Paulo. (Citado por Raw et al. – 1991).

Calmette, A. (1894) – L'immunization artificielle des animaux contre le venin des serpents dans la therapie experimentale de morsures venimeuses. *C.R. Soc. Biol.* 46: 120. Citado por Horowitz (1995).

Chang, C.C. and Lee, C.Y. (1977) – Crotoxin, the neurotoxin of South Americam rattlesnake venom, is a presynaptic toxin acting like  $\beta$  - bungarotoxin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*; Heidelberg, 296:159-168.

Chávez-Olórtegui, C.; Kalapothakis, E.; Moreira Ferreira, A.M.B.; Ferreira, A.P. and Diniz, C.R. (1997) - Neutralizing capacity of antibodies elicited by a non-toxic protein purified from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon* 35: 213-221.

- Chávez-Olórtegui, C.; Moreira Ferreira, A.M.; Nascimento Cordeiro, M.; Maria, W.S.; Richardson, M. and Diniz, C.R. (1996) – Immunological and chemical properties of a non-toxic protein purified from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus* (Lutz & Mello Campos, 1992). *Proc. of the 1<sup>st</sup> Int. Cong. Inst. Pasteur*; Bon, C. and Goyffon, M.; ed. “Envenomings and their treatments”; p. 183-195.
- Chippaux, J.P.; Boche, J. and Courtois, B. (1982) – Electrophoretic patterns of the venoms from a litter of *Bitis gabonica* snakes. *Toxicon* 27: 1397-1399.
- Chippaux, J.P.; Williams, V. and White, J. (1991) – Snake Venom variability: Methods of study, results and Interpretation. *Toxicon* 29: 1279-1303.
- Choumet, V.; Faure, G.; Robbe-Vincent, A.; Saliou, B.; Mazié, J.C. and Bon, C. (1992) – Immunochemical analysis of a snake venom phospholipase A<sub>2</sub> neurotoxin, crotoxin, with monoclonal antibodies. *Molecular Immunology* 29: 871-882.
- Christensen, P.A. (1967) – Remarks on antivenin potency estimation. *Toxicon* 5: 143-145.
- Christensen, P.A. (1966) – Venom and antivenom potency estimation. *Simp. Internat. Mem. Inst. Butantan*. 33(1): 305-326.
- Christensen, P.A. (1979) – Production and standardization of antivenin. In: Lee, C.Y.; ed. *Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer-Verlag-Berlin, Vol. 52, “Snake Venoms”, chap. 20, p. 825-846.
- Chuang, L.Y.; Lin, S.R.; Chang, S.F. and Chang C.C. (1989) – Preparation and characterization of a monoclonal antibody specific for  $\alpha$ -bungarotoxin and localization of the epitope. *Toxicon* 27: 211-219.
- Cinader, B. (1957) – Antibodies against enzymes. *Ann. Rev. Microbiol.* 11: 371-390.
- Cinader, B. (1957) – Antibodies against enzymes. *Ann. Rev. Microbiol.*, 11: 371.
- Cohen, S. and Porter, R.R. (1964) – *Adv. Immunology*, 4: 287-349.

- Cohn, M. (1952) – Techniques and analysis of the quantitative precipitin reaction. A reaction in liquid Media. In: Corcoran, A.C.; ed. *Methods in Medical Research*, vol. 5, section III; Year Book Publishers Inc. Chicago.
- Cohn, M. and Pappenheimer Jr., A.M. (1949) – A quantitative study of the Diphtheria toxin – antitoxin reaction in the sera of various species including man. *J. Immunology*, 63: 291-312.
- Cupo, P.; Azevedo-Marques, M.M. and Hering, S.E. (1988) – Clinical and laboratory features of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in children. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 82: 924-929.
- Da Silva, M.H. and Bier, O.G. (1982) – Titration of antiserum to the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom by measuring inhibition of phospholipase A<sub>2</sub> activity. *Toxicon* 20: 563-569.
- Danysz, J. (1902) – Ann. Institut. Pasteur. 16: 331; citado por Kabat Mayer's (1971).
- Delaunoy, A.L. (1973) – Biostatistics in Pharmacology - Vol. 2, *International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics*, Pergamon Press, Oxford, U.K.
- Desnoyers, J.E.; Verrall, R.E. and Conway (1965) – *J. Chem. Phys.*, 43: 243. Citado por Jencks (1969).
- Dias da Silva, W.; Guidolin, R.; Higashi, H.G.; Caricati, C.P.; Morais, J.F.; Lima, M.L.S.R.; Yamagushi, I.K.; Nishikawa, A.K.; Stephano, M.A.; Marcelino, J.R.; Pinto, J.R. and Santos, M.J. (1989) – Cross-reactivity of horse monovalent antivenoms to venoms of ten Bothrops species. *Mem. Inst. Butantan* 51: 153-168.
- Domingues do Carmo, L.C.T. (1996) – Padronização da atividade hemorrágica de venenos Bothrópicos e anti-hemorrágica de soros antibothrópicos. *Tese de Mestrado* apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Área de Concentração – Farmacologia, ICB, UFMG.
- Doolittle, R. F. (1973) Structural aspects of the fibrinogen to fibrin conversion. *Adv. Protein Chem.* 27:1-109 (Citado por Hantgan et al. 1983).

- Dos Santos, M.C.; Diniz, C.R.; Whitaker, P.M.A. and Dias da Silva, W. (1988) – Phospholipase A<sub>2</sub> injection in mice induces immunity against the lethal effects of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon* 26: 207-213.
- Draper, N. and Smith, H. (1966) – Applied regression analysis. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Fabiano, R.J. and Tu, A.T. (1981) – Purification and Biochemical study of viridotoxin tissue damaging toxin, from Prairie Rattlesnake venom. *Biochemistry*, 20:21-27.
- Faure, G. and Bon, C. (1987) – Several isoforms of crotoxin are present in individual venoms from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon* 25: 229-234.
- Fechner, G.T. (1860) – Elemente der Psychophysik. Leipzig: Breitkopf und Hartel. Citado por Finney, D.J., 1971.
- Ferreira, M.L.; Moura-da-Silva, A.M. and Mota, I. (1992a) – Neutralization of different activities of venoms from nine species of Bothrops snakes by *Bothrops jararaca* antivenom. *Toxicom* 30(12): 1603-1608.
- Ferreira, M.L.; Moura-da-Silva, A.M.; França, F.O.S.; Cardoso, J.L. and Mota, I. (1992b) – Toxic activities of venoms from nine Bothrops species and their correlation with lethality and necrosis. *Toxicon* 30(12): 1603-1608.
- Ferreira-Alves, D.L. (1988) – Ensaio biológico de venenos e antivenenos ofídicos. *Anais do XII Simpósio Anual da ACIESP (57-1) sobre toxinas proteicas*, vol. II, p. 19-23.
- Ferry, J. D. (1952a) The mechanism of polymerization of fibrinogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 38:566-569
- Ferry, J. D.; Shulman, S; Gutfreund, K. and Kats, S. (1952b) The conversion of fibrinogen to fibrin. XI Light Scattering Study on Clotting system inhibited by hexamethylene glycol. *J. Am. Chem. Soc.*74:5704-5715.
- Finney, D.J. (1964) – Statistical Method in Biological Assay. *sec. ed. Charles Griffin & Co Ltd.*, London.
- Finney, D.J. (1971) – Probit Analysis – 3<sup>rd</sup> edition, Cambridge University Press.

- Fontana, F (1767) *Richerche Fisiche sopra il veleno della vipera* (1781) *Traité sur le venin de la Vipera sur les poisons Americains, sur le le Laurirer-Cerise et sur quelques poisons vegetaux.* Florence - Citados por Kornalick (1991).
- Franck, H.S. and Evans, M.W. (1945) – *J. Chem. Phys.*, 13: 507 – Citado por Jencks (1969).
- French, D.L.; Laskov, R. and Scharff, D.M. (1989) – The role of somatic hypermutation in the generation of Antibody diversity. *Science* 244: 1152-1157.
- Furtado, M.F.D.; Maruyama, M.; Kamiguti, A.S. and Antonio, L.C. (1991) – Comparative study of nine bothrops snake venoms from adult females and their offspring. *Toxicon* 29: 219-226.
- Furukawa, Y. & Hayashi, K. (1977) Factor X converting and thrombin-like activities of *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon* 15:107-114.
- Gaddum, J.H. (1933) – Reports on biological standards III. Methods of biological assay depending on a quantal response. *Spec. Rep. Ser. Med. Res. Counc.* London, nº 183. Citado por Finney, D.J., 1971.
- Githens, T.S. and Butz, L.W. (1929) – Venons of North American snakes and their relationships. *J. Immunol.* 16: 71-80.
- Gutierrez, J.M.; Gené, J.A.; Royas, G. and Cerdas, L. (1985) – Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rica snake venoms by a polyvalent Antivenom. *Toxicon*, 23(6): 887-893.
- Gutierrez, J.M.; Royas, G.; Lomonte, B.; Gené, J.A.; Chaves, F.; Alvarado, J. and Rojas E. (1990) – Standartization of assays for testing the neutralizing ability of antivenoms. (letters to the editor). *Toxicon*, 28(10): 1127-1129.
- Hanashiro, M.A.; Da Silva, M.H. and Bier, O.G. (1978) – Neutralization of crotoxin and crude venom by rabbit antiserum to crotatus phospholipase A. *Immunochemistry* 15: 745-750.
- Hantgan, R. R. & Hermans, J. (1979). Assembly of fibrin: A light scattering study. *J. Biol. Chem.* 254:11272-11281.
- Hantgan, R.; Mc Donagh, J and Hermans, J. (1983) Fibrin Assembly. *Ann New York Acad. Sci.*

(408) 345-366.

Harlow, E. and Lane, D. (1988) – In: *Antibodies: A laboratory Manual* (Ed. by Cold Spring Harbor Laboratory, chap. 14).

Harris, J.B. (1991) – Phospholipases in snake venoms and their effects on nerve and muscle. In: “Harvey, A.L., ed. ‘Snake Toxins’, Pergamon Press, Inc. Boca Raton, Florida, U.S.A., chap. 3, p. 91-129”.

Horowitz, R.S. and Dart, R.C. (1995) – Antivenins and Immunobiologicals: Immunotherapeutics of envenomation. In: Auerbach, P.S.; ed. “Wilderness Medicine”; Mosby-Year Book Inc., St. Louis, USA.

Hudson, G.A.; Ritchie, R.F. and Haddow, J.E. (1981) – Method for testing antiserum titer and avidity in nephelometric systems. *Clinical Chemistry*, 27(11): 1838-1844.

Iddon, D.; Hommel, M. and Theakston, R.D.G. (1988) – Characterization of a monoclonal antibody capable of neutralizing the hemorrhagic activity of West African *Echis carinatus* (carpet viper) venom. *Toxicon*, 26(2): 167-179.

Iwanaga, S. & Susuki, T. (1979) – Enzymes in snake venom. In: Lee, C.Y.; ed. *Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer-Verlag-Berlin, Vol. 52, “Snake Venoms”, chap. 4, p. 61-158.

Jencks, W.P. (1969) – Catalysis in Chemistry and Enzymology. *Mc. Graw-Hill Book Company*, New York.

Jeon, O.H. and Kim, D.S. (1999) – Cloning, expression and characterization of a cDNA encoding snake venom metalloprotease. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 47(3): 417-425.

Jerne, N.K. (1951) – A study of Avidity – Based on rabbit skin response to diphtheria toxin-antitoxin mixture. *Acta Pathol. Microb. Scand. Supplementum LXXXVII*.

Jerne, N.K. and Wood, E.C. (1949) – The validity and meaning of the results of biological assays. *Biometrics* 5: 273-299.

Jimenez-Porras, J.M. (1970) – Biochemistry of snake venoms. *Clinical Toxicology* 3(3): 389-431.

- Kabat, E.A. and Mayer, M.M. (1971) – Kabat and Mayer's Experimental Immunochemistry – 2<sup>nd</sup> ed. 4<sup>th</sup> printing – Charles C. Thomas; Pub. Springfield.
- Kamiguti, A. S. & Cardoso, J. L. C. (1989) Haemostatic changes caused by the venoms of south american snakes. *Toxicon* 27:955-963.
- Kamiguti, A. S.; Matsunaga, S.; Spir, M.; Sano-Martins, I. S. & Nahas, L. (1986) Alterations of the blood coagulation system after accidental human inoculation by *Bothrops jararaca* venom. *Brazilian J. Med. Res.* 19:199-204.
- Kamiguti, A. S.; Theakston, R. D. G.; Desmond, H. & Hutton, R. A. (1991b) Systemic haemorrhage in rats induced by a haemorrhagic fraction from *Bothrops jararaca*. *Toxicon* 29:1097-1105.
- Kamiguti, A.S.; Cardoso, L.C.; Theakston, R.D.G.; Sano-Martins, I.S.; Hutton, F.; Rugman, F.P.; Warrel, D.A. and Hay, C.R.M. (1991a) – Coagulopathy and hemorrhage in human victims of *Bothrops jararaca* envenoming in Brasil. *Toxicon*, 29(8): 961-972.
- Kamiguti, A.S.; Theakston, R.D.G.; Desmond, H. and Hutton, R.A. (1991b) – Systemic haemorrhage in rats induced by a haemorrhagic fraction from *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon*, 29(9): 1097-1105.
- Karlsson, E. (1979) – Chemistry of protein in snake venoms. In: Lee, C.Y.; ed. *Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer-Verlag-Berlin, Vol. 52, "Snake Venoms", chap. 4, p. 159-212.
- Katz, S. Gutfreund, K. Shuman, S. and Ferry, J. D. (1952) The conversion of fibrinogen to fibrin. *J. Am. Chem. Soc.* 74:5706-5709
- Kauzman, W. (1959) – Some factors in the interpretation of protein denaturation. *Advan. Protein. Chem.*, 14: 1-63.
- Kondo, H.; Kondo, S.; Ikesawa, H.; Murata, R. and Ohsaka, A. (1960) – Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of habu snake venom. *Japan J. M. Sc. & Biol.*, 13: 43-45.
- Kondo, H.; Kondo, S.; Ikezawa, H. and Ohsaka, A. (1960) – Studies on a quantitative method for determination of hemorrhagic activity of habu snake venom. *Jap. J. M. Sci. & Biol.* 13: 43-45.

- Kondo, H.; Kondo, S.; Sadahiro, S.; Yamauchi, K.; Ohsaka, A. and Murata, R. (1965a) – Standardization of antivenom I. A method for determination of antilethal potency of Habu Antivenine. *Japan J. M. Sc. & Biol.*, 18: 101-110.
- Kondo, H.; Kondo, S.; Sadahiro, S.; Yamauchi, K.; Osaka, A. and Murata, R. (1965b) – Standardization of antivenom II. A method for determination of antihemorrhagic potency of Habu antivenine in the presence of two hemorrhagic principles and their antibodies. *Jap. J. Med. Sci. & Biol.* 18:127-141.
- Kornalick, F (1991) The influence of snake venom proteins on blood coagulation. In: Harvey, A. L. ed "Snake Toxins" Pergamon Press. New York.
- Kunitz, M. (1946) – Crystalline soybean trypsin inhibitor II – general properties. *J.Gen. Physiol.*, 30: 291-310.
- Lacey, A.H. (1967) – The Unit of Insulin Diabetes 16(3): 198-200
- Laing, G.D.; Theakston, R.D.G.; Leite, R.P.; Dias da Silva, W.; Warrell, D.A. and Butantan Institute Antivenom Study Group (1992) – Comparison of the potency of three Brazilian bothrops antivenoms using “in vivo” rodent and “in vitro” assays. *Toxicon*, 30: 1219-1225.
- Lamb, G (1901) On the action of snake venoms on the coagulability of the blood. *Ind. Med. Gas*, 36, 443-455. Cited by Stocker (1980)
- Lee, C.Y. (1972) – Chemistry and pharmacology of polypeptide toxins in snake venoms. In: *Annual Rev. of Pharmacology*. Elliot, H.W.; Okun, R.; George, R. eds. V. 12, p. 265-286.
- Lee, W.Y. and Schon, A.H. (1971) – Studies on inhibition of rabbit ribonuclease activity by its homologous antibodies. *Immunochemistry* 8: 743-749.
- Leite, L.C.C.; Furtado, M.F.D.; Correa, T.C. and Raw, I. (1992) – Characterization of the snake venoms from seven Brazilian species of Bothrops by FPLC anion-exchange chromatography. *Comp. Biochem. Physiol.* 102B(3): 515-520.
- Lomonte B. et al. (1992) – Neutralization of myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> from the venom of the snake *Bothrops asper* by monoclonal antibodies. *Toxicon* 30: 239.

- Longhurst, R.S. (1973) – Geometrical and Physical Optics. 3<sup>rd</sup> ed. Longman Group limited- London.
- Maeno, H. (1962) – Biochemical Analysis of Pathological lesions caused by Habu snake venom with special reference to hemorrhage. *J. Biochem.*, 52: 343-350.
- Magalhães, A.; Brasil da Fonseca, B. C.; Diniz, C. R.; Gilroy, J. and Richardson, M. (1993) The complete amino acid sequence of a thrombin-like enzyme/gyrotoxin analogue from venom of the bushmaster (*Lachesis muta muta*). *FEBS*. 329. 116-120.
- Mandelbaum, F.R. and Assakura, M.T. (1988) – Antigenic relationship of the hemorrhagic factors and proteases isolated from the venoms of three species of Bothrops snakes. *Toxicon*, 26(4): 379-385.
- Mandelbaum, F.R.; Assakura, M.T. and Reichel, A.P. (1984) – Characterization of two hemorrhagic factor isolated from the venom of *Bothrops newiedi* (jararaca pintada). *Toxicon*, 22: 193-206.
- Mandelbaum, F.R.; Reichel, A.P. and Assakura, M.T. (1976) – Some Physical and Biochemical characteristics of HF<sub>2</sub>, one of the hemorrhagic factors in the venom of *Bothrops jararaca*. In Ohsaka, A.; Hayashi, K.; Sawai, Y. eds. *Animal, Plant and Microbial Toxins*, vol. 2, pgs. 111-121, New York, Plenum.
- Mandelbaum, F.R.; Reichel, A.P. and Assakura, M.T. (1982) – Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops jararaca* (jararaca). *Toxicon*, 20: 955.
- Marchalonis, J.J. (1982) – Antibody as a tool – The applications of immunochemistry; chapter IV. *John Wiley & Sons*, New York.
- Martinelli, R. A. & Scheraga, H. A. (1980) Steady-state kinetic study of the bovine thrombin fibrinogen interaction. *Biochemistry* 19:2343-2350.
- Martinez, R.A. (1989) – Antigenic relationships of fractionated Western Diamondback Rattlesnake (*Crotalus atrox*) hemorrhagic toxins and other rattlesnake venoms as indicated by monoclonal antibodies. *Toxicon*, 27(2): 239-245.
- Maruyama, M.; Kamiguti, A. S.; Cardoso, J. L.; Sano-Martins, I.; Chudzinski, A. M.; Santoro, M. L.; Morena, P.; Tomy, S. C.; Antonio, L. C.; Miraha, H. & Kelen, E. M. (1990) Studies on blood coagulation and Fibrinolysis in Patients Bitten by Bothrops jararaca (jararaca). *Thrombos. Haemos. (Stuttg)* 63:449-453.

- Mebs, D. and Kornalick, F. (1984) – Intraspecific variation in content of a basic toxin in eastern diamond back rattlesnake (*Crotalus adamanteus*) venom. *Toxicon* 22: 831-833.
- Mebs, D.; Pohlmann, S. and Von Tenspolde, W. (1988) – Snake venom hemorrhagins: Neutralization by commercial antivenoms. *Toxicon*, 26(5): 453-458.
- Ménez, A. (1991) – Immunology of snake toxins. In: Harvey, A.L.; ed. “*Snake Venoms*”; Pergamon Press, New York, p. 35-90.
- Ménez, A.; Pillet, L.; Léonetti, M.; Bontems, F. and Maillère, B. (1992) – Snake Toxins as Antigens. In: Van-Regenmortel, M.H.V.; ed. “Structure of Antigens”, vol. 1, CRC Press, Inc. Boca Raton, Flórida, U.S.A., Chap. 13, p. 293-320.
- Morawitz, P. (1905). Die der Blutgerinnung. *Ergeb. Physiol.*, 4, 307. Citado por Stocker (1980).
- Moreira Ferreira, A.M.B.; Kalapothakis, E.; Diniz, C.R. and Chávez-Olórtegui, C. (1998) – In vivo protection against *Tityus serrulatus* scorpion toxins by immunization of mice with a non-toxic protein. *Toxicon* 36: 333-339.
- Mosesson, W. M & Finlayson J.S. (1976) The Search for the Structure of Fibrinogen. In: Spaet, T. H. ed. " Progress in Hemostasis and Trombosis" p. 61-107. Grune & Straton - New York.
- Nahas, L.; Kamiguti, A.S. and Barros, A.R. (1979) – Thrombin-like and factor X activator components of Bothrops snake venoms. *Thromb. Haemostas.* 41: 314-328.
- Nikai, T.; Nobuhiro, M.; Kishida, M.; Sugihara, H. and Tu, A.T. (1984) – Isolation and Biochemical characterization of hemorrhagic toxin from the venom of *Crotalus atrox* (Western Diamond back Ratlesnake). *Arch. Bioch. and Bioph.*, 231(2): 309-319.
- Noc, F (1904) Sur quelques propriétés physiologiques des différents venins de serpents. *Ann. Inst. Pasteur*, 18, 387-406. Citado por Stocker (1980)
- Ohsaka, A. (1960) – Fractionation of Habu snake venom by chromatography on C.m. – cellulose, with special reference to biological activities. *Jap. J. Sc & Biol.*, 13: 199-205.

- Ohsaka, A. (1976) – An approach to the physiological mechanism involved in hemorrhage: snake venom hemorrhagic principles as a useful analytical tool. In: Ohsaka, A.; Hayashi, K.; Sawai, Y. eds. *Animal, Plant and Microbial Toxins*, vol. 1, pgs. 123-136, New York, Plenum.
- Okada, M. & Blombäck, B. (1983) Factors influencing fibrin gel structure studied by flow measurement. *Ann. New York Acad. Sci.* 408:233-253.
- Osaka, A.; Ikezawa, H.; Kondo, S. and Uchida, N. (1960) – Hemorrhagic activities of Habu snake venom, and their relations to lethal toxicity, proteolytic activities and other pathological activities. *British. J. Exp. Path.*, 41: 478-486.
- Ouyang, Chaoho; Che-ming, Teng and Tur-fu, Huang (1992) Characterization of snake venoms components acting on blood coagulation and platelet function. *Toxicon* (30) 945-966.
- Ovadia, M. (1978) – Isolation and characterization of three hemorrhagic factor from the venom of *Vipera palaestinae*. *Toxicon*, 16: 479-487.
- Ownby, C.L. (1990) – Standardization of assays for testing the neutralizing ability of antivenoms (comments on letters to the editor). *Toxicon* 28(10): 1129-1130.
- Ownby, C.L.; Cameron, D. and Tu, A.T. (1976) – Isolation of Myotoxic component from rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. *Am. J. Pathol.*, 85: 149-157.
- Ownby, C.L.; Colberg, T.R. and Odell, G.V. (1984) – A new Method for quantitating hemorrhage induced by rattlesnake venoms: ability of polyvalente antivenom to neutralize hemorrhagic activity. *Toxicon*, 22(2): 227-233.
- Pappenheimer Jr., A.M. and Robinson, E.S. (1937) – *J. Immunol.* 32: 291. Citado por Kabat & Mayer's (1971).
- Perez, J.C.; Garcia, V.E. and Huang, S.Y. (1984) – Production of a monoclonal antibody against hemorrhagic activity of *Crotalus atrox* (Western Diamondback Rattlesnake) venom. *Toxicon*, 22(6): 967-973.
- Queiroz, L.S.; Neto, H.S.; Assakura, M.T.; Reichl, A.P. and Mandelbaum, F.R. (1985a) – Muscular lesions induced by hemorrhagic factor from *Bothrops newiedi* snake venom. *Bras. J. Med. Biol. Res.*, 18: 337-340.

- Queiroz, L.S.; Neto, H.S.; Assakura, M.T.; Reichl, A.P. and Mandelbaum, F.R. (1985b) – Pathological changes in muscle caused by hemorrhagic and proteolytic factors *from Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon*, 23: 341-345.
- Quesniaux, V.F.J.; Scmitter, D.; Schreier, M.H. and Regenmortel, M.H.V. (1990) – Monoclonal Antibodies to cyclosporin are representative of the major antibody populations present in antisera of immunized mice. *Molecular Immunology* 27: 227-236.
- Ramon, G. (1922) – *Compte Rend. Soc. Biol.* 86: 661, 711, 813. Citado por Kabat Mayer's (1971).
- Raw, I.; Guidolin, R.; Higashi, G.H. and Kelen, E.M.A. (1991) – Antivenins in Brasil: Preparation; In: Tu, A.T.; ed. *Handbook of Natural Toxins*. Marcel Dekker, Inc. New York, vol. 5, chap. 18, p. 557-581.
- Raw, I.; Rocha, M. C.; Esteves, M. I. & Kamiguti, A. S. (1986) Isolation and Characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. *Brazilian J. Med. Biol.* 19:333-338.
- Reid, H.A. and Theakston, R.D.G. (1983) – The management of snake bite. *Bull. Of W.H.O.* 61: 885-895.
- Rezende, N.A.; Amaral, C.F.S.; Bambilra, E.A.; Lachatt, J.J. and Coimbra, T.M. (1989) – Functional and histopathological renal changes induced in rats by *Bothrops jararaca* venom. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 22: 407-416.
- Rodrigues, R.J. (1991) – Ensaio biológico de venenos e antivenenos ofídicos através do tempo de sobrevivência em camundongos e sua aplicabilidade à padronização de venenos e detecção de atividade anti-ofídica. Tese de Mestrado, Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB-UFMG.
- Rodrigues, R.J.; Barbosa, C.F.; Oliveira, A.B.; Velarde, D.T. and Ferreira-Alves, D.L. (1997) – Uso de venenos de referência internos de *Bothrops jararaca* no acompanhamento da produção de soros antiofídicos. *Resumos da XII Reunião Anual da FESBE*, p. 378.

- Rodrigues, R.J.; Diniz, C.R. and Ferreira-Alves, D.L. (1988) – Aplicação de ensaios biológicos para detecção de atividade anti-ofídica no soro do *Didelphis albiventris*. *Resumo da III Reunião Anual da FESBE*, 15: 28.
- Roitt, I.M. (1994) – Essential Immunology. *Blakwell Scientific Publications*- Oxford. U.K.
- Rosenfeld, G. (1971) – Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South American. In: *Venomous Animals and their venoms*, vol. II, p. 345, Eds. Bucherl, W. et al, Academic Press, New York.
- Rosenfeld, G.; Kelen, E. M. A. & Nahas, L. (1958) Regeneration of fibrinogen after defibrination by bothropic venom in man and dogs. Relationship with clotting and bleeding times. *Ver. Clin. São Paulo* 34:36 (Citado por Kamiguti & Cardoso, 1989).
- Russel, F. (1966) – Tobe or not to be .... the LD<sub>50</sub>. *Toxicon*, 4: 81-83.
- Russel, F.E. (1967) – Pharmacology of animal venoms. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 8(6): 849-873.
- Sadahiro, S. and Omori-Satoh, T. (1980) – Lack of a hemorrhagic principle in habu snake venom, *Trimeresurus flavoviridis*.
- Sanchez, E.F.; Freitas, T.V.; Ferreira-Alves, D.L.; Velarde, D.T.; Diniz, M.R.; Cordeiro, M.N.; Agostini-Cotta, G. and Diniz, C.R. (1992) – Biological Activities of venoms from South American Snakes. *Toxicon* 30(1): 95-103.
- Sanchez, E.F.; Magalhães, A. and Diniz, C.R. (1987) – Purification of a hemorrhagic factor (LHF<sub>I</sub>) from the venom of the Bushmaster snake, *Lachesis muta muta*. *Toxicon*, 25(6): 611-619.
- Sanchez, E.F.; Magalhães, A.; Mandelbaum, F.R. and Diniz, C.R. (1991) – Purification and characterization of the hemorrhagic factor II from the venom of bush master snake (*Lachesis muta muta*). *Biochem. Biophys. Acta*, 1074: 347-356.
- Santos Amaral, C. F.; Da Silva, O. A.; Lopez, M. & Pedroso, E. R. P. (1980) Afibrinogenemia following snake bite (*Crotalus durissus terrificus*) *Am. J. Trop. Med. Hyg* 39:1453-1455.
- Schafer, J. A.; Higgins, D. L. & Lewis, S. D. (1982) Steady-state kinetics for the thrombin catalyzed

- sequential release of fibrinopeptides A and B from human fibrinogen. *Fed. Proc.* 41:654.
- Scheffé, H. (1959) – The analysis of variance. *John Wiley & Sons, Inc.* – London.
- Schemberg, S. (1961) – Análise Imunológica (micro difusão em gel) de venenos individuais de *Bothrops jararaca*. *Ciência e Cultura* 13: 225-230.
- Schemberg, S. (1963) – Immunological (Ouchterlony method) identification of intrasubspecies qualitative differences in snake venom composition. *Toxicon* 1: 67-75.
- Scheraga, H. A. & Laskowski, Jr., M. (1957) The fibrinogen-fibrin conversion *Adv. Protein Chem.* 12:1-131 (Citado por Hantgan et al. 1983).
- Scheraga, H. A. (1983) Interaction of thrombin and fibrinogen and the polymerization of fibrin monomer. *Ann. New York Acad. Sci.* 408:3-343.
- Schmidt, A (1892) *Zur Blutlehre*. Vogel Leipzig. Citado por Kornalick (1991)
- Schottler, W.H.A. (1952) – Problems of Antivenin Standardization. *Bull. World Health Organization* 5: 293-320.
- Schottler, W.H.A. (1958) – Reference toxins for Antivenin standardization. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 19: 341-361.
- Seegers, W. H. & Ouyang, C (1979) In "Lee C. Y ed Handbook of Experimental Pharmacology. Vol 52 " Snake Venoms" chap. 18. p-687-750. Springer Verlag - Berlin.
- Seegers, W. H. & Smith, H. P. (1942) Factors which influence the activity of purified thrombin. *Am. J. Physiol.* 137:348-354.
- Shannon, J.D.; Baramova, E.N.; Bjarnarson, J.B. and Fox, J.W. (1989) – Amino Acid sequence of a *Crotalus atrox* venom metalloproteinase which cleaves type IV collagen and gelatin. *J. Biol. Chem.*, 264(20): 11575-11583.
- Shemberg, S. (1959-a) – Análise da crotamina no veneno individual de cascavéis recebidas pelo Instituto Butantan. *Mem. Inst. Butantan* 29: 213-226.

- Shemberg, S. (1959-b) – Geographical pattern of crotamine distribution in the same rattlesnake subspecies. *Science* 129: 1361-1363.
- Shen, L. L.; Hermans, J.; McDonagh, J. and Mc Donagh, R. P. C. (1977) Role of fibrinopeptide B release: Comparison of fibrins produced by thrombin and ancrod. *Am. J. Physiol.* 232:629-633.
- Shenberg, S. (1959) – Análise da crotamina no veneno individual de cascavéis recebidas pelo Instituto Butantan. *Mem. Inst. Butantan*, vol.29, p. 213-226.
- Stiles, B.G. and Choumet, V. (1997) – Antibody studies with venom phospholipases in “Venom Phospholipase A<sub>2</sub> Enzymes: Structure, Function and Mechanism”. *Ed. R.M. Kini, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, England*, Chapter 9: 223-268.
- Stocker (1978) Defibrinogenation with thrombin-like snake venom enzymes. In: F. Markward. ed. "Fibrinolytics an Antifibrinolytics", p.451-484. Springer-Verlag Berlin. Citado por Stocker (1980).
- Stocker, K. (1980) Snake venom proteases: affecting blood coagulation and fibrinolysis. In: Eaker, D & Wadstroen, I, eds. *Natural Toxin*. p.111-123. Pergamon Press, Oxford.
- Stoker, K. & Barlow, G. H. (1975) The coagulant enzyme from *Bothrops atrox* venom (Batroxobin) In: Colowick, S. P.; Kaplan, N. O. eds “Methods in Enzymology”. Academic Press.
- Sullivam, J.B.; Russell, F.E. and Egem, N.B. (1984) – Protection against crotalus venom lethality by monovalent polyclonal F (ab) fragments – in search of a beltter snake antivenom. *Trap. Vet. Hum. Toxicol.* 26: 400.
- Sullivan, J.B. (1987) – Past, present and future immunotherapy of snake venom poisoning. *Ann. Emerg. Med.* 16: 938-944.
- Tager, A. (1972) – Physical chemistry of polymers. *Mir Publisher, Moscou*.
- Tanford, C. (1961) – Physical Chemistry of Macromolecules. *John Wiley & Sons, New York*.
- Theakston, R.D.G. and Reid, H.A. (1983) – Development of simple standart assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bulletin of the World Health Organization* 61(6): 949-956.
- Trevan, J.W. (1927) – The error of determination of toxicity. *Proc. Roy. Soc. B.* 101: 483-514.

- Tu, A.T. (1991) – Tissue damaging effects by snake venoms: hemorrhage and mionecrose. In: “Tu, A.T. ed. Handbook of Natural Toxins. Marcel Dekker, Inc. New York, Reptile Venoms and Toxins, vol. 5, chap 11, p. 297-347.
- Van Oss, J.C. (1992) – Antigen-Antibody Reactions In: “Structure and function of Antigens, vol. 1, chapter 6, M.H.V. Van Regenmortel ed., CRC Press Inc., Boca Raton, Flórida, U.S.A.
- Van Oss, J.C. and Walker, J. (1987) – Concentration dependence of the binding constant of antibodies. *Molecular Immunology* 24: 715-717.
- Vidigal-Silveira, A. M.; Magalhães, A.; Diniz, C. . and Brandt de Oliveira, E. (1989) Purification and properties of the thrombin-like enzyme from the venom of *Lachesis muta muta*. *Int J. Biochem.*, v.21, 863-871.
- Vital Brasil, O. (1966) – Pharmacology of crystalline crotoxin II. Neuromuscular blocking action. *Mem. Inst. Butantan.*; São Paulo, 33(3): 981-92.
- Vital Brasil, O. and Excell, B.J. (1971) – Action of crotoxin and crotactin from the venom of *Crotalus durissus terrificus* (South American Rattlesnake on frog neuromuscular junction). *J. Physiol.*; London, 212: 34-5P.
- Vollmert, B. (1973) – Polymer Chemistry. *Springer- Verlag*; Berlim.
- Voronov, E.; Apte, R.N. and Sofer, S. (1999) - The systemic inflammatory response syndrome related to the release of cytokines following severe envenomation. *J. Venom Anim. Toxins* 5: 5-33.
- Ware, A. G.; Guest, M. M. & Seegers, W. H. (1947) *Arch. Biochem.* 13:231 (Citado por Cannon, D. C.; Olitzky, I & Inkpen, J. A. (1974) In: Henry, J. R., Cannon, D. C. & Winkelman, J. W. eds. “Clinical Chemistry – Principles and Technics”p. 458. Harper & Row Pub. Md. U.S.A.
- Weintraub, B.D.; Rosen, S.W., Mc Cammon, J.A. and Perlman, R.L. (1973) – Apparent cooperativity in radioimmunoassay of human corionic gonadotrofin. *Endocrinology* 92: 1250-1255.
- WHO (1981) – Progress on the characterization of venoms and standardization of antivenoms. *WHO Offset Publication*, nº 58, Switzerland.

- Yamada, D.; Shin, Y. and Morita, T. (1999) – Nucleotide sequence of a cDNA encoding a common precursor of desintegrin Flavostatin and hemorrhagic factor HR2a from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*.
- Yamakawa, M.; Nozaki, M. and Hokama, Z. (1976) – Fractionation of sakishima-habu (*Trimeresurus elegans*) venom and lethal, hemorrhagic and edema-forming activities of the fractions. In: Ohsaka, A.; Hayashi, K.; Sawai, Y. eds. *Animal, Plant and Microbial Toxins*, vol. 1, pgs. 97-109, New York, Plenum.
- Yonaha, K.; Iha, M.; Tomihara, Y.; Nozaki, M. and Yamakawa, M. (1991) – Characterization of three hemorrhagic factor from the venom of Okinawa Habu (*Trimeresurus flavoviridis*). *Toxicon*, 29: 703-711.
- Zbinden, G. (1973) – Progress in Toxicology. *Special Topic*, vol. 1, Springer-Verlag- New York.