

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Letícia Lopes de Souza**

---

**DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DE UM ENSAIO *IN VITRO* PARA  
DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA NEUTRALIZANTE DE ANTIVENENOS  
ANTIBOTRÓPICOS**

---

Belo Horizonte

2019

LETÍCIA LOPES DE SOUZA

**DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DE UM ENSAIO *IN VITRO* PARA  
DETERMINAÇÃO DA POTÊNCIA NEUTRALIZANTE DE ANTIVENENOS  
ANTIBOTRÓPICOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

**ORIENTADOR:** PROF. DR. CARLOS CHÁVEZ OLÓRTEGUI

**COORIENTADORA:** DRA. FERNANDA COSTAL OLIVEIRA

BELO HORIZONTE

2019

043

Souza, Letícia Lopes de.

Desenvolvimento e padronização de um ensaio in vitro para determinação da potência neutralizante de antivenenos antibotrópicos [manuscrito] / Letícia Lopes de Souza. – 2019.

90 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Chávez Olórtegui. Coorientadora: Dra. Fernanda Costal Oliveira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Bothrops. 3. Antivenenos. 4. Sobrevivência Celular. I. Olórtegui, Carlos Defín Chávez. II. Oliveira, Fernanda Costal. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais  
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG  
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha  
 31270-901 – Belo Horizonte – MG  
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615




**ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE LETÍCIA LOPES DE SOUZA.** Aos dezenove dias do mês de junho de 2019 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "" Desenvolvimento e padronização de um ensaio in vitro para determinação da potência neutralizante de antivenenos antibotrópicos"", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Bioquímica. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Carlos Delfin Chavez Olortegui, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Liza Figueiredo Felicori Vilela (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Carlos Alberto Tagliati (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Fernanda Costal Oliveira - Coorientadora (Universidade Estácio de Sá- Volta Redonda-RJ), aprovada; Dr. Carlos Delfin Chavez Olortegui - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

- APROVADA  
 REPROVADA

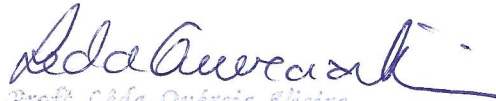
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 19 de junho de 2019.

  
 Dr. Liza Figueiredo Felicori Vilela (UFMG)

  
 Dr. Carlos Alberto Tagliati (UFMG)

  
 Dr. Fernanda Costal Oliveira - Coorientadora (Universidade Estácio de Sá- Volta Redonda-RJ)

  
 Dr. Carlos Delfin Chavez Olortegui - Orientador (UFMG)

  
 Prof. Leda Quirina Vieira  
 Coordenadora do Curso de Pós Graduação  
 em Bioquímica e Imunologia  
 ICB - UFMG

**Este trabalho foi realizado:**

No Laboratório de Imunoquímica de Proteínas, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG.

**E contou com o apoio financeiro do:**

Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas,  
UFMG;

CAPES;

CNPq;

FAPEMIG.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Dr. Carlos Chávez, pela oportunidade, incentivo, orientação e confiança construída ao longo desses anos.

À Dra. Fernanda Costal Oliveira, minha mãe científica, pela co-orientação, amizade, paciência, correções meticolosas e empenho em me ajudar sempre.

À Fundação Ezequiel Dias (FUNED), por fornecer as amostras de veneno e antiveneno utilizadas neste trabalho.

Às agências financiadoras, que possibilitaram a realização deste trabalho.

À Dra. Stephanie Stransky, pela ajuda diária, conselhos e por ser tão solícita em me ajudar;

À Dra. Clara Guerra, por ser sempre tão disposta a resolver minhas constantes dúvidas e se fazer presente em nossas questões científicas;

Aos amigos do Labimq, pelo convívio tão divertido, companheirismo, amizade, e pela ajuda com os experimentos;

Ao Jamil, pela ajuda e empréstimo de reagentes e equipamentos, sempre solícito e de bom humor.

Aos técnicos e servidores da UFMG, que tornam o andamento da universidade e do ICB possível.

À minha mãe, meu porto seguro, por estar sempre ao meu lado fazendo o impossível para me ajudar, pelo amor incondicional e por ser sempre tão positiva e atenciosa em todos os momentos.

À família Souza, pelo carinho, por acreditarem em mim e por sempre me incentivarem a ir adiante. Em especial ao meu pai e minha vó Judite, pelo laço de amor que fortalecemos nos últimos anos.

Aos meus irmãos, pelo amor e incentivo.

Ao Carlos, meu fofinho, por todos os momentos felizes que passamos juntos, por me apoiar em cada escolha e por estar sempre ao meu lado independente das dificuldades.

À família Viana e agregados, pelo acolhimento, companheirismo, amizade e por me darem uma segunda família tão especial.

À Ana Flávia pelas aulas de inglês, incentivo e por torcer pelas minhas realizações.

Ao Fernando, pela disponibilidade em ajudar e interesse em sempre se fazer presente.

Às pentamigas, amigas especiais que o laboratório me deu, donas dos melhores bordões e que tive o prazer de compartilhar momentos inesquecíveis.

Às minhas amigas Paloma e Julianna, que estão sempre presentes em minha vida, por todos os anos que crescemos juntas e por serem irmãs que a vida me deu.

A todos meus amigos pelo apoio, conversas, risadas e comemorações. Vocês sempre estarão no meu coração.

Aos membros da banca, por aceitarem o convite e pela correção desta dissertação.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho e para meu crescimento pessoal e/ou profissional durante esse percurso.

*“Foi o tempo que dedicastes à tua rosa que a fez tão importante.”  
(Antoine de Saint-Exupéry)*



## RESUMO

Acidentes com animais peçonhentos representam um importante problema de saúde pública em países tropicais. No Brasil, o gênero *Bothrops* causa mais de 70 % dos acidentes ofídicos. A imunoterapia é o único tratamento específico e recomendado pela Organização Mundial de Saúde e a produção dos antivenenos requer testes de controle de qualidade para determinação da potência neutralizante. O método convencional para essa análise é o ensaio de neutralização da letalidade, realizado em animais. Tendo isso em vista, o objetivo do trabalho foi desenvolver um método alternativo *in vitro* para avaliação da eficácia pré-clínica de antivenenos. O ensaio de viabilidade celular foi padronizado utilizando diferentes quantidades de soros antibotrópicos, os quais tiveram a potência estabelecida previamente *in vivo*. Os soros foram pré-incubados com o veneno de *B. jararaca* para avaliação de sua eficácia em proteger as células dos efeitos do veneno. Corroborando os resultados *in vivo*, os soros de alta potência foram mais eficazes em neutralizar a citotoxicidade do que os soros de baixa potência. Considerando a concentração inibitória dos soros que neutraliza 50 % da citotoxicidade (IC<sub>50</sub>), um ponto de corte foi estabelecido, a fim de diferenciar os antivenenos de acordo com suas potências. O ensaio de viabilidade celular foi adequado para análise da eficácia dos soros, o que demonstra que o método *in vitro* é apropriado para a determinação da potência neutralizante de antivenenos durante sua produção. Essa metodologia também foi utilizada para avaliar a eficácia do soro em neutralizar os efeitos locais do envenenamento, simulando as reais condições do tratamento. Venenos de serpentes do gênero *Bothrops* foram adicionados às células e após diferentes tempos o antiveneno foi administrado. A eficácia neutralizante do soro apresenta variações interespecíficas e é tempo-dependente. Em suma, o trabalho fornece dados que reforçam a possibilidade de reduzir o número de animais utilizados no estudo da eficácia dos antivenenos, seguindo a tendência mundial de substituição da experimentação animal.

**Palavras-chave:** *Bothrops*; ensaios *in vitro*; viabilidade celular; antivenenos antibotrópicos; potência neutralizante;

## ABSTRACT

Accidents with poisonous snakes are a major health hazard in tropical countries. *Bothrops* genus is responsible for more than 70 % of snakebites in Brazil. Immunotherapy is the only recommended specific treatment against snake toxins approved by World Health Organization and the production of therapeutic antivenoms require quality control tests to determine their neutralizing potency. Currently, these controls are performed by lethality neutralization assay using experimental animals. The aim of this work was to develop an *in vitro* alternative test for antivenom pre-clinical evaluation. In this sense, we designed a cell viability assay using different amounts of low and high potency anti-bothropic sera, preincubated with *B. jararaca* venom, for assessing the antivenom capacity to protect the cells against venom toxic effects. We found that high potency sera are more effective in neutralizing the cytotoxicity when compared to low potency sera, which is in accordance to their pre-determined *in vivo* potency. Considering sera *in vitro* inhibitory concentration able to prevent 50% cell death (IC<sub>50</sub>), a cut-off point was determined to discriminate low and high potency sera. Cell viability assay was suitable for sera potency discrimination, pointing out the potential of the *in vitro* method to determine neutralizing antivenom antiothropic potency during the production process. This assay was also used to evaluate the sera efficacy to neutralize envenomation local effects, simulating the real conditions of treatment. *Bothrops* snake venoms were incubated to cells and after different time points, the antivenom was added. Serum neutralizing efficacy shows interspecific variations and it is time-dependent. Our data provide insights for the development of an *in vitro* method which can reduce the number of animals used in the antivenoms evaluation, following the world trend of replacing animal experimentation.

**Keywords:** *Bothrops*; *in vitro* assays; cell viability; anti-bothropic antivenom; neutralizing potency.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Representantes dos 6 principais grupos de animais peçonhentos.....	<b>19</b>
<b>Figura 2:</b> Distribuição geográfica do número estimado de acidentes ofídicos e óbitos decorrentes do envenenamento .....	<b>21</b>
<b>Figura 3:</b> Principais gêneros de serpentes de importância médica no Brasil .....	<b>22</b>
<b>Figura 4:</b> Distribuição dos acidentes ofídicos no Brasil de acordo com o gênero de serpente .....	<b>23</b>
<b>Figura 5:</b> Serpente <i>B. jararaca</i> e sua distribuição pelo território brasileiro.....	<b>25</b>
<b>Figura 6:</b> Agrupamento de diferentes proteínas do veneno de <i>B. jararaca</i> .....	<b>26</b>
<b>Figura 7:</b> Envenenamento botrópico.....	<b>29</b>
<b>Figura 8:</b> Representação esquemática da produção de antivenenos .....	<b>30</b>
<b>Figura 9:</b> ELISA dos soros de diferentes potências frente ao veneno de <i>B. jararaca</i> .....	<b>45</b>
<b>Figura 10:</b> ELISA dos soros de baixa (A) e alta (B) potência frente ao veneno de <i>B. jararaca</i> .....	<b>46</b>
<b>Figura 11:</b> Viabilidade de células Vero após tratamento com veneno de <i>B. jararaca</i> .....	<b>47</b>
<b>Figura 12:</b> Ensaio de neutralização da citotoxicidade em células Vero tratadas com veneno de <i>B. jararaca</i> e soros de diferentes potências.....	<b>49</b>
<b>Figura 13:</b> Ensaio de neutralização da citotoxicidade em células Vero tratadas com o veneno de <i>B. jararaca</i> incubado com soros de baixa e alta potência .....	<b>50</b>
<b>Figura 14:</b> Ensaio de neutralização da citotoxicidade em células Vero tratadas com veneno de <i>B. jararaca</i> e soros de baixa e alta potência .....	<b>51</b>
<b>Figura 15:</b> Ensaio de neutralização da citotoxicidade em células Vero tratadas com veneno de <i>B. jararaca</i> e soros de baixa e alta potência .....	<b>52</b>
<b>Figura 16:</b> IC <sub>50</sub> dos soros de baixa e alta potência.....	<b>56</b>

<b>Figura 17:</b> Alterações morfológicas em células Vero após diferentes tratamentos.....	<b>57</b>
<b>Figura 18:</b> Viabilidade de células HaCat após tratamento com veneno de <i>B. jararaca</i> .....	<b>59</b>
<b>Figura 19:</b> Viabilidade de células HaCat após tratamento com veneno de serpentes do gênero <i>Bothrops</i> .....	<b>60</b>
<b>Figura 20:</b> Ensaio de neutralização da citotoxicidade em células HaCat tratadas com veneno de <i>B. jararaca</i> e soros comerciais produzidos pela FUNED.....	<b>62</b>
<b>Figura 21:</b> Ensaio de neutralização da citotoxicidade em células HaCat tratadas com venenos do gênero <i>Bothrops</i> e soros comerciais produzidos pela FUNED ..	<b>63</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> IC <sub>50</sub> dos soros de baixa e alta potência .....	<b>55</b>
--	-----------

## LISTA DE ABREVIATURAS

3 R's	<i>Reduce, Refine, Replace</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
cPLA <sub>2</sub>	Fosfolipase A <sub>2</sub> citosólica
CPPI	Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos
DE <sub>50</sub>	Dose média Efetiva
DL <sub>50</sub>	Dose média Letal
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's</i>
DP	Desvio Padrão
EC <sub>50</sub>	Concentração média Efetiva
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
Fab	Fragmento de união ao antígeno
FAD	Flavina Adenina Dinucleotídeo
IC <sub>50</sub>	Concentração média Inibitória
IgG	Imunoglobulina G
iPLA <sub>2</sub>	Fosfolipase A <sub>2</sub> independente de Ca <sup>2+</sup>
LAAO	L-Aminoácido Oxidase

LpPLA <sub>2</sub>	Fosfolipase A <sub>2</sub> associada a lipoproteína
LTC	Lectina do Tipo C
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPD	<i>O-phenylenediamine</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
SFB	Soro Fetal Bovino
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
sPLA <sub>2</sub>	Fosfolipase A <sub>2</sub> secretada
SVMPs	<i>Snake Venom Metaloproteinases</i>
SVSPs	<i>Snake Venom Serine Proteinases</i>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
1.1 Animais peçonhentos.....	19
1.2 Acidentes ofídicos.....	20
1.3 Serpentes do gênero <i>Bothrops</i> .....	24
1.3.1 Composição do veneno botrópico.....	25
1.4 Antivenenos.....	29
1.5 Avaliação pré-clínica dos antivenenos.....	31
1.6 Abordagem <i>animal-free</i> .....	32
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>36</b>
2.1 Objetivo Geral.....	36
2.2 Objetivos específicos.....	36
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>38</b>
3.1 Venenos e Antivenenos.....	38
3.2 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA).....	39
3.3 Cultura Celular.....	39
3.4 Ensaio de Viabilidade Celular.....	40
3.5 Avaliação da eficácia neutralizante de soros anti-botrópicos pré-incubados com veneno de <i>B. jararaca</i> .....	41
3.6 Avaliação da eficácia neutralizante de soros anti-botrópicos em células previamente tratadas com venenos botrópicos.....	42
3.7 Microscopia.....	42
3.8 Análises Estatísticas.....	42
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>45</b>
4.1 Avaliação pré-clínica da potência neutralizante de antivenenos anti-botrópicos.....	45



4.1.1 Soros de diferentes potências reconhecem o veneno de <i>B. jararaca</i> por ELISA.....	45
4.1.2 O veneno de <i>B. jararaca</i> reduz a viabilidade de células Vero.....	47
4.1.3 Padronização do ensaio de neutralização .....	47
4.1.4 Soros de alta potência são mais efetivos em neutralizar a citotoxicidade do veneno de <i>B. jararaca</i> .....	51
4.1.5 O ensaio de viabilidade celular foi adequado para diferenciar soros antibotrópicos de acordo com sua potência .....	55
4.1.6 A morfologia das células varia de acordo com o tratamento utilizado.....	56
<b>4.2 Avaliação da eficácia neutralizante do antiveneno antibotrópico comercial</b>	<b>58</b>
4.2.1 Venenos do gênero <i>Bothrops</i> reduzem a viabilidade de queratinócitos .....	58
4.2.2 A eficácia neutralizante do antiveneno anti-botrópico é tempo-dependente.....	60
4.2.3 A eficácia neutralizante do antiveneno antibotrópico apresenta variações interespecíficas.....	62
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>65</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>75</b>
<b>7. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>77</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>79</b>
<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>91</b>

# **Introdução**

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 ANIMAIS PEÇONHENTOS

Animais peçonhentos representam um problema de saúde pública em várias regiões do mundo, afetando principalmente populações que vivem em áreas rurais (WARRELL, 2012). Um animal é classificado como peçonhento quando possui um aparato especial para inoculação de veneno como dentes, ferrões e espinhos (JUNGHANSS e BODIO, 2006). Aparentemente, a presença de veneno nos seres vivos está relacionada ao sucesso evolutivo e, notoriamente, possui duas funções bem definidas: a captura e processamento da presa e a defesa contra predadores (WHITE, 2010). Os animais peçonhentos de maior importância médica podem ser divididos em 6 grupos principais: cnidários, peixes, himenópteros, escorpiões, aranhas e serpentes, sendo este último o de maior relevância epidemiológica em escala global (JUNGHANSS e BODIO, 2006) (Figura 1).

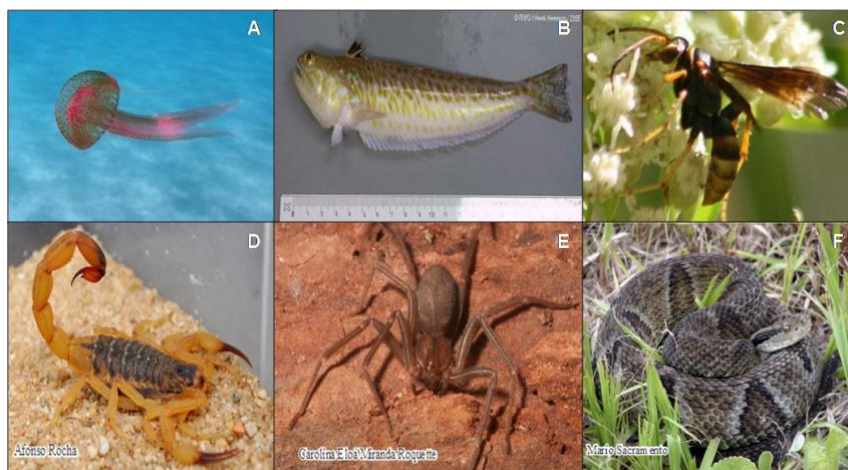


Figura 1: Representantes dos 6 principais grupos de animais peçonhentos.

**(A) Cnidário** – *Pelagia noctiluca*. Fonte: Foto de Pillon, Roberto. Disponível em: <http://www.marinespecies.org/photogallery.php?album=676&pic=48611>;

**(B) Peixe** – *Trachinus draco*. Fonte: Foto de Heessen, Henk. Disponível em: <http://www.marinespecies.org/photogallery.php?album=4487&pic=2627>;

**(C) Himenóptero** - *Poecilopompilus*. Fonte: Foto de Mark H Brown. Disponível em: <http://bugguide.net/node/view/730958>;

**(D) Escorpião** – *Tityus serrulatus*. Fonte: Foto de Afonso Rocha;

**(E) Aranha** – *Loxosceles* spp. Fonte: Foto de Carolina Eloá Miranda Roquette;

**(F) Serpente** - *Bothrops jararaca*. Fonte: Foto de Mario Sacramento. Disponível em: [http://www.funed.mg.gov.br/wpcontent/uploads/2011/07/Guia\\_bolso\\_Site1.pdf](http://www.funed.mg.gov.br/wpcontent/uploads/2011/07/Guia_bolso_Site1.pdf)

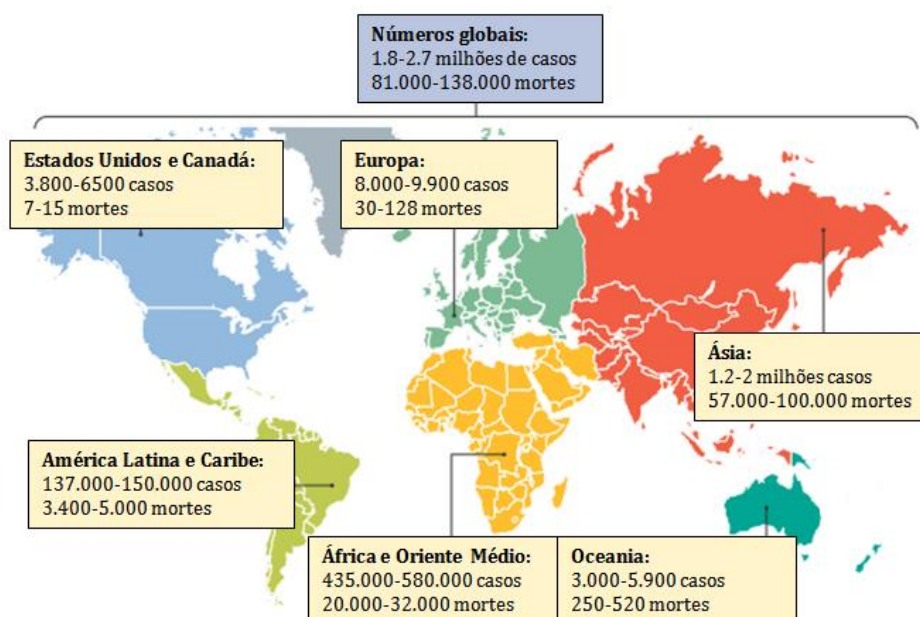
As serpentes são animais vertebrados, pertencentes à subordem Lepidossauria e ordem Squamata. No mundo são conhecidas cerca de 3.400 espécies, podendo ser peçonhentas ou não. Apresentam distribuição cosmopolita e hábitos fossoriais, arbóreos, terrestres ou aquáticos (HSIANG *et al.*, 2015). As serpentes viventes atualmente são caracterizadas por possuírem o corpo alongado e coberto por escamas e não possuírem membros locomotores. Além disso, esses animais têm língua bífida, o que é de grande importância para a quimiorrecepção e, conseqüentemente, para a detecção de presas (POUGH *et al.*, 2008).

Quanto ao modo de nutrição, as serpentes são carnívoras e se alimentam tanto de vertebrados quanto de invertebrados. A constrição ou o envenenamento são os dois principais modos pelos quais realizam a captura e contenção da presa (PINTO e LEMA, 2002). Sendo assim, a existência de presas inoculadoras no maxilar das serpentes é um tipo de especialização que as auxilia no processo de subjugação do alimento capturado (POUGH *et al.*, 2008). Os ofídios classificados como peçonhentos possuem glândulas secretoras de veneno localizadas de cada lado da cabeça, as quais são conectadas, através de ductos, às presas inoculadoras de veneno.

## **1.2 ACIDENTES OFÍDICOS**

O acidente ofídico decorrente da inoculação do veneno representa um sério problema de saúde pública. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que no mundo aproximadamente 5 milhões de pessoas são mordidas por serpentes anualmente, sendo que dessas, quase 3 milhões apresentam o quadro de envenenamento e até 138 mil vão a óbito (Figura 2) (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017). A população mais afetada encontra-se principalmente em ambientes rurais e de baixa renda, sendo os agricultores e crianças os mais acometidos (WHO, 2019). Por afetar trabalhadores rurais, os acidentes ofídicos são também considerados um risco ocupacional. Entretanto, apesar do número elevado de casos, os dados epidemiológicos ainda são subestimados, uma vez que as notificações não são compulsórias em vários países e os locais de ocorrência muitas vezes são de difícil acesso

(GUTIÉRREZ *et al.*, 2010). Além disso, é importante ressaltar que os casos de envenenamento ainda não são tratados como um problema crítico para o sistema de saúde. Estima-se que o número de óbitos causados por esses acidentes pode ser maior do que aqueles causados por todas as doenças tropicais consideradas negligenciadas (WARRELL, 2019). Dessa forma, em 2017 a OMS incluiu os acidentes ofídicos na lista de doenças tropicais negligenciadas (CHIPPAUX, 2017).



**Figura 2: Distribuição geográfica do número estimado de acidentes ofídicos e óbitos decorrentes do envenenamento.** (Traduzido de: GUTIÉRREZ *et al.*, 2017).

A ocorrência de acidentes ofídicos é mais significativa na Ásia, África e América Latina. No Brasil, segundo Chippaux (2015), mais de um quarto dos envenenamentos no país são atribuídos às serpentes, responsáveis por mais da metade dos óbitos decorrentes de acidentes por animais terrestres e venenosos. Mais de 25 mil casos de ofidismo ocorrem anualmente no território brasileiro e as serpentes de maior relevância médica pertencem a duas famílias principais: Elapidae e Viperidae (SINAN, 2016).

A família Elapidae compreende tanto espécies terrestres quanto marinhas, as quais estão distribuídas principalmente na faixa intercontinental

do planeta. Nas Américas ocorrem aproximadamente 90 espécies divididas em 3 gêneros principais: *Micrurus*, *Micruroides* e *Leptomicrurus* (POUGH *et al.*, 2008; LOMONTE *et al.*, 2016).

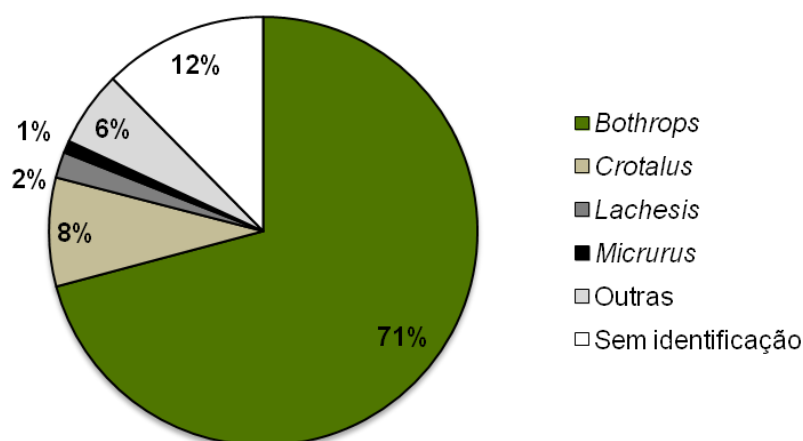
A família Viperidae também está distribuída na maior parte do globo, exceto em locais como Austrália, Nova Guiné e Antártida. É composta por aproximadamente 228 espécies de médio e grande porte, divididas em 2 grupos principais: a subfamília Viperinae, a qual contém as serpentes clássicas do “velho mundo” e a subfamília Crotalinae, caracterizada por apresentar um órgão termossensível entre o olho e a narina (WCH, 2018). Em geral, as serpentes dessa família possuem as presas retráteis, na porção frontal da boca, características da dentição do tipo solenóglifa (POUGH *et al.*, 2008).

No Brasil, quatro gêneros principais são responsáveis, majoritariamente, pelos acidentes ofídicos: *Micrurus* (pertencente à família Elapidae), *Lachesis*, *Crotalus* e *Bothrops* (pertencentes à família Viperidae) (Figura 3) (SINAN, 2016).



**Figura 3: Principais gêneros de serpentes de importância médica no Brasil. (A) *Micrurus* – Espécie: *M. corallinus*; (B) *Lachesis* – Espécie: *L. muta*; (C) *Crotalus* – Espécie: *C. durissus*; (D) *Bothrops* – Espécie: *B. alternatus*. Disponível em: <http://abracit.org.br/wp/principal/wp-content/uploads/2016/10/Guia-de-Bolso-Animais-Pe%C3%A7onhentos-Digital.pdf>.**

O gênero *Micrurus*, o qual contém as serpentes conhecidas como corais, embora não apresente um número de casos significativos, normalmente tem potencial para desencadear um quadro de envenenamento grave devido aos efeitos neurotóxicos e paralisia respiratória causados (BUCARETCHI *et al.*, 2016). Já as serpentes do gênero *Crotalus*, também conhecidas como cascavéis, representam cerca de 9% dos acidentes ofídicos registrados no Brasil e seu envenenamento é caracterizado por sinais e sintomas decorrentes de atividades neurotóxicas, miotóxicas e coagulantes do veneno. As serpentes do gênero *Lachesis*, as surucucus, também são de relevância médica, pois mesmo que a incidência de casos não seja elevada, os envenenamentos envolvendo-as normalmente são mais severos, devido a grande quantidade de veneno inoculado durante o acidente (STEPHANO *et al.*, 2005). O envenenamento envolvendo essa serpente pode levar ao desenvolvimento de efeitos fisiopatológicos e a ocorrência de atividades coagulantes, hemorrágicas, inflamatórias, miotóxicas e neurotóxicas (DE SOUZA *et al.*, 2007). Por último, o gênero *Bothrops*, representado pelas jararacas, é responsável pelo maior número de casos, representando mais de 70% dos acidentes ofídicos que ocorrem no país (FUNED, 2014; SINAN, 2016) (Figura 4).



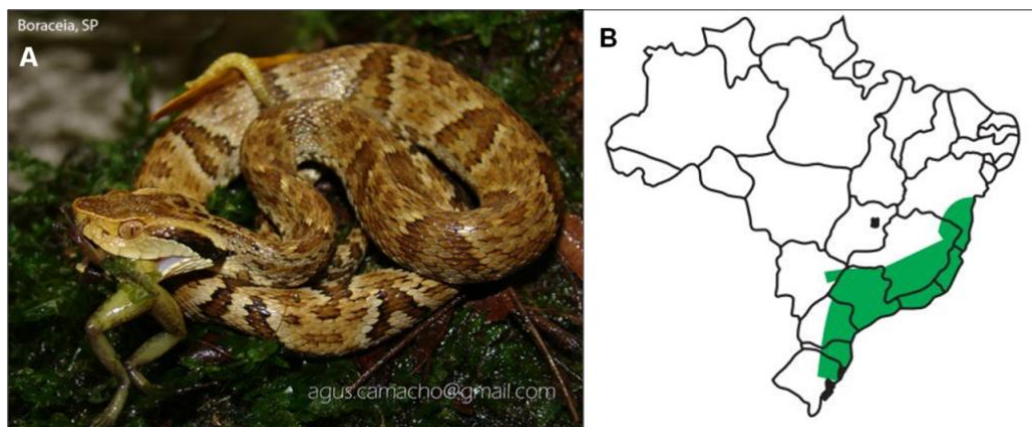
**Figura 4: Distribuição dos acidentes ofídicos no Brasil de acordo com o gênero de serpente.** Os dados são referentes às notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) no ano de 2016.

### 1.3 SERPENTES DO GÊNERO *BOTHROPS*

O gênero *Bothrops* é distribuído nas Américas, do México ao sudeste da Argentina, sendo o grupo de maior importância médica nesse território. Esse gênero é composto por aproximadamente 50 espécies presentes em diferentes ecorregiões do planeta, a maioria habitando florestas, podendo ser encontradas também em áreas abertas (CARRASCO *et al.*, 2016). Além disso, o grupo compreende exclusivamente espécies terrestres, contendo representantes arbóreos ou semi-arbóreos. Em relação à alimentação, a maioria das espécies é generalista, sendo que muitas delas demonstram mudanças ontogenéticas em sua dieta, alimentando-se de ectotérmicos enquanto juvenis e de mamíferos quando adultos. Outras já apresentam uma dieta mais especializada, alimentando-se de pássaros e roedores, por exemplo (MARTINS; MARQUES e SAZIMA, 2002).

No Brasil, a espécie *B. jararaca* (considerada veneno de referência nacional) é responsável pela maior parte dos acidentes que ocorrem nas regiões sul e sudeste, sendo essas as regiões mais populosas do país. Essa serpente é encontrada principalmente no sul da Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (ESTEVÃO-COSTA *et al.*, 2016). O animal apresenta manchas triangulares escuras ao longo do corpo e uma faixa preta após os olhos (Figura 5). São vivíparas e podem ser encontradas principalmente em matas e campos cultivados (DIAS, 2014).

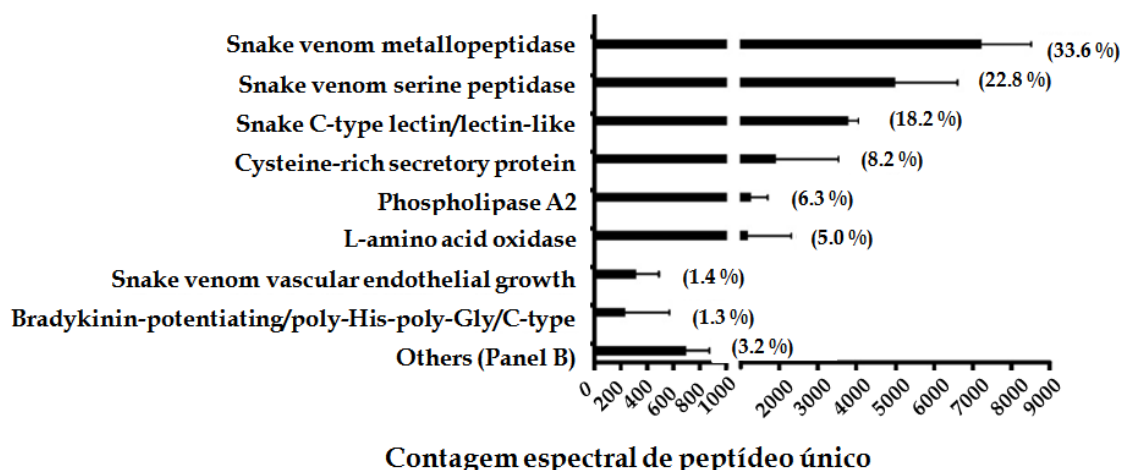




**Figura 5: Serpente *B. jararaca* e sua distribuição pelo território brasileiro. A)** A serpente apresenta manchas triangulares pelo corpo e uma faixa escura após os olhos. Disponível em: <http://reptile-database.reptarium.cz/species?genus=Bothrops&species=jararaca>. **B)** *B. jararaca* pode ser encontrada nas regiões sul e sudeste do país. Disponível em: <https://sites.google.com/site/unipampatoxicologia/animais-peconhentos/serpentes/jararaca-bothrops-jararaca>.

### 1.3.1 COMPOSIÇÃO DO VENENO BOTRÓPICO

A composição do veneno de diferentes espécies do gênero *Bothrops* vem sendo explorada por meio de estudos envolvendo proteômica, venômica e transcriptômica (NICOLAU *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*; AMORIM *et al.*, 2017). Apesar da variabilidade encontrada entre essas serpentes, os venenos são compostos por famílias de proteínas similares, sendo que as diferenças ocorrem principalmente no nível de expressão de cada grupo. As proteínas predominantes no veneno botrópico são as metaloproteases, serinoproteases, fosfolipases A<sub>2</sub>, L-aminoácido oxidases, lectinas do tipo C, entre outras proteínas e peptídeos (GONÇALVES-MACHADO *et al.*, 2016) (Figura 6).



**Figura 6: Agrupamento de diferentes proteínas do veneno de *B. jararaca*.** As proteínas foram identificadas por proteômica e agrupadas por classe. A contribuição média percentual das 8 classes de proteínas mais abundantes no veneno está indicada entre parêntesis (NICOLAU *et al.*, 2016).

As metaloproteases de venenos de serpentes (*Snake Venom Metalloproteinases* - SVMPs) são endopeptidases dependentes de zinco, as quais são abundantes em venenos ofídicos, podendo representar até 65% do conteúdo proteico total do veneno de serpentes da família Viperidae (CALVETE; JUÁREZ e SANZ, 2007). As SVMPs são divididas em 3 classes, PI, PII e PIII, de acordo com suas características estruturais. As metaloproteases do tipo I apresentam apenas o domínio proteolítico, enquanto as do tipo II possuem o domínio proteolítico, além de um domínio do tipo desintegrina. Já as do tipo III possuem esses dois domínios e também um domínio rico em cisteína (FOX e SERRANO, 2008). Essas enzimas são responsáveis por desencadear diversas atividades tóxicas na vítima, tais como hemorragia, atividades pró e anti-coagulante e fibrinólise (SANCHEZ *et al.*, 2017). Dessa forma, as SVMPs estão diretamente envolvidas com os sintomas de hemorragia local e sistêmica que ocorrem durante o quadro de envenenamento (GUTIÉRREZ *et al.*, 2016).

As serinoproteases de venenos de serpentes (*Snake Venom Serine Proteases* - SVSPs) são enzimas que agem no sistema fibrinogenolítico, além de interferir em vários pontos da cascata de coagulação. Essa ação ocorre por degradação proteolítica ou por ativação e inibição de fatores envolvidos na agregação plaquetária, coagulação e fibrinólise, o que pode causar um

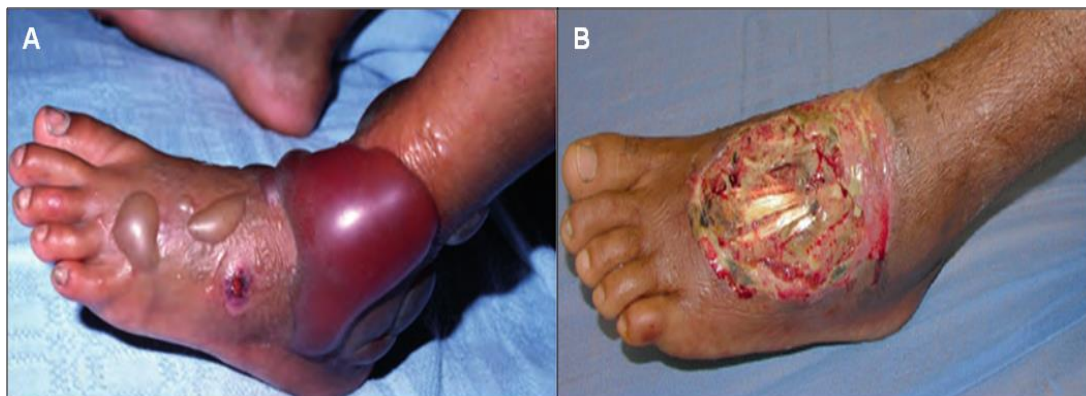
desequilíbrio no sistema hemostático e coagulopatia (SERRANO, 2013). A estrutura das SVSPs se assemelha àquelas das enzimas tipo quimiotripsinas e, em muitos aspectos, são funcionalmente similares às enzimas endógenas do sistema hemostático (ZELANIS *et al.*, 2015).

As fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) representam uma família de enzimas lipolíticas que catalisam a hidrólise de glicerofosfolipídios, resultando na produção de lisofosfolipídios e ácidos graxos. A superfamília de PLA<sub>2</sub>s contém aproximadamente 15 grupos que são divididos em outros subgrupos, entre os quais se destacam 4 tipos principais: PLA<sub>2</sub> secretadas (sPLA<sub>2</sub>) (encontradas nos venenos), PLA<sub>2</sub> citosólicas (cPLA<sub>2</sub>), PLA<sub>2</sub> independente de Ca<sup>2+</sup> (iPLAs) e PLA<sub>2</sub> associadas a lipoproteínas (LpPLA<sub>2</sub>) (KANG *et al.*, 2011). Os produtos provenientes da hidrólise podem desencadear alterações propagadas nas membranas celulares e ativar vias de sinalização que geram efeitos patológicos. Sendo assim, essas enzimas apresentam uma gama de atividades farmacológicas e toxicológicas, podendo estar envolvidas no dano muscular agudo, hemólise, cardiotoxicidade e distúrbios na coagulação (XIAO *et al.*, 2017). Clinicamente, as PLA<sub>2</sub>s contribuem pela maior parte dos óbitos ocasionados pela ação neurotóxica dos venenos ofídicos (GASANOV; DAGDA e RAEL, 2014).

As L-Aminoácido Oxidases (LAAOs), por sua vez, são flavoenzimas capazes de catalisar a desaminação oxidativa de L-aminoácidos em  $\alpha$ -cetoácidos, com consequente liberação de peróxido de hidrogênio e amônia (MOUSTAFA *et al.*, 2006). A enzima é um homodímero composto de três domínios: um domínio de ligação ao FAD, um domínio de ligação ao substrato e um domínio helicoidal, importante na especificidade da LAAO aos L-aminoácidos (KANG *et al.*, 2011). Quanto aos seus efeitos, alguns estudos tem demonstrado que essa enzima está envolvida na toxicidade do veneno, principalmente através da liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, uma espécie reativa de oxigênio que pode contribuir para a citotoxicidade, desencadeando diferentes vias de morte celular (CARONE *et al.*, 2017; COSTAL-OLIVEIRA *et al.*, 2019). Além disso, podem apresentar outras ações biológicas, tais como agregação plaquetária, formação de edema e atividades anti-parasitárias e anti-bactericidas (IZIDORO *et al.*, 2014).

Lectinas do tipo C (LTCs) são proteínas dependentes do íon  $\text{Ca}^{2+}$  que são capazes de reconhecer e se ligar a carboidratos. Essas proteínas possuem um domínio bem conservado e com um enovelamento característico, o qual é conhecido como domínio de reconhecimento de carboidrato (EBLE, 2019). Embora as LTCs sejam conservadas, apresentam uma enorme diversidade funcional, uma vez que os carboidratos participam de muitos processos moleculares. Entre as diversas ações biológicas que essas lectinas estão envolvidas, pode-se destacar inibição da agregação plaquetária e alterações na coagulação, indução de respostas pró-inflamatórias e angiogênica, além de atividades bactericida e citotóxica (SAMAH *et al.*; CASTANHEIRA *et al.*; SARTIM *et al.*, 2017).

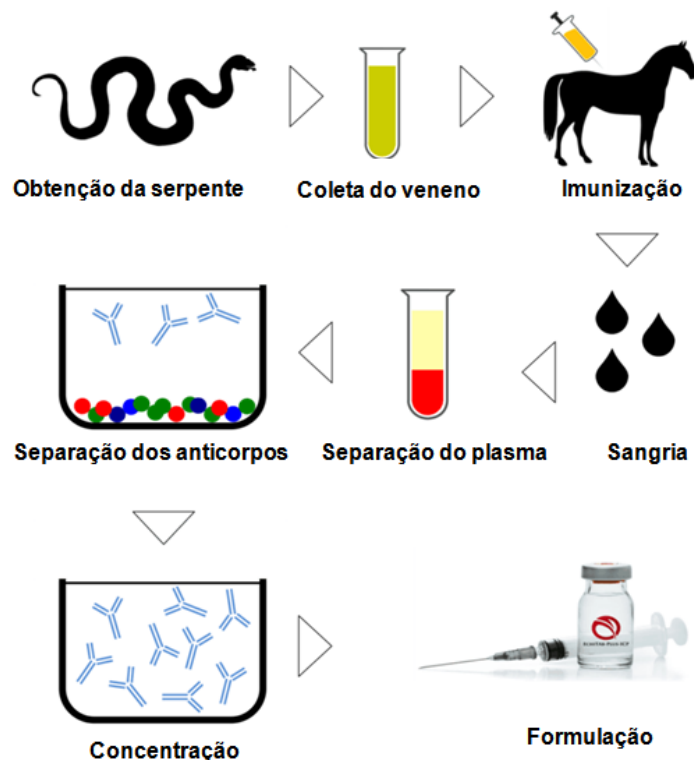
A ação sinérgica dos componentes do veneno desencadeia as manifestações clínicas do acidente botrópico, que envolvem principalmente distúrbios hematológicos, podendo causar efeitos locais e sistêmicos (SANTORO *et al.*, 2008). Os sintomas locais mais evidentes ocorrem na região onde ocorreu a mordida, resultando em danos aos tecidos conjuntivo e muscular, induzindo a liberação de vários mediadores inflamatórios e podendo acarretar edema, necrose e hemorragia. O agravamento desses efeitos pode levar à perda de função do membro afetado, o que justifica a elevada morbidade gerada pelos acidentes ofídicos (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017; (HARRISON *et al.*, 2009). Já as complicações sistêmicas incluem intensa hemorragia, coagulação intravascular disseminada, choque cardiovascular e falência renal aguda, podendo levar o paciente a óbito (SENISE, YAMASHITA e SANTORO, 2015; GOIS *et al.*, 2017; CRUZ, VARGAS e LOPES, 2009) (Figura 7).



**Figura 7: Envenenamento botrópico. A)** Inchaço e bolhas no dorso do pé após mordida da serpente *B. jararaca*. **B)** Necrose no pé esquerdo 15 dias após a ocorrência do acidente (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017; MALAQUE e GUTIÉRREZ, 2016).

#### 1.4 ANTIVENENOS

A única abordagem terapêutica específica e recomendada pela OMS para o tratamento do acidente ofídico é o uso de antivenenos, que são produzidos por meio da hiper-imunização de animais de grande porte, normalmente cavalos, utilizando a peçonha das serpentes de interesse. Após os animais imunizados terem desenvolvido uma resposta de anticorpos satisfatória, o sangue dos mesmos é coletado e o plasma ou soro é fracionado para obtenção das moléculas de IgG ou dos fragmentos  $F(ab')_2$  e Fab (Figura 8). Quando administrados no paciente, espera-se que os anticorpos neutralizem as toxinas dos venenos relacionados, assim como os sintomas decorrentes do envenenamento (WHO, 2016).



**Figura 8: Representação esquemática da produção de antivenenos.** O processo inicia-se com a obtenção da serpente e extração do veneno, seguida de imunização e sangria de animais de grande porte. Posteriormente são realizados métodos de separação e concentração, para obtenção das moléculas de IgG ou fragmentos de interesse. Ao final do procedimento ocorre a formulação do produto para que possa ser empregado em uso clínico. Imagem adaptada de: Andreas Hougaard Laustsen. Disponível em: <http://theconversation.com/how-biotechnology-could-offer-hope-for-snakebite-victims-68244>.

Para a produção de soros antiofídicos existem duas estratégias principais de imunização: uma para produção de antivenenos monoespecíficos e outra para poliespecíficos. A primeira abordagem utiliza veneno de apenas uma espécie para a imunização dos animais, o que limita o uso do soro produzido, pois embora este apresente considerável capacidade neutralizante, o mesmo é restrito a apenas uma espécie ou poucas relacionadas. Portanto, a identificação da serpente que ocasionou o acidente é muito relevante. Já os antivenenos poliespecíficos, como é o caso dos soros anti-botrópicos, são produzidos através da utilização de venenos de duas ou mais espécies para a imunização. Dessa forma, o mesmo soro pode ser utilizado contra diferentes

espécies e a identificação da serpente muitas vezes se torna dispensável (THEAKSTON; WARRELL e GRIFFITHS, 2003).

Segundo a Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (1996), para a produção de soros anti-botrópicos no Brasil deve-se utilizar uma mistura antigênica contendo 50% do veneno de *B. jararaca*, e 12,5% de cada um dos venenos de *B. alternatus*, *B. jararacussu*, *B. neuwiedi* e *B. moojeni* (ANVISA, 1996). No Brasil, a produção desses antivenenos é realizada pelo Instituto Butantan (São Paulo), Instituto Vital Brazil (Rio de Janeiro), Fundação Ezequiel Dias (FUNED) (Belo Horizonte) e pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI) (Paraná) (GUTIÉRREZ, 2018).

Apesar da terapia com antivenenos ser padrão ouro no tratamento dos acidentes ofídicos, efeitos indesejados podem ser observados. Alguns pacientes desenvolvem reações alérgicas após a administração do soro, as quais podem ser rápidas ou tardias. Além disso, a vítima pode desenvolver uma resposta anafilática que pode evoluir para choque e, conseqüentemente, morte do paciente (LEÓN *et al.*, 2013). Outro ponto negativo está relacionado à eficácia do antiveneno em neutralizar os efeitos tóxicos induzidos pelo envenenamento. Embora esses soros sejam eficientes em prevenir os distúrbios sistêmicos, eles não são tão eficazes no controle do dano local, o que pode levar a graves prejuízos no membro onde a mordida ocorreu (GUTIÉRREZ, LEÓN e BURNOUF, 2011).

### **1.5 AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DOS ANTIVENENOS**

Durante o processo de produção, um controle pré-clínico dos soros deve ser realizado. A análise da efetividade dos antivenenos é necessária a fim de avaliar se os mesmos são adequados para uso clínico e também auxiliar na escolha das misturas de veneno para imunização, com o objetivo de aumentar o efeito neutralizante dos antivenenos (GUTIÉRREZ *et al.*, 2013). O teste considerado padrão ouro para avaliar a eficácia é o teste de neutralização da letalidade, realizado em animais experimentais (GUTIÉRREZ, 2018).

Primeiramente é necessário determinar a potência letal do veneno através do ensaio de dose média letal (DL<sub>50</sub>). Para essa metodologia,

diferentes doses são injetadas por via intravenosa ou intraperitoneal em camundongos. As mortes são registradas em até 48 horas e a dose de veneno que causa a morte de 50 % dos animais ( $DL_{50}$ ) é estimada. Já o protocolo padrão para o ensaio de neutralização da letalidade é baseado na incubação de uma quantidade fixa de veneno, de 3 a 5 x  $DL_{50}$ , com diferentes volumes de antiveneno. As misturas são incubadas por 30 minutos a 37 °C e em seguida são injetadas nos animais. As mortes são registradas e é calculado o volume de antiveneno em que 50 % dos animais sobrevivem, ou seja, a dose média efetiva ( $DE_{50}$ ) (WHO, 2016).

Na maior parte das vezes a  $DE_{50}$  é definida como a quantidade de veneno (mg) que é neutralizada por 1 mL de antiveneno. Porém também pode ser expressa como volume de antiveneno ou como a relação antiveneno:veneno (GUTIÉRREZ, 2018). Esse valor é um parâmetro importante para determinar a potência do soro e, conseqüentemente, seu potencial na terapêutica. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recomenda que a potência neutralizante dos antivenenos antibotrópicos seja de pelo menos 5 mg/mL (ANVISA, 1996). Ou seja, 1 mL de antiveneno inibe os efeitos letais de 5 mg de veneno. Os soros que atendem a este requisito são considerados de alta potência e podem então ser processados até o produto final e prosseguir para uso clínico. Os animais produtores de soros que não atendem a esse requisito (baixa potência) retornam para a realização de ciclos de imunização adicionais.

### **1.6 ABORDAGEM ANIMAL-FREE**

Para os venenos de viperídeos, não somente os ensaios de letalidade são realizados para avaliar a eficácia dos soros. Metodologias complementares, tais como neutralização das atividades hemorrágica, miotóxica, edematogênica, dermonecrótica e de coagulação, por exemplo, também são utilizadas (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017). A maioria desses testes é feito em animais, o que causa sofrimento e morte dos mesmos, além de gerarem altos custos, devido à sua manutenção para imunização e realização dos ensaios pré-clínicos. Dessa forma, métodos alternativos *in vitro* que



buscam a substituição do uso de animais experimentais têm sido desenvolvidos, muitos deles com sucesso, seguindo o princípio dos 3R's (SELLS, 2003; MADUWAGE *et al.*, 2016; RUSSELL e BURCH, 1959).

O princípio dos 3R's preconiza reduzir (*Reduce*) o número de animais utilizados em testes pré-clínicos, através da aplicação de ensaios preliminares, revisando e avaliando os parâmetros experimentais para assegurar que o número de animais utilizados é o menor possível. Esse conceito também destaca a importância de refinar (*Refine*) a estratégia experimental, através da utilização de estratégias de analgesia, condições adequadas que diminuam o estresse dos animais e, quando possível, redução da duração dos ensaios. Por último, sugere substituir (*Replace*) as atividades *in vivo* por métodos *in vitro*, que apresentem alguma correlação com os testes convencionais (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017).

Por outro lado, alguns toxicologistas defendem que a substituição de ensaios *in vivo* por métodos *in vitro* seja limitada para avaliar a eficácia pré-clínica dos antivenenos (GUTIÉRREZ *et al.*, 2013). Isso pode ser atribuído à elevada complexidade na composição dos venenos e à ação sinérgica de diferentes toxinas (XIONG *et al.*, 2018). Contudo, nosso grupo demonstrou que ensaios *in vitro* apresentam significativa correlação com testes *in vivo*, sugerindo que cultura celular e ensaios enzimáticos, como atividades hialuronidásica, fosfolipásica e de L-aminoácido oxidase, podem ser adequados para avaliar a toxicidade dos venenos.

A atividade letal do veneno, por exemplo, correlacionou-se com a atividade hialuronidásica realizada *in vitro*. De forma similar, a atividade edematogênica dos venenos botrópicos apresentou elevado coeficiente de correlação com a atividade fosfolipásica, enquanto que a atividade necrótica demonstrou correlação significativa com a atividade de LAAO. Além disso, esses resultados corroboram dados existentes na literatura que podem explicar as relações entre as enzimas avaliadas e os efeitos tóxicos observados após o envenenamento. Dessa forma, os dados sugerem que ensaios *in vitro* podem ser adequados como alternativas para a redução ou até mesmo a substituição da experimentação animal no estudo dos venenos botrópicos (DE SOUZA *et al.*, 2015). Testes que utilizam animais também têm apresentado pouca

aceitabilidade, tanto para a sociedade em geral, uma vez que esse tema é alvo de constantes debates que envolvem questões éticas, como na pesquisa, pois se têm estimulado cada vez mais trabalhos que abordem estratégias *in vitro* (BATALHA, 2017; DOKE e DHAWALE, 2015). Além disso, efeitos observados em modelos animais nem sempre se relacionam com o que ocorre em seres humanos e, vale ressaltar que alguns eventos já reportados em humanos nunca foram observados em animais experimentais (CLARK e STEGER-HARTMANN, 2018).

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um ensaio *in vitro* para a avaliação pré-clínica de antivenenos que se correlacione com o teste de neutralização da letalidade realizado *in vivo*. Foi avaliada a capacidade de soros de diferentes potências em neutralizar os efeitos citotóxicos desencadeados pelo veneno da serpente *B. jararaca* e os mesmos foram discriminados de acordo com sua capacidade neutralizante. Além disso, a eficácia do soro comercial utilizado para tratamento dos pacientes também foi avaliada utilizando o mesmo método. Essa estratégia pode auxiliar a fundamentar alternativas para a redução da experimentação animal, o que segue a tendência mundial de abordagens *animal-free*.

# Objetivos

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e padronizar um ensaio *in vitro* alternativo para avaliação da potência neutralizante de antivenenos botrópicos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar por ensaio imunoenzimático o reconhecimento de soros anti-botrópicos de diferentes potências frente ao veneno da serpente *B. jararaca*;
- Determinar a concentração de venenos botrópicos capaz de reduzir em 50 % (EC<sub>50</sub>) a viabilidade das células tratadas;
- Avaliar a capacidade de soros anti-botrópicos de diferentes potências em neutralizar os efeitos citotóxicos desencadeados pelo veneno da serpente *B. jararaca*;
- Determinar a concentração dos soros de baixa e alta potência capaz de neutralizar 50 % da citotoxicidade (IC<sub>50</sub>) desencadeada pelo veneno de *B. jararaca*;
- Analisar a morfologia das células após diferentes tratamentos com o veneno e na presença ou ausência de soros anti-botrópicos de baixa e alta potência;
- Padronizar uma metodologia *in vitro* baseada na determinação de um ponto de corte (*cut-off*), que diferencie os soros de alta potência dos soros de baixa potência;
- Avaliar a capacidade do soro antibotrópico comercial em neutralizar a citotoxicidade de venenos botrópicos, após diferentes períodos de incubação.

# **Material e métodos**

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 VENENOS E ANTIVENENOS

Venenos botrópicos correspondentes ao *pool* antigênico (venenos de *B. jararaca*, *B. alternatus*, *B. jararacussu*, *B. neuwiedi* e *B. moojeni*) utilizado para produção do antiveneno foram gentilmente cedidos pelo Serpentário da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), localizado em Belo Horizonte, Brasil. Os venenos são compostos por um *pool* de extrações, de diferentes indivíduos e foram obtidos por compressão manual das glândulas, seguida de centrifugação, liofilização e estocagem a -20 °C até o uso, de acordo com as recomendações da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2016). Quando necessário, os venenos foram diluídos em água ultrapura e o conteúdo proteico dos mesmos foi determinado através do método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951), utilizando albumina de soro bovino como padrão.

Soros de 3 cavalos diferentes foram previamente produzidos pelo nosso grupo por meio da imunização dos animais com o *pool* de venenos botrópicos contendo 50 % do veneno de *B. jararaca* e 12,5 % de cada um dos venenos de *B. alternatus*, *B. jararacussu*, *B. neuwiedi* e *B. moojeni*. A potência neutralizante desses antivenenos foi previamente determinada *in vivo*, por nosso grupo de pesquisa, utilizando camundongos através do ensaio de Dose Média Efetiva (DE<sub>50</sub>) e a potência dos mesmos foi de 1 mg/mL, 5 mg/mL e 9 mg/mL (MARIA *et al.*, 1998).

Soro comercial e soros ainda em fase de produção, provenientes de 10 cavalos distintos imunizados com o *pool* dos venenos citado anteriormente, foram também fornecidos pela FUNED. A potência neutralizante desses soros foi determinada pelo ensaio de DE<sub>50</sub> pelo mesmo instituto. Os soros numerados como 534, 570, 633, 635 e 637 correspondem a soros de baixa potência ( $\leq 5$  mg/mL), enquanto que os soros 448, 526, 535, 553 e 613 correspondem a soros de alta potência ( $\geq 5$  mg/mL).

Os ensaios para avaliação pré-clínica da potência dos antivenenos foram realizados primeiramente com os soros de potência 1 mg/mL, 5 mg/mL e 9 mg/mL, com o objetivo de padronizar e avaliar o potencial do método para

diferenciação dos soros. Uma vez que o mesmo se apresentou adequado, os ensaios utilizando os soros provenientes da FUNED foram realizados. Adicionalmente, o soro comercial foi utilizado para avaliação da potência neutralizante do produto final que é disponibilizado para uso terapêutico.

### **3.2 ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO ENZIMÁTICA (ELISA)**

Para avaliação da reatividade dos soros frente ao veneno de *B. jararaca*, microplacas de 96 poços foram sensibilizadas com 0,5 µg/poço de veneno em tampão carbonato (100 µL/poço) pH 9.8. As placas foram incubadas *overnight* a 4 °C e após esse período os poços foram lavados com tampão fosfato 50 mM (PBS) contendo 0,05 % de Tween. Posteriormente, os poços foram bloqueados com uma solução contendo 3 % de leite em pó em PBS 50 mM (100 µL) e incubados a 37 °C por uma hora. Em seguida, as placas foram lavadas e diferentes diluições de cada soro (1:10.000 a 1:128.000 em PBS 50 mM contendo 0,01% de leite em pó) foram incubadas por uma hora a 37 °C. Soro não-imune de cavalo foi utilizado como controle negativo. Após lavagem dos poços, conjugado anti-horse IgG peroxidase (1:6.000) foi adicionado em um volume final de 100 µL/poço e a placa foi novamente incubada por uma hora a 37 °C. Pastilhas de OPD (Sigma Fast) foram utilizadas para detectar o reconhecimento antigênico, de acordo com as instruções do fabricante. As placas foram protegidas da luz, incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente e as reações foram interrompidas utilizando 20 µL/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M. As absorbâncias foram medidas a 490 nm em leitor de microplaca iMark™ (Biorad). Os valores representam as médias de duas replicatas independentes.

### **3.3 CULTURA CELULAR**

As linhagens celulares Vero (derivada de células epiteliais originárias de rim de macaco verde africano) e HaCat (queratinócitos derivados da pele de humanos) foram obtidas de American Type Culture Collection (ATCC – USA). Essas células foram mantidas em Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM, Sigma Aldrich) rico em glicose, suplementado com 10 % de Soro Fetal Bovino (SFB, Gibco by Life Technologies), 1 % de L-glutamina (Gibco by Life Technologies),

1 % de Penicilina/Estreptomicina (Gibco by Life Technologies), 0,2 % de Gentamicina (Gibco by Life Technologies) e mantidas em atmosfera controlada (5 % de CO<sub>2</sub> a 37°C).

### 3.4 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

O efeito dos venenos botrópicos na viabilidade de células Vero e HaCat foi analisado segundo Damico e colaboradores (2007), com modificações. O ensaio foi realizado utilizando Alamar Blue®, um reagente que mede o metabolismo celular ao longo do tempo e tem sido utilizado para quantificar, *in vitro*, a viabilidade das células, uma vez que este é estável e não tóxico. Após ser adicionado na cultura, o Alamar Blue® é transportado para o citoplasma e, quando há metabolismo celular, ele é convertido em sua forma reduzida pela atividade de enzimas mitocondriais. Conseqüentemente, ocorre a mudança do indicador inicialmente azul não fluorescente (Resazurina) para um composto rosa fluorescente (Resofurina), o que indica a presença de células viáveis em cultura (RAMBERSAD, SEPHRA N., 2012).

As células foram plaqueadas em microplaca de 96 poços (1 x 10<sup>4</sup> células/poço) em DMEM 10 % SFB e incubadas em estufa a 37°C e 5 % de CO<sub>2</sub> até atingirem aproximadamente 80 % de confluência. Em seguida, os poços foram lavados com PBS 50 mM para retirada do SFB e as células foram expostas a diferentes concentrações de veneno (1,25 µg/mL a 80 µg/mL) diluído em DMEM, por no mínimo 18 horas. O meio foi então retirado de cada um dos poços, DMEM contendo 10 % de Alamar Blue® foi adicionado e a fluorescência foi medida após 3 horas de incubação utilizando um leitor de fluorescência (Varioskan Flash Multimode Reader – Thermo Scientific) a 540 nm de excitação e 590 nm de emissão. A porcentagem de viabilidade celular foi calculada em relação ao controle positivo, o qual não recebeu tratamento e, portanto, foi considerado como contendo 100 % de células viáveis. Foram realizadas três replicatas independentes e as médias desses valores foram consideradas para as análises subsequentes. Ao término dos ensaios, a concentração efetiva de veneno capaz de reduzir em 50 % a viabilidade celular



(EC<sub>50</sub>) foi determinada por meio de uma curva concentração-resposta, utilizando o software GraphPad Prism 5.0.

### **3.5 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA NEUTRALIZANTE DE SOROS ANTI-BOTRÓPICOS PRÉ-INCUBADOS COM VENENO DE *B. jararaca***

O ensaio de viabilidade celular foi realizado com o intuito de avaliar se o mesmo seria um método adequado para distinguir os soros de alta potência, os quais podem ser processados para uso terapêutico, dos soros de baixa potência, provenientes de animais que ainda necessitam de ciclos adicionais de imunização. Para determinar a potência neutralizante dos antivenenos, células Vero foram plaqueadas conforme descrito na seção anterior. O veneno (5 x EC<sub>50</sub> – equivalente a 58,95 µg/mL) foi pré-incubado com diferentes quantidades de cada soro a 37°C. Após 30 minutos, essa mistura foi adicionada aos poços contendo células e as placas foram incubadas a 37°C e 5 % de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Soro de cavalo não-imune foi utilizado como controle negativo. Após o término do período de incubação, o meio foi retirado de cada um dos poços, DMEM contendo 10 % de Alamar Blue® foi adicionado e a fluorescência foi medida após 3 horas utilizando um leitor de fluorescência (Varioskan Flash Multimode Reader – ThermoScientific) a 540 nm de excitação e 590 nm de emissão. A viabilidade celular foi calculada em relação ao controle positivo (os valores das células não tratadas foram considerados como 100% de viabilidade) e a porcentagem de inibição da citotoxicidade foi quantificada em relação às células tratadas apenas com veneno. Os valores considerados nas análises representam as médias de três replicatas independentes. A concentração inibitória capaz de prevenir 50 % da citotoxicidade (IC<sub>50</sub>) ocasionada pelo veneno foi calculada utilizando uma curva concentração-resposta e o software GraphPad Prism 5.0.

Os antivenenos foram classificados em dois grupos (baixa e alta potência) e um ponto de corte foi estabelecido. Para isto foi escolhido o método convencional de Intervalo de Confiança (CI) 95% da média (SHARMA e JAIN, 2014), no qual 2x o desvio padrão (DP) foi subtraído da média dos soros de baixa potência. O valor resultante foi então considerado o limite máximo para um soro ser considerado de baixa potência. Esse valor foi então considerado um valor de corte. Valores de IC<sub>50</sub> inferiores a este significam que menor

quantidade de soro é necessária para neutralizar a mesma quantidade de veneno e, portanto, maior é a potência do antiveneno. Dessa forma, soros que apresentarem valor de  $IC_{50}$  menor que o ponto de corte devem ser classificados como de alta potência.

### **3.6 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA NEUTRALIZANTE DE SOROS ANTI-BOTRÓPICOS EM CÉLULAS PREVIAMENTE TRATADAS COM VENENOS BOTRÓPICOS**

O ensaio de viabilidade celular também foi realizado para avaliar a eficácia do soro comercial, produzido na Fundação Ezequiel Dias, em inibir a citotoxicidade após o tratamento das células com veneno. Células HaCat foram plaqueadas conforme descrito na seção 3.4. Os venenos botrópicos ( $5 \times EC_{50}$ ) foram adicionados individualmente aos poços e incubados com  $5\mu\text{L}$  do antiveneno após 3, 6, 12 e 24 horas. Após 18 horas de tratamento com soro, o sobrenadante dos poços foi recolhido, adicionou-se DMEM contendo 10% de Alamar Blue® e a fluorescência foi medida após 3 horas utilizando um leitor de fluorescência (Varioskan Flash Multimode Reader – ThermoScientific) a 540 nm de excitação e 590 nm de emissão. A pré-incubação do veneno com o soro também foi realizada a fins de comparação e um soro não-relacionado (anti-escorpiônico) foi considerado como controle negativo. A viabilidade celular foi calculada em relação ao controle positivo (os valores das células não tratadas foram considerados como 100% de viabilidade) e a porcentagem de inibição da citotoxicidade foi quantificada em relação às células tratadas apenas com veneno. Os valores analisados representam as médias de pelo menos duas replicatas independentes.

### **3.7 MICROSCOPIA**

Após a realização dos ensaios de neutralização da citotoxicidade, imagens de contraste de fase das células tratadas foram obtidas utilizando o microscópio Evos XL (aumento 10x) (Thermo Scientific).

### **3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Os resultados dos ensaios foram expressos como média  $\pm$  DP. As análises estatísticas foram realizadas utilizando GraphPad Prism 5.0. Two-way ANOVA, seguido por pós-teste de Bonferroni foi realizado para comparar os soros de baixa e alta potência em diferentes diluições e para avaliar a eficácia do soro comercial após diferentes tempos de tratamento com veneno. Teste *t* student foi usado para comparar os valores de IC<sub>50</sub> dos soros de baixa e alta potência. Um valor de  $p < 0,05$  indica significância.

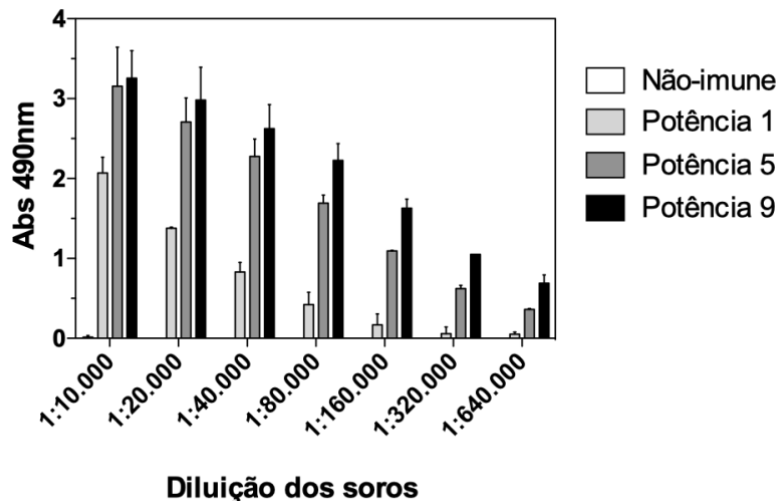
# **Resultados**

## 4. RESULTADOS

### 4.1 AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DA POTÊNCIA NEUTRALIZANTE DE ANTIVENENOS ANTI-BOTRÓPICOS

#### 4.1.1 Soros de diferentes potências reconhecem o veneno de *B. jararaca* por ELISA

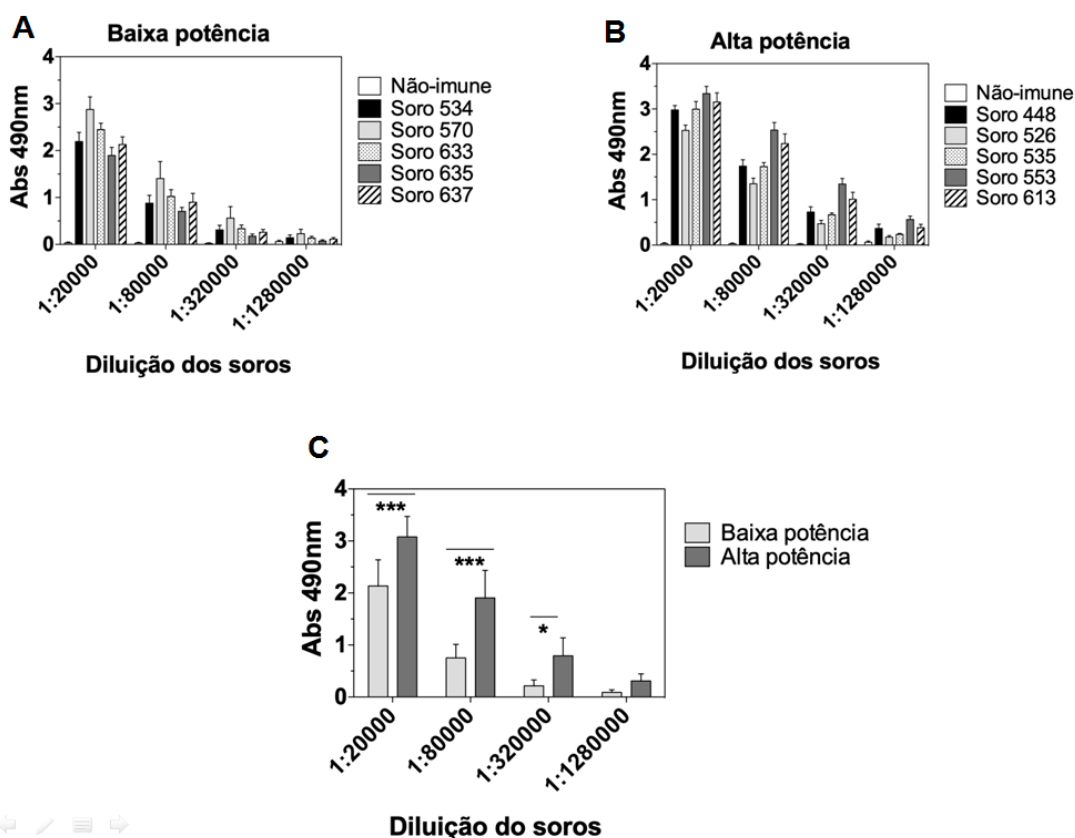
Primeiramente, os 3 soros produzidos pelo nosso grupo foram testados por ELISA frente ao veneno de *B. jararaca* a fim de avaliar seu reconhecimento e quais diluições seriam mais adequadas. Os soros de potência 1, 5 e 9 reconheceram o veneno de forma específica e essa resposta foi concentração-dependente. O controle negativo, soro não imune, não apresentou reconhecimento frente ao veneno (Figura 9).



**Figura 9: ELISA dos soros de diferentes potências frente ao veneno de *B. jararaca*.** As placas foram sensibilizadas com veneno (0,5 µg/poço), incubadas com diferentes diluições dos soros de potência 1 mg/mL, 5 mg/mL e 9 mg/mL e anti-horse peroxidase (1:6000) foi utilizado como anticorpo secundário. Pastilhas de OPD (SigmaFast) foram utilizadas para detecção do reconhecimento, de acordo com as instruções do fabricante. Soro de cavalo não-imune foi testado como controle negativo. Os valores representam as médias ± DP de dois experimentos independentes.

Em seguida foram testados todos os soros de cavalo (de baixa e alta potência) fornecidos pela FUNED, a fim de verificar sua reatividade frente ao

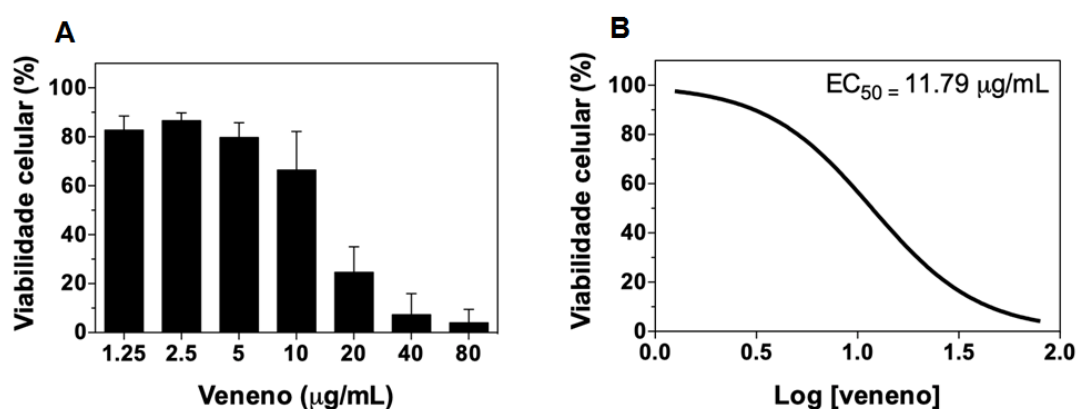
veneno de *B. jararaca*. Diferentes diluições foram utilizadas (1:20.000 a 1:1.280.000) e todos os soros também reconheceram o veneno de forma concentração-dependente. Ambos os grupos apresentaram altos títulos de anticorpos nas maiores concentrações (Figura 10A e 10B). A média da absorbância dos dois grupos demonstra que o reconhecimento dos soros de alta potência é maior do que os dos soros de baixa potência nas diluições de 1:20.000, 1:80.000 e 1:320.000, sendo que nesta última a diferença entre os dois grupos foi menor. Não houve diferença estatística entre os grupos na menor diluição (Figura 10C).



**Figura 10: ELISA dos soros de baixa (A) e alta (B) potência frente ao veneno de *B. jararaca*.** As placas foram sensibilizadas com veneno (0,5 µg/poço), incubadas com diferentes diluições dos soros (1:20.000 a 1:1.280.000) e anti-horse peroxidase (1:6000) foi utilizado como anticorpo secundário. Pastilhas de OPD (SigmaFast) foram utilizadas para detecção do reconhecimento, de acordo com as instruções do fabricante. Soro de cavalo não-imune foi testado como controle negativo. **C)** Média das absorbâncias dos dois grupos em diferentes diluições. Os valores representam as médias ± DP de dois experimentos independentes (\*\*\*) p < 0.001; \* p < 0.05).

#### 4.1.2 O veneno de *B. jararaca* reduz a viabilidade de células Vero

Posteriormente, foi avaliada a capacidade do veneno de *B. jararaca* em reduzir a viabilidade de células Vero. O tratamento com o veneno por 24 horas resultou na diminuição da viabilidade celular, de forma concentração-dependente (Figura 11 A). A atividade citotóxica relativa foi determinada como a concentração de veneno capaz de reduzir em 50 % a viabilidade celular ou Concentração Efetiva média ( $EC_{50}$ ) e o valor calculado foi de 11,79  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 11 B).



**Figura 11: Viabilidade de células Vero após tratamento com veneno de *B. jararaca*.** **A)** Curva concentração-resposta da citotoxicidade do veneno de *B. jararaca*. **B)** Curva de  $EC_{50}$  (concentração efetiva capaz de reduzir 50% da viabilidade celular) calculada utilizando o software GraphPad Prism 5.0. Células Vero ( $1 \times 10^4$  células/poço) foram tratadas com diferentes concentrações de veneno (1,25 a 80  $\mu\text{g/mL}$ ) por 24 horas e a viabilidade celular foi calculada utilizando o reagente Alamar Blue®. Os valores representam a média  $\pm$  DP de três replicatas independentes.

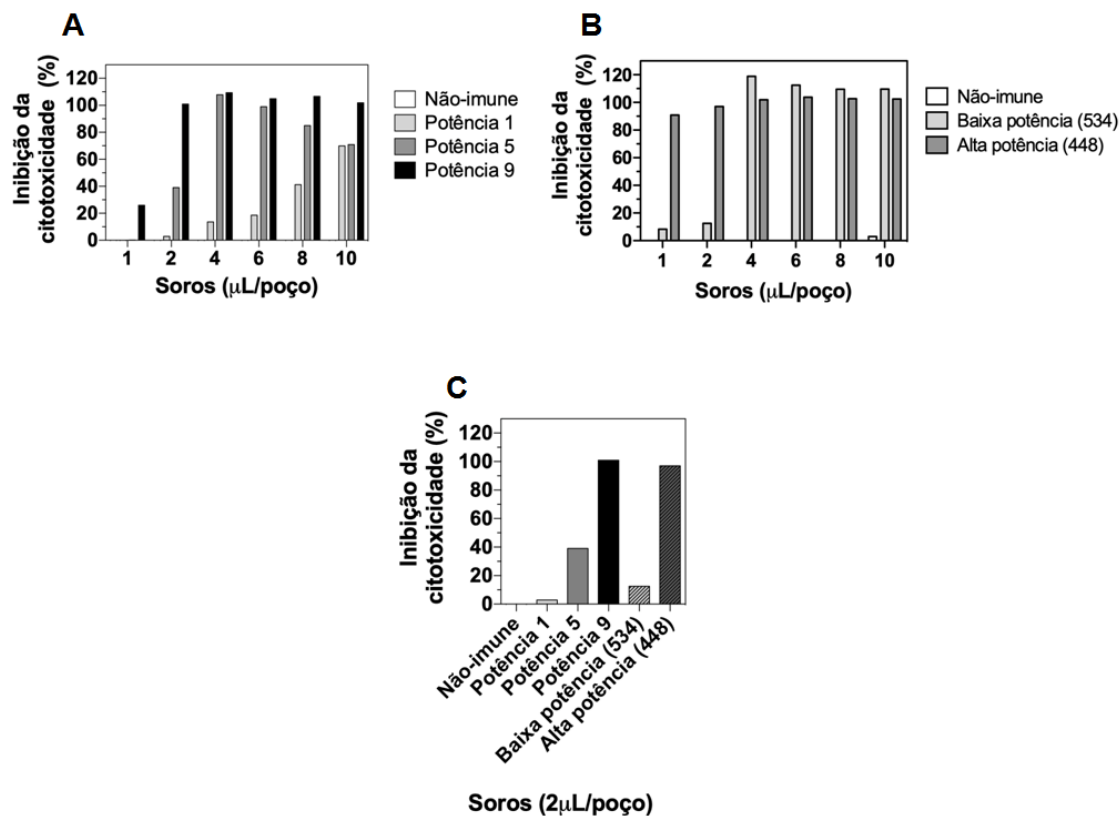
#### 4.1.3 Padronização do ensaio de neutralização

Para analisar se o ensaio de viabilidade celular seria adequado em distinguir soros de alta potência daqueles de baixa potência, testes de neutralização da citotoxicidade foram realizados. As células Vero foram escolhidas para a realização desses ensaios, pois são células provenientes do rim, um importante órgão que pode ser afetado no envenenamento sistêmico. A elaboração desses ensaios teve como objetivo reproduzir o protocolo de neutralização da letalidade, realizado *in vivo* (Chippaux, 2010). Dessa forma, uma quantidade de veneno de *B. jararaca* correspondente a 5 x  $EC_{50}$  foi

incubada com diferentes volumes de cada soro e em seguida adicionada às células. Um ensaio preliminar foi realizado com os antivenenos de potências pré-determinadas (potências 1, 5 e 9) para analisar se a metodologia seria adequada para diferenciação dos mesmos. Foi possível observar que os soros neutralizaram a citotoxicidade de acordo com sua respectiva potência. Ou seja, o soro de potência 1 mg/mL não é tão efetivo em neutralizar os efeitos tóxicos do veneno quando comparado aos soros de potência 5 mg/mL e 9 mg/mL (Figura 12 A).

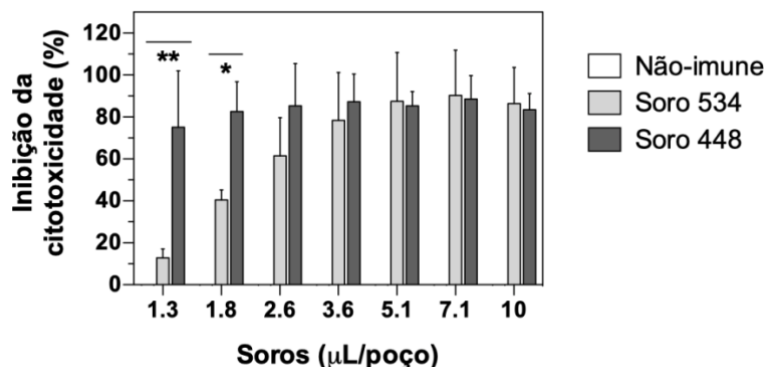
Em seguida, para fins de padronização, dois dos soros fornecidos pela FUNED, um de baixa potência (534) e outro de alta potência (448), foram testados quanto a sua capacidade neutralizante. Os resultados demonstram que ambos inibiram a citotoxicidade de acordo com sua potência pré-determinada. Ou seja, o soro de alta potência foi mais eficaz em neutralizar os efeitos citotóxicos do veneno, uma vez que em concentrações menores que 4  $\mu$ L/poço a capacidade inibitória do soro de baixa potência foi reduzida (Figura 12 B). O soro pré-imune (controle negativo) não foi capaz de inibir a citotoxicidade desencadeada pelo veneno, o que demonstra a inibição específica pelos soros anti-botrópicos. A concentração de 2  $\mu$ L/poço foi escolhida a partir desses dados para uma visualização comparativa de todos os antivenenos testados. Foi possível observar que o ensaio de viabilidade celular foi adequado para diferenciá-los, uma vez que a potência neutralizante dos mesmos refletiu àquela determinada *in vivo* (Figura 12 C).





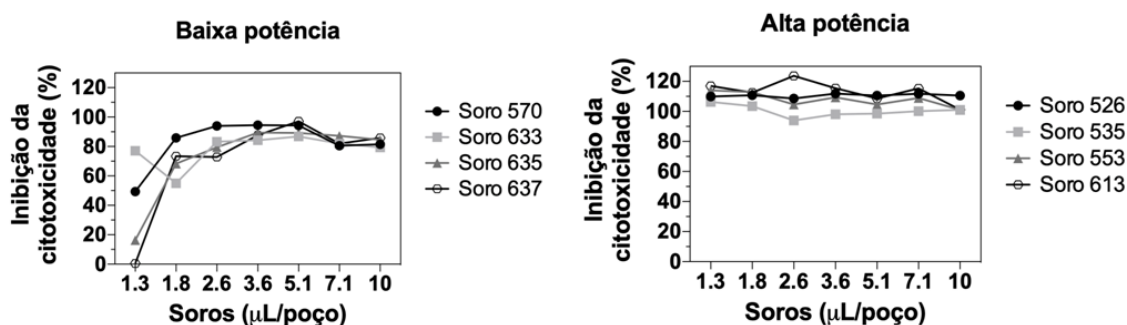
**Figura 12: Ensaio de neutralização da citotoxicidade em células Vero tratadas com veneno de *B. jararaca* e soros de diferentes potências.** Diluições seriadas de soros de diferentes potências (A) e (B) foram incubadas com  $5 \times \text{EC}_{50}$  do veneno por 30 minutos e em seguida essa mistura foi adicionada aos poços contendo  $1 \times 10^4$  células. Após 24 horas, a viabilidade celular foi analisada utilizando o reagente Alamar Blue®. (C) Comparação de todos os antivenenos testados na diluição de  $2 \mu\text{L}/\text{poço}$ . A capacidade neutralizante dos soros refletiu sua potência pré-determinada *in vivo*. Os valores são as médias  $\pm$  DP.

Os ensaios foram repetidos com os soros de baixa potência (534) e alta potência (448), provenientes de cavalo, utilizando um fator de diluição de 1,4. A curva de concentração foi realizada dessa forma na tentativa de analisar o comportamento dos soros em intervalos menores de diluição, uma vez que houve grande diferença na porcentagem de inibição do soro de baixa potência (534) entre a diluição de  $4\mu\text{L}/\text{poço}$  e  $2\mu\text{L}/\text{poço}$ . A partir da análise dos resultados pode-se observar que o soro 448 foi capaz de inibir a citotoxicidade em todas as diluições testadas e que os soros foram estatisticamente diferentes nas menores diluições ( $p < 0.05$ ), já o soro 534 foi eficaz em inibir os efeitos tóxicos somente em diluições maiores que  $1,8 \mu\text{L}/\text{poço}$ . (Figura 13).



**Figura 13: Ensaio de neutralização da citotoxicidade em células Vero tratadas com o veneno de *B. jararaca* incubado com soros de baixa e alta potência.** Utilizando um fator de diluição de 1,4x, diferentes volumes de soros de baixa (543) e alta (448) potência foram incubados com 5 x EC<sub>50</sub> do veneno por 30 minutos e em seguida essa mistura foi adicionada aos poços contendo 1 x 10<sup>4</sup> células. Após 24 horas a viabilidade celular foi analisada utilizando o reagente Alamar Blue®. Os dados foram comparados utilizando Two-way ANOVA (\* p<0.05; \*\* p< 0.01). Os valores são as médias ± DP de dois experimentos independentes.

A OMS recomenda que os volumes de antiveneno utilizados para a realização do teste de neutralização da letalidade sejam definidos de forma a abranger 100% de sobrevivência (diluições totalmente neutralizantes) e 100% de morte (diluições não neutralizantes) dos animais utilizados no ensaio (WHO, 2016). Na tentativa de seguir essa recomendação no ensaio de neutralização da citotoxicidade, os 8 antivenenos ainda não analisados (570, 633, 635, 637, 526, 535, 553 e 613) foram testados nas mesmas condições que os dois soros anteriores (534 e 448) para avaliar se os volumes utilizados seriam adequados para os diferentes grupos. Embora os soros de baixa potência tenham apresentado uma resposta inibitória concentração-dependente, o mesmo não ocorreu para os soros de alta potência, uma vez que estes inibiram 100% da citotoxicidade em todas as diluições testadas (Figura 14). Consequentemente, foi necessário o acréscimo de diluições maiores de antiveneno.



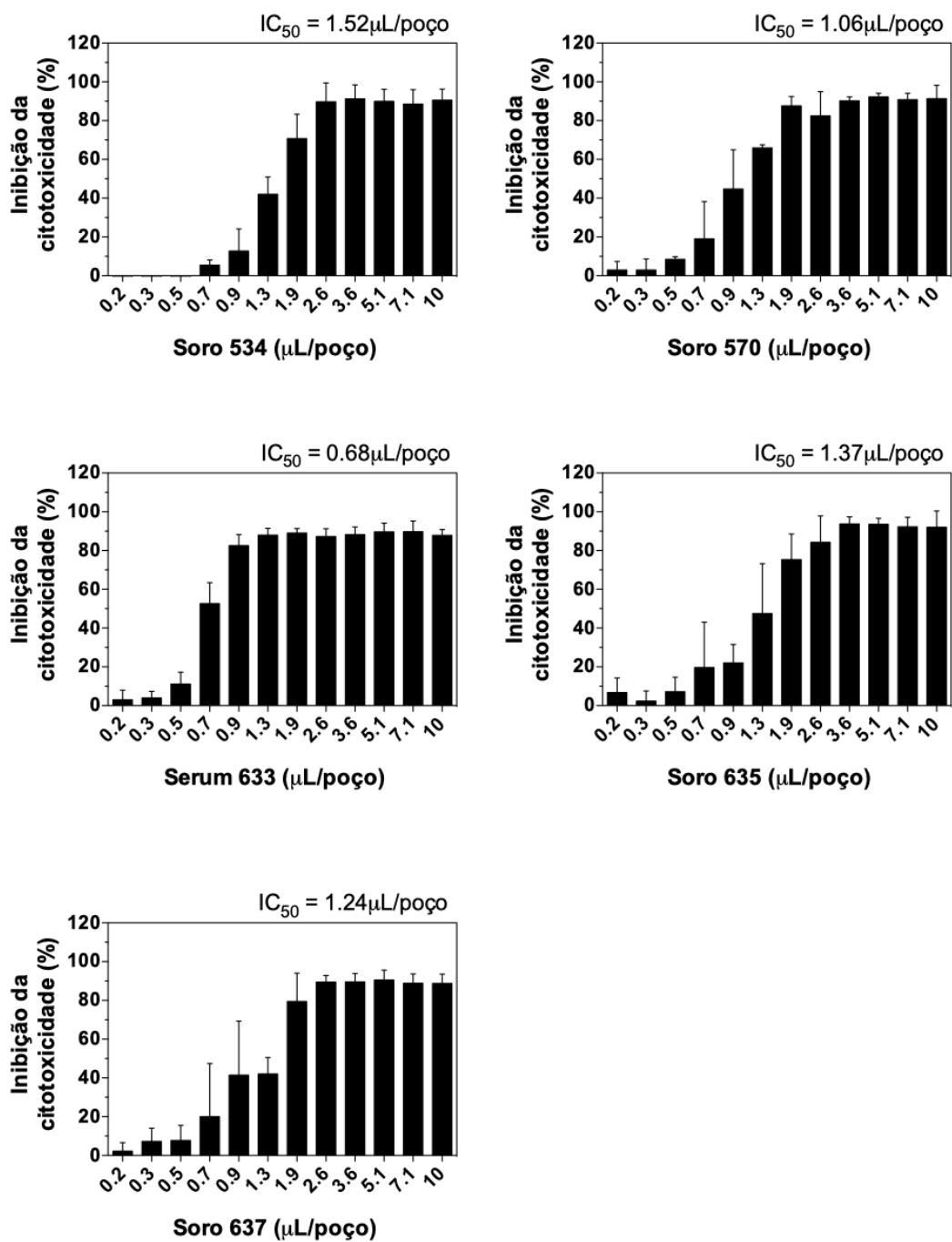
**Figura 14: Ensaio de neutralização da citotoxicidade em células Vero tratadas com veneno de *B. jararaca* e soros de baixa e alta potência.** Utilizando um fator de diluição de 1,4x, diferentes volumes de soros de baixa e alta potência foram incubados com  $5 \times EC_{50}$  do veneno por 30 minutos e em seguida essa mistura foi adicionada aos poços contendo  $1 \times 10^4$  células. Após 24 horas a viabilidade celular foi analisada utilizando o reagente Alamar Blue®. Os valores são as médias  $\pm$  DP.

#### ***4.1.4 Soros de alta potência são mais efetivos em neutralizar a citotoxicidade do veneno de *B. jararaca****

Uma vez que os parâmetros do ensaio de neutralização da citotoxicidade foram padronizados, o mesmo foi realizado, com o emprego de diluições adicionais, utilizando todos os 10 soros fornecidos pela FUNED, a fim de diferenciá-los de acordo com sua potência. Todos os antivenenos testados inibiram os efeitos tóxicos do veneno de forma concentração-dependente (Figura 15 A e 15 B). Entretanto, os soros de alta potência foram mais efetivos, pois neutralizaram a citotoxicidade em todas as diluições testadas (Figura 14B). A média dos dois grupos foi calculada com o objetivo de compará-los e foi possível observar que os mesmos são estatisticamente diferentes nas menores diluições ( $p < 0.001$ ). Ou seja, um menor volume de soro de alta potência foi capaz de neutralizar 100% da citotoxicidade do veneno, enquanto que os soros de baixa potência inibem totalmente os efeitos da peçonha apenas quando quantidades maiores que  $1,3 \mu\text{L/poço}$  são utilizadas (Figura 15 C).

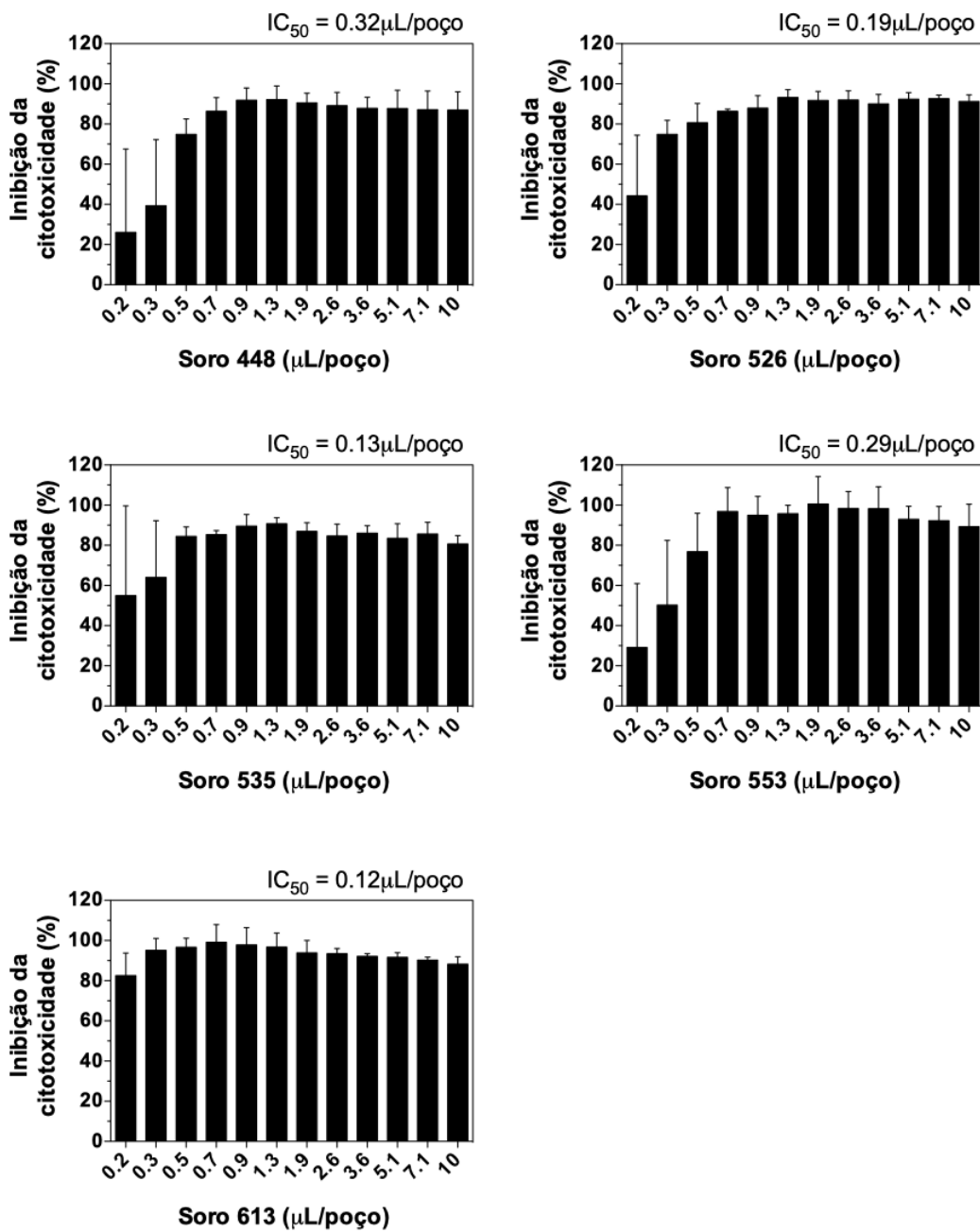
## Soros de baixa potência

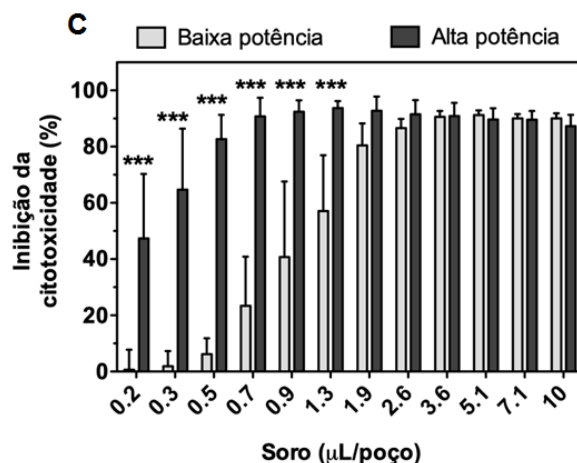
A



## Soros de alta potência

B





**Figura 15: Ensaio de neutralização da citotoxicidade em células Vero tratadas com veneno de *B. jararaca* e soros de baixa e alta potência.** Diluições seriadas dos soros de baixa (A) e alta (B) potência foram incubadas com 5 x EC<sub>50</sub> do veneno por 30 minutos e em seguida essa mistura foi adicionada aos poços. Após 24 horas a viabilidade celular foi analisada utilizando o reagente Alamar Blue®. A concentração inibitória de antiveneno capaz de inibir 50% da morte celular (IC<sub>50</sub>) foi calculada utilizando o software GraphPad Prism 5.0. C) Média da inibição da citotoxicidade dos soros de baixa e alta potência. Os dados foram comparados utilizando Two-way ANOVA (\*\*\*) p<0.001). Os valores representam as médias ± DP de três replicatas independentes.

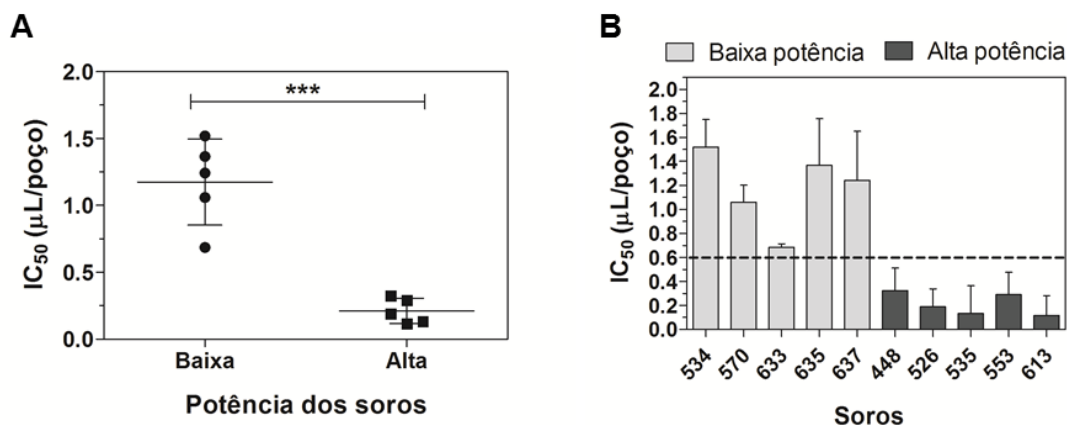
A partir da curva de concentração-resposta, a Concentração Inibitória média (IC<sub>50</sub>) dos antivenenos foi calculada e os valores indicam sua capacidade inibitória relativa (Tabela 1). Os soros de alta potência apresentaram valores de IC<sub>50</sub> menores do que os soros de baixa potência, o que indica que menor quantidade de soro é necessária para neutralizar a mesma quantidade de veneno e, portanto, maior é a potência neutralizante desses antivenenos.

**Tabela 1: IC<sub>50</sub> dos soros de baixa e alta potência.** Os valores foram determinados utilizando uma curva concentração-resposta e o software GraphPad Prism 5.0.

Baixa potência		Alta potência	
Número do soro	IC <sub>50</sub> (μL/poço)	Número do soro	IC <sub>50</sub> (μL/poço)
534	1.52	448	0.32
570	1.06	526	0.19
633	0.68	535	0.13
635	1.37	553	0.29
637	1.24	613	0.12

#### ***4.1.5 O ensaio de viabilidade celular foi adequado para diferenciar soros antibióticos de acordo com sua potência***

A análise estatística entre os valores de IC<sub>50</sub> dos dois grupos demonstrou que ambos são estatisticamente diferentes entre si ( $p < 0.001$ ) (Figura 16 A). Em seguida, com o objetivo de classificar os soros de acordo com sua potência através do ensaio de viabilidade celular, foi determinado um valor de IC<sub>50</sub> que permite a diferenciação desses antivenenos em dois grupos, ou seja, um ponto de corte. O ponto de corte foi calculado considerando a média dos valores de IC<sub>50</sub> dos soros de baixa potência menos 2 DP desse mesmo grupo. Como resultado, o limite mínimo para um soro ser classificado como de baixa potência foi de 0.599 μL/poço (Figura 16 B).



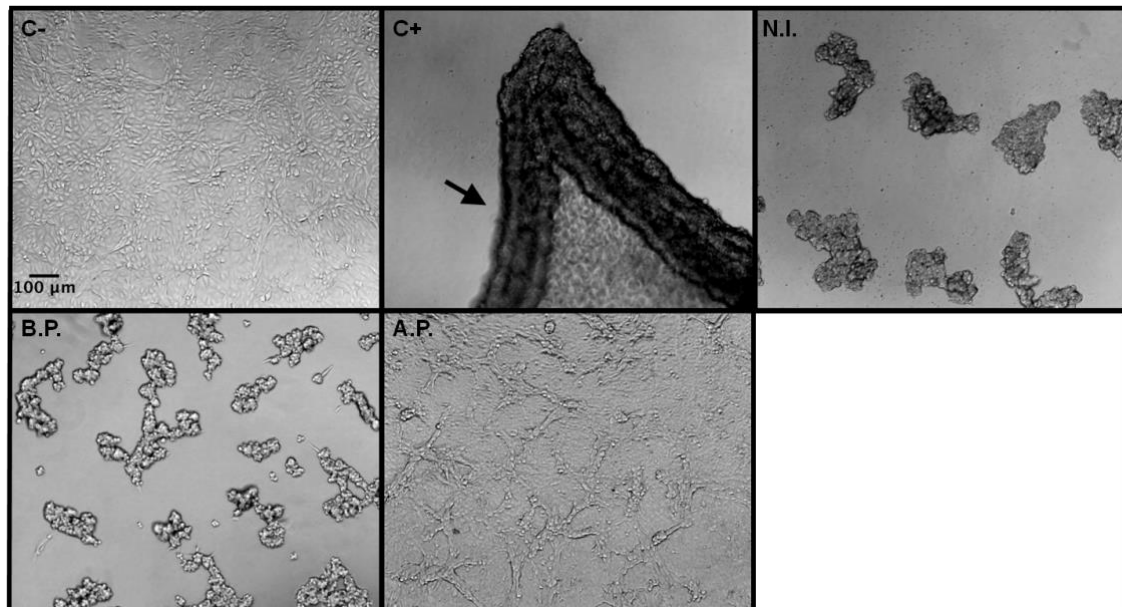
**Figura 16: IC<sub>50</sub> dos soros de baixa e alta potência. A)** Os soros foram separados em dois grupos (baixa e alta potência) e os dados foram analisados estatisticamente utilizando teste *t*. **B)** Determinação do ponto de corte da potência dos soros. O ponto de corte foi estabelecido utilizando a média dos soros de baixa potência menos 2 DP e o valor calculado foi de 0,599 µL/poço. Os valores representam as médias ± DP de três replicatas independentes. A concentração inibitória capaz de neutralizar 50% da morte celular (IC<sub>50</sub>) causada pelo veneno de *B. jararaca* foi determinada para cada soro utilizando uma curva concentração-resposta e o software GraphPad Prism 5.0 (\*\*\*)  $p < 0.001$ ).

#### 4.1.6 A morfologia das células varia de acordo com o tratamento utilizado

No intuito de analisar o efeito do veneno de *B. jararaca* sobre a morfologia celular, células Vero foram incubadas com veneno ( $5 \times EC_{50}$ ) previamente incubado com soro não imune ou com soros de baixa e alta potência. As células não-tratadas ou tratadas apenas com veneno foram consideradas como controles negativo e positivo, respectivamente. Através da avaliação das imagens de microscopia é possível observar que a resposta celular variou de acordo com o tratamento que as células receberam (Figura 17). Quando comparado ao grupo não tratado (C-), as células tratadas com veneno (C+) apresentaram perda da integridade da monocamada celular, uma vez que exibiram expressiva retração da borda da colônia (Figura 17, seta). Já as células tratadas com veneno pré-incubado com soro não-imune (N.I.) ou soro de baixa potência (B.P.) apresentaram alterações morfológicas similares, formando aglomerados celulares com consequente perda na integridade da monocamada celular. Por outro lado, o soro de alta potência (A.P.) protegeu as



células de danos na monocamada e a morfologia celular foi semelhante a das células que não receberam tratamento.



**Figura 17: Alterações morfológicas em células Vero após diferentes tratamentos.** **C-:** Células não tratadas. **C+:** Células tratadas com 5 x  $EC_{50}$  do veneno de *B. jararaca*. **N.I.:** Células tratadas com veneno e soro não-imune. **B.P.:** Células tratadas com veneno e soro de baixa potência. **A.P.:** Células tratadas com veneno e soro de alta potência. Para análise da neutralização da citotoxicidade, 1,3  $\mu$ L/poço de cada soro foram pré-incubados com 5 x  $EC_{50}$  do veneno por 30 minutos. As imagens foram obtidas em microscópio Evos XL (aumento 10x).

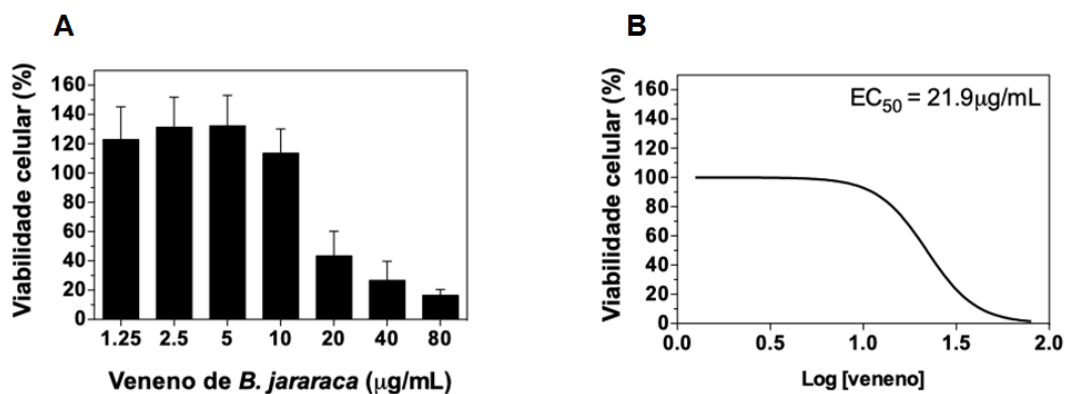
## 4.2 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA NEUTRALIZANTE DO ANTIVENENO ANTIBOTRÓPICO COMERCIAL

Alguns estudos têm empregado estratégias diferenciadas e que mimetizam de maneira mais fidedigna o envenenamento para avaliação da eficácia neutralizante dos antivenenos. No protocolo conhecido como “*rescue-type*”, primeiramente o veneno é administrado nos animais e após determinado período adiciona-se o antiveneno, evitando, assim, a pré-incubação do veneno com o soro (Gutiérrez, 2018). Dessa forma, o ensaio de neutralização da citotoxicidade foi modificado com o intuito de verificar se o mesmo seria adequado para avaliar a potência neutralizante do soro simulando as condições reais do tratamento de um acidente ofídico.

### 4.2.1 Venenos do gênero *Bothrops* reduzem a viabilidade de queratinócitos

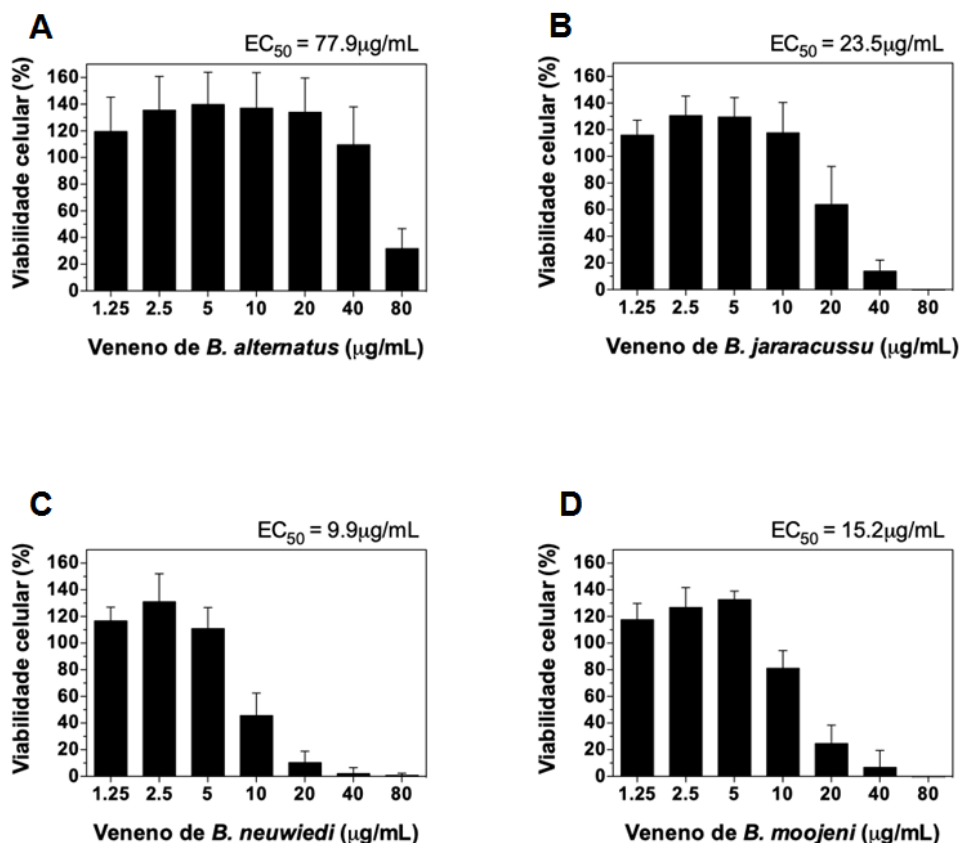
Primeiramente, foi avaliada a capacidade do veneno botrópico de referência nacional (*B. jararaca*) em reduzir a viabilidade de células HaCat assim como na seção 4.1.2. Enquanto as células Vero, utilizadas na seção 4.1, estavam relacionadas aos efeitos sistêmicos, os queratinócitos foram escolhidos para estudo dos efeitos locais, uma vez que são células da pele, órgão seriamente acometido após a mordida de serpentes do gênero *Bothrops*.

O tratamento das células por 24 horas resultou na diminuição da viabilidade, de forma concentração-dependente. A atividade citotóxica relativa foi determinada como a concentração de veneno capaz de reduzir em 50% a viabilidade celular ou Concentração Efetiva média (EC<sub>50</sub>) e o valor calculado foi de 21,9 µg/mL (Figura 18).



**Figura 18: Viabilidade de células HaCat após tratamento com veneno de *B. jararaca*.** **A)** Curva concentração-resposta da citotoxicidade do veneno de *B. jararaca*. **B)** Curva de EC<sub>50</sub> (concentração efetiva capaz de reduzir 50% da viabilidade celular) calculada utilizando o software GraphPad Prism 5.0. Células HaCat ( $1 \times 10^4$  células/poço) foram tratadas com diferentes concentrações de veneno (1,25 a 80 µg/mL) por 24 horas e a viabilidade celular foi calculada utilizando o reagente Alamar Blue®. Os valores representam a média ± DP de três replicatas independentes.

Em seguida, a citotoxicidade dos outros venenos botrópicos que fazem parte da mistura antigênica utilizada para produção do soro também foi analisada. Todos os venenos testados foram efetivos em reduzir a viabilidade das células e essa ação varia entre os venenos. Aqueles que apresentaram menores valores de EC<sub>50</sub> e que, portanto, são mais citotóxicos, foram os das espécies *B. neuwiedi* e *B. moojeni* (Figura 19).



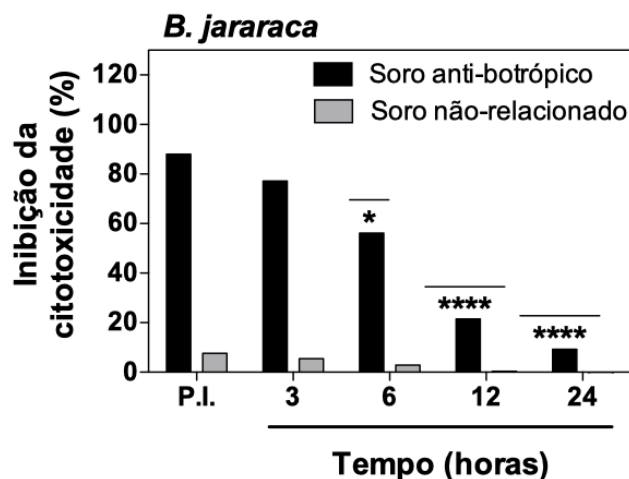
**Figura 19: Viabilidade de células HaCat após tratamento com veneno de serpentes do gênero *Bothrops*.** Curva concentração-resposta da citotoxicidade dos venenos de *B. alternatus* (A), *B. jararacussu* (B), *B. neuwiedi* (C) e *B. moojeni* (D). Células HaCat ( $1 \times 10^4$  células/poço) foram tratadas com diferentes concentrações de veneno (1,25 a 80 µg/mL) por 24 horas e a viabilidade celular foi calculada utilizando o reagente Alamar Blue®. Os valores representam a média  $\pm$  DP de três replicatas independentes.

#### 4.2.2 A eficácia neutralizante do antiveneno anti-botrópico é tempo-dependente

Veneno de *B. jararaca* ( $5 \times EC_{50}$ ) foi adicionado às células e após 3, 6, 12 e 24 horas as mesmas foram tratadas com o antiveneno comercial por 18 horas. O soro comercial foi escolhido para a realização desses ensaios, pois o mesmo é utilizado na terapia e, portanto, é mais adequado para simular o tratamento do envenenamento.

A neutralização da citotoxicidade foi inversamente proporcional ao tempo de contato do veneno com as células. Ou seja, a resposta é tempo dependente, pois quanto antes o antiveneno é adicionado na cultura, maior é a

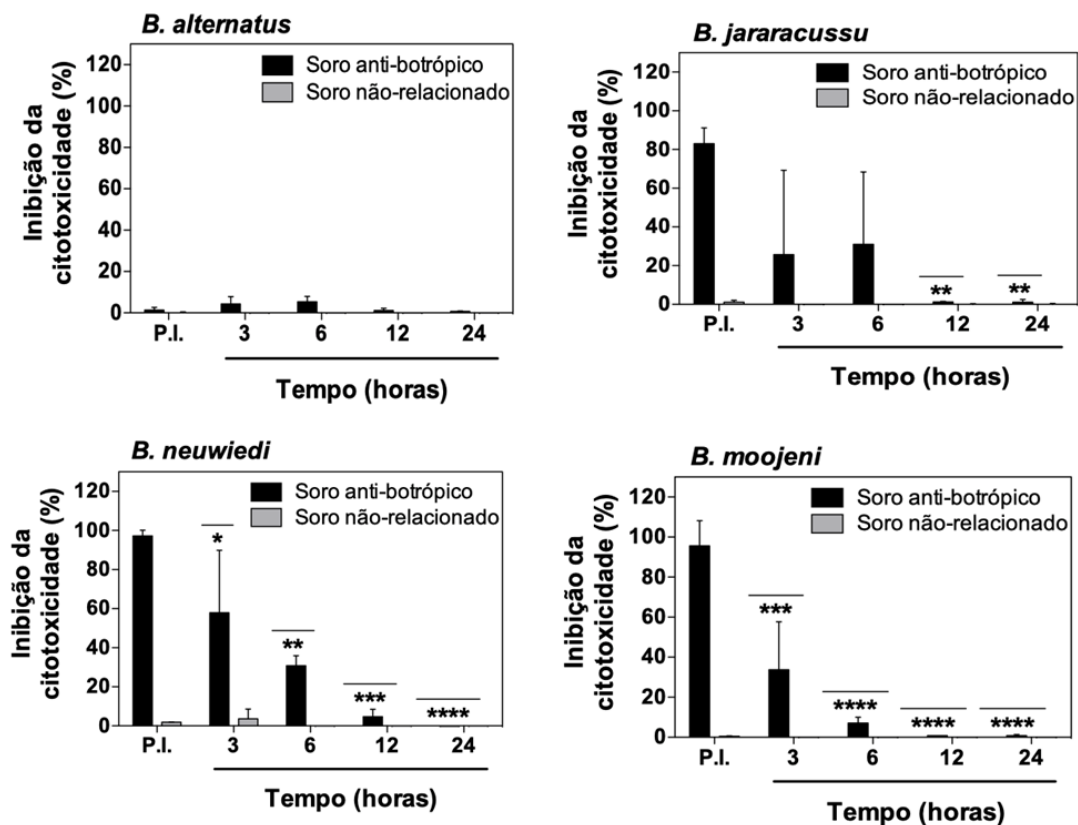
inibição dos efeitos tóxicos (Figura 20). Essa inibição foi mais significativa quando o antiveneno foi adicionado em até 6 horas após o tratamento com veneno. Quando o soro é adicionado depois desse período, a viabilidade das células tratadas reduz de forma considerável. Como o protocolo convencional do ensaio de neutralização da letalidade realiza a pré-incubação do veneno com o antiveneno, os valores de inibição desse método foram comparados ao experimento padrão para avaliar se a potência dos soros é similar em ambos os tipos de ensaio. Foi possível observar que se o tratamento for realizado em até 3 horas, o antiveneno é capaz de inibir aproximadamente 80 % da citotoxicidade do veneno de *B. jararaca*, não apresentando diferença estatística quando comparado à pré-incubação (P.I.) do veneno com o soro. A eficácia neutralizante diminuiu quando as células foram tratadas por 6 horas, uma vez que houve diferença estatística entre este grupo e o grupo P.I. ( $p < 0,05$ ). Nas células que foram tratadas por 12 ou 24 horas, o soro não foi capaz de neutralizar os efeitos do veneno, já que a inibição da citotoxicidade observada nesses grupos foi estatisticamente diferente quando comparado a P.I. ( $p < 0,0001$ ). Além disso, o soro não-relacionado não foi capaz de inibir a citotoxicidade em nenhuma das condições testadas, o que demonstra que a neutralização do soro anti-botrópico ocorre de forma específica.



**Figura 20: Ensaio de neutralização da citotoxicidade em células HaCat tratadas com veneno de *B. jararaca* e soros comerciais produzidos pela FUNED.**  $5 \times EC_{50}$  do veneno foram adicionados aos poços contendo células e após diferentes períodos (3, 6, 12 ou 24 horas) as mesmas foram tratadas com  $5\mu\text{L}$  de antiveneno anti-botrópico. A mesma quantidade de veneno também foi pré-incubada (P.I.) com  $5\mu\text{L}$  de antiveneno por 30 minutos e, em seguida a mistura foi adicionada às células. Após 18 horas de tratamento com antiveneno a viabilidade celular foi determinada utilizando o reagente Alamar Blue®. Soro anti-escorpiônico (não-relacionado) foi testado como controle negativo. Os dados foram analisados utilizando Two-way ANOVA (\*  $<0,05$ ; \*\*\*\*  $p<0.0001$ ). Os valores representam as médias  $\pm$  DP de duas replicatas independentes.

#### 4.2.3 A eficácia neutralizante do antiveneno antitotrópico apresenta variações interespecíficas

Além de analisar a potência neutralizante do soro contra o veneno referência (*B. jararaca*), os outros venenos que compõem o *pool* antigênico para imunização também foram testados. Observou-se que quando o veneno foi pré-incubado com o antiveneno, a neutralização foi de aproximadamente 100% para as diferentes espécies, exceto para o veneno de *B. alternatus*. A resposta inibitória do soro foi tempo-dependente frente aos venenos de *B. jararacussu*, *B. neuwiedi* e *B. moojeni*. Porém, o soro não foi capaz de neutralizar os efeitos tóxicos desencadeados pelo veneno de *B. alternatus* em nenhuma das condições testadas (Figura 21). Vale ressaltar que esses resultados ainda são preliminares e experimentos adicionais são necessários para garantir a repetibilidade dos ensaios.



**Figura 21: Ensaio de neutralização da citotoxicidade em células HaCat tratadas com venenos do gênero *Bothrops* e soros comerciais produzidos pela FUNED.** 5 x EC<sub>50</sub> de cada um dos venenos foram adicionados aos poços contendo células e após diferentes tempos as mesmas foram tratadas com 5μL de antiveneno anti-botrópico. Soro anti-escorpiônico (não-relacionado) foi testado como controle negativo. Após 18 horas a viabilidade celular foi determinada utilizando o reagente Alamar Blue®. Os dados foram analisados utilizando Two-way ANOVA (\* <0,05; \*\*\*\* p<0.0001). Os valores representam as médias ± DP de pelo menos duas replicatas independentes.

# Discussão



## 5. DISCUSSÃO

Os antivenenos são os únicos produtos terapêuticos específicos e recomendados pela OMS para o tratamento do envenenamento ofídico (WHO, 2016). No Brasil, os casos de acidentes botrópicos são os mais significativos do ponto de vista epidemiológico e o tratamento é realizado com o antiveneno poliespecífico produzido pela hiperimunização de cavalos utilizando uma mistura contendo 5 venenos de serpentes do gênero *Bothrops* (*B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. alternatus*, *B. neuwiedi* e *B. moojeni*). A FUNED é um dos institutos brasileiros responsáveis pela produção e distribuição de antivenenos (SINAN, 2016; GUTIÉRREZ, 2018). Durante a produção dos soros na FUNED (desde os ciclos de imunização até envase em frascos-ampola), a potência neutralizante dos antivenenos produzidos é determinada em 3 estágios a fim de assegurar sua eficácia (ANVISA, 1996).

O método considerado padrão ouro para avaliação da potência é o ensaio de neutralização da letalidade, realizado em camundongos (WHO, 2016). Esse ensaio determina a dose média efetiva ( $DE_{50}$ ) dos antivenenos e o valor resultante expressa a eficácia neutralizante dos mesmos (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017). Apesar de ser o teste recomendado, esse procedimento é extremamente laborioso, apresenta altos custos, o tempo para sua execução é longo e muitas vezes produz resultados variáveis que são difíceis de reproduzir (MARIA *et al.*, 1998). Além disso, essa metodologia ocasiona sofrimento aos animais experimentais, devido aos efeitos tóxicos do envenenamento e, ainda, um elevado número de animais é necessário para a realização desses testes e também dos ensaios complementares (ESTEVÃO-COSTA *et al.*, 2016; INSTITUTO CLODOMIRO PICADO, 2007).

Em alguns casos, o ensaio de letalidade pode não refletir as manifestações clínicas mais relevantes do envenenamento. As serpentes do gênero *Naja*, pertencentes à família Elapidae, por exemplo, desencadeiam intensa necrose tissular, assim como venenos de espécies africanas e asiáticas (PETRAS *et al.*, 2011). A maioria dos venenos das serpentes da família Viperidae, por sua vez, podem ocasionar tanto danos locais (hemorragia, edema e dermonecrose),

quanto alterações sistêmicas (distúrbios hemodinâmicos, coagulopatias e problemas renais). Alguns desses efeitos podem não ser letais, entretanto os danos locais podem resultar em sequelas permanentes. Nesses casos, a avaliação da neutralização da letalidade, de forma isolada, não é suficiente para se obter uma avaliação integrada da eficácia dos antivenenos (GUTIERREZ *et al.*, 2017).

Considerando essas questões, o desenvolvimento de métodos alternativos para estimar a potência de soros é necessário e alguns estudos têm elaborado estratégias seguindo o princípio dos 3'Rs (RUSSELL e BURCH, 1959). Há alguns anos técnicas tais como aglutinação passiva, neutralização da atividade de PLA<sub>2</sub> e ELISA têm sido realizadas na avaliação da neutralização dos antivenenos na tentativa de substituir o método *in vivo* (BOCHE e RUSSELL, 1968; ALAPE *et al.*, 1997; MARIA *et al.*, 1998). Em relação aos ensaios imunoenzimáticos, estudos demonstram que a presença de anticorpos específicos contra os componentes antigênicos do veneno nem sempre se correlaciona com a neutralização da letalidade. Todos os soros testados no presente trabalho apresentaram altos títulos de anticorpos e o reconhecimento foi de acordo com a potência pré-determinada *in vivo*. Ou seja, soros de alta potência reconheceram mais o veneno do que os soros de baixa potência. Contudo, os valores de absorvância nem sempre estão diretamente relacionados à habilidade do antiveneno em neutralizar os efeitos tóxicos do envenenamento, uma vez que esse método é limitado à detecção de interações entre as imunoglobulinas presentes no soro e as proteínas do veneno (MARIA *et al.*, 2005). Sendo assim, os altos valores de absorvância encontrados podem ser resultado do reconhecimento das toxinas mais imunogênicas, que não são necessariamente as principais responsáveis pela toxicidade do veneno (BARBOSA *et al.*, 1995; GUTIÉRREZ *et al.*, 2011).

Ensaio baseado em modelos celulares têm sido utilizados para investigar mecanismos de ação e efeitos citotóxicos desencadeados pelo veneno bruto ou por toxinas purificadas a partir dos venenos ofídicos (RIBEIRO *et al.*, 2016; STRANSKY *et al.*, 2018; COSTAL-OLIVEIRA *et al.*, 2018). A citotoxicidade da peçonha de serpentes do gênero *Bothrops* já foi avaliada em diferentes linhagens celulares e observou-se que os venenos reduzem a viabilidade

celular e podem promover morte celular por apoptose e/ou necrose (BERNARDES-OLIVEIRA *et al.*, 2016; JORGE *et al.*, 2011). No presente estudo, a citotoxicidade do veneno de *B. jararaca* foi avaliada utilizando células Vero, provenientes de rim, um importante órgão afetado durante o envenenamento sistêmico (JORGE *et al.*, 2017). De Moraes e colaboradores (2013) demonstraram em linhagens celulares que a falência renal aguda ocasionada pelo envenenamento botrópico pode estar diretamente relacionada com a nefrotoxicidade que o veneno causa nas células, a qual pode envolver diferentes mecanismos de morte. Sendo assim, ensaios em cultura celular têm potencial para serem utilizados no estudo de efeitos sistêmicos. O veneno de *B. jararaca* avaliado neste estudo reduz a viabilidade de forma concentração-dependente, o que é corroborado por resultados observados em outros trabalhos (GUERRA-DUARTE *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2002). A concentração de veneno capaz de reduzir 50% da viabilidade celular ( $EC_{50}$ ) foi calculada e o valor obtido foi de 11,79  $\mu\text{g/mL}$ . Comparando com dados já existentes na literatura, esse valor não foi muito discrepante (GUERRA-DUARTE *et al.*, 2015). Porém, em outro modelo de células renais epiteliais (MDCK), o valor de  $EC_{50}$  encontrado foi menor, evidenciando que algumas células podem ser mais sensíveis à ação do veneno do que outras (JORGE *et al.*, 2017).

Em analogia ao método *in vivo* para determinação da eficácia neutralizante, 5 x  $EC_{50}$  do veneno de *B. jararaca* foi pré-incubada com concentrações variadas de antivenenos de diferentes potências e a Concentração Inibitória média ( $IC_{50}$ ) dos mesmos foi calculada. O ponto de corte, ou seja, o valor de  $IC_{50}$  que diferencia os antivenenos em dois grupos (baixa e alta potência) foi de 0.599  $\mu\text{L/poço}$ . Isso significa que os antivenenos que apresentem  $IC_{50}$  abaixo desse valor devem ser considerados como de alta potência. Através da análise dos dados pode-se observar que a capacidade neutralizante de todos os soros testados pelo ensaio de viabilidade celular estava de acordo com sua potência pré-estabelecida *in vivo*. Portanto, é possível sugerir que o ensaio de viabilidade foi apropriado para diferenciar os soros e indicar quais deles são adequados para uso terapêutico (potência  $\geq 5 \text{ mg/mL}$ ). Contudo, os soros utilizados nesse trabalho foram empregados apenas para determinação do

ponto de corte. A validação desse valor deve ser realizada com soros adicionais, sem conhecimento de sua potência, a fim de avaliar se o ponto de corte realmente é adequado para diferenciar os antivenenos de forma similar ao ensaio *in vivo*.

Vários métodos alternativos ao uso animal foram previamente validados e aprovados para testar a toxicidade de drogas e químicos. A utilização de células e tecidos nas abordagens *in vitro* representa uma das principais estratégias para substituição de animais, pois apresenta vantagens como as condições controladas para a realização dos ensaios, o que diminui a variabilidade entre os experimentos e facilita a padronização. Além disso, na maior parte das vezes os ensaios são mais rápidos, de menor custo e exigem menor quantidade das amostras a serem testadas (MUSHTAQ, 2018). Em relação ao teste de ELISA, que detecta o reconhecimento antígeno-anticorpo, ensaios em cultura celular são mais vantajosos, pois avaliam de forma direta a ação das moléculas. Mais de 60 testes *in vitro* já foram validados como métodos alternativos e alguns deles já são comumente utilizados, como o teste de irritação ocular, teste de corrosão da pele e fototoxicidade, todos eles realizados em cultura celular (KANDAROVÁ e LETASIOVÁ, 2011).

Considerando os venenos de serpente, nosso grupo demonstrou significativa correlação entre métodos *in vitro* e *in vivo*. A atividade letal do veneno, por exemplo, correlacionou-se com a atividade hialuronidásica realizada *in vitro*. De forma similar, a atividade edematogênica dos venenos botrópicos apresentou elevado coeficiente de correlação com a atividade fosfolipásica, enquanto que a atividade necrótica demonstrou correlação significativa com a atividade de LAAO. Além disso, esses resultados corroboram dados existentes na literatura que podem explicar as relações existentes entre as enzimas avaliadas e os efeitos tóxicos observados após o envenenamento (DE SOUZA *et al.*, 2015). Além disso, a habilidade dos antivenenos em reduzir a citotoxicidade causada por venenos elapídicos já foi demonstrada através de ensaios em linhagens de células musculares (KALAN *et al.*, 2011; MENDEZ *et al.*, 2011). Ratanabanangkoon e colaboradores (2017) desenvolveram um ensaio *in vitro* para determinação da potência de antivenenos contra o veneno da serpente *Naja kaouthia*. Esse método é

baseado na ligação ao receptor nicotínico de acetilcolina e apresentou alto coeficiente de correlação com o ensaio realizado *in vivo* ( $R^2 = 0.98$ ). Entretanto, como essa metodologia avalia a ligação das neurotoxinas ao receptor, ela é restrita aos venenos neurotóxicos, não sendo, portanto, adequada ao estudo dos venenos de viperídeos. A metodologia proposta aqui seria adequada, pois utiliza um tipo celular acometido no envenenamento botrópico que, conseqüentemente, pode refletir os efeitos tóxicos desencadeados por essas peçonhas.

As células Vero, linhagem de escolha para a realização desse estudo, foram adequadas para a realização dos ensaios de neutralização da citotoxicidade, uma vez que refletiram a potência pré-determinada dos soros. Esse tipo celular foi previamente utilizado para avaliar a neutralização dos efeitos tóxicos do veneno de *Naja naja* pelo antiveneno produzido contra diferentes proteínas dessa peçonha. Os resultados demonstraram que o soro protegeu as células dos efeitos tóxicos, corroborando as observações *in vivo*, o que reforça o potencial dessa célula como modelo (VENKATESAN *et al.*, 2014). Além disso, Araújo (2008) desenvolveu um ensaio para avaliar a inibição da citotoxicidade do veneno de *B. jararaca* pelo antiveneno anti-botrópico utilizando a mesma linhagem celular e encontrou significativa correlação entre os métodos *in vitro* e *in vivo*. Entretanto, a repetibilidade entre os ensaios apresentou elevado coeficiente de variação e, portanto, o método não foi padronizado. Além disso, a metodologia empregada para quantificação do efeito citotóxico foi baseada na densidade ótica do corante Azul Brilhante de Comassie eluído após contato com as células. Dessa forma, a detecção da viabilidade celular foi uma medida indireta, baseada no conteúdo proteico das células, uma vez que o corante se liga às proteínas (MARGIS e BOROJEVIC, 1989). O Alamar Blue, por sua vez, reagente de escolha do presente estudo, é uma medida direta do metabolismo celular e, conseqüentemente, proporciona resultados mais acurados e com maior sensibilidade (RAMPERSAD, 2012).

A morfologia das células foi observada para análise da resposta celular frente a diferentes tratamentos, com o objetivo de avaliar se além de alterações metabólicas também ocorriam alterações na morfologia celular. As células tratadas com veneno pré-incubado com soro de alta potência mantiveram a

integridade da monocamada celular. Por outro lado, os soros de baixa potência não foram eficazes em proteger as células dos efeitos citotóxicos do veneno, uma vez que ocorreram alterações na monocamada, com consequente retração da borda das colônias. Características como retração celular e alterações na monocamada podem estar relacionadas a danos nas junções intercelulares. Essas junções são componentes importantes que auxiliam na adesão e comunicação celular (BRUCKNER e JANSHOFF, 2018). Dessa forma, a manutenção da monocamada pode ser um indicativo de homeostase tecidual, o que pode refletir as alterações que ocorrem no órgão como um todo. Em suma, os efeitos observados na microscopia, juntamente com os dados dos ensaios de neutralização da citotoxicidade, fundamentam a utilização do ensaio de viabilidade como método alternativo ao ensaio de neutralização da letalidade realizado *in vivo* para determinação da potência pré-clínica dos antivenenos.

Como mencionado anteriormente, no protocolo convencional para análise da eficácia pré-clínica dos soros, os mesmos são pré-incubados por 30 minutos com o veneno referência e após esse período a mistura é inoculada nos camundongos (WHO, 2016). Entretanto, alguns autores têm questionado essa abordagem e têm utilizado uma estratégia, conhecida como “*rescue-type*”, baseada na inoculação do veneno independentemente do antiveneno. Ou seja, os animais recebem primeiramente uma dose letal de veneno, seguida pela administração intravenosa do antiveneno, o que mimetiza melhor as reais condições de um envenenamento, no qual a vítima leva algum tempo para chegar até o hospital e receber o tratamento (GUTIÉRREZ *et al.*, 2013).

Diante disso, a capacidade do soro antibotrópico comercial em neutralizar os efeitos locais de diferentes venenos botrópicos foi avaliada. Primeiramente, a ação tóxica de diferentes venenos de serpentes do gênero *Bothrops* foi analisada em queratinócitos (HaCat), tipo celular afetado durante o envenenamento local. Os venenos testados foram aqueles que fazem parte do *pool* botrópico para imunização e observou-se que a toxicidade do veneno varia de acordo com a espécie. Comparativamente, os venenos de *B. neuwiedi* e *B. moojeni* foram os mais citotóxicos, enquanto que o veneno de *B. alternatus* só apresenta citotoxicidade em concentrações maiores do que 80 µg/mL.

Delafontaine e colaboradores (2017) também utilizaram essa linhagem celular para estudo dos efeitos locais e observaram que o veneno de *B. jararaca* reduz de forma significativa a viabilidade das células tratadas, assim como observado no presente trabalho. Além disso, a citotoxicidade dos venenos variou frente à mesma linhagem celular. Ou seja, os efeitos tóxicos desencadeados nas células apresentaram variação interespecífica, o que corrobora outros dados encontrados na literatura (DE SOUZA *et al.*, 2015; BUSTILLO *et al.*, 2009; JORGE *et al.*, 2011).

Diferentes fatores podem interferir na composição dos venenos, tais como filogenia, sexo, distribuição geográfica, estação do ano, idade e alimentação, o que pode explicar essa variação de toxicidade encontrada entre as espécies (CHIPPAUX; WILLIAMS; WHITE, 1991). Os venenos botrópicos também apresentam elevada variabilidade, tanto em relação ao conteúdo proteico, quanto às atividades tóxicas que desencadeiam. Além disso, essas diferenças interespecíficas também podem interferir na capacidade neutralizante dos antivenenos (QUEIROZ *et al.*, 2008; CAMEY; VELARDE; SANCHEZ, 2002). Também é importante ressaltar que apesar da eficácia do antiveneno em neutralizar os efeitos sistêmicos do envenenamento, os soros não são tão eficazes no controle do dano tecidual, principalmente quando a administração do soro é tardia (GUTIERREZ; LEÓN; BURNOUF, 2011). Esses efeitos ocorrem no local da mordida, rapidamente após a inoculação do veneno. Dessa forma, no momento em que os anticorpos atingem o fluido intersticial, os efeitos patológicos do veneno já foram iniciados (GUTIERREZ; LEÓN; LOMONTE, 2003).

Diante disso, com o objetivo de avaliar a capacidade do soro antibotrópico comercial em neutralizar os efeitos locais de diferentes venenos botrópicos, queratinócitos foram utilizados. O soro comercial produzido pela FUNED foi avaliado quanto à sua potência utilizando o ensaio de viabilidade celular. Além do veneno considerado referência nacional (*B. jararaca*), o antiveneno também foi testado frente aos venenos de *B. alternatus*, *B. jararacussu*, *B. neuwiedi* e *B. moojeni*, a fim de avaliar sua capacidade neutralizante frente aos diferentes venenos que compõem o *pool* antigênico. Para isto, 5 x EC<sub>50</sub> de cada um dos venenos foi adicionado às células e, após diferentes períodos, o antiveneno foi

administrado. O soro foi mais eficaz em neutralizar a citotoxicidade do veneno de *B. jararaca* do que dos venenos de *B. jararacussu*, *B. neuwiedi* e *B. moojeni*. Isso pode ser explicado pela maior contribuição do veneno de *B. jararaca* (50%) no *pool* antigênico utilizado no protocolo de imunização, do que dos demais venenos que correspondem a apenas 12,5% cada um (ANVISA, 1996).

Adicionalmente, o veneno de *B. alternatus* não foi neutralizado em nenhuma das condições testadas. De Roodt e colaboradores (2011) avaliaram as atividades tóxicas de venenos de espécimes de *B. alternatus*, provenientes de diferentes localidades, e observaram que a toxicidade dos venenos varia de acordo com a localidade. Além disso, a potência neutralizante do antiveneno não foi a mesma frente às diferentes amostras, demonstrando que a eficácia neutralizante do soro pode variar de acordo com a região em que a serpente foi coletada. Outro ponto relevante está relacionado com a composição do veneno. O proteoma de *B. alternatus* demonstra que o mesmo é composto apenas por proteínas ácidas e predominam metaloproteases e serinoproteases (78%). Em comparação a outros venenos do gênero *Bothrops*, existe grande variação no conteúdo das principais famílias de proteínas, o que também pode influenciar a eficácia neutralizante do antiveneno antitropical (OHLER *et al.*, 2010).

Outros estudos também demonstram a ineficácia dos antivenenos em neutralizar os efeitos locais de venenos botrópicos. Soros provenientes de diferentes instituições produtoras não inibem totalmente a miotoxicidade desencadeada pelo veneno de *B. jararacussu* em camundongos, quando a administração das amostras ocorre de forma independente (DA SILVA *et al.*, 2007). Da mesma maneira, soro antitropical polivalente também não é capaz de neutralizar a atividade edematogênica e hiperalgesia desencadeadas pelo veneno de *B. jararaca* (CHACUR *et al.*, 2002). Em contrapartida, com o objetivo de contornar os problemas associados à pobre eficácia dos antivenenos em neutralizar o dano local, alguns autores têm proposto a injeção de potentes inibidores enzimáticos, com alta capacidade de difusão, a fim de complementar a imunoterapia (GUTIERREZ e RUCAVADO, 1999).

Outro importante fator relacionado ao êxito dos antivenenos é o tempo. Quanto maior o período entre a ocorrência do envenenamento e o tratamento,



maior é a severidade do quadro. Uma análise realizada com mais de 140 mil casos de acidentes ofídicos demonstrou que a maior parte dos pacientes que receberam tratamento rapidamente apresentou quadro de envenenamento leve ou moderado. Entretanto, quando a terapia foi realizada 6 horas ou mais após o acidente, os pacientes desenvolveram um quadro de envenenamento grave, ao contrário daqueles que receberam o soro antecipadamente (MISE; LIRA-DA-SILVA; CARVALHO, 2018). Os ensaios de neutralização da citotoxicidade corroboram essas observações, uma vez que a nível celular o soro antibotrópico comercial foi capaz de inibir os efeitos da maioria dos venenos botrópicos apenas em períodos inferiores a 6 horas. Após esse intervalo de tempo o antiveneno não foi tão eficaz em reverter a toxicidade dos venenos e a viabilidade das células foi significativamente reduzida. Dessa forma, a neutralização tempo-dependente da citotoxicidade pode estar relacionada com o aumento da severidade evidenciado por Mise e colaboradores (2018), indicando, novamente, uma correlação entre estudos *in vitro* e *in vivo*. Essas observações são de extrema valia para se determinar o prognóstico do paciente e, conseqüentemente, propor intervenções terapêuticas mais adequadas, que levem em consideração todos os fatores envolvidos no envenenamento.

# **Conclusões**

## 6. CONCLUSÕES

O presente estudo propõe um método *in vitro*, que utiliza a linhagem celular Vero, para avaliação da eficácia de antivenenos antibotrópicos em neutralizar a citotoxicidade do veneno de *B. jararaca*. O ensaio demonstrou ser adequado para a determinação da capacidade neutralizante de antivenenos, uma vez que foi capaz de diferenciá-los de acordo com sua potência. Dessa forma, a metodologia apresenta potencial para ser utilizada como alternativa ao ensaio convencional, realizado *in vivo*, na análise da potência dos antivenenos durante os ciclos de imunização. Além disso, o ensaio de viabilidade celular também foi utilizado para análise da eficácia dos soros em neutralizar os efeitos locais do envenenamento, o que pode auxiliar no estudo de terapias mais eficazes e baseadas no prognóstico do paciente, assim como na determinação do momento adequado para a administração do antiveneno. Esse trabalho fornece dados que reforçam a possibilidade de se reduzir o número de animais utilizados durante a produção dos soros antibotrópicos, seguindo a tendência mundial de substituição da experimentação animal.

# **Perspectivas**

## 7. PERSPECTIVAS

- Testar um maior número de soros antibotrópicos de diferentes potências pré-determinadas para validação do ponto de corte estabelecido;
- Testar venenos de diferentes gêneros de animais peçonhentos e seus respectivos soros utilizando o ensaio de neutralização da citotoxicidade;
- Realizar testes de neutralização da citotoxicidade *in loco* na Fundação Ezequiel Dias;
- Realizar os ensaios do tipo “*rescue-type*” utilizando a linhagem celular Vero.

# Referências

## 8. REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA); **Normas de produção e controle de qualidade de soros antiofídicos**. Portaria nº 174 de 11 de Novembro de 1996.

ALAPE-GIRÓN, A. *et al.* **A comparison of *in vitro* methods for assessing the potency of therapeutic antisera against the venom of the coral snake *Micrurus nigrocinctus***. *Toxicon*; v. 35, p. 573-581, 1997.

AMORIM, F. G. *et al.* **New findings from the first transcriptome of the *Bothrops moojeni* snake venom gland**. *Toxicon*; v. 140, p. 105-117, 2017.

ARAÚJO, Humbert Pinheiro. **Avaliação da metodologia oficial *in vivo* e desenvolvimento de metodologia de inibição da citotoxicidade *in vitro* para a determinação da potência do soro antibotrópico**. 2008. 200f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2008.

BARBOSA, C. F., *et al.* **Determination of the neutralizing potency of horse antivenom against bothropic and crotalic venoms by indirect enzyme immunoassay**. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*; v. 28, p. 1077-1080, 1995.

BATALHA, Elias; **Uso de animais em pesquisa abrange desafios éticos e compromisso com novas tecnologias**. *Revista Radis*, Fevereiro de 2017. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/noticia/uso-de-animais-em-pesquisa-abrange-desafios-eticos-e-compromisso-com-novas-tecnologias>. Acesso em: 17 de maio de 2019.

BERNARDES-OLIVEIRA, E., *et al.* ***Bothrops jararaca* and *Bothrops erythromelas* Snake Venoms Promote Cell Cycle Arrest and Induce Apoptosis via the Mitochondrial Depolarization of Cervical Cancer Cells**. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*; v. 2016, p. 1-9, 2016.

BOCHE, R.; RUSSELL, F. **Passive hemagglutination studies with snake venom and antivenin**. *Toxicon*; v. 6, p. 125-130, 1968.

BRUCKNER, B. R.; JANSHOFF, A. **Importance of integrity of cell-cell junctions for the mechanics of confluent MDCK II cells.** Scientific Reports; v. 8, p. 1-11, 2018.

BUCARETCHI, F. *et al.* **Coral snake bites (*Micrurus spp.*) in Brazil: a review of literature reports.** Clinical Toxicology; v. 54, p. 222-234, 2016.

BUSTILLO, S., *et al.* **Cytotoxicity and morphological analysis of cell death induced by *Bothrops* venoms from the northeast of Argentina.** J Venom Anim Toxins incl Trop Dis; v. 15, p. 28-42, 2009.

CALVETE, J. J.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. **Snake venomomics. Strategy and applications.** Journal of Mass Spectrometry; v. 42, p. 1405-1414, 2007.

CAMEY, K. U.; VELARDE, D. T.; SANCHEZ, E. F. **Pharmacological characterization and neutralization of the venoms used in the production of Bothropic antivenom in Brazil.** Toxicon; v. 40, p. 501-509, 2002.

CARONE, S. E. I. *et al.*; **A new L-amino acid oxidase from *Bothrops jararacussu* snake venom: isolation, partial characterization, and assessment of pro-apoptotic and antiprotozoal activities.** International Journal of Biological Macromolecules; v. 103, p. 25-35, 2017.

CARRASCO, P. A. *et al.* **Nomenclatural instability in the venomous snakes of the *Bothrops* complex: Implications in toxinology and public health.** Toxicon; v. 119, p. 122-128, 2016.

CASTANHEIRA, L. E. *et al.*; **Angiogenic effects of BpLec, a C-type lectin isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom.** International Journal of Biological Macromolecules; v.102, p. 153-161, 2017.

CHACUR, G. P. M., *et al.* **Evaluation of antivenoms in the neutralization of hyperalgesia and edema induced by *Bothrops jararaca* and *Bothrops asper* snake venoms.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research; v. 35, p. 1221-1228, 2002.

CHIPPAUX, Jean-Phillippe. **Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease!** Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases; v. 23:38, p. 1-2, 2017.



CHIPPAUX, Jean-Phillippe. **Epidemiology of envenomations by terrestrial venomous animals in Brazil based on case reporting: from obvious facts to contingencies.** Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases; v, 21:13, p. 1-17, 2015.

CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. **Snake venom variability: methods of study, results and interpretation.** Toxicon; v. 29, p. 1279-1303, 1991.

CLARK, M.; STEGER-HARTMANN, T. **A big data approach to the concordance of the toxicity of pharmaceuticals in animals and humans.** Regulatory Toxicology and Pharmacology; v. 96, p. 94-105, 2018.

CLINICAL TOXINOLOGY RESOURCES (WCH). **Overview of snake taxonomy, 2018.** Disponível em: <http://www.toxinology.com/fusebox.cfm?staticaction=snakes/ns-sntaxon.htm%3E>. Acesso em: 17 de maio de 2019.

COSTAL-OLIVEIRA, F. *et al*; **L-amino acid oxidase from *Bothrops atrox* snake venom triggers autophagy, apoptosis and necrosis in normal human keratinocytes.** Scientific Reports; v. 9:781, p. 1-14, 2019.

CRUZ, L. S.; VARGAS, R.; LOPES, A. A. **Snakebite envenomation and death in the developing world.** Ethnicity & Disease; v. 19, p. 42-46, 2009.

DAMICO, D. C. S. *et al*. **Cytotoxicity of *Lachesis muta muta* snake (bushmaster) venom and its purified basic phospholipase A<sub>2</sub>(LmTX-I) in cultured cells.** Toxicon; v. 49, p. 678-692, 2007.

DA SILVA, N. M. V., *et al*. **Evaluation of three Brazilian antivenom ability to antagonize myonecrosis and hemorrhage induced by *Bothrops* snake venoms in a mouse model.** Toxicon; v. 50, p. 196-205, 2007.

DELAFONTAINE, M., *et al*. **Enzymatic and Pro-Inflammatory Activities of *Bothrops lanceolatus* Venom: Relevance for Envenomation.** Toxins; v. 9, p. 1-19, 2017.

DE MORAIS, I. C. O., *et al*. ***Bothrops leucurus* venom induces nephrotoxicity in the isolated perfused kidney and cultured renal tubular epithelia.** Toxicon; v. 61, p. 38-46, 2013.

DE ROODT, A. R., *et al.* **Neutralization of *Bothrops alternatus* regional venom pools and individual venoms by antivenom: A systematic comparison.** *Toxicon*; v. 57, p. 1073-1080, 2011.

DE SOUZA, L. L. *et al.* **Determination of Toxic Activities in *Bothrops* spp. Snake Venoms Using Animal-Free Approaches: Correlation Between *In Vitro* Versus *In Vivo* Assays.** *Toxicological Sciences*; v. 147, p. 458-465, 2015.

DE SOUZA, R. C. G. *et al.* **The Enigma of the North Margin of the Amazon River: Proven *Lachesis* Bites in Brazil, Report of Two Cases, General Considerations about the Genus and Bibliographic Review.** *Chicago Herpetological Society Bulletin*; v. 42, p. 105-115, 2007.

DOKE, S. K.; DHAWALE, S. C.; **Alternatives to animal testing: A review.** *Saudi Pharmaceutical Journal*; v. 23, p. 223-229, 2015.

EBLE, Johannes A. **Structurally Robust and Functionally Highly Versatile—C-Type Lectin (-Related) Proteins in Snake Venoms.** *Toxins*; v. 136, p. 1-25, 2019.

ESTEVIÃO-COSTA, M. I. *et al.* **Neutralization of toxicological activities of medically-relevant *Bothrops* snake venoms and relevant toxins by two polyvalent Bothropic antivenoms produced in Peru and Brazil.** *Toxicon*; v. 122, p. 67-77, 2016.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. **Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity.** *FEBS Journal*; v. 275, p. 3016-3030, 2008.

FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS (FUNED). **Guia de bolso animais peçonhentos.** Belo Horizonte, Março de 2015. Disponível em: <http://abracit.org.br/wp/principal/wp-content/uploads/2016/10/Guia-de-Bolso-Animais-Pe%C3%A7onhentos-Digital.pdf>. Acesso em: 17 de maio de 2019.

GASANOV, S. E.; DAGDA, R. K.; RAEL, E. D. **Snake Venom Cytotoxins, Phospholipase A<sub>2</sub>s, and Zn<sup>2+</sup>-dependent Metalloproteinases: Mechanisms**

**of Action and Pharmacological Relevance.** Journal of Clinical Toxicology; v. 4(1), p. 1-34, 2014.

GOIS, P. H. F. *et al.* **Allopurinol attenuates acute kidney injury following *Bothrops jararaca* envenomation.** PLoS Neglected Diseases; v. 11, p. 1-15, 2017.

GONÇALVES-MACHADO, L. *et al.* **Combined venomomics, venom gland transcriptomics, bioactivities, and antivenomics of two *Bothrops jararaca* populations from geographic isolated regions within the Brazilian Atlantic rainforest.** Journal of Proteomics; v. 135, p. 73-89, 2016.

GUERRA-DUARTE, C., *et al.* **Partial *in vitro* analysis of toxic and antigenic activities of eleven Peruvian pitviper snake venoms.** Toxicon; v. 108, p. 84-96, 2015.

GUTIÉRREZ, José Maria. **Global Availability of Antivenoms: The Relevance of Public Manufacturing Laboratories.** Toxins; v. 11, p. v. 1-13, 2018.

GUTIÉRREZ, José Maria. **Preclinical assessment of the neutralizing efficacy of antivenoms in Latin America and the Caribbean: A review.** Toxicon; v. 146, p. 138-150, 2018.

GUTIÉRREZ, J. M. *et al.* **Preclinical Evaluation of the Efficacy of Antivenoms for Snakebite Envenoming: State-of-the-Art and Challenges Ahead.** Toxins; v. 9, p. 1-22, 2017.

GUTIÉRREZ, J. M. *et al.* **Snakebite envenoming.** Nature reviews; v. 3, p. 1-20, 2017.

GUTIÉRREZ, J. M. *et al.* **Hemorrhage Caused by Snake Venom Metalloproteinases: A Journey of Discovery and Understanding.** Toxins; v. 93, p. 1-19, 2016.

GUTIÉRREZ, J. M. *et al.* **Assessing the preclinical efficacy of antivenoms: From the lethality neutralization assay to antivenomics.** Toxicon; v. 69, p. 168-179, 2013.

GUTIÉRREZ, J. M. *et al.* **Antivenoms for Snakebite Envenomings.** Inflammation & Allergy – Drug targets ; v. 10, p. 369-380, 2011.

GUTIÉRREZ, J. M.; LEÓN, G.; BURNOUF, T. **Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: The road ahead.** *Biologicals*, v. 39, p. 129-142, 2011.

GUTIÉRREZ, J. M. *et al.* **Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach.** *Toxicon* ; v. 56, p. 1223-1235, 2010.

GUTIÉRREZ, J. M.; LEÓN, G.; LOMONTE, B. **Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Relationships of Immunoglobulin Therapy for Envenomation.** *Clin Pharmacokinet*; v. 42, p. 721-741, 2003.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A. **Metalloproteinase inhibitors in snakebite envenomations.** *Profiles*; v. 4, p. 532 e 533, 1999.

HARRISON, R. A. *et al.* **Snake Envenoming: A Disease of Poverty.** *PLoS Neglected Tropical Diseases*; v. 3, p. 1-6, 2009.

HSIANG, A. Y. *et al.* **The origin of snakes: revealing the ecology, behavior, and evolutionary history of early snakes using genomics, phenomics, and the fossil record.** *BMC Evolutionary Biology*; v. 15, p. 1-22, 2015.

INSTITUTO CLODOMIRO PICADO. **Determinación de actividades tóxicas de venenos de serpientes y su neutralización por antivenenos.** Universidad de Costa Rica, Facultad de Microbiología, 2007.

IZIDORO, L. F. M. *et al.*; **Snake Venom L-Amino Acid Oxidases: Trends in Pharmacology and Biochemistry.** *BioMed Research International*; v. 2014, p. 1-19, 2014.

JORGE, R. J. B., *et al.* **Differences between renal effects of venom from two *Bothrops jararaca* populations from southeastern and southern Brazil.** *Toxicon*; v. 125, p. 84-90, 2017.

JORGE, R. J. B., *et al.* ***In vitro* studies on *Bothrops* venoms cytotoxic effect on tumor cells.** *Journal of Experimental Therapeutics and Oncology*; v. 9, p. 249-253, 2011.

JUNGHANSS, T.; BODIO, M. **Medically Important Venomous Animals: Biology, Prevention, First Aid, and Clinical Management.** *Clinical Infectious Diseases*; v. 43, p. 1308-17, 2006.

KALAN, Y., *et al.* **Validation of a cell-based assay to differentiate between the cytotoxic effects of elapid snake venoms.** Journal of Pharmacological and Toxicological Methods; v. 63, p. 137-142, 2011.

KANDÁROVÁ, H.; LETASIOVÁ, S. **Alternative methods in toxicology: pre-validated and validated methods.** Interdisciplinary Toxicology; v. 4, p. 107-113, 2011.

KANG, T. S. *et al.* **Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis.** FEBS Journal; v. 278, p. 4544-4576, 2011.

KROEMER, G., *et al.* **Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death.** Cell Death and Differentiation; v. 12, p. 1463-1467, 2005.

LEÓN, G. *et al.* **Pathogenic mechanisms underlying adverse reactions induced by intravenous administration of snake antivenoms.** Toxicon, v. 76, p. 63-76, 2013.

LOMONTE, B. *et al.* **Venoms of *Micrurus* coral snakes: evolutionary trends in compositional patterns emerging from proteomic analyses.** Toxicon; v., 122, p. 7-25, 2016.

LOWRY, O. H. *et al.* **Protein measurement with the Folin Phenol reagent.** The Journal of Biological Chemistry; v. 193, p. 265-275, 1951.

MADUWAGE, K. *et al.* **Efficacy of Indian polyvalent snake antivenoms against Sri Lankan snake venoms: lethality studies or clinically focussed *in vitro* studies.** Scientific Reports; v. 6, p. 1-11, 2016.

MALAUQUE, C. M. S.; GUTIÉRREZ, J. M.; **Snakebite Envenomation in Central and South America,** In: [s.l.] Critical Care Toxicology, 2016.

MARGIS, R.; BOROJEVIC, R. **Quantification of Attached Cells in Tissue Culture Plates and on Microcarriers.** Analytical Biochemistry; v. 181, p. 209-211, 1989.

MARIA, W. S., *et al.* **Localization of epitopes in the toxins of *Tityus serrulatus* scorpions and neutralizing potential of therapeutic antivenoms.** Toxicon, v. 46, p. 210-217, 2005.

MARIA, W. S. *et al.* **Neutralizing potency of horse antiotherapeutic antivenom. Correlation between *in vivo* and *in vitro* methods.** *Toxicon*; v. 36, p. 1433-1439, 1998.

MARTINS, M.; MARQUES, O. A. V.; SAZIMA, I. **Ecological and phylogenetic correlates of feeding habitats in neotropical pitvipers of genus *Bothrops*.**

MENDEZ, I., *et al.* **Comparative study of the cytolytic activity of snake venoms from African spitting cobras (*Naja* spp., Elapidae) and its neutralization by a polyspecific antivenom.** *Toxicon*; v. 58, p. 558-564, 2011.

MISE, Y. F.; LIRA-DA-SILVA, R. M.; CARVALHO, F. M. **Time to treatment and severity of snake envenoming in Brazil.** *Revista Panamericana de Salud Pública*; v. 42, p. 1-13, 2018.

MOUSTAFA, I. M. *et al.*; **Crystal Structure of LAAO from *Calloselasma rhodostoma* with L- Phenylalanine Substrate: Insights into Structure and Mechanism.** *Journal of Molecular Biology*; v. 364 (5), p. 991-1002, 2006.

MUSHTAQ, S.; DAS, Y. K.; AKSOY, A. **Alternative Methods to Animal Experiments.** *Turkiye Klinikleri J Med Sci*; v. 38, p. 161-170, 2018.

NICOLAU, A. C. *et al.* **An in-depth snake venom proteopectidome characterization: Benchmarking *Bothrops jararaca*.** *Journal of Proteomics*; v. 16, p. 214-231, 2016.

OHLEER, M., *et al.* **The Venomics of *Bothrops alternatus* is a Pool of Acidic Proteins with Predominant Hemorrhagic and Coagulopathic Activities.** *Journal of Proteome*; v. 9, p. 2422-2437, 2010.

OLIVEIRA, J. C. R., *et al.* **Toxicity of South American snake venoms measured by an *in vitro* cell culture assay.** *Toxicon*; v. 40, p. 321-325, 2002.

PETRAS, D. *et al.* **Snake Venomics of African Spitting Cobras: Toxin Composition and Assessment of Congeneric Cross-Reactivity of the Pan-African EchiTAB-Plus-ICP Antivenom by Antivenomics and Neutralization Approaches.** *Journal of Proteome*; v. 10, p. 1266-1280, 2011.

POUGH, F. *et al.* **A vida dos vertebrados, 4ª edição.** São Paulo: Atheneu, 2008.

PINTO, C. C.; LEMA, T. **Comportamento alimentar e dieta de serpentes, gêneros Boiruna e Clelia (Serpentes, Colubridae)**. Iheringia, Sér. Zool.; v. 92, p. 9-19, 2002.

QUEIROZ, G. P., *et al.* **Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus**. Toxicon; v. 52, p. 842-851, 2008.

RAMPERSAD, SEPHRA N. **Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays**. Sensors; v. 12, p. 12347-12360, 2012.

RATANABANANGKON, K., *et al.* **A novel *in vitro* potency assay of antisera against Thai *Naja kaouthia* based on nicotinic acetylcholine receptor binding**. Scientific Reports; v. 7, p. 1-8, 2017.

RIBEIRO, P. H., *et al.* **Mechanism of the cytotoxic effect of l-amino acid oxidase isolated from *Bothrops alternates* snake venom**. International Journal of Biological Macromolecules; v. 92, p. 329-337, 2016.

RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L.; **The Principles of Humane Experimental Technique**. London: Methuen & Co, 1959. Disponível em: [http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane\\_exp/het-toc](http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/het-toc). Acesso em: 17 de maio de 2019.

SAMAH, S. *et al.*; **Purification and characterization of Cc-Lec, C-type lactose-binding lectin: A platelet aggregation and blood-clotting inhibitor from *Cerastes cerastes* venom**. International Journal of Biological Macromolecules; v. 102, p. 336-350, 2017.

SANCHEZ, E. F. *et al.* **Direct Fibrinolytic Snake Venom Metalloproteinases Affecting Hemostasis: Structural, Biochemical Features and Therapeutic Potential**. Toxins; v. 392, p. 1-18, 2017.

SANTORO, M. L. *et al.*; **Haematological evaluation of patients bitten by the jararaca, *Bothrops jararaca*, in Brazil**. Toxicon; v. 51, p. 1440-1448, 2008.

SARTIM, M. A. *et al.*; **Structural and binding studies of a C-type galactose-binding lectin from *Bothrops jararacussu* snake venom**. Toxicon; v. 126, p. 59-69, 2017.

SELLS, Paula G.; **Animal experimentation in snake venom research and *in vitro* alternatives.** *Toxicon*; v. 23, p. 115-133, 2003.

SENISE, L. V.; YAMASHITA, K. M.; SANTORO, M. L. ***Bothrops jararaca* envenomation: Pathogenesis of hemostatic disturbances and intravascular hemolysis.** *Experimental Biology and Medicine*; v. 240, p. 1528-1536, 2015.

SERRANO, Solange M. T. **The long road of research on snake venom serine proteinases.** *Toxicon*; v. 62, p. 19-26, 2013.

SHARMA, B.; JAIN, R. **Right choice of a method for determination of cut-off values: A statistical tool for a diagnostic test.** *Asian Journal of Medical Sciences*; v. 5, p. 30-34, 2014.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO (SINAN). **Acidentes por animais peçonhentos – notificações registradas no Brasil, 2016.** Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def>. Acesso em: 17 de maio de 2019.

SOUSA, L. F. *et al.* **Functional proteomic analyses of *Bothrops atrox* venom reveals phenotypes associated with habitat variation in the Amazon.** *Journal of Proteomics*; v. 21, p. 32-46, 2017.

STEPHANO, M. A. *et al.* **The improvement of the therapeutic *anti-Lachesis muta* serum production in horses.** *Toxicon*; v. 45, p. 467-473, 2005.

STRANSKY, S., *et al.* ***In vitro* assessment of cytotoxic activities of *Lachesis muta muta* snake venom.** *PloS Neglected Tropical Diseases*; v. 12, p. 1-17, 2018.

THEAKSTON, R. D. G.; WARRELL, D. A.; GRIFFITHS, E. **Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms.** *Toxicon*; v. 41, p. 541-557, 2003.

VENKATESAN, C., *et al.* **Neutralization of cobra venom by cocktail antiserum against venom proteins of cobra (*Naja naja naja*).** *Biologicals*; v. 42, p. 8-21, 2014.



WARRELL, David A. **Venomous Bites, Stings, and Poisoning: An Update**. Infect Dis Clin N Am; v. 33, p. 17-38, 2019.

WARRELL, David A. **Venomous Bites, Stings, and Poisoning**. Infect Dis Clin N Am; v. 26, p. 207–223, 2012.

WHITE, Julian. **Venomous animals: clinical toxicology**. Molecular, Clinical and Environmental Toxicology; v. 2, p. 233-291, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Snakebite envenoming**. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming>. Acesso em: 17 de maio de 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION; **WHO Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins**. Genebra, Outubro de 2016.

XIAO, H. *et al.* **Snake Venom PLA<sub>2</sub>, a Promising Target for Broad-Spectrum Antivenom Drug Development**. BioMed Research International; v. 2017, p. 1-10, 2017.

XIONG, S.; HUANG, C. ; **Synergistic strategies of predominant toxins in snake venoms**. Toxicology Letters; v. 287, p. 142-154, 2018.

ZELANIS, A. *et al.* **Snake venom serine proteinases specificity mapping by proteomic identification of cleavage sites**. Journal of Proteomics; v. 113, p. 260-267, 2015.

# **Anexos**

## 9. ANEXOS

**Anexo 1:** Artigo publicado durante o período do Mestrado, intitulado “*In vitro* assessment of cytotoxic activities of *Lachesis muta muta* snake venom”, publicado em Abril de 2018, na revista PloS Neglected Tropical Diseases. Autores: Stransky, Stephanie; Costal-Oliveira, Fernanda; **Lopes-de-Souza, Letícia**; Guerra-Duarte, Clara; Chávez-Olórtegui, Carlos; Braga, Vânia Maria Martin.

**Anexo 2:** Artigo publicado durante o período do Mestrado, intitulado “Proteomic profile, biological activities and antigenic analysis of the venom from *Bothriopsis bilineata smaragdina* (-loro machaco-), a pitviper snake from Peru”, publicado em Julho de 2018, na revista Journal of Proteomics. Autores: Rodrigues, Carolina Rego; Teixeira-Ferreira, André; Vargas, Frey Francisco Romero; Guerra-Duarte, Clara; Costal-Oliveira, Fernanda; Stransky, Stephanie; **Lopes-de-Souza, Letícia**; Dutra, Alexandre Augusto Assis; Yarlequé, Armando; Bonilla, César; Sanchez, Eladio Flores; Perales, Jonas; Chávez-Olórtegui, Carlos.