

Wany Selena Maria

**AVALIAÇÃO E CORRELAÇÃO DE ENSAIOS *IN VITRO* E
IN VIVO DE ANTIVENENOS BOTRÓPICOS.**

**Dissertação apresentada à Escola de
Veterinária da Universidade Federal
de Minas Gerais, como requisito
parcial para obtenção do grau de
mestre em Medicina Veterinária.**

**Área de Concentração: Medicina
Veterinária Preventiva**

Orientador: Prof. José Oswaldo Costa

**Belo Horizonte
UFMG - Escola de Veterinária
1998**

M332a Maria, Wany Selena, 1960-

Avaliação e correlação de ensaios in vitro e in vivo de antivenenos botrópicos / Wany Selena Maria. - Belo Horizonte: UFMG - Escola de Veterinária, 1998.

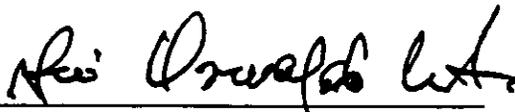
100p.: il.

Dissertação (Mestrado)

1. Teste imunoenzimático - Teses. 2. Antivenenos - Teses. 3. Fosfolipase - Teses. I. Título.

CDD - 636.089 607 9

Dissertação defendida e aprovada em 03/03/98, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. José Oswaldo Costa
Orientador



Prof. Elvio Carlos Moreira



Dr. David Toledo Velarde



Prof. Andrey Pereira Lage



Prof. Romário Cerqueira Leite

AGRADECIMENTOS

A Deus, por esta passagem.

Ao grande mestre, Vô Geraldo, pelos ensinamentos mais nobres de amor, honestidade e trabalho.

Ao professor José Oswaldo Costa pela orientação e valiosa contribuição em minha formação científica e pessoal.

Ao Carlos Chavez Olórtegui pelo amor, pelo incentivo, orientação e acompanhamento à minha carreira científica, pelos ensinamentos e sobretudo pela compreensão e presença constantes.

A minha família pela paciência, estímulo e carinho.

Ao Centro de Pesquisa e Produção de Imunobiológicos-CPPI do Paraná pela oportunidade de realização deste trabalho e pelos conhecimentos adquiridos.

A Fundação Ezequiel Dias- FUNED pela oportunidade profissional, pelo incentivo e permissão de crescimento na minha carreira.

Aos funcionários do CPPI e FUNED pela amizade, colaboração e contribuição para realização deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Patologia Básica da UFPr, pelo auxílio, disponibilidade e ensinamentos.

Aos professores da Escola de Veterinária e do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG pelos conhecimentos adquiridos.

Ao Dr. José Maria Gutiérrez pelo exemplo de pesquisador e cientista, pela dedicação ao trabalho, pela simplicidade pessoal e pela orientação valiosa na realização deste trabalho.

Ao Prof. João Paulo Hadad pela disponibilidade no auxílio estatístico e execução de figuras.

As colegas de mestrado Joely e Valeska pela amizade, companheirismo e pela ajuda e sugestões neste trabalho.

A Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) pelos auxílios durante a realização do curso.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURAS	11
RESUMO	13
1. INTRODUÇÃO	15
2. LITERATURA CONSULTADA	17
2.1 Biologia e patologia dos venenos	17
2.2 Terapia dos acidentados	20
2.3 Determinação da potência dos antivenenos	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Animais	27
3.2 Venenos	28
3.2.1 Obtenção dos venenos	28
3.2.2 Caracterização do Veneno de <i>Bothrops jararaca</i>	28
3.3.2. Dosagem de Proteínas	28
3.2.2.2 Determinação da dose letal 50%-DL ₅₀	28
3.2.2.3 Determinação da dose hemolítica sub-máxima	29
3.2.2.4 Fracionamento do veneno em Sephadex G-100	30
3.3 Antivenenos	31
3.3.1 Padronização do antígeno botrópico	31
3.3.2 Obtenção de antiveneno botrópico	31
3.4 Avaliação dos antivenenos botrópicos	32

3.4.1	Determinação da dose efetiva 50%- DE ₅₀	32
3.4.2	Determinação da reação de inibição da hemólise indireta	33
3.4.3	ELISA para determinar título de anticorpos anti-Bothrops	34
3.5	Produção do conjugado	35
3.5.1	Purificação de imunoglobulina eqüina (IgG)	35
3.5.2	Produção de antisoro anti IgG eqüina	36
3.5.3	Purificação de anti IgG por imunoafinidade	37
3.5.4	Preparação do conjugado (Anti IgG peroxidase)	38
3.6	Vantagens economicas	39
3.7	Análises estatísticas	39
4	RESULTADOS	41
4.1	Caracterização do veneno de <i>B. jararaca</i>	41
4.2	Avaliação dos antivenenos	45
4.2.1	Neutralização da atividade letal	45
4.2.2	Neutralização da atividade fosfolipásica	49
4.2.3	Resposta humoral ao veneno de <i>Bothrops jararaca</i> detectada pela técnica de ELISA	55
4.3	Produção do conjugado	59
4.4	Padronização do teste de ELISA	61
4.5	Sensibilidade e especificidade dos testes <i>in vitro</i>	62
4.6	Estudos de correlação entre os testes	64
4.7	Estimativa de custos	75
5	DISCUSSÃO	77
6	CONCLUSÕES	87
	SUMMARY	89
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

LISTA DE TABELAS

	Pag.
Tabela 1. Atividade letal do veneno de <i>Bothrops jararaca</i> em camundongos Swiss albinos pesando 20 ± 2 g.	41
Tabela 2. Determinação da DE_{50} de 30 antivenenos botrópicos obtidos de eqüinos hiperimunizados, realizada em camundongos Swiss albinos pesando 20 ± 2 g.	46
Tabela 3. Sensibilidade e especificidade do teste de ELISA para avaliar anticorpos neutralizantes de letalidade em antivenenos botrópicos	63
Tabela 4. Sensibilidade e especificidade do teste de RIHI para avaliar anticorpos neutralizantes de letalidade em antivenenos botrópicos	63

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Atividade fosfolipásica do veneno de <i>Bothrops jararaca</i> avaliada por hemólise indireta em gel de agarose-hemácias-lecitina de ovo- CaCl_2	42
Figura 2. Perfil de fracionamento de 50 mg de veneno de <i>Bothrops jararaca</i> em Sephadex G-100	43
Figura 3. Neutralização da atividade letal do veneno de <i>Bothrops jararaca</i> por 30 soros de eqüinos hiperimunizados com "pool" botrópico	47
Figura 4. Neutralização da atividade fosfolipásica do veneno de <i>Bothrops jararaca</i> por inibição da hemólise indireta em gel	49
Figura 5. Curvas dose-resposta de soros antibotrópicos em Reação de inibição da hemólise indireta - RIHI	51
Figura 6. Neutralização da atividade fosfolipásica presente no veneno de <i>Bothrops jararaca</i> por 30 soros de eqüinos hiperimunizados com "pool" botrópico	53

Figura 7	Níveis de anticorpos anti- <i>Bothrops jararaca</i> medidos por ELISA em 30 soros de eqüinos hiperimunizados com "pool" botrópico	57
Figura 8	Níveis de anticorpos anti-IgG eqüina medidos por ELISA de conjugados com peroxidase	59
Figura 9	Correlação entre soroneutralização e ELISA indireto, utilizando veneno bruto de <i>B. jararaca</i> como antígeno, de 30 soros de eqüinos hiperimunizados com "pool" botrópico	65
Figura 10	Correlação entre soroneutralização e ELISA indireto, utilizando Bjp1G100 como antígeno, de 30 soros de eqüinos hiperimunizados com "pool" botrópico	67
Figura 11	Correlação entre soroneutralização e RIHI de 30 soros de eqüinos hiperimunizados com "pool" botrópico	71
Figura 12	Correlação entre ELISA indireto e RIHI de 30 soros de eqüinos hiperimunizados com "pool" botrópico	73

RESUMO

Foram investigados coeficientes de correlação entre teste de neutralização da letalidade (DE_{50}), neutralização da atividade fosfolipásica (PLA_2) e níveis de anticorpos dosados por ELISA para avaliar a potência neutralizante de antivenenos botrópicos. Trinta equinos foram hiperimunizados com veneno de serpentes *Bothrops alternatus*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. neuwiedi* e *B. moojeni*. Para as provas de atividade dos antivenenos utilizou-se veneno de *B. jararaca* (veneno referência para teste de potência dos soros antibotrópicos no Brasil). Também foi usado como antígeno nas placas de ELISA uma fração tóxica deste veneno purificada por cromatografia em coluna Sephadex G-100. Todos os antivenenos analisados neutralizaram a atividade letal variando de 1,6 a 9,6mg veneno/ml de antiveneno. Os coeficientes de correlação obtidos entre DE_{50} e títulos de anticorpos, medidos por teste ELISA, para veneno bruto e fração tóxica foram de $r=0,45$ ($p<0,05$) e $r=0,60$ ($p<0,0005$), respectivamente. Estudos de correlação da neutralização da atividade fosfolipásica com DE_{50} e títulos de anticorpos (ELISA) apresentaram valores de $r=0,46$ ($p<0,02$) e $r=0,59$ ($p<0,001$). Assim, os resultados obtidos permitem sugerir que teste ELISA usando fração tóxica do veneno de *B. jararaca* como antígeno na fase sólida pode ser usado como um método para avaliar potência neutralizante de antivenenos botrópicos.

Palavras chave: Antivenenos

1 INTRODUÇÃO

Injúrias e mortalidade em humanos devido a picadas de serpentes ocorrem em muitas partes do mundo, especialmente nas regiões tropicais, representando um problema de saúde pública (WHO, 1981). O índice anual de mortalidade notificado no mundo por acidentes ofídicos é de 40-50.000 mortes. No Brasil 20.000 a 30.000 acidentes são notificados anualmente, com uma taxa de mortalidade estimada em 1,8% a 2,4% (Ministério da Saúde, 1993). Na América do Sul e também no Brasil, 90% dos acidentes ofídicos são causados por serpentes do gênero *Bothrops*, no qual estão incluídas aproximadamente 31 espécies (Campbell & Lamar, 1989). São serpentes que habitam preferencialmente locais úmidos, como matas e áreas cultivadas. Possuem hábitos noturnos e são consideradas agressivas.

As pessoas ofendidas por tais serpentes são normalmente submetidas a tratamento específico com soro antiofídico, cuja eficácia é determinada pela capacidade de neutralizar o efeito letal do veneno, por teste de soroneutralização em camundongos.

Estes testes de soroneutralização são trabalhosos, onerosos, demorados, além de utilizarem, molestarem e sacrificarem grande número de animais contrariando a tendência mundial que requer a redução na utilização de animais, mencionada como lei dos "3Rs" na experimentação

animal ("Refine, Reduce, Replace") apresentada no "Home Office guidelines" (Russell & Burch, 1959).

Trabalhos citados em literatura descrevem diferentes métodos desenvolvidos na tentativa de substituírem os ensaios *in vivo*. Testes imunoenzimáticos apresentaram resultados promissores para alguns antivenenos testados, demonstrando altos índices de correlação entre anticorpos dosados por ELISA e soroneutralização. Entretanto, para antivenenos botrópicos, somente há citação de um trabalho (Barbosa et al., 1995), o qual apresenta um pequeno estudo e com a metodologia utilizada não se obteve correlação suficiente entre os dois ensaios.

Além disso, a grande demanda de antivenenos botrópicos para tratamento de acidentados por serpentes no Brasil, estimulou a realização deste trabalho com o objetivo de se desenvolver um método de ELISA para dosar anticorpos antiveneno de *Bothrops* em eqüinos hiperimunizados.

Neste estudo, soros eqüinos antibotrópicos foram produzidos e avaliados por ensaios *in vivo* quanto a capacidade de neutralizarem os efeitos letais do veneno de *Bothrops jararaca*. Estes soros também foram avaliados quanto a capacidade de neutralizarem atividade fosfolipásica do veneno, por ensaios *in vitro* de inibição de hemólise indireta em gel de agarose.

Os três métodos foram comparados e correlacionados, no intuito de se determinar e padronizar um ensaio eficaz, sensível, rápido, e de baixo custo que permita acompanhar os níveis de anticorpos neutralizantes nas diferentes etapas de imunização dos eqüinos e da produção do soro antibotrópico de uso terapêutico.

2 LITERATURA CONSULTADA

2.1. Biologia e patologia dos venenos

Os venenos das serpentes são misturas complexas contendo diversos componentes. Mais de 90% do extrato seco são proteínas com diversificadas ações farmacológicas, toxicológicas e bioquímicas, com uma grande variedade de enzimas tóxicas e outras proteínas não tóxicas. As frações não protéicas são formadas por carboidratos, lipídeos, nucleosídeos, nucleotídeos, metais e outros (Bieber, 1979). As diferentes enzimas e componentes tóxicos não enzimáticos presentes nos venenos podem possuir efeito aditivo ou sinérgico de ações na indução dos sintomas apresentados por pessoas ofendidas (Ferreira et al., 1992b).

As alterações locais comumente observadas em acidentes por picadas de serpentes do gênero *Bothrops* são dor, hemorragia local, edema e necrose, que posteriormente podem resultar em seqüelas que variam desde cicatrizes até perda do membro atingido. Inicialmente os efeitos locais destes envenenamentos foram atribuídos a enzimas proteolíticas e em estudos posteriores concluiu-se que ocorrem ações associadas de proteases, fatores hemorrágicos, fosfolipases, bem como liberação de mediadores endógenos induzida pelos venenos (Farsky et al., 1997). Os efeitos sistêmicos, resultando em distúrbios de coagulação, hemorragias sistêmicas, falência renal e até morte, também são evidenciados (Domingos et al., 1994).

Os componentes hemorrágicos presentes nos venenos botrópicos foram isolados e caracterizados como fatores hemorrágicos (HF) do tipo 1, 2 e 3 por Mandellbaum et al. (1982). As miotoxinas envolvidas na necrose muscular foram descritas por Gutierrez & Lomonte (1989), e por Moura da Silva et al. (1990b). Foi encontrada também uma enzima nestes venenos capaz de converter o fibrinogênio em fibrina, com atividade semelhante a trombina, estando envolvida no processo hemorrágico (Nahas et al., 1979).

Nos últimos anos vários autores têm purificado e caracterizado inúmeras enzimas e toxinas do veneno de *B. jararaca*. Assim, Sosa et al. (1979) caracterizaram enzimas com atividade fosfolipásica e concluíram ser a atividade hemolítica da fosfolipase (PLA₂) do tipo indireta. Davidson & Dennis (1990) verificaram que muitas PLA₂s envolvidas em ações tóxicas dos venenos apresentavam atividades neurotóxicas, hemorrágicas, hemolíticas e edemaciante. Al-Abdulla et al. (1991) descreveram que estas enzimas hidrolisam fosfolípidos em ácidos graxos e liso-derivados que rompem membrana de eritrócitos. Portanto, já foram purificadas e caracterizadas mais de cem enzimas com atividade fosfolipásica nos venenos de serpentes, e que induzem a vários efeitos farmacológicos, dependentes ou não da hidrólise de fosfolípidos (Machado et al., 1993).

Uma dipeptídeo-hidrolase, com atividade quininase, a carboxypeptidase foi descrita por Lavras et al. (1980); uma metaloproteinase com 48 KDa de peso molecular (P.M.) foi identificada como bothropasin por Mandelbaum et al. (1982). A *Bothrops* protease A, uma glicoproteína de P.M. 65 KDa, com atividade arginina-ester-hidrolase, foi demonstrada por Reichl et al. (1983). Tanizaki et al. (1989) descreveram uma zinco-metaloprotease com atividade proteolítica, denominando-a de J. protease. O estudo apresentado por

Selistre et al. (1990), relatou uma fosfolipase com atividade esterase que induz ao edema classificada como SIII-SpI (P.M. 32 KDa), outra fosfolipase com atividade mionecrótica (P.M. 29 KDa) classificada como SIII-SpVI, e três enzimas com atividade hemorrágicas, (P.M. 26 KDa, 29 Kda e 26 KDa) classificadas como SIII-SpIII-3, SIII-SpIII-4 e SIII-SpIII-5, respectivamente. Smith et al. (1991), isolaram proteinases de 50 KDa que inibiam agregação plaquetária induzida pelo colágeno; Fujimura et al. (1991) demonstraram duas formas de botrocetin, com 28 e 32 KDa, e Kamiguti et al. (1991) isolaram e denominaram os fatores hemorrágicos de haemorrhagin e batroxobin. Incluindo na família das desintegrinas, Paine et al. (1992), denominaram de jararhagin (P.M. 55 KDa) uma metaloprotease com atividade hemorrágica e Usami et al. (1994) denominaram de jararhagin-C (P.M. 28kDa) uma enzima inibidora de agregação plaquetária induzida pelo colágeno. Tanigawa et al. (1994) identificaram a jararafibrase I (P.M. 47 KDa) e jararafibrase II (P.M. 21 KDa) como componentes com atividades fibrinolíticas e hemorrágicas. Maruyama et al. (1992) identificaram a jararafibrase III (P.M. 20.KDa) e jararafibrase IV (P.M. 21 KDa) metaloproteinases também com atividades fibrinolíticas e hemorrágicas. Nishida et al. (1994) purificaram uma serinoprotease com P.M. entre 33 a 35 KDa que atua na coagulação do fibrinogênio, denominando-a de bothrombin. De-Luca et al. (1995) estudaram componentes inibidores do receptor de colágeno e classificaram-no como jaracetin, uma proteína de P.M. 60 KDa. Apesar destes vários estudos na tentativa de isolar e caracterizar os componentes dos venenos botrópicos, ainda não está bem estabelecido a associação e correlação das atividades tóxicas destes componentes com a necrose local e o efeito letal provocados pelo envenenamento com serpentes deste gênero (Ferreira et al. 1992b).

2.2. Terapia dos acidentados

A gravidade dos acidentes ofídicos depende de fatores relacionados à vítima, como: estado geral de saúde, idade, peso, local da picada, sensibilidade ao veneno e de fatores relacionadas às serpentes, como: espécie envolvida, idade, condições ambientais e alimentares, e quantidade de veneno inoculada. Devido a estas variáveis, os efeitos locais e sistêmicos dos envenenamentos provavelmente com diferentes intensidades necessitarão de procedimentos clínicos e terapêuticos diferenciados.

O tratamento dos acidentes humanos por picadas de animais peçonhentos consiste normalmente na administração de antivenenos específicos, obtidos em animais, principalmente eqüinos inoculados previamente com misturas de venenos de serpentes representativas da região. Conforme revisão descrita por Bon (1996), as bases do tratamento surgiram em 1894 a partir dos trabalhos de Sewall nos Estados Unidos, de Phisalix, Bertrand e Calmette na França. Estes investigadores mostraram que era possível obter anticorpos contra o veneno de animais peçonhentos assim como havia sido possível obtê-los contra as toxinas bacterianas. Em 1898, Vital Brazil, verificou que o soro antiofídico do Instituto Pasteur não era eficaz contra as ações do veneno de algumas espécies de serpentes brasileiras e, então, trabalhando no Instituto Bacteriológico de São Paulo, preparou os primeiros soros eqüinos eficazes para neutralizar os venenos de serpentes brasileiras dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*. Até hoje, cem anos após, o tratamento dos envenenamentos ofídicos baseia-se no uso de soluções de imunoglobulinas específicas purificadas, a partir de plasma de eqüídeos hiperimunizados com veneno bruto de uma ou mais espécies de serpentes (Diário Oficial da União., 1996).

A eficácia deste tratamento está relacionada à identificação do animal agressor e conseqüentemente ao uso do antiveneno específico e ao tempo decorrido desde o acidente até o acesso da pessoa ofendida ao soro antiofídico, além da eficácia deste antiveneno, expressa em termos de potência.

2.3. Determinação da potência dos antivenenos

A potência ou capacidade neutralizante dos antivenenos empregados nos tratamentos ofídicos é tradicionalmente avaliada por teste de neutralização da letalidade utilizando-se camundongos como animais de experimentação (WHO, 1981). Este procedimento é extremamente laborioso, caro e de difícil reprodução devido a variação biológica das respostas de distintas populações de camundongos, além da necessidade de sacrificar grande número de animais (Gutiérrez et al., 1988). Vários grupos de pesquisadores têm estudado e desenvolvido técnicas para avaliarem a capacidade neutralizante dos antivenenos, tentando correlacioná-las com o teste de soroneutralização e possivelmente a substituição deste ensaio *in vivo*, pois, em inúmeros países do mundo, razões éticas, científicas e econômicas requerem a redução de experimentos animais (Meier & Stocker, 1989).

Os testes de soroneutralização são realizados misturando-se *in vitro* os venenos com seus respectivos antivenenos e posteriormente injetando a mistura em camundongos. A sobrevivência dos camundongos indica a eficiência dos soros em neutralizar os efeitos letais dos venenos.

A capacidade neutralizante dos soros hiperimunes eqüinos está ligada a presença de anticorpos específicos produzidos contra os diversos componentes tóxicos presentes nos

venenos. Entretanto, dados da literatura (Ownby et al., 1983) sugerem que a maioria dos anticorpos produzidos a partir de imunizações com venenos totais são direcionados contra componentes não tóxicos dos venenos. Assim torna-se importante avaliar também os antivenenos conforme sua capacidade de neutralizar os vários efeitos tóxicos e enzimáticos induzidos pelos venenos (Gutierrez et al., 1985). Para antivenenos botrópicos ensaios de avaliação da neutralização de efeitos relevantes como hemorrágico, defibrinolítico, coagulante, miotóxico e edemaciante deveriam ser padronizados e rotineiros (Gutierrez et al., 1990).

A titulação de antivenenos medindo neutralização e inibição de atividades protéicas têm sido estudada por diferentes autores. Da Silva & Bier (1982), avaliaram a inibição da atividade da fosfolipase A_2 , enzima presente no veneno crotálico, por diferentes soros anticrotálicos comerciais e experimentais. Os antivenenos polivalentes produzidos na Costa Rica, foram avaliados quanto à capacidade em neutralizarem efeito letal e várias atividades específicas dos venenos de serpentes daquele país. Assim, Gené et al. (1985), apresentaram resultados da neutralização das atividades hemolítica indireta e hialuronidásica; Gutierrez et al. (1985), demonstraram eficácia destes antivenenos em neutralizarem a atividade hemorrágica e proteolítica dos venenos. Gutierrez et al. (1988), determinaram potência dos antivenenos em neutralizarem a atividade fosfolipásica presente nos venenos, através da capacidade em inibirem a hemólise indireta. Na África, foram avaliados antivenenos polivalentes comerciais e monovalentes preparados experimentalmente quanto a capacidade em neutralizarem efeito letal, e atividades hemorrágicas, necróticas e fibrinolíticas de venenos de serpentes africanas das famílias Viperidae e Crotalidae (Kornalík & Táborská, 1989). Os

resultados obtidos demonstraram que ocorre uma maior ou menor neutralização destes efeitos de acordo com o antiveneno empregado, e sugerem que em acidentes humanos onde não se tem uma identificação precisa do animal agressor, seria válido utilizar antivenenos polivalentes.

Para avaliarem os soros antibotrópicos, quanto a capacidade em neutralizarem diferentes atividades induzidas pelos venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, estudos experimentais demonstraram uma resposta efetiva na neutralização da atividade miotóxica destes venenos por antivenenos espécie específicos (Moura da Silva et al., 1991) e na inibição da atividade hemorrágica determinada pelo veneno (Borkow et al., 1997). Quando Ferreira et al. (1992a) utilizaram um antiveneno anti *Bothrops jararaca* produzido em coelhos e testaram sua capacidade em neutralizar diferentes atividades dos venenos de outras espécies botrópicas, concluíram que este era bastante efetivo em neutralizar efeitos hemorrágicos, coagulantes e necrosantes, porém pouco efetivo em neutralizar as atividades miotóxicas e proteolíticas. Concluíram também que as atividades fosfolipásicas e edemaciantes somente eram neutralizadas completamente por sistemas homólogos. Testando os antivenenos botrópicos comerciais produzidos no Brasil, Laing et al. (1992), utilizando ensaios *in vivo* e *in vitro*, demonstraram a capacidade destes em neutralizarem atividade letal, hemorrágica, necrosante, coagulante e fibrinolítica em concentrações diferentes conforme um dos três institutos produtores, Fundação Ezequiel Dias-FUNED, (Belo Horizonte), Vital Brasil (Rio de Janeiro) ou Instituto Butantan (São Paulo). Entretanto, no uso clínico terapêutico, Domingos et al. (1994) afirmaram que quando o antiveneno botrópico é efetivo em neutralizar os efeitos sistêmicos do veneno, parece possuir menor capacidade em aliviar a

necrose local desenvolvida em pacientes humanos, ocasionando inclusive no aumento de doses dos soros na tentativa de prevenir estas necroses locais (Theakston et al., 1992).

No processo de determinação da potência de antivenenos seria de grande utilidade contar com um método de titulação *in vitro*, confiável, sensível, pouco oneroso e de fácil realização. Assim, vários ensaios *in vitro* foram desenvolvidos: Gawade & Gaitonide (1980) utilizaram técnicas imunoeletroforéticas para testar a eficácia de antivenenos de serpentes marinhas. Esta técnica mostrou-se pouco específica, porém evitou-se o uso excessivo de animais de laboratório para este fim. Khupulsup et al. (1981) descreveram técnica baseada na hemaglutinação passiva para determinação semiquantitativa de anticorpos antitoxina de *Naja naja siamensis*. Outros ensaios utilizando neutralização da atividade da fosfolipase A₂ (Da Silva & Bier, 1982) e testes de inibição da atividade hemolítica indireta dos venenos por Gutiérrez et al. (1988) e Al-Abdulla et al. (1991) foram desenvolvidos como uma possível alternativa para substituir o teste *in vivo* de neutralização da letalidade, diminuindo a utilização de animais experimentais.

A técnica de "enzyme-linked immunosorbent assay" - ELISA (Engvall & Perlmann, 1971) também tem sido desenvolvida para avaliar potência de alguns antivenenos. Desde sua introdução a técnica de ELISA tem sido continuamente refinada e cada vez mais vem sendo utilizada na detecção de antígenos ou anticorpos em fluidos. Theakston et al. (1977) descreveram o uso de micro-ELISA na detecção de antígenos e anticorpos em pacientes acidentados por picadas de serpentes *Naja naja*. Os testes de ELISA desenvolvidos para titularem antivenenos e correlacioná-los com potência neutralizante de letalidade mostraram-se

eficazes para antivenenos anti- *Bitis*, anti- *Echis* e anti- *Naja*, conforme Theakston & Reid (1979). Trabalho de Rungsiwongse & Ratanabanangkoon (1991), demonstrou que o uso de ELISA indireto utilizando antígeno purificado do veneno de *Naja naja* permitia avaliar a potência do antiveneno específico. Barbosa et al. (1995) utilizando técnicas de ELISA indireto para determinar potência neutralizante, obtiveram alta correlação com soroneutralização para antivenenos crotálicos, porém insignificante correlação para antivenenos botrópicos, mesmo quando se utilizou antígeno purificado de *B. jararaca*. Também Alape-Girón et al. (1997) não obtiveram correlação ente os títulos de anticorpos medidos por ELISA e potência neutralizante para os antivenenos elapídicos testados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Para as provas biológicas de dose letal 50% (DL₅₀) e dose efetiva 50% (DE₅₀) utilizou-se 2.000 camundongos Swiss fêmeas e machos pesando 20 ± 2 g, filhotes de primeira geração de matrizes controladas geneticamente pelo Centro de Bioterismo da UNICAMP e mantidos pelo Setor de Biotério do Centro de Pesquisa e Produção de Imunobiológicos - CPPI, Paraná, Brasil., em condições ambientais controladas. Para cada teste sempre foram utilizados animais do mesmo sexo.

Para produção dos soros antibotrópicos foram utilizados eqüinos SRD (sem raça definida) de ambos os sexos pesando acima de 300 Kg, em condições controladas de nutrição e sanidade, mantidos pelo Setor de Grandes Animais do CPPI. Foram utilizados 30 eqüinos, sendo 10 animais não imunizados e 20 já imunizados anteriormente com veneno botrópico. Todos os eqüinos foram submetidos a avaliação clínica por um período de 30 dias antes de iniciarem-se as inoculações. Os eqüinos foram também resenhados, devidamente numerados e todos os demais procedimentos anotados em protocolo individual e ficha de imunização.

Para produção de antisoro anti-IgG eqüino utilizou-se uma fêmea de ovino SRD pesando 40-50 Kg e mantida em condições controladas de alimentação e sanidade.

3.2. Venenos

3.2.1. Obtenção dos venenos

Os venenos foram obtidos de espécimes adultos de serpentes do gênero *Bothrops*, mantidas pelo Setor de Serpentário do CPPI. Após extração individual de aproximadamente 100 serpentes de cada espécie, os venenos foram misturados em "pool", centrifugados, liofilizados e estocados a -20°C. As espécies utilizadas para produção do antiveneno botrópico foram *Bothrops jararaca*, *Bothrops alternatus*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops neuwiedi*, e para provas de atividade do antiveneno foi utilizado veneno de *Bothrops jararaca*, conforme especificações do DOU (1996).

3.2.2. Caracterização do veneno de *Bothrops jararaca*

3.2.2.1. Dosagem de proteínas

O conteúdo protéico do veneno de *Bothrops jararaca* foi estimado utilizando-se o método de Lowry et al. (1951) modificado, ou seja, alterando o tempo de incubação para 15 minutos com cada reagente. Soroalbumina bovina (BSA) foi utilizada como padrão, na concentração de 1 mg/ml.

3.2.2.2. Determinação de dose letal 50% (DL₅₀)

A atividade letal do veneno de *Bothrops jararaca* foi determinada pelo cálculo da dose letal de veneno, conforme teste de Probit (WHO, 1981). Foram preparadas seis doses crescentes de veneno *Bothrops jararaca* em solução salina (NaCl a 0,85%), utilizando um fator constante de diluição 1:1,5. Foi inoculado 0,5 ml desta solução intraperitonealmente (i.p.) em cada camundongo, sendo

utilizados oito camundongos para cada dose. Como controle, um grupo de oito animais foram inoculados apenas com solução salina. Os camundongos foram mantidos em caixas devidamente identificadas, em ambiente controlado, e, sendo anotado no protocolo, o número de mortos 24 e 48 horas após inoculação do veneno. Foram realizados seis experimentos e para o estudo ser estatisticamente validado, considerou-se somente os experimentos em que a faixa de resposta, ou seja, porcentagem de morte, ficou compreendida entre 10 e 90%, formando a curva de regressão que apresentou uma relação linear. As análises de variância foram realizadas por programa de computação Probit, segundo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS. Os resultados finais foram avaliados por análise colaborativa, realizados por programa de computação, Teste Combim, fornecido pelo INCQS.

3.2.2.3. Determinação da dose hemolítica sub-máxima (DHsm)

A atividade fosfolipásica do veneno de *B. jararaca* foi avaliada por determinação da dose hemolítica indireta, em placas com gel de agarose conforme Gutiérrez et al. (1988), com algumas modificações. As placas foram preparadas de acordo com seguinte protocolo: a cada 25 ml de agarose (Tipo II - Sigma) a 0,8% (p/v) foi adicionado solução de hemácias de carneiro (1,2%), lecitina de ovo (1,2%) e cloreto de cálcio CaCl_2 0,01 M (1%), em banho-maria a 50°C e condições estéreis até diluição completa dos componentes. Esta solução (25 ml), de agarose-lecitina-hemácias foi colocada em placa de polipropileno 126 x 85 mm (tampa de placas de ELISA) e deixado a temperatura ambiente até completa solidificação. O gel contido em cada placa foi perfurado em três fileiras com cinco orifícios de 3 mm cada. Foram preparadas várias diluições seriadas do veneno em

PBS (solução salina tamponada) e 15 μ l de cada dose aplicados nos orifícios do gel de agarose. Após incubação em câmara úmida por 18 horas a 37°C, foram feitas as leituras dos halos hemolíticos, em milímetros. Estes valores foram colocados em papel mono-log, traçada a curva dose-efeito e estimada a dose hemolítica sub-máxima. Determinou-se dose hemolítica submáxima do veneno por estar compreendida na parte linear da curva dose-resposta e não dose hemolítica mínima ou dose hemolítica 50%, pois, em ensaios pré-experimentais, estas apresentaram halos de hemólise muito pequenos de difícil leitura e interpretação.

3.2.2.4. Fracionamento do veneno de *B. jararaca* por cromatografia de filtração molecular

Para fracionamento e purificação de seus componentes tóxicos, amostras de 50 mg do veneno total de *B. jararaca* foram reidratadas com 50 mM de Acetato de amônio contendo 0,3 M de NaCl, pH 7,4 e aplicadas em coluna de filtração molecular (75 cm x 1,6 cm) de Sephadex G-100 (Pharmacia). A coluna foi eluída com tampão acetato de amônio num fluxo de 4 ml por hora e frações de 4 ml/tubo foram coletadas. O conteúdo protéico de cada fração foi estimado por leitura em espectrofotômetro a 280 nm. Os tubos correspondentes a cada uma das frações denominadas Bjp1G-100, Bjp2G-100 e Bjp3G-100 foram homogeneizados em "pool", dialisados contra água destilada e liofilizados. Finalmente as frações foram reidratadas em 4,5 ml de tampão PBS, estimadas quanto a concentração de proteínas (método de Lowry modificado) e testadas quanto a atividade letal de cada uma, em animais experimentais.

3.3. Antivenenos

3.3.1. Padronização do antígeno botrópico

Conforme Normas e Procedimentos para Produção e Controle de Soros Antiofídicos de origem equídea do DOU (1996), o antígeno utilizado para produzir antisoros contra venenos das serpentes do gênero *Bothrops* foi composto de 50% de veneno de *Bothrops jararaca* e 12,5% de cada um dos venenos de *Bothrops alternatus*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops neuwiedi* e *Bothrops moojeni*.

3.3.2. Obtenção de antiveneno botrópico

Para a obtenção do soro antibotrópico os eqüinos foram imunizados de acordo com o seguinte protocolo: 5 mg de antígeno botrópico dissolvidos em 5 ml de solução salina foram emulsionados com 5 ml de adjuvante completo de Freund (Sigma) e inoculados por via subcutânea em quatro pontos distintos na região dorso lombar de eqüinos sadios. Sendo que nesta primeira dose de imunização foram submetidos somente os 10 animais sem imunizações anteriores. Após 21 dias foi preparada nova emulsão com veneno botrópico (5 mg) e adjuvante incompleto de Freund (Sigma) num volume final de 10 ml e realizada nova inoculação subcutânea em outros quatro pontos na região dorso lombar dos 30 eqüinos. Foi realizada mais uma imunização conforme descrito acima, 15 dias após a anterior. Os animais foram submetidos a mais duas imunizações, também intervaladas de 15 dias, com mistura de veneno botrópico (5 mg) diluídos em solução de hidróxido de alumínio $Al(OH)_3$ a 2%. Todas as soluções para imunização dos eqüinos foram preparadas em condições estéreis e as etapas do ciclo de imunização, bem como as práticas de produção obedeceram as normas e procedimentos do CPPI.

Dez dias após a última imunização foram coletadas amostras de sangue (aproximadamente 60 ml), por punção jugular, em todos os eqüinos imunizados. Os tubos de coleta foram deixados em repouso a temperatura ambiente com a finalidade de separar o soro dos elementos figurados do sangue. Após retirada dos soros, estes foram centrifugados à 3.000 rpm por 15 minutos e descartou-se o sedimento. Após outra homogeneização, foram feitas três alíquotas de cada soro e armazenados a -20°C até sua utilização.

3.4. Avaliação dos antivenenos botrópicos

3.4.1. Determinação da dose efetiva 50% (DE_{50})

A potência neutralizante dos antivenenos foi determinada pelo método da dose efetiva mediana (DE_{50}) em camundongos, segundo Finney (1971). Foram preparadas, seguindo um fator constante de diluição de 1:2, cinco doses progressivas de antiveneno botrópico com solução de veneno *B. jararaca* contendo $5x DL_{50}$ em volume constante de solução salina (0,85%). Estas soluções foram incubadas a 37°C por 30 minutos em banho-maria. Cada camundongo foi inoculado com 0,5 ml i.p., sendo empregado oito camundongos para cada dose do soro antibotrópico. Foi inoculado o mesmo volume de solução de veneno em salina para o grupo controle formado também de oito animais. Os animais foram mantidos em caixas devidamente identificadas, em ambiente controlado, sendo anotado no protocolo, número de sobreviventes em cada grupo nas 24 e 48 horas após inoculações. Para validação do experimento, a faixa de resposta, ou seja, porcentagem de sobrevivência, ficou compreendida entre 10 e 90%, formando a curva de regressão e apresentando uma relação linear. O cálculo da DE_{50} foi efetuado pelo método estatístico Probit, conforme

programa de computador - INCQS. Quando as análises de variância não apresentavam validação estatística, os testes de soroneutralização *in vitro* foram repetidos.

A potência neutralizante foi determinada pelo cálculo da atividade conforme fórmula:

$$\text{Atividade} = \frac{\text{Dose desafio} - 1}{\text{DE}_{50}} \times \text{DL}_{50}$$

Sendo que a dose desafio foi correspondente a cinco DL_{50} , e utilizou-se $5 \times \text{DL}_{50} - 1$, porque ao final de cada dose houve uma DL_{50} não neutralizada pelo soro que foi responsável pela morte de 50% dos camundongos. O título da atividade foi expresso em miligramas de veneno neutralizados por 1 ml do antiveneno.

3.4.2. Determinação da reação de inibição da hemólise indireta - RIHI

Os ensaios de inibição da hemólise indireta foram realizados conforme metodologia descrita por Gutiérrez et al. (1988). Foram preparadas soluções de veneno *B. jararaca* com o dobro da concentração correspondente a DHsm em mg/ml, e reagidas em partes iguais com amostras dos soros anti-botrópicos. Para cada soro testado foram utilizadas diluições (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128) e misturadas com a solução de veneno e incubadas a 37°C por 30 minutos. As soluções venenos-antivenenos (num volume de 15 μl) foram aplicadas em orifícios no gel de agarose, conforme citado no item 3.2.2.3. Obedeceu-se ao mesmo protocolo para as 30 amostras, com as diluições de antiveneno mais solução de veneno e uma amostra controle somente com solução de veneno. As placas contendo as misturas foram incubadas por 18 horas a 37°C, em câmara úmida. As leituras foram

feitas com auxílio de régua milimetrada, tendo como controle o diâmetro do halo hemolítico da solução de veneno, e os demais comparando-se com o controle e determinando a porcentagem de inibição do halo. No papel mono-log foi traçado uma curva dose-resposta relacionando potência neutralizante do soro teste (mg/ml) e porcentagem de inibição do halo hemolítico, e determinou-se a dose efetiva 50%, ou seja, a razão de atividade fosfolipásica presente no veneno neutralizada por 1 ml de antiveneno.

3.4.3. ELISA para determinar título de anticorpos anti-*Bothrops*

O teste de ELISA indireto para detectar anticorpos foi realizado utilizando-se procedimento descrito por Engvall & Perlmann (1971). As placas de ELISA com 96 poços da marca Hemobag (Ribeirão Preto, SP, Brasil) foram sensibilizadas com 100 µl/poço (volume padrão) de solução em diferentes concentrações, variando de 0,8 a 100 ng/poço de veneno total de *B. jararaca* ou frações Bjp1G-100, Bjp2G-100 e Bjp3G-100 diluídas em tampão carbonato de sódio (pH 9,6), durante 18 horas a 4°C. Em seguida as placas foram lavadas duas vezes com solução de lavagem (Tween 0,05%, 150 mM de NaCl), e bloqueadas com caseína 2% em PBS e incubadas durante 1 hora a 37°C, para bloqueio dos sítios inespecíficos de ligação. Seguiram-se duas lavagens da placa com solução de lavagem e incubação dos soros eqüinos em teste, diluídos em tampão de incubação (Caseína 0,25%, tween 0,05% em PBS), por 1 hora a 37°C. Para determinação da diluição ótima dos soros foram realizadas diluições variando de 1:500 a 1:1280000. As placas foram lavadas seis vezes com solução de lavagem e incubadas com o conjugado diluído 1:1000 em tampão de incubação, por 1 hora a 37°C. Novamente foram feitas seis lavagens das placas com solução de lavagem e

incubadas com o substrato, uma solução de 0,34 mg/ml de ortofenilenodiamino (OPD) em tampão citrato pH 5,2, na presença de 0,04% de peróxido de hidrogênio. Após 15 minutos de incubação em ambiente escuro, a reação foi interrompida pela adição de 20 µl de ácido sulfúrico diluído 1:20. As leituras de absorbância foram feitas a 492 nm determinada em leitor de ELISA (Titertek Multiskan MCC/340). Para cada placa, além dos soros testes, foi incluído soro normal como controle negativo e controle de conjugado.

3.5. Produção do conjugado

3.5.1. Purificação de imunoglobulina eqüina (IgG)

Um "pool" de soros normais eqüinos foi utilizado para purificação de imunoglobulinas. As imunoglobulinas foram precipitadas com 30 ml de uma solução supersaturada de sulfato de amônio, adicionada gota a gota a 30 ml de soro sob agitação e a temperatura de 4°C. A suspensão foi em seguida centrifugada à 6.000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento contendo as imunoglobulinas ressuspenso em 10 ml de PBS 0,15 M, pH 7,4. Após diálise contra 20 volumes de PBS 0,03 M, pH 7,4, por 20 horas a 4°C e um volume com PBS 0,15 M, a suspensão foi novamente centrifugada a 3.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante, após estimativa de seu conteúdo protéico, foi aliquoteado em amostras de aproximadamente 200 mg de proteína a -20° C.

Imunoglobulinas do isotipo IgG foram purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-proteína A, segundo técnica descrita por Ey et al. (1978) com algumas modificações. A coluna foi estabilizada com

tampão PBS 0,15 M, então foram aplicados 200 mg de imunoglobulinas totais num fluxo de 20 ml por hora. Frações de 2 ml por tubo foram coletadas e o conteúdo protéico determinado por leitura em espectrofotômetro em absorvância de 280 nm. Após desprezar o primeiro pico de proteínas, correspondente a imunoglobulinas que não ligaram-se na proteína A, a coluna foi extensivamente lavada com PBS 0,15 M. Para eluição das IgGs, alterou-se o tampão do fluxo com solução glicina - HCl 0,1 M, pH 2,8, contendo NaCl 0,8%. As frações foram coletadas em tubos com 2 ml e realizada leitura em espectrofotômetro (A 280 nm). O conteúdo dos tubos com leitura de absorvância (280 nm) superior a 0,05 foi juntado, imediatamente neutralizado para pH 7,0 com NaOH 1 M e dialisado contra PBS. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry (1951) modificado.

3.5.2. Produção de antisoro anti-IgG eqüina

Após obter-se o soro pré-imune, a ovelha foi inoculada com uma emulsão de IgG eqüina purificada (1 mg) e adjuvante completo de Freund (v/v) por via subcutânea em quatro pontos distintos na região dorso lombar. Após 21 dias foi feita nova inoculação, com IgG eqüina (1 mg) emulsionada em adjuvante incompleto de Freund. Foram realizadas mais três imunizações intervaladas de 15 dias conforme descrito anteriormente. Uma semana após a última dose, foi colhida uma pequena alíquota de sangue e, após separação, o soro foi avaliado pelo método de imunodifusão indireta, quanto a presença de anticorpos específicos anti-IgG eqüina. Como foi evidenciado linhas de precipitação do antígeno IgG eqüino com antisoro ovino diluído até 1:256, foram realizadas três sangrias de aproximadamente 150 ml de sangue neste animal.

3.5.3. Purificação de anti-IgG eqüina por imunoafinidade

O soro ovino foi precipitado e dialisado conforme descrito para o soro eqüino (item 3.5.1). As imunoglobulinas foram concentradas com polietilenoglicol PM 8.000 (Sigma) em membrana de diálise. Após concentração, as imunoglobulinas foram dializadas contra tampão carbonato de sódio 0,1 M com NaCl 0,5 M (pH 8,3) por 18 horas a 4°C. Seu conteúdo protéico foi estimado pelo método de Lowry (1951) e alíquotas de 20 mg armazenadas a -20°C.

A coluna de imunoafinidade Sepharose-IgG eqüina foi preparada conforme manual de instruções (Pharmacia). Cerca de 1 g de Sepharose 4B ativada com Brometo de Cianogênio (Sigma) foi dissolvida em 15 ml de solução HCl 1 mM, após homogeneizado vagarosamente por inversão foi centrifugado a 2.500 rpm por 2 minutos e o sobrenadante desprezado. Esta operação se repetiu até ter utilizado um volume final de 200 ml de HCl 1 mM.

O gel resultante foi então ressuspendido em solução carbonato de sódio 0,1 M, depois centrifugado como anteriormente e desprezado o sobrenadante. Foram adicionados 20 mg de IgG eqüina e homogeneizados lentamente por 20 horas a temperatura ambiente. Após centrifugação a 3.000 rpm por 3 minutos, o sobrenadante foi retirado, este volume foi anotado e calculado a porcentagem de ligação de IgG eqüina na Sepharose após leitura em espectrofotometria (A de 280 nm). Posteriormente, adicionou-se 20 ml de tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0) para bloquear o excesso de grupos ativos e novamente colocado sob agitação lenta por 18 horas a 4°C. Com a finalidade de remover o excesso de ligantes não acoplados ao gel, este foi lavado alternadamente com solução carbonato de sódio 0,1M, pH 8,3 e solução acetato de sódio 0,1M, pH 4,0. Esta

operação repetiu-se por cinco vezes com cada tampão e após centrifugado e desprezado o sobrenadante o gel foi ressuspenso em 15 ml de PBS 0,15 M, pH 7,4 e armazenado a 4°C até uso posterior.

Para a obtenção das imunoglobulinas específicas contra IgG eqüina, alíquotas de 4 ml de soro ovino anti-IgG eqüina foram incubadas em agitação lenta por 2 horas. Este gel foi montado numa coluna de 6 ml (Bio-Rad) e exaustivamente lavado com PBS 0,15 M, usando-se um volume final de 10 vezes o volume da coluna. Para remoção das imunoglobulinas ligadas, a coluna foi eluída com solução Glicina 0,1 M (pH 2,8). Frações de 2 ml foram coletadas e o conteúdo protéico estimado por leitura espectrofotométrica a 280nm. Os tubos com leitura superior a 0,100 juntados, neutralizados a pH 7,0 com NaOH 0,1 M e dialisados contra PBS. As imunoglobulinas anti-IgG eqüina obtidas na coluna de afinidade foram concentradas por liofilização e armazenadas a -20°C.

3.5.4. Preparação do conjugado anti-IgG eqüina com peroxidase

O conjugado IgG ovina anti-IgG eqüina ligado a enzima foi obtido pelo método do periodato segundo Nakane & Kawoi (1974). Aproximadamente 5 mg de peroxidase (horseradish peroxidase-HRP, Sigma) foram dissolvidas em 1,0 ml de água bidestilada e adicionado de 100 µl de uma solução de metaperiodato de sódio 0,1 M (preparado no momento do uso). A solução foi incubada a temperatura ambiente, no escuro e com agitação constante por 20 minutos. Posteriormente, a mistura foi dialisada contra tampão carbonato de sódio 0,1 M, pH 9,5 overnight a 4°C, também em ambiente escuro. A ligação da IgG ovina anti-IgG eqüina (15 mg diluídos em 2 ml de tampão carbonato) com

peroxidase (tratada com periodato) foi realizada incubando-se as duas soluções lentamente durante 3 horas a temperatura ambiente e overnight a 4°C, sempre em recipiente protegido da luminosidade.

Foram adicionados 100 µl de uma solução recém preparada de borohidreto de sódio na concentração de 2 mg para 500 µl de água bidestilada, incubados por 2 horas a 4°C. Esta solução foi dialisada contra tampão borato 0,1 M (pH 7,4) por 12 horas a 4°C, centrifugada e algum precipitado que formou foi removido. Em relação ao volume preparado foi adicionado 1% de soro albumina bovina - BSA para estabilização das proteínas e 0,01% de timerosol como conservante. Foram separadas em alíquotas de 250 µl, condicionadas em recipientes escuros e estocadas a -20°C.

Para titulação do conjugado foi utilizado teste imunoenzimático tendo como referência o conjugado anti-IgG eqüino produzido em coelho (Sigma).

3.6. Vantagens econômicas

Foi feita estimativa de custo dos três testes, soroneutralização, ELISA, RIHI para avaliação de anticorpos antibotrópicos em soro eqüinos.

3.7. Análises estatísticas

Foram realizadas análises de variância para interpretação dos testes biológicos de DL₅₀ e DE₅₀. Para orientar a interpretação dos resultados empregou-se testes para avaliação da especificidade e sensibilidade dos testes *in vitro* ELISA e RIHI. Foram realizadas análises de correlação e regressão linear entre os testes de avaliação dos antivenenos botrópicos em estudo.

4 RESULTADOS

4.1. Caracterização do veneno de *Bothrops jararaca*

O veneno utilizado neste estudo foi identificado como Bj. lote 06/96 e apresentou teor de umidade de 5% e concentração de proteínas de 97,5%. O referido veneno apresentou atividade letal conforme apresentado na Tabela 1, e o resultado do estudo colaborativo-Combin obteve um valor ponderado de 45,5 µg/20 g camundongo, que foi então estabelecido como DL₅₀ para o veneno.

Tabela 1. Atividade letal do veneno de *Bothrops jararaca* em camundongos Swiss albinos pesando 20 ± 2 g

ENSAIO Nº	DL ₅₀ (µg)	L.S.C. (µg)	L.I.C. (µg)	G.L	Q ² Tab.	Q ² Lin.
1	44,27	48,53	40,40	4	9,49	5,80
2	46,84	51,59	43,02	4	9,49	6,16
3	41,65	45,54	37,91	4	9,49	1,16
4	45,23	49,29	41,82	4	9,49	2,29

L.S.C. - limite superior de confiança

L.I.C. - limite inferior de confiança

G.L. - graus de liberdade

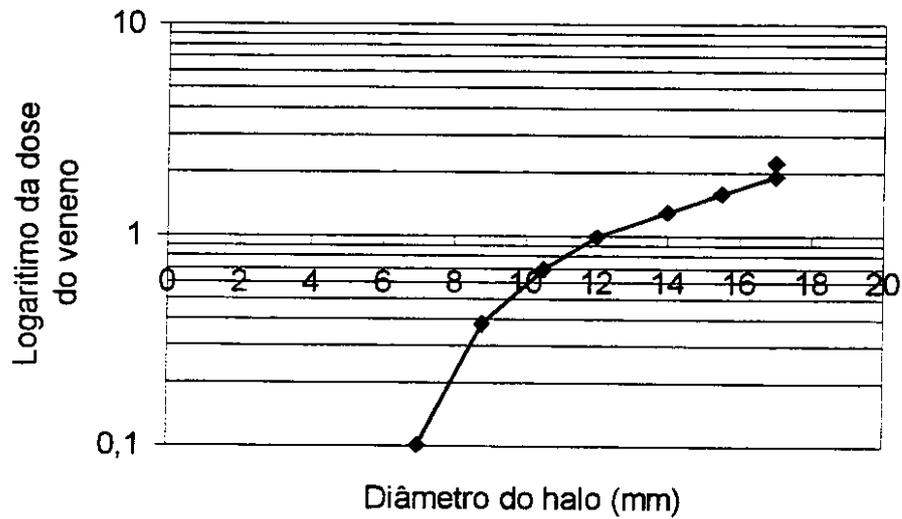
Q² Tab. - valor máximo de qui quadrado (tabela)

Q² Lin. - qui quadrado de linearidade

O veneno de *Bothrops jararaca* - Bj. lote 06/96 apresentou altos níveis de atividade fosfolipásica que foi avaliada através da hemólise indireta em gel de agarose-lecitina-hemácia-CaCl₂. O valor estimado da dose hemolítica sub-

máxima - DHsm foi de 9,5 μg , conforme observado na Figura 1.

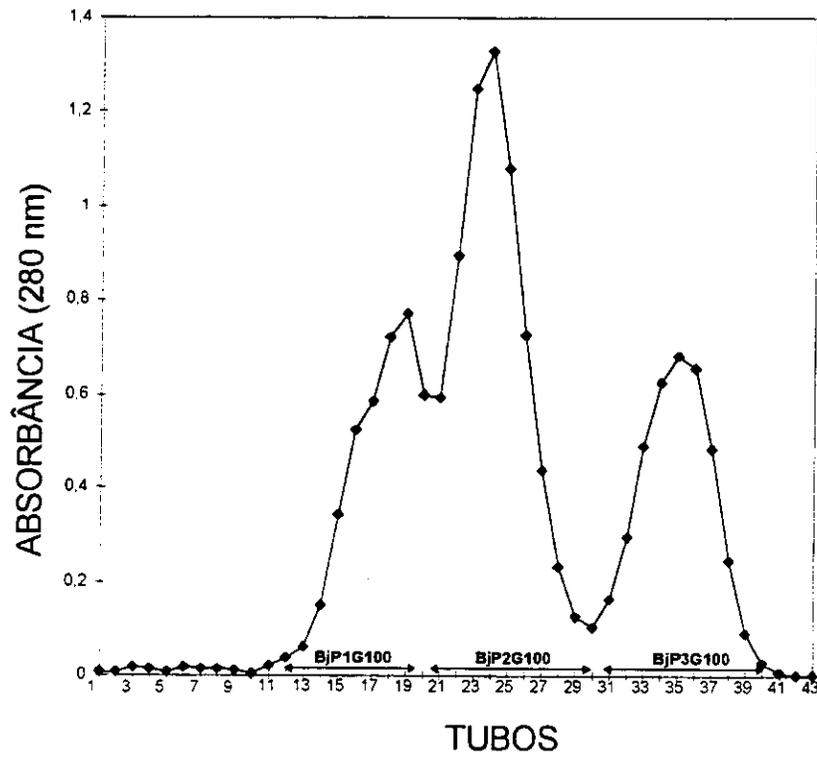
Figura 1. Atividade fosfolipásica do veneno de *Bothrops jararaca* avaliada por hemólise indireta em gel de agarose-hemácias-lecitina ovo- CaCl_2 .



O logaritmo de 0,98 corresponde a uma dose de 9,5 μg de veneno de *B. jararaca*, e esta dose sub-máxima determina um halo hemolítico de 12 mm de diâmetro.

O veneno Bj. lote 06/96 foi submetido à cromatografia de filtração molecular em coluna de Sephadex G-100. A Figura 2 mostra o perfil de fracionamento do veneno, apresentando três picos que foram designados frações Bjp1G100, Bjp2G100, Bjp3G100.

Figura 2. Perfil de fracionamento de 50 mg de veneno de *Bothrops jararaca* em Sephadex G-100.



O tempo de retenção correspondente a eluição dos picos variou de 28-40 horas. A concentração de proteínas totais correspondeu a 31,6% de Bjp1G100, 61,2% de Bjp2G100 e 6% de Bjp3G100. Para verificar a presença de toxicidade letal nas três frações, amostras das mesmas, contendo quantidades correspondentes a 46 µg (1 DL₅₀) foram injetadas por via i.p. em camundongos. A atividade tóxica letal foi localizada apenas na fração Bjp1G100, sendo que todos animais inoculados morreram e nenhuma mortalidade foi observada para as frações Bjp2G100 e Bjp3G100 (dados não apresentados).

4.2. Avaliação dos antivenenos

4.2.1. Neutralização da atividade letal

As amostras dos soros antibotrópicos foram coletadas individualmente, e identificadas de acordo com o número do equino. Estes soros foram avaliados pela sua capacidade de neutralização da letalidade, pré incubando veneno e antiveneno a 37°C por 30 minutos e posterior inoculação em camundongos. A Tabela 2 mostra os resultados da dose efetiva 50% de antissoros dos 30 equinos imunizados com "pool" botrópico.

Tabela 2. Determinação da DE₅₀ de 30 antivenenos botrópicos obtidos de eqüinos hiperimunizados, realizada em camundongos Swiss albinos pesando 20 ± 2 g.

SORO EQÜINO N°	DE ₅₀ (µl)	L.S.C. (µl)	L.I.C. (µl)	G.L	Q ² Tab.	Q ² Lin.
0	27,48	31,04	23,05	5	11,1	2,60
1	40,88	46,32	35,12	3	7,8	0,03
2	35,82	43,02	31,87	3	7,8	6,08
3	28,85	32,69	24,82	3	7,8	1,47
4	19,20	24,03	8,47	3	7,8	1,77
7	40,09	50,59	35,66	3	7,8	4,11
8	19,97	22,25	17,37	5	11,1	0,11
9	23,78	26,58	19,15	3	7,8	6,32
11	39,00	52,51	34,11	3	7,8	2,00
12	21,84	24,18	19,33	5	11,1	0,05
15	32,84	36,12	30,24	3	7,8	3,97
16	32,68	37,19	23,70	3	7,8	3,33
17	23,58	27,66	16,85	5	11,1	7,18
18	28,98	31,43	26,44	3	7,8	5,70
20	28,07	30,93	25,15	3	7,8	3,00
21	25,77	29,99	19,45	5	11,1	1,81
22	30,56	32,69	27,30	3	7,8	1,67
23	34,95	38,64	32,03	3	7,8	2,61
24	27,58	30,25	24,56	3	7,8	0,01
26	26,06	29,18	22,04	3	7,8	4,65
27	50,20	56,27	43,35	5	11,1	2,87
28	52,14	60,74	46,96	3	7,8	2,02
29	25,17	27,92	22,07	5	11,1	0,11
30	70,83	97,70	60,68	5	11,1	7,85
31	59,00	86,13	48,60	5	11,1	5,90
32	36,33	40,99	29,77	3	7,8	9,15
33	18,90	25,74	12,09	5	11,1	2,87
34	41,22	48,48	29,11	5	11,1	1,97
35	111,50	200	90,06	5	11,1	2,87
37	77,40	90,50	63,54	3	7,8	3,57

L.S.C. - limite superior de confiança

L.I.C. - limite inferior de confiança

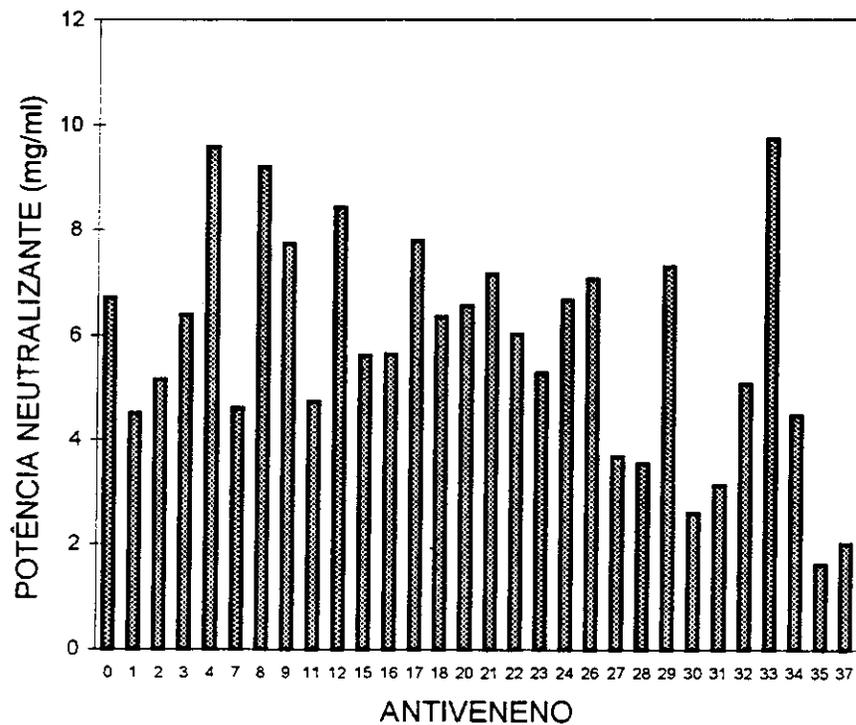
G.L. - graus de liberdade

Q² Tab. - valor máximo de qui quadrado (tabela)

Q² Lin. - qui quadrado de linearidade

Todos os animais imunizados produziram anticorpos anti-fração letal do veneno de *Bothrops jararaca*, em quantidades diversas e apresentaram uma potência neutralizante que variou de 1,6 a 9,7 mg/ml, conforme Figura 3.

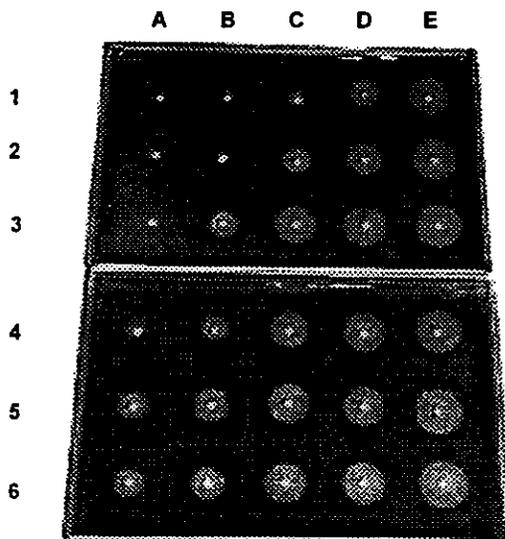
Figura 3. Neutralização da atividade letal do veneno de *Bothrops jararaca* por 30 soros de equinos hiperimunizados com "poo" botrópico.



4.2.2. Neutralização da atividade fosfolipásica

Para analisar a capacidade dos soros antibotrópicos em neutralizarem a atividade da fosfolipase A_2 , foram pré incubados veneno e antiveneno a 37°C por 30 minutos e posterior avaliação da RIHI em gel, conforme Figura 4.

Figura 4. Neutralização da atividade fosfolipásica do veneno de *Bothrops jararaca* por inibição da hemólise indireta em gel.



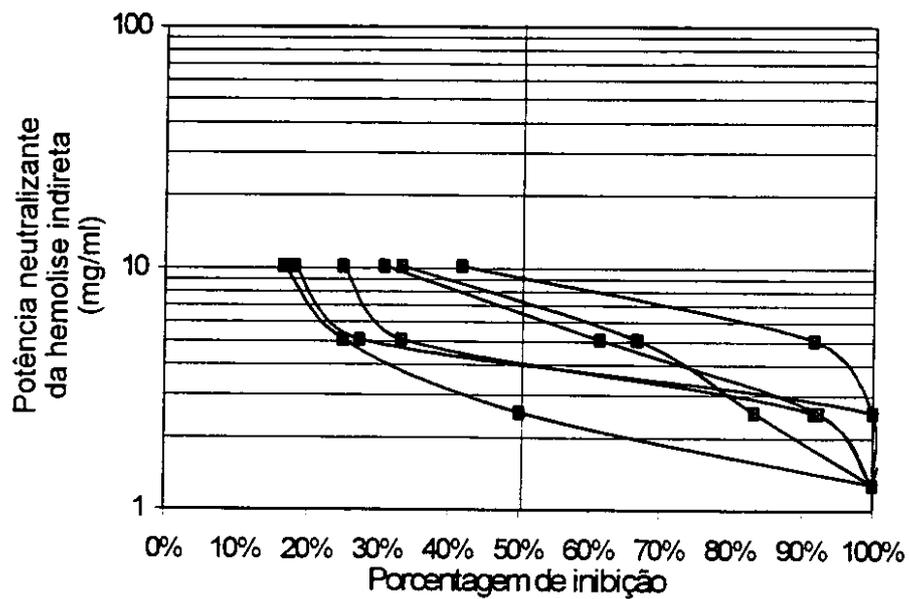
A, B, C e D correspondem as diluições 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16 dos soros antibotrópicos testados, após incubação com dose hemolítica sub-máxima do veneno.

E corresponde ao controle positivo da dose hemolítica para cada soro testado.

1 apresenta um soro com potência neutralizante de 9 mg/ml, 2 um soro com potência neutralizante de 7 mg/ml, 3 e 4 soros com potência neutralizante de 5 mg/ml, 5 soro com potência neutralizante de 3 mg/ml e 6 soro com potência neutralizante de 1 mg/ml.

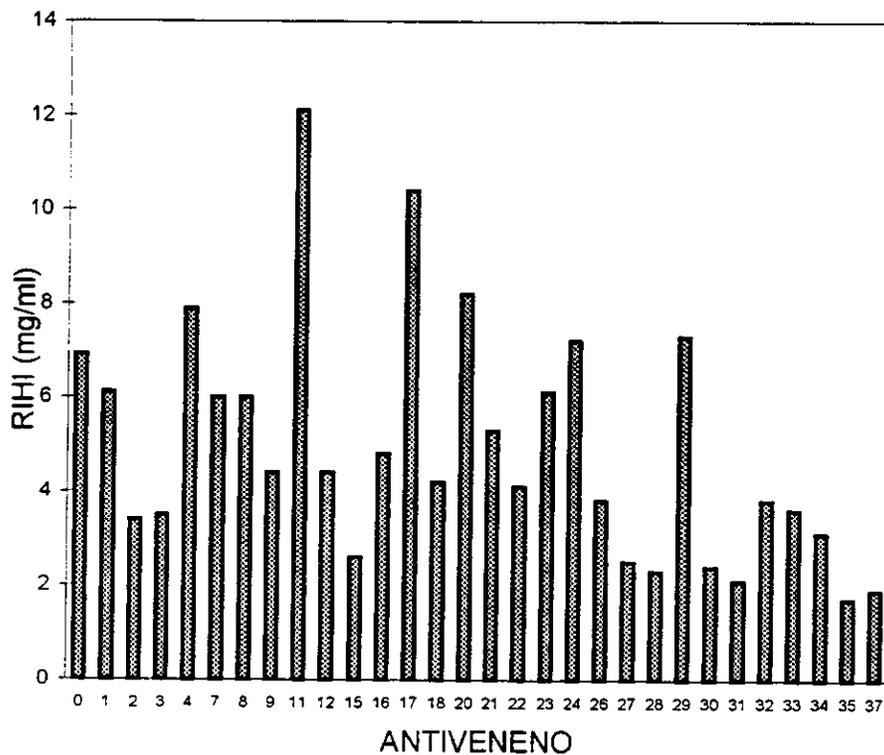
Para determinar a dose efetiva 50% dos antissoros foram realizadas curvas dose-resposta observadas na Figura 5.

Figura 5. Curvas dose-resposta de soros antibotrópicos em Reação de inibição da hemólise indireta - RIHI.



Todos os animais imunizados produziram anticorpos anti-fosfolipase A₂ presente no veneno de *Bothrops jararaca*, em quantidades diversas e apresentaram uma potência neutralizante que variou de 1,7 a 12,1 mg/ml, conforme Figura 6. Todas as amostras de antivenenos foram analisadas três vezes e os dados representam a média destes resultados.

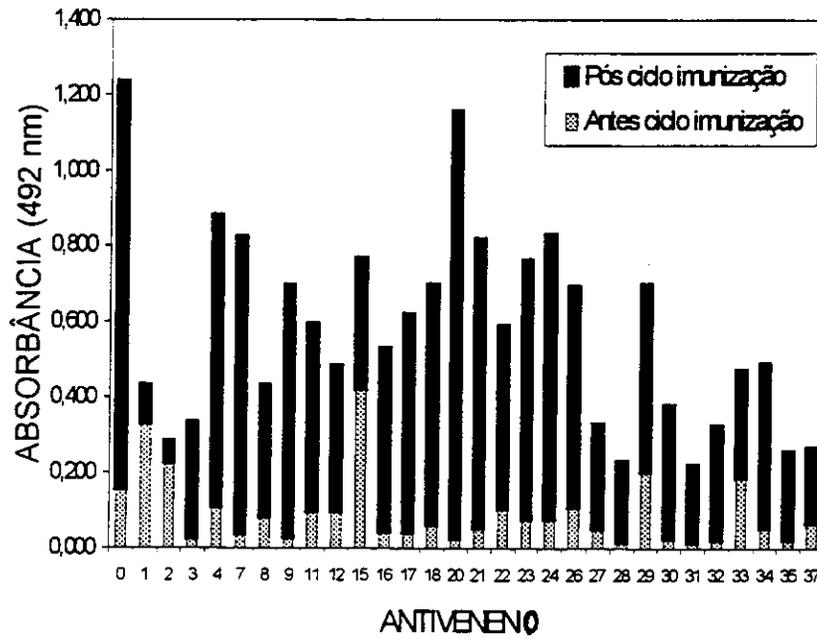
Figura 6. Neutralização da atividade fosfolipásica presente no veneno de *Bothrops jararaca* por 30 soros de eqüinos hiperimunizados com pool botrópico.



4.2.3. Resposta humoral ao veneno de *Bothrops jararaca*, detectada pela técnica de ELISA

Os níveis de anticorpos da classe IgG antiveneno foram avaliados por ELISA nas amostras de soros coletadas antes do início do protocolo de imunizações dos eqüinos. Como pode ser observado na Figura 7, o "pool" botrópico utilizado na imunização mostrou-se bastante imunogênico, e após o término das inoculações, todos os eqüinos apresentaram aumento dos níveis de anticorpos IgG antiveneno botrópico. Nos soros dos 30 animais hiperimunizados foram detectados diferentes níveis de IgG-antiveneno.

Figura 7. Níveis de anticorpos anti-*Bothrops jararaca* medidos por ELISA em 30 soros de equinos hiperimunizados com "pool" botrópico.

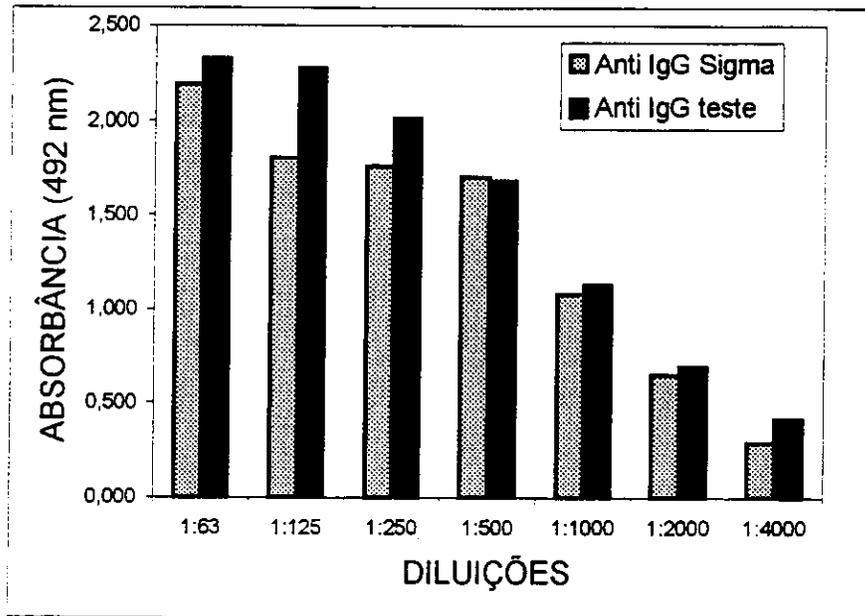


As placas foram sensibilizadas com 50 ng/poço de veneno bruto de *B. jararaca* e incubadas com soros testes diluídos 1:80.000.

4.3 - Produção do conjugado

O conjugado foi produzido com IgG ovina anti-IgG eqüina e peroxidase. Foram preparados aproximadamente 3,0 ml de conjugado e este foi avaliado conforme Figura 8. O conjugado apresentou boa estabilidade, pois não houve diminuição do título durante o período de trabalho.

Figura 8. Níveis de anticorpos anti-IgG eqüina medidos por teste ELISA de conjugados com peroxidase



As placas foram sensibilizadas com 7 ng/poço de gG total eqüina, os conjugados anti-IgG, comercial da Sigma produzido em coelho e o produzido em ovino foram incubados em diluições sucessivas.

4.4. Padronização do teste de ELISA

Foram utilizadas diferentes concentrações dos antígenos, ou seja, veneno total *Bothrops jararaca* ou Bjp1G100, e determinada a concentração ótima para os testes imunoenzimáticos, que foi de 5 ng/well, quando se sensibilizou as placas de ELISA com veneno bruto e de 50 ng/well quando se sensibilizou as placas de ELISA com Bjp1G100 (dados não apresentados).

Na determinação da melhor diluição para os soros, foram utilizadas diluições seriadas de todos os antivenenos testados, após avaliadas as curvas foi estabelecida a diluição ideal do antiveneno de 1:80.000 quando o antígeno utilizado foi veneno bruto e diluição de 1:32.000 quando o antígeno utilizado foi Bjp1G100 (dados não apresentados).

A Figura 8 mostra que a melhor diluição do conjugado a ser usado foi de 1:1000, semelhante ao conjugado comercial da Sigma, ou seja, quando na concentração de 7ng/poço obteve-se leitura de absorbância a 492 nm em torno de 1,000.

Após padronização do teste todas as amostras de antivenenos foram analisadas três vezes e os dados representam a média destes resultados.

4.5. Sensibilidade e especificidade dos testes ELISA e RIHI

Para avaliar estes valores, desde que neste estudo não trabalhou-se com sorologia positiva ou negativa, foi determinado, para o teste oficial de soroneutralização, que as amostras positivas seriam aquelas que possuísem valores acima de 5 mg/ml e negativas com valores abaixo de 5 mg/ml. Estes valores foram estipulados devido a exigência de potência do soro antitoxínico ser de neutralização de 5 mg de veneno por um ml de antiveneno.

O ponto de corte para o teste de ELISA foi estabelecido em leitura de absorvância 0,700 e para o teste RIHI em capacidade neutralizante de 3mg/ml. Os valores dos testes *in vitro* foram cruzados com os valores do ensaio *in vivo*, conforme Tabelas 3 e 4.

Tabela 3. Sensibilidade e especificidade do teste de ELISA para avaliar anticorpos neutralizantes de letalidade em antivenenos botrópicos

SORONEUTRALIZAÇÃO	ELISA Positivo	ELISA Negativo
Positivo	18	2
Negativo	4	6
Total	22	8

Considerou-se ELISA positivo valores de absorbância (492 nm) acima de 0,7, e ELISA negativo valores de absorbância (492 nm) abaixo de 0,7.

Sensibilidade do teste de ELISA = 81,8 %

Especificidade do teste de ELISA = 75 %

Tabela 4. Sensibilidade e especificidade do teste de RIHI para avaliar anticorpos neutralizantes de atividade fosfolipásica em antivenenos botrópicos

SORONEUTRALIZAÇÃO	RIHI Positivo	RIHI Negativo
Positivo	19	1
Negativo	4	6
Total	23	7

Considerou-se RIHI positivo os valores de potência neutralizante acima de 3 mg/ml e RIHI negativo os valores abaixo de 3 mg/ml.

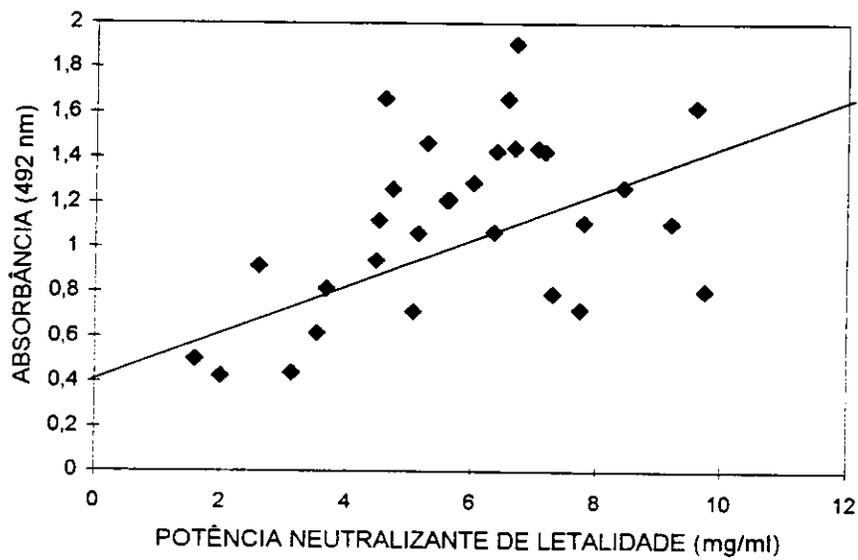
Sensibilidade do teste de RIHI = 82,6 %

Especificidade do teste de RIHI = 85,7 %

4.6. Estudos de correlação entre os ensaios de ELISA, RIHI e soroneutralização

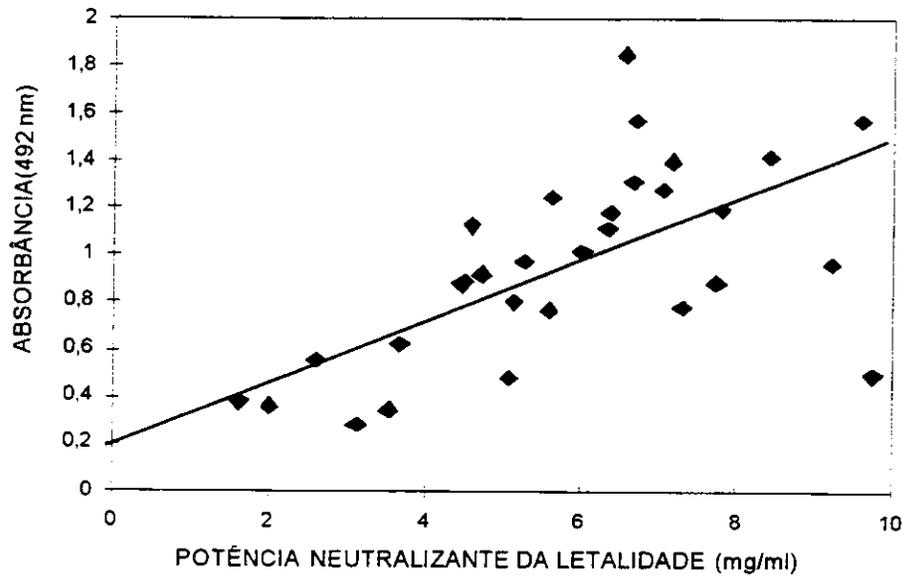
As potências dos antivenenos produzidos em eqüinos que foram determinadas *in vivo* por neutralização em camundongos foram comparadas com os resultados obtidos por ELISA indireto através de coeficiente de correlação realizado através do Programa Instat. As Figuras 9 e 10 apresentam as correlações obtidas entre a potência neutralizante em mg/ml e títulos de ELISA em absorbância a 492 nm quando utilizou-se veneno bruto ou fração B;P1G100 como antígeno, respectivamente.

Figura 9. Correlação entre soroneutralização e ELISA indireto utilizando veneno bruto de *B. jararaca* como antígeno, de 30 soros de eqüinos hiperimunizados com "pool" botrópico.



As placas foram sensibilizadas com 5 ng/poço de veneno bruto de *B. jararaca* e os soros diluídos 1:80.000.
Os valores de correlação obtidos foram $r = 0,45$ e $p < 0,05$.

Figura 10. Correlação entre soroneutralização e ELISA indireto utilizando Bjp1G100 como antígeno, de 30 soros de eqüinos hiperimunizados com "pool" botrópico.



As placas foram sensibilizadas com 50 ng/poço de Bjp1G100 e os soros diluídos 1:32.000.

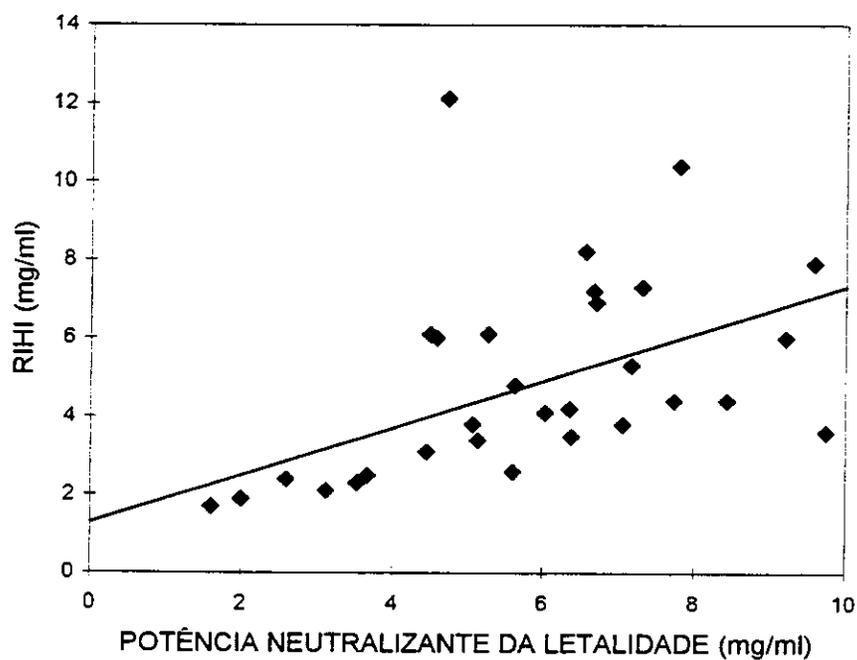
Os valores de correlação obtidos foram $r = 0,60$ e $p < 0,0005$

Os resultados obtidos entre os dois ensaios de ELISA e soroneutralização apresentaram coeficientes de correlação (r) de 0,45 ($p < 0,05$) e 0,60 ($p < 0,0005$) quando utilizou-se os antígenos, veneno bruto ou fração tóxica do veneno de *Bothrops jararaca*, respectivamente, demonstrando um aumento significativo nos valores de correlação quando se utiliza fração purificada do veneno como antígeno.

Também foi correlacionado a potência neutralizante com títulos obtidos por ELISA de competição, e obteve-se um índice muito baixo de correlação (dados não apresentados). Assim, como nos outros testes de avaliação dos antivenenos previamente ocorre uma ligação veneno-antiveneno anterior ao ensaio, utilizou-se para os testes de ELISA de competição, o antígeno, veneno de *B. jararaca* competindo na fase sólida e líquida. Tentou-se uma incubação prévia da mistura antígeno-anticorpo em várias concentrações, diferentes intervalos de tempo e em diversas temperaturas anteriormente a detecção de anticorpos pela reação imunoenzimática.

Para correlacionar anticorpos neutralizantes da letalidade, avaliados por soroneutralização e anticorpos neutralizantes da atividade fosfolipásica, avaliados por RIHI, foi novamente utilizado o coeficiente de correlação e os resultados apresentados na Figura 11. Uma baixa correlação foi obtida onde valor de $r = 0,46$ e $p < 0,02$.

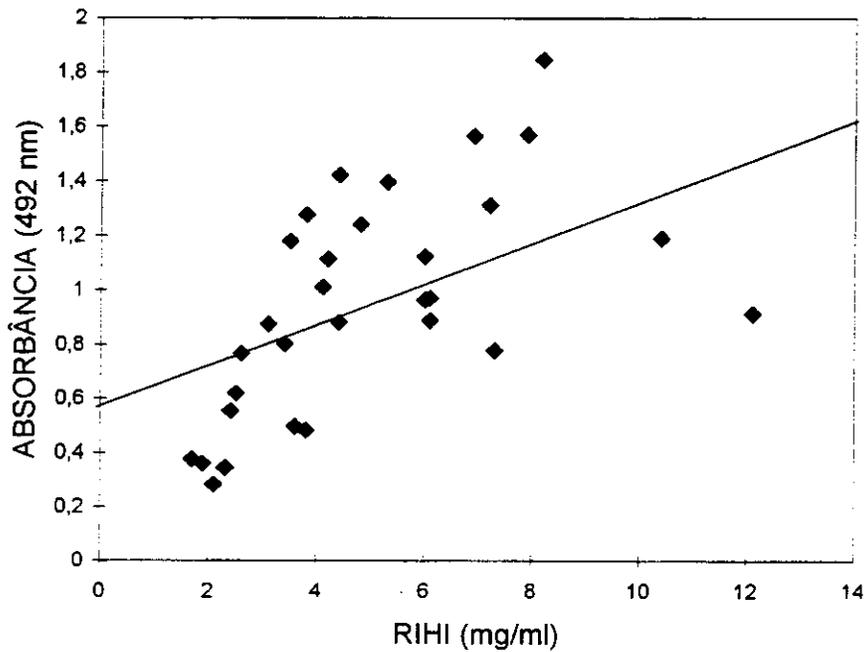
Figura 11. Correlação entre soroneutralização e RIHI de 30 soros de eqüinos hiperimunizados com "pool" botrópico.



Os valores de correlação obtidos foram de $r = 0,46$ e $p < 0,02$.

Outro estudo foi realizado correlacionando-se os valores obtidos nos testes de ELISA e RIHI, e foram obtidos valores de $r = 0,59$ e $p < 0,001$, apresentando correlação média entre estes testes, conforme Figura 12.

Figura 12. Correlação entre ELISA indireto e RIHI de 30 soros de equinos hiperimunizados com "pool" botrópico.



O antígeno utilizado no teste de ELISA indireto foi B_JP1G100, os valores obtidos foram $r = 0,59$ e $p < 0,001$.

4.7. Estimativa de custos

Para realização dos ensaios de soroneutralização na avaliação dos 30 antivenenos botrópicos foram necessários 460 mg de veneno, 100 ml de antiveneno e 2000 camundongos. O tempo utilizado para se obter resultados finais para cada soro teste foi de 50 horas, e para avaliar os 30 soros testes foi de 30 dias. Estimou-se um custo de aproximadamente R\$40,00 para cada antiveneno testado.

Para realização dos ensaios de RIHI na avaliação dos 30 antivenenos botrópicos foram necessários 5 mg de veneno, 5 ml de antiveneno. O tempo utilizado para se obter resultados finais para cada soro teste foi de 20 horas, e para avaliar os 30 soros testes foi de 30 horas, estimando-se em R\$1,50 o custo para cada antiveneno testado.

Para realização dos ensaios de ELISA na avaliação dos 30 antivenenos botrópicos foram necessários 52 mg de veneno, 3 ml de antiveneno. O tempo utilizado para se obter resultados finais para cada soro teste foi de 4 horas, e para avaliar os 30 soros testes foi de 5 horas, com custo de aproximadamente R\$3,00 para cada antiveneno testado.

5 DISCUSSÃO

Envenenamentos humanos por picadas de serpentes são considerados emergência médica e requerem tratamento imediato, geralmente com antivenenos heterólogos. A taxa de mortalidade nos acidentados estimada em 2%, cresce para 8% quando não se usa antivenenos (WHO, 1981).

Neste trabalho foram produzidos 30 soros antibotrópicos em eqüinos e avaliadas suas potências neutralizantes utilizando-se os métodos de neutralização da letalidade e inibição da atividade fosfolipásica. Os valores encontrados foram correlacionados com títulos de anticorpos (medidos pelo teste de ELISA) no intuito de se padronizar um método imunoenzimático eficiente na avaliação da capacidade neutralizante dos antivenenos botrópicos.

O antígeno utilizado na imunização dos eqüinos foi uma mistura de venenos botrópicos, entretanto, os testes de soroneutralização, RIHI e ELISAs foram feitos usando-se o veneno de *Bothrops jararaca* que é o veneno de referência para ensaiar a potência dos soros antibotrópicos no Brasil (DOU, 1996).

Os primeiros ensaios realizados foram realizados para caracterizar o veneno de *B. jararaca* quanto a sua propriedade letal e a sua atividade fosfolipásica. As propriedades letais dos venenos de serpentes são predominantemente realizadas em animais de experimentação. O teste de dose letal 50% (DL₅₀) foi

introduzido por Trevan (1927) e apesar das suas limitações foi o ensaio de melhor aceitação em função da sua capacidade de determinar a toxicidade aguda ou potência biológica dos venenos (Meier & Theakston, 1986). Desde então, este teste sofreu várias modificações e diversos autores têm trabalhado com metodologias diferentes na determinação da DL₅₀ de venenos ofídicos. Para o veneno de *Bothrops jararaca*, o valor encontrado neste estudo para a DL₅₀ foi de 45,5 µg/20 g de camundongo, bem próximo aos valores de 45,9 µg, 47,5 µg e 48,7 µg, estimados por Sanchez et al. (1992) e pela Fundação Oswaldo Cruz, *B. jararaca* (Bj) lote 004 (1996). Entretanto, Ferreira et al. (1992b), Sanchez et al. (1992) e Barbosa et al. (1995), encontraram valores de 33 µg, 38,7 µg e 55 µg/20 g de camundongo, respectivamente, para DL₅₀ de outros lotes de veneno da serpente *B. jararaca*. Estes resultados indicam que os componentes tóxicos letais do veneno de uma mesma espécie podem variar quantitativa e qualitativamente, e/ou, os animais experimentais utilizados nos ensaios por pertencerem a linhagens diferentes e serem mantidos em condições diversas, apresentam índices diferenciados de mortalidade nas curvas de dose-resposta dos ensaios de DL₅₀.

Na determinação da atividade fosfolipásica e hemolítica do veneno de *B. jararaca* os ensaios foram realizados avaliando-se a hemólise indireta em gel. Os resultados indicaram que o veneno de *B. jararaca* lote 06/96 apresentou bastante atividade fosfolipásica (Fig. 1). Vários autores relataram atividade enzimática da PLA₂ em venenos de serpentes do gênero *Bothrops* (Gené et al., 1985; Al-Abdulla et al., 1991; Ferreira et al., 1992a e Lôbo de Araújo et al., 1994). Recentemente, Monteiro et al. (1997) estudando individualmente seis venenos de *B. jararaca*, constataram atividade fosfolipásica apenas em cinco destes. Isto sugere

que esta enzima pode constar ou não, inclusive em quantidades diferentes da composição protéica complexa dos venenos botrópicos.

Na tentativa de purificar e posteriormente avaliar as propriedades toxicológicas dos diversos componentes, o veneno bruto de *B. jararaca* foi submetido a fracionamento molecular em coluna de Sephadex G-100. O veneno de *B. jararaca* foi separado em apenas três frações (Fig. 2), e somente a primeira fração (BjP₁G100) mostrou-se com efeito tóxico e letal para camundongos. Os resultados obtidos neste estudo são coincidentes com os encontrados por Nisenbom et al. (1986) que purificaram o veneno em cromatografia Sephadex G-50 e observaram fracionamento em três picos, estudaram a atividade fosfolipásica que foi evidenciada no segundo pico e correspondia a moléculas de peso molecular em torno de 15.000, entretanto estes autores não avaliaram a atividade letal das frações obtidas no fracionamento.

As proteínas de alto peso molecular (>50.000) presentes na fração BjP₁G100, provavelmente correspondem à fatores hemorrágicos, proteinases coagulantes, enzimas semelhantes a trombina e outras (Moura da Silva et al., 1990a). Estes autores e, também, Tanigawa et al. (1994), purificaram o veneno de *B. jararaca* em coluna de filtração molecular Sephacryl S-200.

Para avaliar a neutralização da letalidade, após obter-se os valores de dose efetiva mediana (Tab. 2), os resultados foram expressos em potência neutralizante (Fig. 3). Observou-se que, os venenos das cinco espécies de *Bothrops* utilizados na imunização dos animais foram capazes de induzir anticorpos e conferir proteção em diferentes graus aos camundongos. O ensaio de

soroneutralização foi utilizado neste estudo por ser o teste oficial e padronizado, conforme Normas Técnicas de Produção e Controle de Qualidade de soros antiofídicos, antitóxicos e anti-rábico (DOU, 1996). Porém, desde 1968, em trabalho de Kocholaty et al., esta técnica vem sendo questionada, pois, estes autores obtiveram resultados de neutralização do antiveneno com até 100% de diferença entre as diversas vias de administração de venenos e antivenenos, e explicam que normalmente num acidente ofídico a inoculação do veneno ocorre por via intradérmica, subcutânea ou intramuscular e, raramente por via intraperitoneal ou intravenosa. Concluíram que os diversos componentes dos venenos e antivenenos, por apresentarem tamanhos moleculares, propriedades físicas, químicas e fisiológicas diferentes, resultavam em cinéticas diferentes de absorção, penetração e ligação nos sítios de ação, dependentes inclusive da via de administração. Concordando com estes resultados, Domingos et al. (1994), demonstraram que, quando antiveneno de *B.jararaca* foi injetado intradermicamente em camundongos, foi mais efetivo para neutralizar ou minimizar os efeitos locais do veneno que quando injetado por via intravenosa. Concluíram também, que a eficácia na neutralização dos efeitos locais estava associada ao tempo de administração do antiveneno após inoculação do veneno. Entretanto, Laing et al. (1992) avaliando em animais experimentais, a capacidade neutralizante dos três antivenenos botrópicos produzidos no Brasil, concluíram que os efeitos protetores foram mais ou menos efetivos dependente do instituto produtor do antiveneno. Trabalho recente de Krifi et al. (1996), baseando-se nos diferentes resultados de vários autores, sugere então a padronização de novos procedimentos e parâmetros para melhor avaliarem os antivenenos.

Outro ensaio realizado neste estudo foi a capacidade destes antivenenos de inibirem a hemólise indireta, ou seja, neutralizarem a atividade fosfolipásica do veneno. Para se obter resultados sem influência de outras variáveis como: concentração de fosfolípides na gema de ovo, fragilidade da membrana celular das hemácias de carneiro ou uniformidade do gel em cada placa, utilizou-se um controle de atividade hemolítica do veneno para cada soro testado, conforme apresentado na Figura 4. Os resultados apresentados na Figura 5, indicam diferentes pendências das curvas de neutralização dos antivenenos, isto pode ser explicado pelo fato do veneno bruto de *B jararaca* possuir várias isoenzimas ou isoformas de fosfolipases, que funcionariam como diferentes sistemas antigênicos. Então, um animal pode produzir mais anticorpos contra uma isoenzima que contra a outra, e outro animal produzir mais anticorpos contra uma segunda, formando diferentes sistemas antígeno-anticorpos, e assim após incubação poderá haver predominância de um sistema sobre o outro.

Quando tentou-se correlacionar os resultados obtidos nos ensaios de neutralização da letalidade e neutralização da atividade fosfolipásica dos soros testes (Fig. 11), estes demonstraram baixo índice de correlação ($r= 0,46$) apesar da validação estatística com valor de $p < 0,02$. Estes resultados diferem dos obtidos por Da Silva e Bier (1982), Gutiérrez et al. (1988) e Alape-Girón et al. (1997) que determinaram altos índices de correlação entre os dois ensaios para antivenenos das serpentes *Crotalus durissus terrificus*, *Bothrops asper* e *Micrurus nigrocintus*, respectivamente. Diferentemente, Al-Abdulla et al. (1991), concluíram que a quantidade de antiveneno requerida para neutralizar a atividade hemolítica indireta do veneno de *Crotalus durissus terrificus* é muito superior àquela necessária para prevenir a atividade tóxica letal *in vivo*. A

baixa correlação entre os dois testes verificada nos resultados aqui apresentados não é surpreendente, visto que, a atividade fosfolipásica não é o principal componente com importância clínica dos venenos botrópicos; assim sugere-se que o veneno de *B. jararaca* por ser muito complexo, provavelmente possui atividade letal desencadeada por outros componentes que poderiam estar associados à fosfolipase, concordando com os resultados verificados por Hanashiro et al. (1978).

Um fato interessante observado ao correlacionar apenas as 18 amostras com valor de DE_{50} da RIHI abaixo de 5 mg/ml, no qual obteve-se um alto índice de correlação ($r = 0,80$), sugerindo que os animais que produziram menor título de anticorpos anti-fosfolipase também produziram menor quantidade de anticorpos neutralizantes do efeito tóxico do veneno. Observou-se que o soro do animal número 11 apresenta maior divergência da reta linear da regressão, e quando retira-se tal amostra do estudo, o índice de correlação aumenta para 0,60.

O tratamento estatístico dos resultados finais deste estudo foi realizado considerando-se um intervalo de confiança de 95% na curva de dispersão normal dos dados, e retirou-se do estudo de correlação as quatro amostras consideradas "extremos" (média \pm duas vezes desvio padrão). Portanto, obteve-se um índice de correlação das 26 amostras avaliadas pelo testes de soroneutralização e RIHI de 0,76, sugerindo uma boa correlação entre os dois ensaios

Theakston & Reid (1979), desenvolveram o teste de ELISA para dosar anticorpos antivenenos e obtiveram alta correlação entre níveis de anticorpos e os ensaios de DE_{50} em camundongos, para antivenenos de *Bitis arietans*, *Echis carinatus*, *Naja haje* e *Naja nigricollis*. Resultados

semelhantes foram obtidos por Rungsiwongse e Ratanabanangkoon (1991), principalmente quando utilizou neurotoxina purificada do veneno de *Naja* como antígeno no teste de ELISA. No Brasil, Barbosa et al. (1995) demonstraram também alta correlação entre potência neutralizante e títulos de anticorpos medidos por ELISA de oito amostras anticrotálicas; entretanto, baixa correlação foi relatada quando soros antitetrópicos foram testadas, mesmo utilizando fração purificada ou veneno bruto de *B. jararaca* como antígenos.

Neste trabalho, desenvolveu-se e padronizou-se teste de ELISA indireto utilizando como antígeno o veneno bruto de *B. jararaca*, os resultados apresentados na Figura 9, indicam que mesmo com validação estatística (valor de $p < 0,05$), o índice de correlação entre níveis de anticorpos e potência neutralizante foi baixo ($r = 0,45$). Objetivando alcançar melhores índices de concordância entre níveis de anticorpos e neutralização da letalidade utilizou-se como antígeno na placa de ELISA a fração tóxica B_JP₁G100. Os resultados apresentados na Figura 10 indicam alta significância estatística ($p < 0,0005$) e médio índice de correlação ($r = 0,60$). Pode-se notar que uma amostra é muito destoante na regressão linear, correspondente ao animal número 33, e quando retira-se esta amostra do ensaio, o valor de r passa de 0,60 para 0,73, indicando aumento significativo na correlação. Talvez uma explicação para este fato, seria a pouca diferenciação dos anticorpos produzidos por este animal, pois este foi submetido ao primeiro ciclo de imunização, sendo que o soro deste equino conferiu a maior proteção de letalidade aos camundongos dentre todos os trinta soros avaliados. Interessante observação também se deve ao fato deste animal já possuir anticorpos contra *B. jararaca* antes das imunizações, demonstrados na Figura 7. Isto sugere que este animal possa ter tido anteriormente

contato com algum animal peçonhento ou outras moléculas com identidade antigênica com o veneno de *B. jararaca*.

Após tratamento estatístico dos resultados finais deste estudo, considerando-se o intervalo de confiança de 95% na curva de dispersão normal dos dados e retirando-se as quatro amostras consideradas "extremos" (média \pm duas vezes desvio padrão, o índice de correlação das 26 amostras avaliadas pelo testes de soroneutralização e ELISA apresenta um valor de r de 0,85, demonstrando uma boa correlação entre níveis de anticorpos medidos por ELISA e soroneutralização.

Na tentativa de correlacionar os dois ensaios *in vitro* (ELISA e RIHI), observou-se, conforme Figura 12, um baixo índice de correlação com valor de $r = 0,59$, confirmando os dados já apresentados por Angulo et al. (1997) e Alape-Girón et al. (1997). Entretanto, estas técnicas *in vitro*, conforme Tabelas 3 e 4, apresentaram altos valores de sensibilidade e especificidade em relação ao teste padrão da soroneutralização, sugerindo que podem ser utilizadas como teste de triagem para avaliação da capacidade neutralizante de antivenenos botrópicos principalmente nas etapas iniciais da produção de soros.

As vantagens dos testes *in vitro*, além dos aspectos relacionados as limitações de ensaios biológicos, referem-se a redução de tempo e de recursos financeiros. O teste de ELISA possui sobre o RIHI as vantagens de ter leitura automatizada e realizar maior número de amostras em menor tempo. O teste de RIHI possui a vantagem de ser mais econômico, por utilizar somente reagentes de baixo custo.

Finalmente, os resultados obtidos no presente estudo indicam que o método de ELISA utilizando-se a fração tóxica do veneno de *B. jararaca* como antígeno imobilizado na fase sólida pode ser usado como método *in vitro* para avaliar a potência neutralizante dos antivenenos botrópicos no Brasil, durante as diferentes fases de imunização dos eqüinos e em algumas etapas de produção dos antivenenos botrópicos. Entretanto, supõe-se que o método clássico de soroneutralização em camundongos possa ser utilizado apenas nas etapas finais da produção dos soros antibotrópicos.

6 CONCLUSÕES

- Os antivenenos botrópicos obtidos em 30 eqüinos hiperimunizados neutralizaram, com diferentes valores, as atividades letal e fosfolipásica do veneno de *Bothrops jararaca*.
 - O perfil cromatográfico do veneno de *Bothrops jararaca* em Sephadex G-100 resultou em três frações. A análise da atividade biológica das frações indicou que os componentes responsáveis pela atividade letal do veneno estão localizados na primeira fração.
 - O teste de ELISA indireto, utilizando fração tóxica do veneno de *B. jararaca*, como antígeno, foi eficaz em determinar a potência neutralizante dos antivenenos botrópicos, podendo ser usado como triagem, na avaliação de soros de eqüinos hiperimunizados e na produção dos soros antibotrópicos.
 - O método de inibição da hemólise indireta em gel de agarose foi mais eficaz, quando comparado com o teste de ELISA indireto, em confirmar os soros antibotrópicos com baixas capacidades de neutralização da letalidade, portanto, podendo também ser usado na avaliação individual dos antivenenos botrópicos em eqüinos.
-

- Os dois ensaios *in vitro*, ELISA e RIHI, quando comparados com soroneutralização, foram mais econômicos, utilizaram menores quantidades de antígenos e anticorpos e realizados em menor tempo.

SUMMARY

The correlation coefficients between *in vivo* neutralization of lethal toxicity (ED_{50}), neutralization of the hemolytic activity (PLA_2) and levels of antibodies measured by ELISA, was investigated to test the potency of horse anti-bothropic antivenom. Thirty horses were hyperimmunized with *Bothrops* venoms (*B. alternatus*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. neuwiedii* and *B. moojeni*). To set up an indirect ELISA, for neutralization of PLA_2 activity and for determination of ED_{50} in Swiss mice, the whole *Bothrops jararaca* venom (reference venom for assessing the bothropic antivenom potency in Brazil) was used. The toxic fraction (purified from *B. jararaca* venom by Sephadex G-100 chromatography) was also used as antigen for ELISA. All antivenoms analyzed effectively neutralized the lethal activity in the range of 1.6 to 9.6 mg/ml of antivenom. The correlation coefficient between ED_{50} and ELISA antibody titers against the crude venom and toxic fraction was $r=0.45$ ($P<0.05$) and $r=0.60$ ($P<0.0005$), respectively. Correlation between ED_{50} and neutralization of PLA_2 activity was $r=0.46$ ($P<0.02$), and the correlation between ELISA antibody titers and neutralization of PLA_2 activity was $r=0.59$ ($P<0.001$). Thus, the ELISA which measures only the antibody against the major toxic fraction of the *B. jararaca* venom should be most suitable for use as an *in vitro* assay of bothropic antivenom potency.

Key-words: Antivenons, ELISA, phospholipase A_2

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-ABDULLA, I.H., SIDKI, A.M., LANDON, J. An indirect haemolytic assay for assessing antivenoms. **Toxicon**, v.29, n.8, p.1043-1046, 1991.
- ALAPE-GIRÓN, A., MIRANDA-ARRIETA, K., CORTES-BRATTI, X. 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, n.4, p.573-581, 1997.
- ANGULO, Y., ESTRADA, R., GUTIÉRREZ, J.M. Clinical and laboratory alterations in horses during immunization with snake venoms for the production of polyvalent (crotaline) antivenom. **Toxicon**, v.35, n.1, p.81-90, 1997.
- BARBOSA, C.F., RODRIGUES, R.J., OLORTEGUI, C.C. et al. Determination of the neutralizing potency of horse antivenom against bothropic and crotalic venoms by indirect enzyme immunoassay. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.28, n.10, p.1077-1080, 1995.
- BIEBER, A.L. Metal and non protein constituents in snake venoms. In: **Snake Venoms**. Berlin: Springer-Verlag (C.Y. Lee), p.295-308, 1979.
- BON, C., GOYFFON, M. (Ed.) **Envenomings and their treatments**. Lyon: Fondation Marcel Mérieux. 1995. 343p.
-

- BORKOW, G., GUTIÉRREZ, J.M., OVADIA, M. Inhibition of hemorrhagic activity of *Bothrops asper* venom by a novel neutralizing mixture. **Toxicon**, v.35, n.6, p.865-877, 1997.
- CAMPBELL, J.A., LAMAR, W.W. In: **The Venomous Reptiles of Latin America**. Ithaca, New York, Comstock, 1989.
- DA SILVA, M.H., BIER, O.G. Titration of antiserum to South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom by measuring inhibition of phospholipase A₂ activity. **Toxicon**, v.20, n.3, p.563-569, 1982.
- DAVIDSON, F. & DENNIS, E.A. Evolutionary relationships and implications for the regulation of phospholipase A₂ from snake venom to human secreted forms. **J. Molec. Evol.**, v.31, p.228-238, 1990.
- DE LUCA, M., WARD, C.M., OHMORI, K. et al. Jararhagin and jaracetin: Novel snake venom inhibitors of the integrin collagen receptor, $\alpha_2\beta_1$. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.206, n.2, p.570-576, 1995.
- DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO. Portaria Nº 174 de 11 nov. 1996. Normas de produção e controle de qualidade dos soros antiofídicos, antitóxicos e anti-rábico. Brasília, 12 nov. 1996.
- DOMINGOS, M.O., TAKEHARA, H.A., LAING, G. et al. Detection and neutralization of *B. jararaca* venom in mice. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.27, n.11, p.2613-2622, 1994.
-

- ENGVALL, E., PERLMANN, P. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA): quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochem.*, v.8, n.9, p.871-874, 1971.
- EY, P.L., POWSE, S.J., JENKIN, C.R. Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein-A-Sepharose. *Immunochem.*, v.15, n.7, p.429-436, 1978.
- FARSKY, S.H.P., WALBER, J., COSTA-CRUZ, M. et al. Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom: *in vivo* and *in vitro* studies. *Toxicon*, v.35, n.2, p.185-193, 1997.
- FERREIRA, M.L., MOURA DA SILVA, A.M., MOTA, I. Neutralization of different activities of venoms from nine species of *Bothrops* snakes by *Bothrops jararaca* antivenom. *Toxicon*, v.30, n.12, p.1591-1602, 1992(a).
- FERREIRA, M.L., MOURA DA SILVA, A.M., FRANÇA, F.O.S. et al. Toxic activities of venoms from nine *Bothrops* species and their correlation with lethality and necrosis. *Toxicon*, v.30, n.12, p.1603-1608, 1992(b).
- FINNEY, D.J. **Probit Analysis**. Cambridge: 3rd edition. 1971.
- FUJIMURA, Y., TITANI, K., USAMI, Y. et al. Isolation and chemical characterization of two structurally and functionally distinct forms of botrocetin, the platelet coagglutinin isolated from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry*, v.30, n.7, p.1957-1964, 1991.
-

- GAWADE, S.P., GAITONDE, B.B. Immunological studies on monovalent *Enhydrina schistosa* antivenin. **Indian. J. Med. Res.**, v.72, p.895-899, 1980.
- GENÉ, J.A., GÓMEZ, M., GUTIÉRREZ, J.M., CERDAS, L. Neutralization of hyaluronidase and indirect hemolytic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. **Toxicon**, v.23, n.6, p.1015-1018, 1985.
- GUTIÉRREZ, J.M., AVILA, C., ROJAS, E., CERDAS, L. An alternative *in vitro* method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. **Toxicon**, v.26, n.4, p.411-413, 1988.
- GUTIÉRREZ, J.M., GENÉ, J.A., ROJAS, G., CERDAS, L. Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. **Toxicon**, v.23, n.6, p.887-893, 1985.
- GUTIÉRREZ, J.M., LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. **Mem. Inst. Butantan**, v.51, n.3, p.211-223, 1989.
- GUTIÉRREZ, J.M., LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v.33, n.11, p.1405-1424, 1995.
- GUTIÉRREZ, J.M., ROJAS, G., LOMONTE, B. et al. Standardization of assays for testing the neutralizing ability of antivenoms. **Toxicon**, v.28, n.10, p.1127-1129, 1990.
- HABERMANN, E., HARDT, K.L. A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases. **Analy. Biochem.**, v.50, n.1, p.163-173, 1972.
-

- HANASHIRO, M.A., DA SILVA, M.H., BIER, O.
Neutralization of crotoxin and crude venom by rabbit antiserum to *Crotalus Phospholipase A*. **Immunoch.**, v.15, n.10/11, p.745-750, 1978.
- KAMIGUTI, A.S., THEAKSTON, R.D.G., DESMOND, H., HUTTON, R. A. Systemic haemorrhage in rats induced by a haemorrhagic fraction from *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon**, v.29, n.9, p.1097-1105, 1991.
- KHUPULSUP, K., POOPYRUCHPONG, N., PETCHCLAI, B., RATANABANANGKON, K. A passive hemagglutination test for antibody to *Naja naja siamensis* toxin 3. **Toxicon**, v.19, n.6, p.863-866, 1981.
- KOCHOLATY, W.F., BILLINGS, T.A., ASHLEY, B.D. et al. Effect of the route of administration on the neutralizing potency of antivenins. **Toxicon**, v.5, p.165-170, 1968.
- KORNALÍK, F., TÁBORSKÁ, E. Cross reactivity of mono- and polyvalent antivenoms with Viperidae and Crotalidae snake venoms. **Toxicon**, v.27, n.10, p.1135-1142, 1989.
- KRIFI, M.N., EL AYEB, M., DELLAGI, J. New procedures and parameters for better evaluation of *Androctonus australis garzonii* (Aag) and *Buthus occitanus tunetanus* (Bot) scorpion envenomations and specific serotherapy treatment. **Toxicon**, v.34, n.2, p.257-266, 1996.
- LAING, G.D., THEAKSTON, R.D.G., LEITE, R.P. et al. Comparison of the potency of three Brazilian *Bothrops* antivenoms using *in vivo* rodent and *in vitro* assays. **Toxicon**, v.30, n.10, p.1219-1225, 1992.
-

- LAVRAS, A.A.C., FICHMAN, M., HIRAICHI, E. et al. The kininases of *Bothrops jararaca* plasma. **Acta Physiologica Latinoamericana**, v.30, n.4, p.269-274, 1980
- LÔBO DE ARAÚJO, A., RADVANYI, F., BON, C. Purification of an acidic phospholipase A₂ from *Bothrops lanceolatus* (fer de lance) venom: molecular and enzymatic properties. **Toxicon**, v.32, n.9, p.1069-1081, 1994.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v.193, p.265-275, 1951.
- MACHADO, O.L.T., OLIVEIRA-CARVALHO, A.L., ZINGALI, R.B., CARLINI, C.R. Purification, physicochemical characterization and N-terminal-amino acid sequence of a phospholipase A₂ from *Bothrops jararaca* venom. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.26, n.2, p. 163-166, 1993.
- MANDELBAUM, F.R., REICHL, A.P., ASSAKURA, M.T. Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops jararaca* (jararaca). **Toxicon**, v.20, n.6, p.955-972, 1982.
- MARUYAMA, M., SUGIKI, M., YOSHIDA, E. et al. Purification and characterization of two fibrinolytic enzymes from *Bothrops jararaca* (jararaca) venom. **Toxicon**, v.30, n.8, p.853-864, 1992.
- MEIER, J., STOCKER, K. On the significance of animal experiments in toxinology. **Toxicon**, v.27, n. 1, p.91-104, 1989.
-

- MEIER, J., THEAKSTON, R.D.G. Approximate LD₅₀ determinations of snake venoms using eight to ten experimental animals. **Toxicon**, v.24, n.4, p.395-401, 1986.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Ofidismo; análise epidemiológica. Brasília. CENEPI - CCZP, Brasil, 1993.
- MONTEIRO, R.Q., CARLINI, C.R., GUIMARÃES, J.A. et al. Distinct bothrojaracin isoforms produced by individual jararaca (*Bothrops jararaca*) snakes. **Toxicon**, v.35, n.5, p.649-657, 1997.
- MOURA DA SILVA, A.M., D IMPPÈRIO LIMA, M.R., NISHIKAWA, A.K. et al. Antigenic cross-reactivity of venoms obtained from snakes of genus *Bothrops*. **Toxicon**, v.28, n.2, p. 181-188, 1990(a).
- MOURA DA SILVA, A.M., CARDOSO, D.F., TANIZAKI, M.M. Differences in distribution of myotoxic proteins in venoms from different *Bothrops* species. **Toxicon**, v.28, n.11, p.1293-1301, 1990(b).
- MOURA DA SILVA, A.M., CARDOSO, D.F., TANIZAKI, M.M., MOTA, I. Neutralization of myotoxic activity of *Bothrops* venoms by antisera to purified myotoxins and to crude venoms. **Toxicon**, v.29, n.12, p.1471-1480, 1991.
- NAHAS, L., KAMIGUTI, A.S., BARROS, M.A.R. Thrombin-like and factor X-activator components of *Bothrops* snake venoms. **Thromb. Haemost.**, v.41, p.314-328, 1979.
- NAKANE, P.K., KAWAOI, A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. **J. Histochem. Cytochem.**, v.22, n.12, p.1084-1091, 1974.
-

- NISENBOM, H.E., SEKI, C., VIDAL, J.C. Phospholipase A₂ from *Bothrops alternatus* (víbora de la cruz) venom. Purification and some characteristic properties. **Toxicon**, v.24, n.3, p.259-272, 1986.
- NISHIDA, S., FUJIMURA, Y., MIURA, S. et al. Purification and characterization of bothrombin, a fibrinogen-clotting serine protease from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry**, v.33, n.7, p.1843-1849, 1994.
- OWNBY, C.L., ODELL, G.V., WOODS, W.M. and COLBERG, T.R. Ability of antiserum to myotoxin α from prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom to neutralize local myotoxicity and lethal effects of myotoxin α and homologous crude venom. **Toxicon**, v.21, n.1, p.35-45, 1983.
- PAINE, M.J.I., DESMOND, H.P., THEAKSTON, R.D.G., CRAMPTON, J.M. Purification, cloning and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloprotease, jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. **J. Biol. Chem.**, v.267, n.32, p.22869-22876, 1992.
- REICHL, A.P., ASSAKURA, M.T., MANDELBAUM, F.R. Biophysical properties and amino acid composition of Bothrops protease A, a proteolytic enzyme isolated from the venom of the *Bothrops jararaca* (jararaca). **Toxicon**, v.21, n.3, p.421-427, 1983.
- RUNGSIWONGSE, J., RATANABANANGKON, K. Development of an ELISA to assess the potency of horse therapeutic antivenom against Thai cobra venom. **J. Immunol. Methods**, v. 136, n.1, p. 37-43, 1991.

RUSSELL, W., BURCH, R. L. **The Principles of Humane Experimental Technique.** Methuen, London, 1959.

SANCHEZ, E.F., FREITAS, T.V., FERREIRA-ALVES, D.L. et al. Biological activities of venoms from South American snakes. **Toxicon**, v.30, n.1, p.95-103, 1992.

SELISTRE, H.S., QUEIROZ, L.S., CUNHA, A.B. et al. Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema-inducing toxins from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. **Toxicon**, v.28, n.3, p.261-273, 1990.

SMITH, J.B., DANGELMAIER, C., SELAK, M. Identification of 50 Kda snake venom proteins which specifically inhibit platelet adhesion to collagen. **Febs Letters**, v.283, n.3, p.307-310, 1991.

SOSA, B.P., ALAGON, A.C., POSSANI, L.D., JULIA, J.Z. Comparison of phospholipase activity with direct and indirect lytic effects of animal venoms upon human red cells. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.64, n.2, p.231-234, 1979.

TANIGAWA, M., MARUYAMA, M., SUGIKI, M. et al. Clearance and distribution of a haemorrhagic factor purified from *Bothrops jararaca* venom in mice. **Toxicon**, v.32, n.5, p.583-593, 1994.

TANIZAKI, M.M., ZINGALI, R.B., KAWAZAKI, H. et al. Purification and some characteristics of a zinc metalloprotease from the venom of *Bothrops jararaca* (jararaca). **Toxicon**, v.27, n.7, p.747-755, 1989.

- THEAKSTON, R.D.G., FAN, H.W., WARRELL, D.A. et al. Use of enzyme immunoassays to compare the effect and assess the dosage regimens of three brazilian *Bothrops* antivenoms. **Am. J. Trop. Hyg.**, v.47, n.5, p.593-604, 1992.
- THEAKSTON, R.D.G., LLOYD-JOSES, M.J., REID, H.A. Micro-ELISA for detecting and assaying snake venom and venom-antibody. **Lancet**, v.24, p.639-641, 1977.
- THEAKSTON, R.D.G., PUGH, R.N.H., REID, H.A. Enzyme-linked immunosorbent assay of venom antibodies in human victims of snakebite. **J. Trop. Med. Hyg.**, v.84, p.109-112, 1981.
- THEAKSTON, R.D.G., REID, H.A. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in assessing antivenom potency. **Toxicon**, v.17, n.5, p.511-515, 1979.
- USAMI, Y., FUJIMURA, Y., MIURA, S. et al. A 28 Kda-protein with disintegrin-like structure (jararhagin-C) purified from *Bothrops jararaca* venom inhibits collagen- and ADP-induced platelet aggregation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.201, n.1, p.331-339, 1994.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms. Geneva: World Health Organization, 1981.