

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
Doutorado em Saúde Pública

KARLA PATRÍCIA DE OLIVEIRA LUNA

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE RELACIONADA À AÇÃO
DOS VENENOS DAS SERPENTES *Bothrops erythromelas* E
Crotalus durissus cascavella

RECIFE

2010

KARLA PATRÍCIA DE OLIVEIRA LUNA

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE RELACIONADA À AÇÃO DOS
VENENOS DAS SERPENTES *Bothrops erythromelas* E *Crotalus durissus*
*cascavella***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública, do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Dra. Valéria Rego Alves Pereira

Recife
2010

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

L961a Luna, Karla Patrícia de Oliveira.

Avaliação da resposta imune relacionada a ação dos venenos das serpentes *Bothrops erythromelas* e *Crotalus durissus cascavella*/ Karla Patrícia de Oliveira Luna. — Recife: K. P. de O. Luna, 2011.

xxx f.: il.

Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2011.

Orientadora: Valéria Rego Alves Pereira.

1. Venenos - efeitos adversos. 2. Venenos de Serpentes. 3. Epidemiologia. 4. Formação de Anticorpos. I. Pereira, Valéria Rego Alves. II. Título.

CDU 614.8:591.145

KARLA PATRÍCIA DE OLIVEIRA LUNA

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE RELACIONADA À AÇÃO DOS
VENENOS DAS SERPENTES *Bothrops erythromelas* E *Crotalus durissus*
*cascavella***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública, do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada em ____/____/____

Banca Examinadora

Dr^a Valéria Rêgo Alves Pereira
Departamento de Imunologia do CPqAM/FIOCRUZ

Dra. Clarice Neuenschwander Lins de Moraes
Departamento de Imunologia do CPqAM/FIOCRUZ

Dra. Milena de Paiva Cavalcanti
Departamento de Imunologia do CPqAM/FIOCRUZ

Dra. Márcia Bezerra da Silva
Departamento de Biofísica e Radiobiologia/UFPE

Dra. Cristiane Moutinho Lagos de Melo
Departamento de Imunologia do CPqAM/FIOCRUZ

Dedico este trabalho aos meus pais e irmã, que sempre me apoiaram nas
decisões da minha vida, mesmo as erradas.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas bênçãos concedidas na vida e na tese;

À família Luna pela paciência em aturar mais uma pós-graduação – ‘stress’ pra todos eles!;

À Dra. Valéria Rêgo Alves Pereira pela dedicação, atenção, abnegação e genialidade na condução deste trabalho;

Aos amigos do Laboratório de Imunogenética: Amanda, Andresa, Lucas, Maria Carolina e Marina – e famílias. Sem vocês nada disso teria sido possível. Agradeço também pelos momentos de descontração a qualquer hora do dia – ou da noite! Love you all!;

Às tuberculetes, que sempre me deram apoio moral nas horas de desespero antes, durante, depois da tese. É nesses momentos que a gente conhece os verdadeiros amigos;

Aos amigões da Imunologia: Aduarde, Roberto Werkhäuser, Clarice, Sheilla, Romero, Milena, Fábria, Roni, Neide, Simone, Neidinha, Lilian. Levarei para a vida o que vocês todos foram capazes de fazer por mim nesses anos todos. ‘Porque irmãos nem sempre são de sangue’;

Às amigas, Andréa Sales, Marília Sales, Keyla Oliveira, Késia Oliveira, Fabiana Gomes, Cássia Docena, Tereza Magalhães, Kirte Maria, Rosely Santos, Kátia Medeiros, Gabriela Guedes, Ana Carolina e Ana Paula, Andreza Melo, amigas de verdade, numa concepção indescritível da palavra;

A Roberto Luz Rosa, pela inexplicável paciência em me esperar!;

Aos meus melhores amigos de Campina: Bel, Ju, Pâmella, Polyanne, Paloma, Diego, Allan e Darlan pelos maravilhosos momentos em família;

Aos amigos do NEWLAB, Campina Grande, pela colaboração desapegada e pela amizade;

Aos pacientes, sempre dispostos a ajudar e conhecer mais sobre os envenenamentos, mostrando que o conhecimento popular não deve ser descartado nunca;

Ao Dr. Eduardo Nascimento pela colaboração nas análises do CBA;

À Dra. Sayonara Maria Lia Fook pela colaboração através do CEATOX-CG;

Ao Hospital de Urgência e Emergência de Campina Grande, que nos alocou em suas instalações para realização de nossos procedimentos com os pacientes;

Aos Drs. Olindo Martins Assis-Filho e Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal pela colaboração científica;

À Dra. Cristiane Moutinho Lagos de Melo pela colaboração no artigo de camundongo;

Aos bibliotecários do CPqAM pelo auxílio em relação as referências bibliográficas;

À Carmem e Graça, pelo apoio na limpeza e organização dos laboratórios;

À Sara e Joselma, da reprografia, pelo apoio no concernente às cópias da tese e outros arquivos;

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães por ceder suas instalações e equipamentos para a realização deste trabalho;

À FACEPE, pela concessão de fomento ao nosso projeto;

A todos que, direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

**“Se Deus existe, deve se encontrar fora do mundo natural e,
portanto, os instrumentos científicos não são
as ferramentas certas para aprender sobre ele.”**

Francis S. Collins – Ex-diretor do Projeto Genoma

LUNA, Karla Patrícia de Oliveira. **Avaliação da Resposta Imune Relacionada à Ação dos Venenos das Serpentes *Bothrops erythromelas* e *Crotalus durissus cascavella***. 2010. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2010.

RESUMO

Acidentes causados por serpentes, especialmente nos países tropicais e subtropicais, ainda constituem grave problema de saúde pública. Este estudo objetivou avaliar aspectos da resposta imune em vítimas de envenenamento por *Bothrops erythromelas* (jararaca) antes e após tratamento soroterápico. Além disso, em cultura de esplenócitos de camundongos BALB/c foram determinadas citotoxicidade, produção de óxido nítrico, de citocinas (IL-10, IFN- γ , IL-2, IL-6) e a viabilidade celular na presença do veneno de *B. erythromelas*. Os aspectos clínicos e epidemiológicos de pacientes picados por *B. erythromelas* e a resposta imune humoral dos mesmos foram avaliados antes, 12 e 24 horas após soroterapia. IFN- γ , IL-10 e óxido nítrico foram quantificados em sobrenadantes de culturas desses pacientes, além de marcadores de superfície celular. Níveis séricos de quimiocinas e citocinas também foram avaliados. Em cultura de esplenócitos, assim como em sobrenadantes de cultura de pacientes acometidos por envenenamento botrópico, o veneno de *B. erythromelas* induziu uma resposta imunomoduladora através de citocinas (IFN- γ e IL-6) e produção de óxido nítrico, apresentando um perfil pró-inflamatório. No soro de pacientes foi identificada uma proteína de 38 kDa, sugerindo um marcador no envenenamento por essa espécie. A clínica e a epidemiologia dos acidentes por *B. erythromelas* mostram aspectos similares aos acidentes ofídicos ocorridos no Brasil. A variação nos marcadores de superfície celular observados pode estar relacionada a aspectos que vão da quantidade inoculada de veneno ao tratamento do paciente. Os níveis séricos de citocinas Th1/Th2, além de quimiocinas mostraram um perfil semelhante para todos os tipos de envenenamento humano. Portanto, o presente estudo permitiu compreender os aspectos relacionados à evolução clínica de pacientes acometidos por envenenamento por *B. erythromelas* na região Nordeste.

Palavras-Chave: Veneno, Resposta Imune, Epidemiologia.

LUNA, Karla Patrícia de Oliveira. **Evaluation of the Immune Response Associated to Poison Action of Snakes *Bothrops erythromelas* and *Crotalus durissus cascavella***. 2010. Thesis (Doctorate in Public Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2010.

ABSTRACT

Accidents caused by snakes specially in tropical and subtropical countries still constitute a serious public health problem. This study aimed to evaluate aspects of the immune response in cases of poisoning by *Bothrops erythromelas* (jararaca) before and after treatment serotherapy. In cultured splenocytes of BALB/c were determined cytotoxicity, nitric oxide, IL-2, IL-6) and cell viability in the γ production of cytokines (IL-10, IFN- presence of the venom of *B. erythromelas*. The clinical and epidemiological features of patients bitten by *B. erythromelas* and humoral immune response of them were evaluated before, 12 and 24 hours after serum therapy. IFN- γ , IL-10 and nitric oxide were quantified in culture supernatants of these patients as well as cell surface markers. Serum cytokines and chemokines were also evaluated. In cultured splenocytes, as well as in culture supernatants of patients with *Bothrops* envenomation, *B. erythromelas* venom induced an IL-6) and nitric oxide immunomodulatory response through cytokines (IFN- γ production, featuring a pro-inflammatory profile). The serum of patients was identified a protein of 31 kDa, suggesting a marker in poisoning by this species. The clinic and epidemiology of accidents by *B. erythromelas* show similar aspects to snakebites in Brazil. The variation in cell surface markers observed might be related to aspects ranging from the amount of venom inoculated the patient's treatment. Serum levels of Th1/Th2 cytokines, and chemokines showed a similar profile for all types of human poisoning. Therefore, this study allows us to understand the aspects related to clinical outcome of patients suffering from poisoning by *B. erythromelas* in the Northeast.

Keywords: Poison, Immune Response, Epidemiology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Produção e ativação de mediadores pelos venenos de serpentes.....	28
Figura 2 -	Esquema de imunização e produção de soro antiveneno em animais.....	33
Figura 3 -	Análise quantitativa de citocinas / quimiocinas de sobrenadante de cultura utilizado pelo BD CBA Analyses Software.....	52
Figura 4 -	Perfil da produção de IFN- γ por esplenócitos de camundongos BALB/c estimulados <i>in vitro</i> com veneno de serpente.....	56
Figura 5 -	Análise comparativa na produção de IFN- γ , NO e IL-10 por esplenócitos de camundongos BALB/c após 72 horas de estímulo <i>in vitro</i> com veneno de serpente.....	57
Figura 6 -	Perfil pró-inflamatório/regulatório em esplenócitos de camundongos BALB/C após 72 horas de estímulo <i>in vitro</i> com veneno de serpente.....	58
Figura 7 -	Viabilidade celular em esplenócitos de camundongos BALB/C após 24 horas de estímulo <i>in vitro</i> com veneno de serpente.....	60
Figura 8 -	Distribuição dos acidentes ofídicos atendidos pelo CEATOX – HR no período de junho de 2007 a junho de 2008, em relação ao tempo decorrido do acidente e admissão hospitalar.....	63
Quadro 1 -	Características clínicas e epidemiológicas do grupo de estudo PB....	64
Figura 9 -	Manifestações clínicas características do envenenamento botrópico.....	65

Figura 10 - Western blot representativo do padrão antigênico reconhecido pelo “pool” de soro de pacientes envenenados por <i>Bothrops erythromelas</i>	66
Figura 11 - Produção de IFN- γ em pacientes leve e moderado + grave envenenados e grupo controle antes da soroterapia.....	67
Figura 12 - Produção de IFN- γ em pacientes leve e moderado + grave envenenados e grupo controle 12 horas após soroterapia.....	68
Figura 13 - Produção de IFN- γ em pacientes leve e moderado + grave envenenados e grupo controle 24 horas após soroterapia.....	68
Figura 14 - Produção de óxido nítrico induzido por diferentes estímulos em culturas de células de pacientes com envenenamento leve.....	70
Figura 15 - Produção de óxido nítrico induzido por diferentes estímulos em culturas de células de pacientes com envenenamento grave.....	71
Figura 16 - Produção de óxido nítrico induzido por diferentes estímulos em cultura de células de indivíduos saudáveis.....	72
Figura 17 - Gráficos representando o percentual de linfócitos CD3 ⁺ e CD4 ⁺ em pacientes com envenenamento Leves e Moderados e Graves (MG) em 0h, 12h e 24 após o tratamento.....	74
Figura 18 - Gráficos representando o percentual de linfócitos CD8 ⁺ e CD16 ⁺ em pacientes com envenenamento Leves e Moderados e Graves (MG) em 0h, 12h e 24 após o tratamento.....	75
Figura 19 - Gráfico representando o percentual de linfócitos CD25 ⁺ em pacientes com envenenamento Leves e Moderados e Graves (MG) em 0h, 12h e 24 após o tratamento.....	75

Figura 20 - Gráficos representando o percentual de linfócitos CD19 ⁺ e CD32 ⁺ em pacientes com envenenamento Leves e Moderados e Graves (MG) em 0h, 12h e 24 após o tratamento.....	75
Figura 21 - Gráficos representando o percentual de monócitos CD11b ⁺ e CD35 ⁺ em pacientes com envenenamento Leves e Moderados e Graves (MG) em 0h, 12h e 24 após o tratamento.....	76
Figura 22 - Gráficos representando o percentual de monócitos CD11b ⁺ e CD35 ⁺ em pacientes com envenenamento Leves e Moderados e Graves (MG) em 0h, 12h e 24 após o tratamento.....	76
Figura 23 - Gráfico representando o percentual de monócitos CD18 ⁺ em pacientes com envenenamento Leves e Moderados e Graves (MG) em 0h, 12h e 24 após o tratamento.....	76
Figura 24 - Gráficos representando o percentual de granulócitos CD55 ⁺ e CD88 ⁺ em pacientes com envenenamento Leves e Moderados e Graves (MG) em 0h, 12h e 24 após o tratamento.....	77
Figura 25 - Gráfico representando o percentual de granulócitos CD55 ⁺ CD 88 ⁺ em pacientes com envenenamento Leves e Moderados e Graves (MG) em 0h, 12h e 24 após o tratamento.....	77
Figura 26 - Gráfico representando o percentual de granulócitos CD18 ⁺ em pacientes com envenenamento Leves e Moderados e Graves (MG) em 0h, 12h e 24 após o tratamento.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Prevenção e primeiros socorros para acidentes ofídicos. Modificado de Manual de Animais Peçonhentos, Ministério da Saúde, Brasil, 2003.....	22
Tabela 2 - Tipo de envenenamento ofídico e tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde, Brasil. (Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos (2003).....	23
Tabela 3 - Tipo de marcador e tipo celular avaliados no estudo.....	49
Tabela 4 - Efeito citotóxico induzido pelos venenos de <i>Bothrops erythromelas</i> e <i>Crotalus durissus cascavella</i>	54
Tabela 5 - Níveis de citocinas Th1 e Th2 em pacientes com diferentes manifestações clínicas de envenenamento por <i>B. erythromelas</i>	78
Tabela 6 - Níveis de quimiocinas em pacientes com diferentes manifestações clínicas de envenenamento por <i>B. erythromelas</i> snake. Valores são mostrados em pg/mL.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	hormônio adrenocorticotrófico
BALB/C	camundongos 'inbred'
BaP-1	Metaloprotease do veneno de <i>B. asper</i>
C3a	fator 3a do sistema complemento
C5a	fator 5a do sistema complemento
CCR1, CCR5	quimiocinas
CD	"cluster of differentiation"
CK	creatina kinase
ELISA	"Enzyme linked immunosorbent assay"
F (ab) '2 ou Fab	Fração isolada de Imunoglobulina
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFN- γ	interferon gama
IgM	imunoglobulina M
Igs	imunoglobulinas
IL-1	interleucina 1
IL-10	interleucina 10
IL-6	interleucina 6
IL-8	interleucina 8
iNOS	óxido nítrico sintase indutível
kDa	kilodalton
LDH	lactato desidrogenase
M	molar
MIP-1 β , MIP-2, RANTES, CXCR2	quimiocinas
mRNA	RNA mensageiro
PBS	tampão salina-fosfato
PLA ₂	fosfolipase A ₂
PMN	células polimorfonucleares
RPMI	meio de cultura
SAB	soro antibotrópico
SABC	soro antibotrópico-crotálico
SABL	soro antibotrópico-laquélico

SAC	soro anticrotálico
SAE	soro antielapídico
SAL	soro antilaquético
SVMPs	metaloproteases de venenos ofídicos
TC	tempo de coagulação
TCD4+	linfócitos T CD4 positivas
TGF- β	fator de crescimento tumoral
TNF- α	fator de necrose tumoral
TS	tempo de sangria

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	Ação dos Venenos Ofídicos.....	24
1.2	Participação de citocinas, óxido nítrico e sistema complemento..	28
1.3	Terapia.....	32
2	JUSTIFICATIVA.....	36
3	OBJETIVOS.....	37
3.1	Objetivo geral.....	37
3.2	Objetivos específicos.....	37
4	PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....	39
4.1	Tipo de estudo.....	39
4.2	População Estudada.....	39
4.2.1	<i>Camundongos.....</i>	<i>39</i>
4.2.2	<i>Pacientes.....</i>	<i>40</i>
4.2.3	<i>Descrição de Exames laboratoriais de avaliação dos pacientes..</i>	<i>41</i>
4.2.4	<i>Considerações Éticas.....</i>	<i>43</i>
4.3	Obtenção do veneno.....	43
4.4	Obtenção de esplenócitos murinos.....	44
4.5	Avaliação da atividade tóxica dos venenos em células de camundongos isogênicos.....	44
4.6	Quantificação de citocinas nos sobrenadantes de cultura de esplenócitos.....	45
4.7	Análise de viabilidade celular por anexina v-FITC e iodeto de propídeo em cultura de esplenócitos.....	46
4.8	Análise da produção de nitrito nos sobrenadantes de cultura de esplenócitos.....	47
4.9	Avaliação da resposta imune humoral em pacientes envenenados pela serpente <i>Bothrops erythromelas</i>	47
4.10	Quantificação de citocinas nos sobrenadantes das culturas de sangue periférico dos pacientes envenenados por <i>Bothrops erythromelas</i>	48
4.11	Detecção de nitrito nos sobrenadantes das culturas de sangue periférico dos pacientes envenenados por <i>Bothrops</i>	

	<i>erythromelas</i>	48
4.12	Identificação de marcadores de superfície em sangue periférico de pacientes envenenados pela serpente <i>Bothrops erythromelas</i>	49
4.13	Detecção do nível de citocinas plasmáticas por citometria de fluxo em soro de pacientes envenenados pela serpente <i>Bothrops erythromelas</i>	50
4.13.1	<i>Aquisição dos dados no citômetro de fluxo</i>	51
4.13.2	<i>Análise semi-quantitativa de citocinas/quimiocinas nos soros de pacientes envenenados pela serpente Bothrops erythromelas</i>	51
4.14	Análise estatística.....	52
5	RESULTADOS	54
5.1	Efeito citotóxico do veneno da serpente <i>Bothrops erythromelas</i> em células esplênicas de camundongos BALB/c.....	54
5.2	Dosagens de citocinas e de óxido nítrico nos sobrenadantes de culturas de células esplênicas de camundongos BALB/c estimuladas com veneno de <i>Bothrops erythromelas</i>	55
5.2.1	<i>Avaliação da produção de IFN-γ</i>	55
5.2.2	<i>Avaliação da produção de IL-2, IL-10, IL-6 e de óxido nítrico</i>	56
5.2.3	<i>Análise da razão IFN-γ/IL-10 entre venenos das serpentes Bothrops erythromelas e Crotalus durissus cascavella</i>	58
5.3	Perfil de células viáveis indicou maior percentual de necrose induzida pelo veneno de <i>Bothrops erythromelas</i>	59
5.4	Caracterização da população de estudo.....	60
5.4.1	<i>Pacientes do Centro de Toxicologia do Hospital da Restauração (HR) de Recife, Pernambuco (CEATOX-HR-PE)</i>	61
5.4.2	<i>Pacientes do Centro de Toxicologia do Hospital de Urgência e Emergência de Campina Grande, Paraíba (CEATOX-HUECG-PB)</i>	63
5.5	Avaliação da resposta imune humoral em pacientes do Centro de Toxicologia do Hospital de Urgência e Emergência de Campina Grande, Paraíba (CEATOX-HUECG-PB), envenenados pela serpente <i>Bothrops erythromelas</i>	65
5.5.1	<i>Avaliação do padrão antigênico reconhecido por pacientes</i>	

	<i>envenenados pela serpente Bothrops erythromelas</i>	65
5.6	Quantificação das citocinas IL-10 e IFN- γ nos sobrenadantes das culturas de sangue periférico dos pacientes envenenados por <i>Bothrops erythromelas</i>	66
5.7	Avaliação da produção de óxido nítrico nos sobrenadantes das culturas de sangue periférico dos pacientes envenenados por <i>Bothrops erythromelas</i>	69
5.8	Avaliação dos marcadores de superfície em sangue periférico de pacientes envenenados pela serpente <i>Bothrops erythromelas</i>	72
5.9	Níveis séricos de citocinas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α e IFN- γ) e quimiocinas (IL-8, Rantes, MIG, MCP-1 e IP-10) de pacientes envenenados por <i>Bothrops erythromelas</i>	78
6	DISCUSSÃO	79
7	CONCLUSÃO	95
	REFERÊNCIAS	97
	APÊNDICES	109
	Apêndice A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-paciente.....	110
	Apêndice B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-paciente menor (15 – 18 anos).....	111
	Apêndice C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-grupo controle.....	112
	Apêndice D – Artigo publicado.....	113
	Apêndice E – Artigo aceito.....	116
	Apêndice F– Artigo enviado.....	156
	Apêndice G - Artigo enviado.....	181
	Apêndice H – Artigo em preparação.....	207
	ANEXO	232
	ANEXO A - Comitê de Ética do CPqAM/FIOCRUZ.....	
	ANEXO B - Comitê de Ética da Universidade Estadual da Paraíba.....	

1. INTRODUÇÃO

Acidentes ofídicos ocorrem no mundo inteiro e constituem um importante problema de saúde pública negligenciado. Isto é particularmente relevante nas áreas rurais dos países tropicais e subtropicais, onde os acidentes são mais comuns e onde o acesso aos serviços de saúde é limitado. A real magnitude da ameaça dos envenenamentos por serpentes para a saúde pública nesses países é desconhecida, o que torna difícil para as instituições responsáveis otimizar a prevenção e o tratamento das vítimas (KASTURIRATNE et al., 2008).

Segundo Kasturiratne et al. (2008), no mundo, 1,8 milhões de pessoas são envenenadas e 94 mil morrem anualmente. De acordo com os autores a Índia é o país com o maior número de envenenamentos, 81.000 por ano, seguido pelo Sri Lanka (33.000), Vietnã (30.000), México (28.000) e Nepal (20.000). O Brasil aparece junto com o Vietnã, com cerca de 30.000 acidentes por ano.

No Brasil, os gêneros *Micrurus*, *Lachesis*, *Crotalus* e *Bothrops* são considerados os mais importantes do ponto de vista médico. O gênero *Micrurus* - comumente conhecido como corais - abriga 22 espécies no Brasil. Ocorre em todo o território nacional (MELGAREJO, 2003) e é responsável pelo menor número de acidentes ofídicos no país: 0,3% (BRASIL, 2003). O envenenamento causado por serpentes do gênero *Micrurus* causa diplopia, visão turva e, em alguns casos, insuficiência respiratória, levando a óbito.

O gênero *Lachesis* abriga as maiores espécies peçonhentas das Américas, com exemplares de até 4,0 metros. Esse gênero apresenta duas subespécies na América do Sul: *L. muta muta* e *L. muta rhombeata*. Essas subespécies são responsáveis por 1,1% dos acidentes por ano no Brasil (BRASIL, 2003). Essas serpentes deflagram envenenamento caracterizado por edema local e necrose, podendo inabilitar o indivíduo permanentemente.

O gênero *Crotalus* tem uma distribuição ampla, sendo encontrado desde o México até a Argentina; abriga 6 subespécies que habitam o território brasileiro: *C. durissus terrificus*, *C. durissus collineatus*, *C. durissus cascavela*, *C. durissus marajoensis*, *C. durissus ruruima* e *C. durissus trigonicus*. São responsáveis por 6,2% dos acidentes ocorridos no país (BRASIL, 2003). Esse

tipo de envenenamento pode levar a diplopia, visão turva e mialgia, além de poder causar edema pulmonar agudo, o que pode levar a óbito.

Recentemente a Organização Mundial da Saúde introduziu os acidentes ofídicos na lista das doenças tropicais negligenciadas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2009). O “Snake Bite Initiative” (SBI), criado em 2010, publicou na sua primeira edição, a maior cobertura dos acidentes ofídicos até então registrados no mundo inteiro (WILLIAMS et al., 2010), especialmente em relação à notificação desses acidentes (GUTIÉRREZ et al., 2006; 2010). De acordo com o SBI, a mortalidade para os indivíduos envenenados por serpentes no mundo todo é maior do que da doença de Chagas, dengue, cólera, leishmaniose e esquistossomose.

A maioria dos acidentes ofídicos que ocorrem na América Latina é causada por espécies do gênero *Bothrops* (HOGE; ROMANO-HOGE, 1978). Serpentes desse gênero são responsáveis por 90,6% dos acidentes notificados, com um índice de letalidade de 0,45% dos casos tratados. Os acidentes geralmente ocorrem no início e no final do ano, com trabalhadores rurais do sexo masculino, em idade produtiva (entre os 19 e 45 anos), atingindo principalmente os membros inferiores (BOCHNER; STRUCHINER, 2003).

As serpentes mais importantes do ponto de vista médico pertencem ao gênero *Bothrops*, o mais estudado clínica e imunologicamente, sendo responsáveis pela maioria dos acidentes ocorridos no Brasil (BRASIL, 2003). Esse tipo de envenenamento causa edema local, hemorragia local e/ou sistêmica e inflamação.

Prevenção é a palavra de ordem quando se trata da diminuição dos acidentes ofídicos em qualquer lugar do mundo. Na Tabela 1 observam-se os cuidados e primeiros socorros para o caso de envenenamento.

Tabela 1. Prevenção e primeiros socorros para acidentes ofídicos.

PREVENÇÃO	PRIMEIROS SOCORROS	NÃO FAZER
Usar botas de cano alto ou perneira de couro, botinas e sapatos evita cerca de 80% dos acidentes	Lavar local da picada com água ou com água e sabão	Não fazer torniquete ou garrote
Cerca de 15% das picadas atinge mãos ou antebraços. Usar luvas de aparas de couro para manipular folhas secas, montes de lixo, lenha, palhas, paus, gravetos, tijolos. Não colocar as mãos em buracos	Manter o paciente deitado	Não cortar ou perfurar o local da picada
Cobras gostam locais quentes, escuros e úmidos. Cuidado ao mexer em pilhas de lenha, palhadas de feijão, milho ou cana. Cuidado ao revirar cupinzeiros	Manter o paciente hidratado	Não cortar ao redor do local da picada
Onde existe rato existe cobra. Limpar paióis e terreiros, não deixar amontoar lixo. Fechar buracos de muros e frestas de portas	Procurar o serviço médico mais próximo	Não colocar folhas, pó de café, alho no local da picada
Evitar acúmulo de lixo ou entulho, de pedras, tijolos, telhas, madeiras, bem como mato alto ao redor das casas, que atraem e abrigam pequenos animais que servem de alimentos às serpentes	Se possível, levar o animal para identificação, o que ajuda na identificação do tipo de envenenamento pela equipe do hospital	Não oferecer bebidas alcoólicas, querosene ou outros tóxicos

Fonte: Modificado de Manual de Animais Peçonhentos, Ministério da Saúde (BRASIL, 2003).

Segundo o Ministério da Saúde, os envenenamentos ofídicos podem ser considerados leves, moderados ou graves, de acordo com a gravidade dos sinais e sintomas apresentados pelas vítimas (BRASIL, 2003) (Tabela 2).

Tabela 2. Tipo de envenenamento ofídico e tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2003).

Tipo de acidente	Leve	Moderado	Grave	Tipo de soro
Botrópico (jararacas)	2-4 ampolas	4-8 ampolas	12 ampolas	SAB, SABC ou SABL
Crotálico (cascavéis)	5 ampolas	10 ampolas	20 ampolas	SAC ou SABC
Elapídico (corais)	10 ampolas de SAE			
Laquético (surucucus)	10 a 20 ampolas de SAL ou SABL			

Para entender os acidentes ofídicos e melhorar a estratégia terapêutica faz-se necessário avançar mais nos estudos sobre os papéis de importantes mediadores inflamatórios como óxido nítrico (NO), citocinas e sistema complemento. Vários estudos descrevem a presença das citocinas nos envenenamentos por serpentes, escorpiões e aranhas (PETRICEVICH et al., 2000; MEKI; EL-DEAN, 1998; TAMBOURGHY et al., 1998). O NO também participa na patogênese de envenenamento por serpente através de mecanismos, tais como: (a) indução do dano tecidual devido à sua capacidade de gerar peroxinitrito e radicais hidroxila após interação com íons superóxido (RADI, 1991; HOGG, 1992); b) contribuição para a hipotensão característica deste tipo de envenenamento, devido à sua ação vasodilatadora. No entanto, os mecanismos pelos quais os venenos de serpentes induzem a produção de citocinas e NO continuam desconhecidos (PETRICEVICH et al., 2000).

Estudos experimentais têm evidenciado que a resposta inflamatória local, induzida por peçonhas do gênero *Bothrops*, é caracterizada por exsudação de proteínas plasmáticas e decorre da síntese e/ou liberação de mediadores endógenos como histamina, serotonina, eicosanóides e fator ativador de plaquetas (PAF), além da ativação de receptores adrenérgicos α -1 e α -2 (CHAVES; GUTIÉRREZ, 1995). A lesão local é caracterizada ainda, pela presença de células inflamatórias. O recrutamento leucocitário acarretado pela peçonha de *Bothrops jararaca* acompanha a liberação de mediadores lipídicos, particularmente leucotrieno B₄ (LTB₄) e tromboxano A₂ (TXA₂), além da

ativação do sistema complemento (FARSKY et al., 1997). A participação de mediadores lipídicos nos fenômenos locais induzidos pelas peçonhas botrópicas indica que enzimas com atividade de fosfolipase A₂, presentes nestas peçonhas ou liberadas pela atuação dos mesmos, são relevantes para estes fenômenos (CHAVES et al., 1998).

Tem-se observado nos animais injetados com veneno botrópico o acúmulo de leucócitos durante o desenvolvimento da reação inflamatória, o que parece depender da liberação de eicosanóides e fatores quimiotáticos derivados do soro (FARSKY et al., 1997). No entanto, este último efeito é provavelmente devido à ativação do complemento (DIAS-DA-SILVA et al., 1995).

Os estudos dos aspectos clínicos e imunológicos nos envenenamentos ofídicos ajudam a compreender a evolução do paciente, visando novas terapias.

1.1 Ação dos Venenos Ofídicos

Normalmente as ações dos venenos de serpentes envolvem coagulopatia, trombocitopenia, edema, inflamação, choque, hemorragia intracraniana, hemorragia pituitária, insuficiência renal, trombose e embolia pulmonar. Os venenos ofídicos contêm uma vasta gama de componentes (KAMIGUTI et al., 1996), cujo papel preliminar é agir para imobilizar a presa (JENNINGS et al., 2005), mas essas também são usadas defensivamente contra grandes animais e contra o homem (STEBINS et al., 2000).

A imobilização imediata é causada por insuficiência cardíaca ou respiratória. Os venenos contêm aproximadamente 70% a 90% do seu peso seco composto por proteínas e polipeptídeos com atividades biológicas diferentes. Os 10% a 30% restantes correspondem a substâncias de baixo peso molecular, tais como carboidratos, aminoácidos, pequenos peptídeos, aminas, nucleotídeos, compostos inorgânicos e íons (SILVA JR.; BUCARETCHI, 2003).

Os componentes protéicos dos venenos ofídicos foram agrupados em diferentes categorias baseadas em suas funções hemostáticas: 1) enzimas que

coagulam fibrinogênio; 2) enzimas que degradam fibrinogênio; 3) ativadores de plasminogênio; 4) ativadores de protrombina; 5) ativadores de fator V da coagulação; 6) ativadores de fator X da coagulação; 7) enzimas com atividade anticoagulante incluindo inibidores da formação do complexo protrombinase, inibidores de trombina, fosfolipases e ativadores de proteína C; 8) enzimas com atividade hemorrágica; 9) enzimas que degradam inibidores de serino-proteinases plasmáticas; 10) ativadores da agregação plaquetária incluindo enzimas de ação direta, componentes não enzimáticos e agentes que necessitam de cofator; 11) inibidores da agregação plaquetária incluindo α -fibrinogenases, 5'-nucleotidases, fosfolipases e disintegrinas. Embora muitas peçonhas de serpentes contenham vários componentes hemostaticamente ativos, é importante ressaltar que uma única peçonha não contém todos esses componentes descritos (MARKLAND, 1998).

A coagulopatia foi observada em muitos envenenamentos ofídicos. Suas principais manifestações incluem incoagulabilidade sanguínea, hemorragia sistêmica, efeitos colaterais sistêmicos, choque, hemorragia intracraniana e pituitária, insuficiência renal, trombose e embolia pulmonar. Uma série de componentes presentes nos venenos ofídicos pode ativar o sistema de coagulação, o que não irá necessariamente resultar em trombose. Venenos procoagulantes, especialmente botrópicos ativam a cascata da coagulação resultando no consumo e depleção de fatores da coagulação, tornando o sangue incoagulável, contribuindo para o aumento da hemorragia (HUTTON; WARRELL, 1993).

A trombocitopenia pode ocorrer, o que leva a um aumento do sangramento (WHITE, 2005). O consumo dos fatores da coagulação reduz o número de plaquetas e induzem a ação direta das toxinas hemorrágicas nas paredes dos vasos (KAMIGUTI, 1991). Estas toxinas, conhecidas como hemorraginas, têm entre 55 e 105 kDa e podem atuar degradando componentes da lâmina basal de vasos e promovendo a sua ruptura (MANDELBAUN, 1976), ou, produzindo lesão direta nas células endoteliais (GUTIÉRREZ, 1980).

A primeira hemorragina (BAP-1) isolada da serpente *Bothrops asper*, ativa no processo inflamatório (GUTIÉRREZ et al., 1995) é uma hemorragina

da classe PI (metaloproteinase I), edematogênica quando injetada em patas de ratos. Depois da injeção intramuscular foram observadas bolhas e infiltrado leucocitário na derme que foi associado com a degranulação de mastócitos e aumento de macrófagos (RUCAVADO et al., 1998,1999).

Ao estudar as ações inflamatórias e hemorrágicas da peçonha de *Bothrops jararaca*, Gonçalves e Mariano (2000), mostraram que os principais mediadores do edema causado por este veneno são derivados do ácido araquidônico. Além disso, os autores afirmam que a serotonina também está envolvida no desenvolvimento do edema de pata em camundongos. Segundo os autores, o mecanismo de formação do edema difere do mecanismo da hemorragia, pois o ácido araquidônico não participa da hemorragia local causada por esse veneno. Curiosamente, os animais pré-tratados com guanetidina, capsaicina ou submetidos à denervação apresentaram hemorragia atenuada, mas não edema. Isto sugere que hemorragia e edema são fenômenos multimediados.

Graus variáveis de trombocitopenia são comumente encontrados em pacientes envenenados por serpentes da família Viperidae e por algumas espécies das famílias Elapidae e Colubridae (MEIER, WHITE, 1995). A associação de trombocitopenia com o tempo de coagulação prolongado tem sido relatada por aumentar o risco de sangramento (KAMIGUTI et al., 1991; ROJNUCKARIN et al., 1998). Os resultados das contagens de plaquetas sugerem que a trombocitopenia contribui para o desenvolvimento de hemorragia sistêmica nos envenenamentos botrópicos (KAMIGUTI et al., 1991), e geralmente está relacionada com a gravidade do envenenamento. Além da trombocitopenia, alterações das funções das plaquetas também são observadas em pacientes picados por *B. jararaca* (SANO-MARTINS et al., 1997; SANTORO; SANO-MARTINS, 2004). A fisiopatologia dos transtornos de plaquetas é complexo (SANO-MARTINS et al., 1997; SANTORO; SANO-MARTINS, 2004; SANTORO et al., 1994), mas sua associação com distúrbios de coagulação (KAMIGUTI et al., 1996; MARUYAMA et al., 1990) e danos às células endoteliais (GUTIÉRREZ et al., 2005), certamente contribui para o desenvolvimento de hemorragia sistêmica (SANTORO et al., 2008).

Alguns venenos ofídicos podem ser considerados trombóticos, como os das serpentes *Bothrops lanceolatus* e *Bothrops caribeus*, ambas restritas às

ilhas do Caribe (THOMAS et al., 2006; MALBRANQUE et al., 2008; NUMÉRIC et al., 2002). Esses venenos causam, além de trombo cerebral, coagulopatia e trombocitopenia, edema local, hemorragia e necrose. Estudos filogenéticos sugerem que os venenos dessas duas espécies botrópicas do Caribe estão muito próximos e podem ter o mesmo potencial trombogênico (WÜSTER et al., 1999). Assim, um tratamento com antiveneno monoespecífico para acidentes por *B. lanceolatus* poderia ser útil para o tratamento dos envenenamentos por *B. caribbaeus*, já que um antiveneno específico para esta última não está disponível (NUMÉRIC et al., 2002).

No envenenamento botrópico ocorre o rápido desenvolvimento do edema e inflamação no local da picada. O edema induzido por estes venenos estão ligados à ação de várias substâncias, tais como hemorraginas, toxinas que agem diretamente sobre o endotélio dos capilares e pequenas veias, aumentando a permeabilidade; citotoxinas, que induzem a liberação de histamina, PLA₂, ácido araquidônico, que libera o fosfolípídeos de membrana, a partir da síntese de prostaglandinas (que aumenta a permeabilidade capilar); proteases, que quebram cininogênio liberando cininas e leva à produção de óxido nítrico e prostaglandinas; peptídeos vasoativos, inibindo a ação da enzima conversora da angiotensina (ECA), impulsionando a ação da bradicinina; e componentes da cascata do complemento (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1989; GILMAN, 1996).

A mionecrose é um resultado comum em envenenamentos causados por serpentes do gênero *Bothrops*. Os venenos botrópicos afetam as células do músculo pela ação de miotoxinas em canais iônicos afetando a permeabilidade da membrana celular, e pela ação indireta de proteases, que causam o rompimento dos vasos, levando a isquemia da célula muscular (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1989). A maior atividade miotóxica do gênero *Bothrops* pertence à espécie *B. jararacussu* (MOURA-SILVA, 1991).

O choque é um dos efeitos causados por toxinas presentes em venenos botrópicos, o que ocorre através da ativação de substâncias hipotensoras. Essas substâncias ativam o sistema calicreina-cininogênio-cinina, aumentando a permeabilidade vascular e facilitando a circulação do líquido. As substâncias responsáveis por esse efeito em estados patológicos não são as cininas (GILMAN, 1996).

O estudo do veneno de *Bothrops jararaca* levou os pesquisadores brasileiros Rocha e Silva et al. (1949) a descoberta da bradicinina, que orientou a formulação do Captopril, utilizado no tratamento da hipertensão, insuficiência cardíaca, insuficiência cardíaca congestiva e doença arterial coronariana (FRANÇA; MÁLAQUE, 2003). Portanto, o estudo dos venenos tem proporcionado a elucidação de diversos mecanismos farmacológicos.

1.2 Participação de citocinas, óxido nítrico e sistema complemento

Vários estudos descrevem a participação das citocinas nos envenenamentos por serpentes, escorpiões e aranhas (PETRICEVICH et al., 2000; MEKI, EL-DEAN, 1998; TAMBOURGHY et al., 1998). A Figura 1 mostra a produção e ativação de mediador pelos venenos de serpentes.

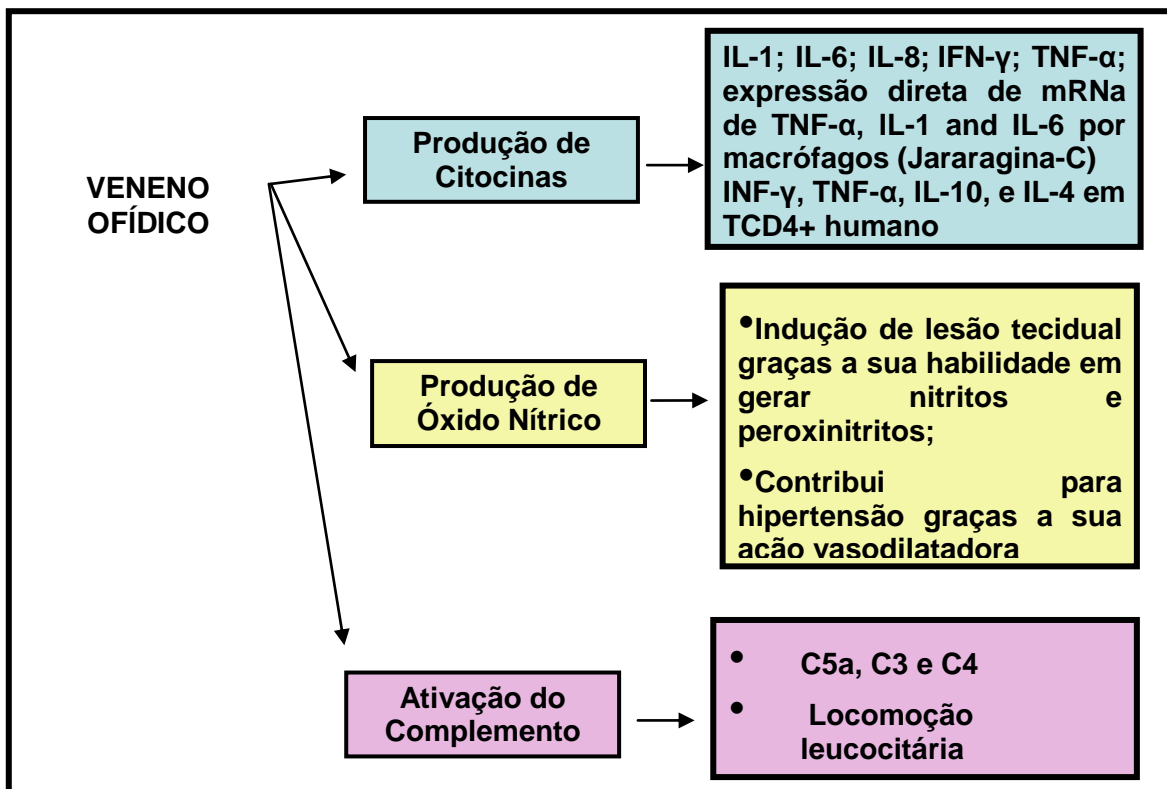


Figura 1. Produção e ativação de mediadores pelos venenos de serpentes.

A patogênese dos efeitos sistêmicos nos envenenamentos ofídicos é complexa.

Barraviera et al. (1995) mostraram que os indivíduos picados por *Bothrops jararaca* e *C. d. terrificus* (espécimes provenientes do Brasil) apresentaram aumento nos níveis de IL-6 e IL-8. O aumento da IL-6 poderia explicar a linfopenia e leucocitose, uma vez que essa citocina é capaz de aumentar a secreção de ACTH e glicocorticóides. Esses autores sugerem que os envenenamentos ofídicos remetem ao trauma agudo, induzindo uma resposta aguda típica.

Barros et al. (1998) constataram que a injeção subcutânea do veneno de *B. atrox* (espécimes provenientes do Serpentário do Instituto Butantan) em camundongos induziu inflamação crônica com sinais de exsudato plasmático, com migração de leucócitos e de dano vascular, que resultou em hemorragia e ruptura das células do músculo esquelético. Este estudo mostrou que a IL-6 não foi produzida por esplenócitos; IL-10 foi produzida por esplenócitos e células peritoneais; IFN- γ foi produzido por células peritoneais, e não por esplenócitos. Além disso, os autores hipotetizam que a exsudação de plasma pode ser mediada pela liberação local de histamina e bradicinina; a migração e adesão de leucócitos podem ser iniciadas por C3a, C5a e/ou IL-8; células endoteliais podem ser ativadas e P-selectina expressa, bem como e-selectina, através da ativação parácrina pela histamina, enzimas tipo trombina e TNF- α ; acúmulo de basófilos e leucócitos podem ser mediados por IL-8; ruptura das células do músculo esquelético podem ser acionados diretamente por proteases como PLA₂, hemorraginas ou compostos citolíticos presentes nos venenos, ou indiretamente por mediadores liberados por leucócitos.

Escocard et al. (2006) investigaram os efeitos da depleção de neutrófilos na expressão de citocinas, quimiocinas e iNOs induzida pelo veneno de *B. atrox* (espécimes provenientes do Serpentário do Instituto Butantan) com o objetivo de compreender a lesão tecidual causada por este veneno. Os níveis de IL-6, MIP-1 β , MIP-2 e NO, mas não de IL-1 β , foram significativamente maiores no soro de animais depletados. Quando o RNAm de citocinas de animais depletados e não-depletados foi analisado, os autores concluíram que a IL-1 β , IL-6, iNOS, RANTES, MIP-2 e CXCR2 foram detectados nas células dos dois grupos de camundongos, TNF- α e TGF- β não foram detectados e CCR1, CCR5 e MIP-1 β foram detectados apenas em células de animais

depletados. Estes resultados indicam que neutrófilos regulam negativamente a expressão de MIP-1 β , CCR1 e CCR5 por células na localização de lesões, o que é importante para a migração celular na inflamação.

Investigando os efeitos de jararagina-c na indução de rolamento de leucócitos e liberação de citocinas pró-inflamatórias no local da injeção, Clissa et al. (2006) mostraram que a mesma estimula a interação entre leucócitos em vasos capilares, pois o número de leucócitos circulante aumentou 250% após o tratamento *in vivo* com a toxina isolada. Além disso, a toxina foi capaz de induzir a liberação de citocinas como IL-1 β , IL-6 e TNF- α .

Lopes et al. (2009) investigaram a indução da inflamação por neuwiedase, uma hemorragina classe PI isolada do veneno de *B. neuwied* (sinônimos: *B. n. goyazensis*, *B. n. meridionalis*, *B. N. paranaensis* e *B. n. urutu*) (SILVA; RODRIGUES, 2008). Este estudo foi realizado em culturas de células de músculo gastrocnêmio. Os resultados desses autores mostraram que culturas de células tratadas com neuwiedase apresentaram PMN na fase aguda e macrófagos em estágios mais tardios. Esses resultados foram corroborados por Fernandes et al. (2006), usando BAP-1, que induziu acúmulo de leucócitos nos ensaios com camundongos. No que diz respeito à liberação de citocinas induzidas por neuwiedase, Lopes et al. (2009) mostraram um aumento significativo no KC (quimiocina similar a IL-8 humana) em homogeneizado de músculo, 2 horas após a inoculação. O aumento significativo de IL-6 e IL-1 β também tem sido verificado. Essas informações corroboram com os estudos em BAP-1, com o aumento da IL-6 e IL-1 em homogeneizado muscular (RUCAVADO et al., 2002) e o aumento dos níveis de IL-1 β e exsudato peritoneal de camundongos injetados com a mesma hemorragina (FERNANDES et al., 2006).

Investigações posteriores mostraram que a jararagina estimula diretamente a expressão de RNAm, de TNF- α , IL-1 e IL-6 por macrófagos (CLISSA et al., 2001). Isto sugere que os macrófagos são alvos importantes de SMVPs. A pesquisa com camundongos knock-out para TNF- α e IL-6 mostrou que ambos os receptores de citocinas são relevantes para o desenvolvimento da necrose induzida por jararagina, mas não no edema ou na hemorragia (LAING, 2003).

Investigando se o veneno de *B. asper* (proveniente da região atlântica da Costa Rica) poderia ativar complemento, Farsky et al. (2000) mostraram que C5a está envolvido na locomoção de leucócitos na presença do veneno *in vivo* e *in vitro*. Além disso, BaP-1, isolada do mesmo veneno, ativou o sistema complemento, o que pode ser observado pela diminuição da atividade hemolítica do soro. Os autores também afirmam que a BaP-1 ativou a quimiotaxia de neutrófilos, o que não aconteceu com nenhuma PLA₂ do veneno.

Luna et al. (2010) observaram que os venenos tanto *B. erythromelas* como *C. d. cascavella* (espécimes provenientes da região Nordeste do Brasil) induziram maior produção de IFN- γ e IL-6 em culturas de esplenócitos de camundongos. O óxido nítrico apresentou uma produção significativa apenas com veneno de *B. erythromelas*, que também apresentou maior taxa de indução de morte celular quando comparado ao veneno de *C. d. cascavella*. Os resultados mostraram que os venenos de *B. erythromelas* e *C. d. cascavella* induziram uma marcada resposta imunomoduladora *in vitro*, através da produção de citocinas e NO. No entanto, *B. erythromelas* induziu uma resposta pró-inflamatória e uma maior taxa de morte celular em relação a *C. d. cascavella*.

Com o objetivo de avaliar o quanto o sistema complemento estaria envolvido na patogênese da inflamação e/ou hemorragia, Rodrigues et al. (2004) isolaram a hemorragina Hi5 de *B. atrox* (do Serpentário do Instituto Butantan), que tem atividade hemorrágica e ativa o sistema complemento. Quando incubada com soro humano normal, esta hemorragina perde a sua atividade hemolítica. Este efeito foi dependente da dose e foi acompanhado pelo consumo de C3 e C4. No mesmo estudo, C3 semipurificado foi incubado com Hi5 para ser clivado em fragmentos menores. Proteína A hemorragina HI-5 foi então injetada em músculo gastrocnêmio de camundongo induzindo inflamação caracterizada por edema e afluxo de PMN. A hemorragina não foi alterada. Os autores sugerem o sistema complemento, como uma fonte de mediadores endógenos dos principais efeitos da inflamação aguda, tais como C3a e C5a, e também participa do recrutamento de leucócitos, mas não na indução de hemorragia.

Assim, estudos envolvendo a participação do NO, citocinas e do complemento confirmam as evidências experimentais de que a ação direta das toxinas do veneno em vários tecidos tem um papel relevante na patogênese de alterações sistêmicas características do envenenamento ofídico.

1.3 Terapia

No final do século 19 Vital Brasil (1865-1950) descreveu, pela primeira vez, a terapia específica para o tratamento de sintomas de envenenamentos causados por serpentes. Depois de ler um relatório de soro anti-Naja de Calmette (1891), Vital Brasil fabricou em 1889, soro monovalente contra os venenos de *Bothrops jararaca* e de *Crotalus durissus terrificus*, o que levou à primeira demonstração da especificidade do soro anti-peçonhento e mais tarde para a primeira produção de soro polivalente com uso terapêutico (HAWGOOD, 1992; 1999). Na época, o cientista imunizou cavalos com os venenos de *Lachesis lanceolatus* (hoje *Bothrops jararaca*) e *Crotalus terrificus* (hoje *Crotalus durissus terrificus*). Desde então, soroterapia foi introduzida definitivamente na clínica. No Brasil, os produtores de soro antiveneno são o Instituto Butantan, a Fundação Ezequiel Dias e o Instituto Vital Brasil (BOCHNER; STRUCHINER, 2003; BRASIL, 1903, 1905). Na Figura 2 observa-se o esquema utilizado para a produção do soro antiveneno.

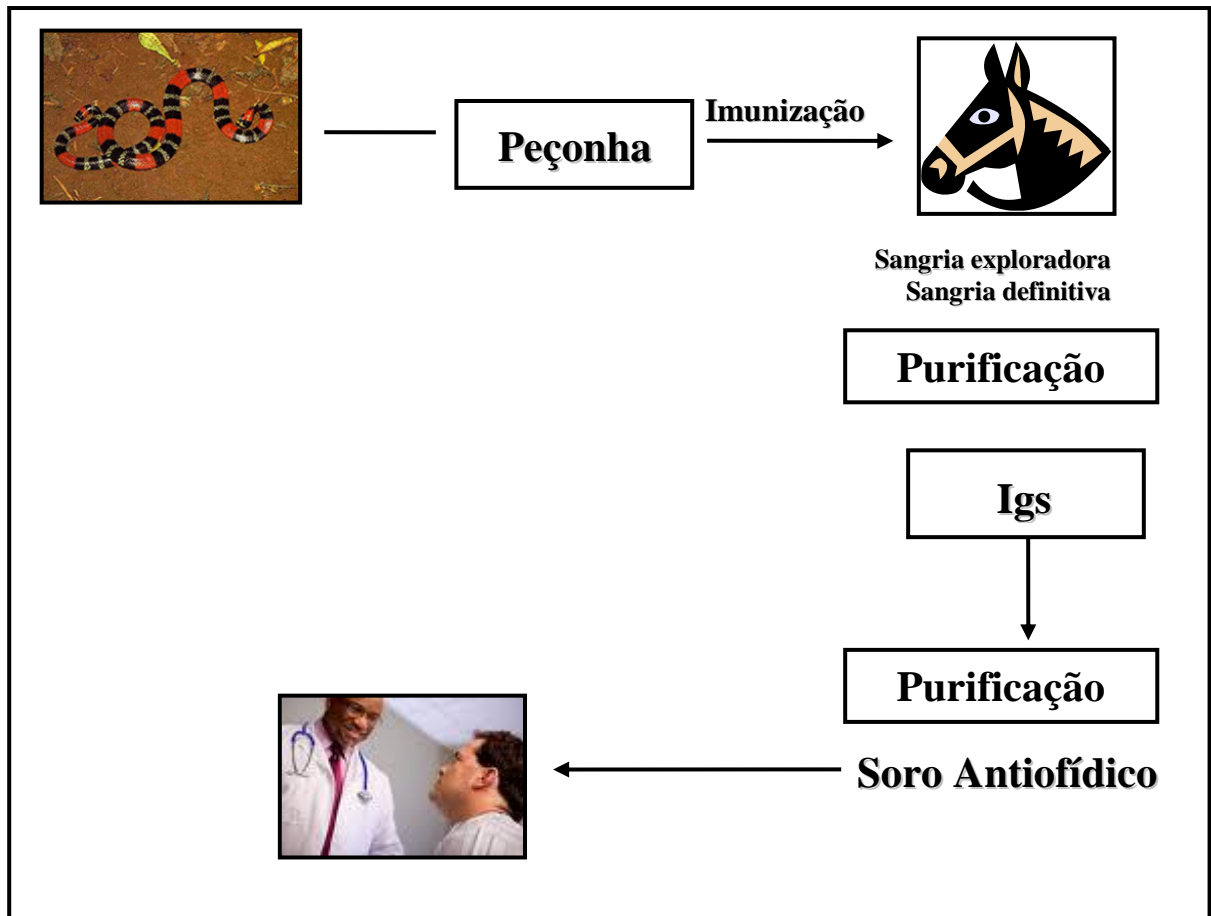


Figura 2. Esquema de imunização e produção de soro antiveneno em animais.

Os anticorpos utilizados para uma neutralização eficiente das toxinas do veneno devem ser dirigidos especificamente para as principais toxinas responsáveis pelas ações locais e sistêmicas. Geralmente, o soro antiveneno deve ser específico, exceto em casos onde a clínica é semelhante, como em casos de acidentes por *Bothrops* e *Lachesis*. No entanto, o antiveneno poli-específico apresenta desvantagens em seu uso devido à sua baixa eficiência. Por conta das diferenças estruturais de cada toxina, alguns podem levar à produção de anticorpos contra as toxinas dominantes de dado veneno em detrimento do outro. Além disso, reduzem a resposta dos animais imunizados, conseqüentemente, reduzindo a quantidade de anticorpos produzidos, devido à atividade imunossupressora de alguns venenos, como *C. d. terrificus* e *L. muta muta*. A variabilidade entre espécies e entre indivíduos também deve ser considerada, já que há variações no veneno quando se leva em consideração

período do ano e idade dos espécimes, assim como distribuição geográfica dos espécimes (BUCHANAN et al., 2003; WARREL, et al., 1997).

Além disso, para reduzir problemas com hipersensibilidade alguns produtores digerem a molécula de imunoglobulina em seus fragmentos independentes, apresentando como produto final apenas a porção F (ab) '2 ou Fab (CARDOSO, 2003).

Atualmente, estudos em torno da filogenética de serpentes correlacionando o mesmo gênero têm sido realizados. A caracterização de venenos através da proteômica contribui para uma maior compreensão da biologia, ecologia e fisiopatologia do envenenamento causado por esses animais. Além disso, o conhecimento de diferentes famílias de toxinas pode ser relevante para a geração de protocolos de imunização com a produção de anticorpos com maior especificidade e eficácia que os antivenenos convencionais, produzidos em cavalos (GUTIÉRREZ et al., 2008).

A compreensão dos mecanismos moleculares que sublinham as variações de veneno, como ontogenéticas e geográficas, e um profundo conhecimento das toxinas do veneno podem provocar um grande impacto no tratamento de vítimas de acidentes ofídicos, assim como na melhoria da seleção de amostras para a geração de antídotos (GUTIÉRREZ et al., 2009).

A heterogeneidade observada em inter e intra-espécies na composição do veneno devem ser consideradas na apresentação dos sintomas de envenenamento em seres humanos, especialmente no que diz respeito ao envenenamento provocado pela mesma espécie em diferentes regiões geográficas (CHIPPAUX et al., 1991; WARREL, 1997). Compreender a variação antigênica das toxinas dos venenos de serpentes de diferentes origens geográficas pode levar à concepção de novas abordagens terapêuticas, com base na imunogenicidade destes componentes. Assim, o desenvolvimento da soroterapia específica está relacionado com um conhecimento detalhado da composição do veneno e do perfil imunológico estabelecido por cada um (CALVETE, 2009).

Um bom exemplo de antivenômica (termo usado para identificar as toxinas que são reconhecidas pelo antiveneno por técnicas de proteômica) é o caso do gênero *Crotalus* (LOMONTE et al., 2008; GUTIÉRREZ et al., 2008; CALVETE et al. 2009). O antiveneno produzido contra o veneno de *Crotalus*

simus simus, espécie da América Central é ineficaz para a neutralização da neurotoxicidade do veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus* da América do Sul. Da mesma forma, antivenenos produzidos na América do Sul contra o veneno de *C. d. terrificus* são ineficazes em neutralizar a atividade hemorrágica dos venenos do gênero *Crotalus* em geral (SARAVIA et al., 2002). Este caso ilustra como o conhecimento da variabilidade em venenos de serpentes, principalmente como consequência da sua distribuição geográfica pode levar à geração de antivenenos mais eficazes contra o veneno de *Crotalus* em América do Sul e Central (CALVETE, 2009).

2. JUSTIFICATIVA

De acordo com o exposto, a importância do presente trabalho justifica-se por chamar a atenção para os problemas existentes nos registros epidemiológicos dos acidentes ofídicos, visto que os dados obtidos nas diferentes instituições hospitalares não são apropriadamente notificados e, portanto, esses resultados não corroboram com a realidade.

Outrossim, ressaltaremos a importância da participação de citocinas, NO e outros mediadores imunológicos envolvidos no desenvolvimento das manifestações clínicas, apresentadas por indivíduos envenenados por serpente da *Bothrops erythromelas*. Os estudos desses mediadores poderá elucidar os mecanismos deflagrados nos envenenamentos, com o intuito de melhorar a terapêutica e diminuir a morbidade.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar aspectos imunológicos em camundongos e vítimas de envenenamento por *Bothrops erythromelas* (jararaca) antes e após tratamento soroterápico.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Determinar *in vitro*, a citotoxicidade, a produção de óxido nítrico, IFN- γ , IL-10, IL-2, IL-6 e a viabilidade de células esplênicas de camundongos BALB/C na presença do veneno de *Bothrops erythromelas*;
- b) Avaliar os aspectos clínicos e epidemiológicos dos indivíduos envenenados por *Bothrops erythromelas*;
- c) Caracterizar a produção de IgM em pacientes envenenados por *Bothrops erythromelas*, antes, 12 e 24 horas após tratamento;
- d) Quantificar os níveis das citocinas IFN- γ , e IL-10 nos sobrenadantes das culturas dos sangues periféricos dos pacientes envenenados por *Bothrops erythromelas*, antes, 12 e 24 horas após tratamento soroterápico;
- e) Avaliar os níveis de óxido nítrico em sobrenadantes de cultura de sangue periférico de pacientes envenenados por *Bothrops erythromelas* antes, 12 e 24 horas após tratamento soroterápico;
- f) Caracterizar os marcadores de superfície celular (CD3, CD4, CD8, CD16, CD25, CD55, CD11b, CD35, CD88, CD32 e CD18) do sangue periférico dos pacientes envenenados por *Bothrops erythromelas*, antes, 12 e 24 horas após tratamento soroterápico;

- g) Avaliar os níveis séricos de citocinas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α e IFN- γ) e quimiocinas (IL-8, Rantes, MIG, MCP-1 e IP-10) de pacientes envenenados por *Bothrops erythromelas*, antes, 12 e 24 horas após tratamento soroterápico.

4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

4.1 Tipo de estudo

O estudo com camundongos foi do tipo experimental (randomizado). Nesse caso, a divisão dos animais em grupos experimental e controle foi realizada aleatoriamente, para que as características de cada grupo não se afastassem da média dos valores representativos do universo estudado (ROUQUAYROL; ALMEIDA FILHO, 2003).

Com os pacientes de Recife, o estudo foi do tipo experimental (não-randomizado). Esse estudo consiste na comparação entre um grupo de participantes sujeitos à intervenção e outro grupo de participantes não sujeitos à intervenção, controles. Ambos os grupos foram escolhidos a partir de critérios de disponibilidade ou conveniência (ROUQUAYROL, ALMEIDA FILHO, 2003). O estudo com os pacientes de Campina Grande foi do tipo retrospectivo com abordagem quantitativa e descritiva. A análise quantitativo-descritiva consiste em investigações empíricas, que objetivam o delineamento ou análise das características principais ou decisivas de um fenômeno, a avaliação de programas ou ainda o isolamento de variáveis principais ou chave. Neste tipo de estudo são empregadas técnicas como entrevistas e questionários, e procedimentos de amostragem (MARCONI; LAKATOS, 2003).

4.2 População estudada

4.2.1 Camundongos

Para os ensaios experimentais foram utilizados camundongos (3 a 5) *Mus musculus* da linhagem BALB/C, machos com 6 – 8 semanas de idade, pesando $20 \pm 2g$ e provenientes do Biotério do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz/Pernambuco (CPqAM/FIOCRUZ) em Recife. O protocolo de experimentação animal, utilizado no presente trabalho foi parte de um projeto aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FIOCRUZ, processo de número 0266-05.

4.2.2 Pacientes

Os pacientes do presente estudo foram provenientes do Centro de Toxicologia (CEATOX) do Hospital da Restauração (HR) de Recife, Pernambuco (CEATOX-HR-PE) e do CEATOX do Hospital de Urgência e Emergência de Campina Grande, Paraíba (CEATOX-HUECG-PB). Setenta e duas fichas foram selecionadas no CEATOX-HR-PE, sendo cinquenta (50) casos notificados como pacientes acometidos por acidente crotálico e vinte e dois (22) por acidente botrópico. No CEATOX-HUECG-PB, o estudo preliminar da presente tese, referente a avaliação da produção de IgM, foi realizado com 11 pacientes. As outras avaliações foram realizadas com outros 16 pacientes, selecionados no CEATOX-HUECG-PB. Pacientes de ambos os sexos e diferentes idades, envenenados por *B. erythromelas* e atendidos nos dois hospitais foram entrevistados passando pelos exames clínico-laboratoriais, além da coleta de informações a partir das fichas de atendimento.

Em relação aos pacientes do CEATOX-HR-PE, a análise clínica-epidemiológica foi realizada a fim de avaliar parâmetros importantes como variáveis relacionadas ao indivíduo (sexo, faixa etária, escolaridade); ao evento (sazonalidade, município, zona de ocorrência, espécie responsável pelo acidente, tempo decorrido entre o acidente e o atendimento, local do evento e evolução clínica); aos dados clínicos mais frequentes nos envenenamentos botrópico (edema local, dor, gengivorragia, bolhas, mialgia) e crotálico (edema local, dor, gengivorragia, mialgia, ptose palpebral e visão turva). Os exames laboratoriais contemplaram tempo de coagulação –TC, tempo de sangria –TS, creatinoquinase –CK e desidrogenase láctica –LDH. As mesmas variáveis foram avaliadas para os pacientes do HUECG-PB.

A confirmação da espécie *B. erythromelas* responsável pela picada foi realizada por profissionais dos hospitais no momento que a vítima acometida pelo envenenamento ou levou a espécie ao hospital ou descreveu a mesma ao profissional.

Os critérios de inclusão na seleção dos indivíduos incluíram aqueles que receberam tratamento soroterápico antibotrópico e sinais/sintomas clínicos mais frequentes de envenenamento botrópico, já descritos anteriormente. Os critérios de exclusão foram considerados para indivíduos que receberam

tratamento soroterápico polivalente, ou seja, soros antibotrópico e anticrotálico ou indivíduos com patologias similares a clínica dos envenenamentos.

Dez mililitros (ml) de sangue dos pacientes foram coletados a cada intervalo de tempo: antes da soroterapia, 12h e 24h após a soroterapia, totalizando três coletas, ou seja, 30 ml de sangue.

A soroterapia empregada no tratamento antibotrópico preconizado pelo Ministério da Saúde (2003), determina que em pacientes com envenenamento leve devem ser administradas 4 ampolas de soro antibotrópico; em pacientes com envenenamento moderado, devem ser administradas 8 ampolas de soro antibotrópico; e para pacientes sabidamente graves, devem ser administradas 12 ampolas de soro antibotrópico.

O grupo controle constituiu-se de voluntários saudáveis (n= 5), sem antecedentes de envenenamento ofídico e com idade acima de quinze anos. Esse grupo foi submetido a coleta de 10 ml de sangue venoso em um momento.

4.2.3 Descrição dos exames laboratoriais de avaliação dos pacientes

Os pacientes envenenados por *B. erythromelas* foram submetidos à avaliação clínica, epidemiológica e a alguns procedimentos laboratoriais. Os exames laboratoriais incluíram:

a) Tempo de Coagulação - mede o tempo necessário para que o sangue coagule *in vitro*. Procede-se à punção venosa, procurando-se lesar os tecidos o mínimo possível; dispara-se o cronômetro, assim que o sangue entra na seringa; separa-se 3 tubos de ensaio (10 x 120 mm), colocando-se 1 ml de sangue em cada um e levando-se os mesmos imediatamente ao banho à 37°C. Três minutos após a coleta, inicia-se a observação do tubo 1, inclinándolo suavemente e repetindo-se essa observação a cada 30 segundos até que o sangue coagule. O tempo transcorrido foi marcado desde a coleta até a formação do coágulo; procedendo-se do mesmo modo com os tubos 2 e 3. O tempo de coagulação foi o obtido pela média dos tempos encontrados nos 3 tubos. O valor de tempo de coagulação normal é de 4 a 9 minutos.

b) Tempo de Sangria - corresponde à duração de uma pequena hemorragia quando uma incisão de dimensões padronizadas é praticada na pele artificialmente. O teste fornece dados relativos à função e número das plaquetas, bem como da resposta da parede capilar à lesão. O método mais comumente utilizado é o de Duke (RAVEL, 1997). Realizou-se a assepsia do lóbulo da orelha (pode-se usar também a polpa digital) com algodão embebido em álcool 70%. Com auxílio de uma lanceta específica e de um só golpe, uma incisão local foi feita com cerca de 2 mm de profundidade. Disparou-se o cronômetro e a cada 30 segundos, a gota de sangue foi recolhida em papel de filtro (tendo o cuidado de não tocar o mesmo no lóbulo ou a polpa), até que a última gota deixe apenas um sinal puntiforme no papel. Em seguida, anotou-se o tempo decorrido entre a primeira e a última gota recolhidas. O valor de tempo de coagulação normal é de 1 a 3 minutos.

c) Creatinofosfoquinase (CPK) ou creatinoquinase (CK) é uma enzima presente em vários sítios do nosso organismo, sendo encontrada em abundância no coração e, principalmente, nos músculos. Sua elevação na corrente sanguínea é um forte indicador de lesão muscular, uma vez que a destruição das células dos músculos provoca um grande fluxo de CK em direção ao sangue. O sangue foi colhido por punção venosa, geralmente da prega do cotovelo ou dorso da mão. O local da punção é limpo com anti-séptico e um torniquete (tira elástica) foi amarrado ao braço para comprimi-lo e restringir o fluxo de sangue através da veia. Isto faz com que a porção da veia abaixo do torniquete se distenda, enchendo-se de sangue. Uma agulha foi introduzida na veia e o sangue coletado em um tubo. Durante o procedimento, o torniquete foi removido para restaurar a circulação. Após coleta do sangue, a agulha foi removida e o local da punção coberto para evitar qualquer sangramento. O valor normal é de 24 a 194 U/ml.

d) Desidrogenase láctica - A medição dessa enzima é mais utilizada para avaliar a presença de tecidos danificados. A enzima está presente em muitos tecidos, especialmente no coração, fígado, rins, músculos do esqueleto, células sanguíneas do cérebro e pulmões. A LDH catalisa a interconversão de piruvato e lactato. Músculos que se exercitam convertem (e os glóbulos vermelhos

metabolizam) glicose em lactato. O lactato é liberado no sangue e eventualmente absorvido pelo fígado. O fígado converte lactato de volta em glicose e libera glicose no sangue. Essa glicose é então absorvida pelos músculos em repouso, glóbulos vermelhos e por outros tecidos. O sangue foi colhido da mesma maneira coletada para o ensaio da Creatinofosfoquinase (CPK). O valor normal é 105 a 333 UI/L.

4.2.4 Considerações éticas

Uma parte das amostras coletadas e utilizadas neste trabalho foi processada no laboratório do HUECG-PB, outra parte no HR-PE e uma terceira parte, no Laboratório de Imunogenética do Depto. de Imunologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz/Pernambuco (CPqAM/FIOCRUZ/PE). Os dados coletados nesta pesquisa foram utilizados unicamente para atender aos objetivos da mesma. As informações foram apresentadas de forma coletiva, sem identificação dos pacientes ou dos profissionais de saúde envolvidos nos atendimentos destes.

Os procedimentos só foram realizados após todos os participantes terem concordado e assinado o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (TCLE) (Apêndices A, B, C). Os protocolos experimentais foram aprovados pelos Comitês de Ética do CPqAM/FIOCRUZ com CAAE número 000.50095.000.08 (Anexo 1).

4.3 Obtenção do veneno

Os venenos das serpentes *B. erythromelas* e *Crotallus durissus cascavella* foram obtidos através da ordenha de espécimes de cativeiro. Os espécimes foram provenientes do Centro de Répteis da Caatinga, localizado em Campina Grande, PB. Foram selecionados animais adultos e filhotes de ambos os sexos. O veneno, após liofilização, foi mantido sob refrigeração (4°C) até o momento de sua utilização. As concentrações protéicas de cada veneno foram analisadas pelo método de Lowry (1951).

4.4 Obtenção de esplenócitos murinos

Esplenócitos de camundongos BALB/C foram obtidos de acordo com Pereira et al. (2004). Após o sacrifício do animal em cilindro de CO₂, o baço de cada camundongo foi removido em condições assépticas e colocado em tubo plástico (Falcon) contendo meio RPMI 1640 sem soro bovino fetal (SFB) (meio incompleto). Em um fluxo vertical, cada baço foi transferido para uma placa de Petri, onde foram macerados. As suspensões celulares obtidas foram transferidas para tubos plástico (Falcon) contendo aproximadamente 10 ml de meio incompleto, baço, centrifugados a 4°C, a 200 X g por 5 minutos. Após descartar o sobrenadante, água destilada foi adicionada ao sedimento para promover a lise das células vermelhas do sangue. O sobrenadante, não contendo restos celulares foi coletado e centrifugado a 4°C, a 200 X g por 5 minutos. O sedimento (contendo células) foi ressuspensionado em RPMI 1640 completo (com SFB). Uma alíquota de cada suspensão de células foi separada, diluída em azul de tripan para ser quantificada em câmara de Neubauer e a viabilidade celular foi determinada.

4.5 Avaliação da atividade tóxica dos venenos em células de camundongos isogênicos

Células esplênicas (6×10^5 células/poço), obtidas de acordo com item anterior, foram cultivadas em placas de 96 poços de fundo plano em meio RPMI completo (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), contendo 10% de SBF (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), 1% de L-glutamina 200 mM; 1% de piruvato de sódio 100mM; 26,8 ml de bicarbonato de sódio a 7,5% e 1% de solução de antibióticos estreptomicina 100 µg/ml e penicilina 100 U/ml (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Cada alíquota de veneno foi avaliada em seis concentrações diferentes (1, 5, 10, 25, 50 e 100 µg/mL), em triplicata, em dois ensaios independentes. As culturas foram incubadas na presença de ³H-timidina ([³H] TdR) (Amersham Biosciences) (1 µCi por poço) por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após esse período, o conteúdo da placa foi colhido para determinar a incorporação de [³H] TdR, utilizando um contador de radiação

beta (β -matriz de 9600, Packard). A toxicidade dos venenos foi determinada pela comparação da porcentagem de incorporação de [^3H] TdR (como indicador de viabilidade celular) nos poços tratados com diferentes concentrações de veneno em relação aos poços sem tratamento. Saponina (0.05%), composto sabidamente citotóxica foi usada como controle positivo. Concanavalina A (ConA) e fitohemaglutinina (PHA) foram usados como referências para os ensaios imunológicos. Concentrações não citotóxicas foram definidos como aqueles que causam uma diminuição da incorporação de [^3H] TdR abaixo de 30% em relação aos controles.

4.6 Quantificação de citocinas nos sobrenadantes de cultura de esplenócitos

Esplenócitos foram cultivados em placas de 24 poços (TPP) com uma densidade de 10^6 células por poço. As citocinas foram quantificados em 24, 48, 72 horas e 6 dias de sobrenadante de culturas estimuladas com o veneno da serpente *Bothrops erythromelas* (100, 10 e 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), veneno da serpente *Crotalus durissus cascavella* (100, 10 e 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ConA (2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), PHA (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou mantida apenas em meio de cultura (controle). A dosagem de IL-2, IL-6, IL-10 e IFN- γ foi realizada através do ELISA de captura, utilizando-se o Kit OptEIA, (BD Biosciences), seguindo orientações do fabricante. Placas de ELISA (Costar half-area plate-96 poços) foram sensibilizadas com 25 μl dos anticorpos anti-citocinas específicos (de acordo com o fabricante), diluídos em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 e incubadas por 18h a 4°C. As placas foram lavadas três vezes com 150 μl /poço de PBS pH 7,2-Tween-20 0,05% (PBS-Tw), e incubadas com 100 μl de solução bloqueadora contendo soro fetal bovino (PBS pH 7,2 + 10% SFB) por 1h, a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-Tw. Os padrões das citocinas foram diluídos seriadamente (fator 2) em PBS pH 7,2 + 10% SFB a partir da concentração inicial recomendada pelo fabricante. Em seguida, 25 μl da amostra e dos padrões foram adicionados em duplicata e a placa incubada por 2h em TA. Quando necessário, as amostras eram diluídas em PBS pH 7,2

+ 10% SFB. Após o tempo de incubação, as placas foram lavadas 6 vezes com PBS-Tw e 25µl dos anticorpos biotinizados específicos (de acordo com o fabricante), diluídos em PBS pH 7,2 + 10% SFB foram adicionados por 1h30min, em TA. Após nove lavagens com PBS-Tw, foram adicionados 50µl da solução reveladora contendo ABTS - 2,2-azino-de [sulfato(6)de 3-etil benzitiazolina] (KPL). A reação foi bloqueada com 25µl de ácido sulfúrico 1 M e a leitura realizada no espectrofotômetro (Bio-Rad 3550) a 415 nm. As concentrações das amostras foram calculadas na região linear da curva de titulação dos padrões de citocinas e as concentrações finais expressas em pg/ml, utilizando o software Microplate Manager, versão 4.0 (Bio-Rad laboratories).

4.7 Análise de viabilidade celular por anexina v-FITC e iodeto de propídeo em cultura de esplenócitos

Esplenócitos foram tratados com veneno de *Bothrops erythromelas* (100, 10 e 1 µg/mL), veneno de *Crotalus durissus cascavella* (100, 10 e 1 µg/mL), ConA (2,5 µg/mL) e PHA (5 µg/mL). As células tratadas foram mantidas em placas de cultura de 24 poços e a análise da viabilidade celular foi feita após 24 e 48 horas. Células sem tratamento foram usadas como controle negativo. Em seguida, os linfócitos foram centrifugados a 4°C, a 450 x g por 10 minutos. Após descartar o sobrenadante, foi adicionado 1mL de PBS 1X ao sedimento para ser centrifugado a 4°C, a 450 x g por 10 minutos. Após descartar o sobrenadante, o sedimento foi ressuspensionado em tampão de ligação (10 mM HEPES (pH 7,4), 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM de MgCl₂ e 1,8 mM de CaCl₂) e foi adicionado anexina V conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1:500) e iodeto de propídeo (PI, 20 µg/mL; 10⁶ células) ao tubo de citometria. A viabilidade celular foi quantificada no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson Biosciences, Mountain View, CA, EUA), utilizando-se anexina Vconjugada a FITC e iodeto de propídeo (IP). A análise foi realizada no software Cell Quest (Becton Dickinson) onde a apoptose foi quantificada pelo número de células anexina V-FITC positivas e PI negativas divididas pelo

número total de células. A necrose por PI positivas e anexina V-FITC negativas pelo número total de células. Apoptose tardia foi determinada quando as células apresentarem positivas para anexina V-FITC e PI positivas.

4.8 Análise da produção de nitrito nos sobrenadantes de cultura de esplenócitos

Cultura de esplenócitos foi utilizada para avaliar a concentração de nitrito durante o tratamento com veneno de *Bothrops erythromelas* (100, 10 e 1 µg/mL), veneno de *Crotalus durissus cascavella* (100, 10 e 1 µg/mL), ConA (2,5 µg/mL), PHA (5 µg.mL⁻¹) ou mantida apenas em meio de cultura (controle) após 24, 48, 72 horas e 6 dias de incubação. Em seguida, as placas foram centrifugadas a 1800 x g por 10 minutos, em TA e os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80°C até a análise pelo método de Griess (DING et al., 1988). Placas de ELISA (96 poços, placa Costar) foram preenchidas em duplicata com 25µl do sobrenadante de cultura armazenado, seguido pela adição de 25 µl do reagente de Griess. A leitura do sobrenadante foi realizada em espectrofotômetro a 450 nm (Bio-Rad 3550, Hercules, CA) e a concentração de NO foi determinada comparando-se a absorbância contra uma curva padrão (3,12 – 100 µmol/mL preparada com nitrito de sódio (NaNO₂), utilizando-se o software Microplate Manager versão 4.0 (Bio-Rad Laboratories).

4.9 Avaliação da produção de IgM em pacientes envenenados pela serpente *Bothrops erythromelas*

Dez mililitros de sangue de pacientes picados pela serpente *B. erythromelas* foram coletados imediatamente após sua admissão no CEATOX-HUECG-PB. Cada amostra foi centrifugada e o soro obtido, armazenado -20°C em microtubos identificados até o momento de sua utilização. Os pacientes foram separados em três grupos, de acordo com a gravidade do envenenamento botrópico: leve (n = 4), moderado (n = 4) e grave (n = 3).

Todos os pacientes foram submetidos à soroterapia no mesmo hospital. Alíquotas do veneno de *B. erythromelas* foram submetidas a eletroforese em

gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), segundo Laemmli (1970). Os géis de empilhamento (“stacking gel”) e de separação (“running gel”) foram preparados a uma concentração de acrilamida de 4,5% (p/v) e 10% (p/v), respectivamente. Após SDS-PAGE, as bandas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, seguindo-se incubação com “pool” de soro de pacientes de cada tipo de envenenamento botrópico. Os imunocomplexos formados (componentes antigênicos do veneno mais anticorpo presente no soro) foram detectados através de uma sonda enzimática. No presente trabalho, a sonda enzimática foi a anti-IgM conjugada a peroxidase. Este estudo preliminar de avaliação da resposta imune humoral foi aprovado pelo CEP/UEPB.

4.10 Quantificação de citocinas nos sobrenadantes das culturas de sangue periférico dos pacientes envenenados por *Bothrops erythromelas*

Sangue periférico, coletados antes e após o tratamento antibotrópico foram cultivados a 37°C e 5% de CO₂, em placas de 24 poços (TPP, Suíça) com veneno de *B. erythromelas* (5, 2,5 e 1 µg/mL), PHA (5 µg/mL) ou ConA (2,5 µg/mL) durante 24 horas. Sangue cultivado em meio de cultura apenas foi utilizado como controle negativo. Em seguida, as placas foram centrifugadas a 1800 x g por 10 minutos, em temperatura ambiente (TA) e os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80°C até a análise. A dosagem das citocinas IFN-γ, e IL-10 foi realizada através do ELISA de captura, conforme descrito no item 3.6.

4.11 Detecção de nitrito nos sobrenadantes das culturas de sangue periférico dos pacientes envenenados por *Bothrops erythromelas*

Sangue periférico, coletados antes e após o tratamento antibotrópico foram cultivados a 37°C e 5% de CO₂, em placas de 24 poços (TPP, Suíça) com veneno de *Bothrops erythromelas* (5, 2,5 e 1 µg/mL), PHA (5 µg/mL) ou ConA (2,5 µg/mL) durante 24, 48, 72 horas e 6 dias. Sangue cultivado em meio de cultura apenas foi utilizado como controle negativo. Em seguida, as placas

foram centrifugadas a 1800 x g por 10 minutos, em TA e os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80°C até a análise pelo método de Griess (Ding et al., 1988), conforme descrito no item 3.8.

4.12 Identificação de marcadores de superfície celular em sangue periférico de pacientes envenenados pela serpente *Bothrops erythromelas*

Alíquotas de 100 µl do sangue periférico de pacientes e controles, coletados com EDTA, foram transferidas para tubos de citometria contendo anticorpos monoclonais específicos para marcadores de superfície celular (CD3, CD4, CD8, CD16, CD25, CD55, CD11b, CD35, CD88, CD32 e CD18) (Tabela 3). Após homogeneização em vortex, a mistura foi incubada por 30 minutos. Depois disso, as amostras foram submetidas à lise de eritrócitos, seguido por duas lavagens com PBS e 2 centrifugações (400 x g), com posterior ressuspensão em 400 µl de paraformaldeído a 1%. Os parâmetros imunofenotípicos e morfométricos celulares foram determinados por citometria de fluxo (FACSCalibur-Becton Dickinson), utilizando-se o CELLQuestPro™ para aquisição e análise de dados (50.000 eventos).

Tabela 3. Tipo de marcador e tipo celular avaliados no estudo

MARCADOR	TIPO CELULAR
CD3	Linfócito
CD4	Linfócito T helper
CD8	Linfócito T citotóxico
CD16	Célula NK
CD25	Receptor para IL-2
CD11b	Complemento
CD35	Complemento
CD88	Complemento
CD32	Receptor de Fc para IgG
CD18	Expresso por todos leucócitos

4.13 Detecção do nível de citocinas plasmáticas por citometria de fluxo em soro de pacientes envenenados pela serpente *Bothrops erythromelas*

A partir dos soros obtidos, os níveis plasmáticos de citocinas e quimiocinas foram quantificados, utilizando-se o sistema Cytometric Bead Array (CBA) da Becton Dickinson-BD. Esse sistema emprega uma mistura de seis esferas de poliestireno, de intensidades de fluorescência discretas e distintas, recobertas com anticorpos específicos para as citocinas e quimiocinas humanas, e são detectadas no canal FL-3. Essa metodologia permite a avaliação simultânea de diversas citocinas ou quimiocinas no mesmo ensaio, empregando-se pequenos volumes de amostra.

Inicialmente as amostras de soro de pacientes envenenados pela serpente *B. erythromelas*, mantidas a -20°C foram descongeladas e ultracentrifugadas a 14000 rpm por 10 min. e o sobrenadante transferido para outro tubo. Alíquotas de $25\mu\text{L}$ do soro teste com diluente G, alíquotas de $25\mu\text{L}$ dos padrões de citocinas, submetidos a diluição seriada com diluente G (reagente presente no kit CBA) (“Top Standart”) e $25\mu\text{L}$ de diluente G apenas (Controle Negativo), foram transferidas para tubos de poliestireno de 5mL (Falcon nº 2052). Em seguida, a cada tubo foi adicionado $15\mu\text{L}$ da mistura de esferas de captura, conjugadas com anticorpos monoclonais anti-IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α e IFN- γ (Human Th1/Th2 Cytokine CBA Kit) ou anti- IL-8, Rantes, MIG, MCP-1 e IP-10 (Human Chemokine Kit) com subsequente incubação por 90 minutos em TA, ao abrigo da luz. Após a incubação, as esferas de captura foram lavadas com $500\mu\text{L}$ da solução F (“Wash buffer”, reagente presente no kit CBA), centrifugadas a $600 \times g$, por 7 minutos a 18°C e, o sobrenadante cuidadosamente aspirado e descartado. As esferas foram então re-incubadas na presença de $20\mu\text{L}$ do reagente B, que corresponde a um coquetel de anticorpos monoclonais anti-citocinas (ou anti-quimiocinas) humanas, conjugados com o fluorocromo PE (FL-2) por 90 minutos, T.A., ao abrigo da luz. Após incubação, as esferas de captura foram novamente lavadas com $500\mu\text{L}$ da solução F, centrifugadas a $600 \times g$, por 7 minutos a 18°C e, o sobrenadante cuidadosamente aspirado e descartado. Após centrifugação, as

esferas foram ressuspensas em 250 μ L de reagente F e imediatamente analisadas no citômetro de fluxo.

4.13.1 Aquisição dos dados no citômetro de fluxo

Antes de proceder à aquisição dos dados das amostras, o aparelho foi ajustado, utilizando-se o BD FACSComp Software e o BD Calibrate Beads. O objetivo do ajuste do aparelho consistiu em definir os parâmetros de tamanho e granulosidade adequados para o posicionamento das esferas de captura em gráficos de tamanho *versus* granulosidade (R1). Após a seleção das esferas, procedeu-se o ajuste da intensidade da FL3 para permitir a segregação das esferas policromáticas, apresentando diferentes intensidades de fluorescência, em histogramas unidimensionais. Para cada tubo processado foram adquiridos 1800 eventos dentro da região selecionada R1 (300 eventos por citocina testada).

4.13.2 Análise semi-quantitativa de citocinas/quimiocinas nos soros de pacientes envenenados pela serpente *Bothrops erythromelas*

A análise do perfil de citocinas / quimiocina no soro de pacientes picados pela serpente *Bothrops erythromelas* foi feita segundo protocolo proposto pelo fabricante através da utilização do BD CBA Analyses Software, com auxílio do Microsoft Excel, modificado como descrito a seguir. O programa BD CBA Analysis Software faz a seleção automática da região das esferas de captura em gráficos de tamanho *versus* granulosidade. Em seguida, o programa separa as esferas em função da intensidade da FL3 e analisa o deslocamento das esferas em função da intensidade da fluorescência 2 (FL2) em gráficos bidimensionais de FL2 *versus* FL3. A ligação da citocina / quimiocina presente na amostra de interesse à esfera de captura e a revelação da ligação através do uso de um coquetel de anticorpos monoclonais anti-citocinas/ quimiocinas humanas marcadas com ficoeritrina (PE) pode ser evidenciado através do deslocamento do conjunto de esferas para a região de maior intensidade de fluorescência em relação ao tubo controle negativo, sem soro humano (Figura

2). Os valores correspondentes à intensidade média de fluorescência FL2 na escala logarítmica são utilizados como a unidade de análise semi-quantitativa para cada citocina / quimiocina analisada.

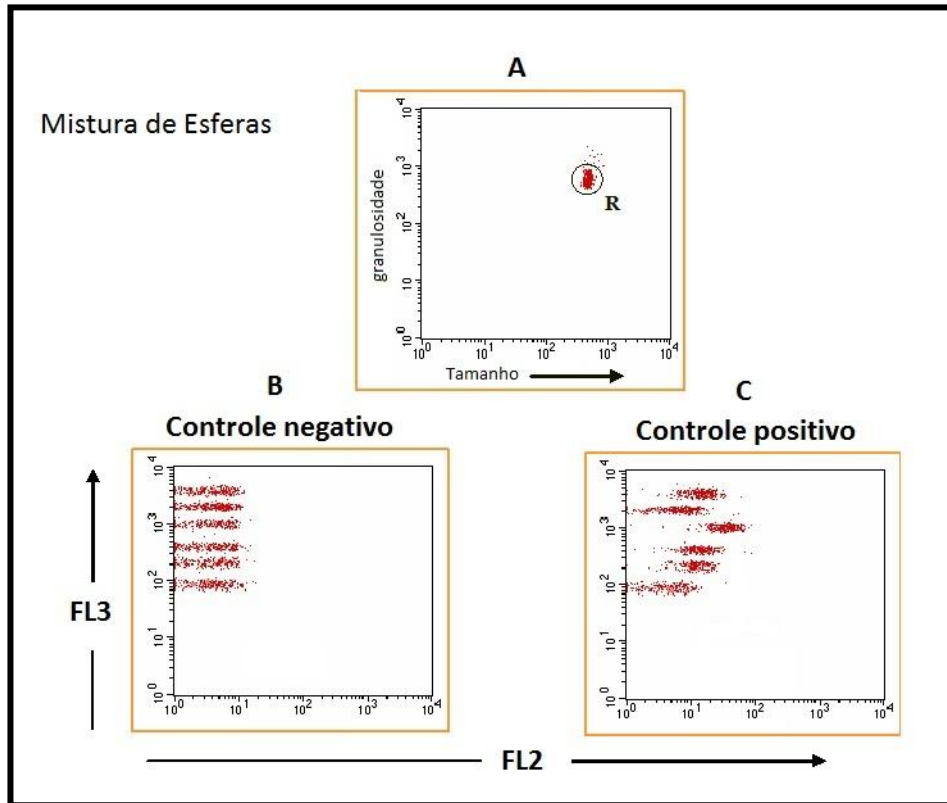


Figura 3. Análise quantitativa de citocinas/quimiocinas de sobrenadante de cultura utilizado pelo BD CBA Analyses Software. Inicialmente, o programa promove a seleção automática da população de esferas de captura em gráficos de tamanho *versus* granulosidade (A). Em seguida, separa as esferas e analisa da intensidade de fluorescência correspondente ao complexo esfera-citocina-anticorpo PE (B e C).

4.14 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no Laboratório de Métodos Qualitativos do Núcleo de Saúde Coletiva do CPqAM.

Todos os dados foram analisados por testes não-paramétricos. Diferenças entre grupos foram analisadas por meio da análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste t ou teste de Tukey e Kruskal-Wallis. O teste Mann-Whitney foi utilizado para comparação entre os grupos. Para a correlação de variáveis foi utilizado o teste de correlação de Spearman. Os

resultados foram expressos em valores das médias dos grupos, desvio padrão e as análises estatísticas foram realizadas considerando-se o valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

Os softwares utilizados nas análises foram Excel, 2007 e Graph Pad Prim 5.0.

5 RESULTADOS

5.1 Efeito citotóxico do veneno da serpente *Bothrops erythromelas* e *Crotalus durissus cascavella* em células esplênicas de camundongos BALB/c

A citotoxicidade foi expressa como a maior concentração testada não citotóxica para células esplênicas de camundongos BALB/c. Saponina foi utilizada como controle positivo. A saponina, conhecida por sua atividade citotóxica, apresentou 94% de inibição na proliferação celular. Con A e PHA, mitógenos utilizados como referência para testes imunológicos, não mostraram atividades tóxicas nas concentrações de 50 até 1 µg/mL para Con A e em nenhuma concentração para PHA. Ambos os venenos das serpentes *Bothrops erythromelas* (*B. erythromelas*) e *Crotalus durissus cascavella* (*C.d. cascavella*) foram citotóxicos acima de 1 µg/mL de concentração (Tabela 3). É importante ressaltar que em todos os ensaios *in vitro* com células esplênicas de camundongos BALB/c, o veneno de *C.d. cascavella* foi utilizado paralelamente para comparar seus resultados com os de *B. erythromelas*.

Tabela 4 - Efeito citotóxico induzido pelos venenos de *Bothrops erythromelas* e *Crotalus durissus cascavella*. Ensaio realizado com timidina tritiada em culturas *in vitro* de esplenócitos de camundongos BALB/c na presença dos venenos de *Bothrops erythromelas* e *Crotalus durissus cascavella*, Con A, PHA e saponina (controle positivo). Células não estimuladas foram utilizadas como controle negativo.

COMPOSTOS	CONCENTRAÇÕES (µg/mL)					
	100	50	25	10	5	1
	Inibição (%)*					
<i>Bothrops erythromelas</i>	62	55	44	35	33	-
<i>Crotalus durissus cascavella</i>	61	56	53	36	31	-
Con A	58	-	-	-	-	-
PHA	-	-	-	-	-	-
Saponina	94	91	90	89	88	88

Nota: * Percentual de inibição de proliferação celular

(-) = Concentrações não-citotóxicas foram definidas como aquelas causadoras da redução de incorporação de timidina tritiada abaixo de 30% em relação aos controles não tratados com os compostos.

5.2 Dosagens de citocinas e de óxido nítrico nos sobrenadantes de culturas de células esplênicas de camundongos BALB/c estimuladas com veneno de *Bothrops erythromelas*

As investigações imunológicas dos esplenócitos estimulados *in vitro* com o veneno de *B. erythromelas* foram comparadas com os esplenócitos estimulados com veneno de *C. d. cascavella*. Devido às suas propriedades imunológicas, os mitógenos ConA e PHA foram utilizados como controle positivo e células não estimuladas (meio + células) foram utilizadas como controle negativo. Nestes ensaios foram utilizados tempos de 24, 48, 72 horas e 6 dias. Os resultados a seguir estão apresentados em pg/ml \pm erro padrão.

5.2.1 Avaliação da produção de IFN- γ

Em 24 horas, 100 μ g/mL de ConA (2149 ± 311), 1 μ g/mL veneno de *B. erythromelas* (1422 ± 480 e 1214 ± 380) e 1 μ g/mL de *C. d. cascavella* (1234 ± 348) induziram isoladamente, maior e significativa produção de IFN- γ ($p \leq 0,05$). Em 48 horas, apenas 1 μ g/mL de *C. d. cascavella* (1374 ± 288) apresentou valores estatisticamente significativos em relação ao controle ($p \leq 0,05$). O melhor tempo de produção de IFN- γ para todos os estímulos, *in vitro*, foi de 72 horas (Figura 4A-E). Neste tempo, observamos que tanto *B. erythromelas* como *C. d. cascavella*, ambos na concentração de 100 μ g/mL apresentaram valores máximos (Figura 4D-E). Finalmente, após seis dias de ensaio, apenas ConA ($6,032 \pm 2,545$) e *C. d. cascavella* (3090 ± 601), a 100 μ g/mL apresentaram produção significativa de IFN- γ ($p \leq 0,05$). Conforme mostrado na Figura 4, os níveis de IFN- γ em sobrenadantes de culturas apresentaram valores máximos em 72 horas. Assim, 72 horas foi o tempo escolhido para avaliar IL-2, IL-10, IL-6 e o óxido nítrico.

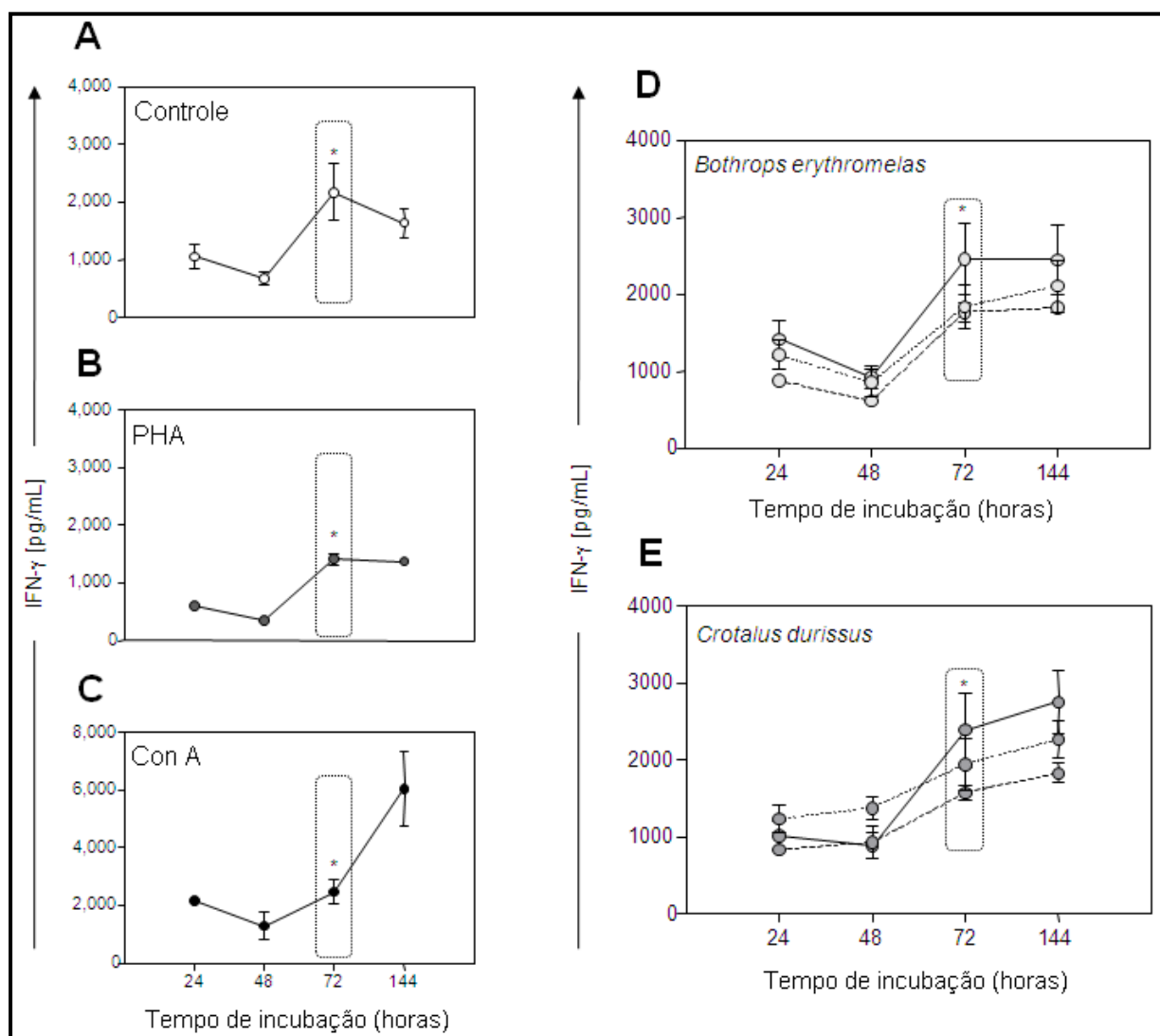


Figura 4. Perfil da produção de IFN- γ por esplenócitos de camundongos BALB/c estimulados *in vitro* com veneno de serpente.

Nota: Os esplenócitos foram incubados em diferentes condições experimentais, incluindo: **A)** ausência de estímulo exógeno – culturas controle (O); **B)** presença de PHA (●); **C)** presença de ConA (●); **D)** em diferentes concentrações (— 100 μ g/mL, --- 10 μ g/mL e 1 μ g/mL) dos venenos de *B. erythromelas* (O) ou **E)** *C. d. durissus* (●). Os resultados estão expressos como média dos níveis de IFN- γ (pg/mL) \pm erro padrão. * significativamente estatístico; $p < 0,05$.

5.2.2 Avaliação da produção de IL-2, IL-10 e de óxido nítrico

A produção de IL-2 não foi significativa em nenhum tempo avaliado mediante estímulo com veneno. Somente ConA induziu de modo significativo a produção de IL-2 em 24, 48 e 72 horas (628 ± 42 , 768 ± 13 , 151 ± 1.9 e $p < 0.05$, respectivamente) (dados não mostrados). O mesmo resultado foi apresentado para a produção de IL-10 e NO em 72 horas de ensaio (Figura 5B e C). IL-10

foi detectada em esplenócitos estimulados com veneno de *B. erythromelas* (concentrações de 100 e 10 $\mu\text{g/mL}$) e veneno de *C. d. cascavella* (1 $\mu\text{g/mL}$) quando comparada com o controle (Figura 5B). Níveis significativos ($p \leq 0.05$) de NO foi somente observado mediante estímulo com veneno de *B. erythromelas* na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ em relação ao controle, em ensaios de 72 horas (Figura 5C).

Além disso, observamos uma dicotomia na síntese de NO e IL-10 as 72 horas de ensaio, embora não houvesse diferenças entre estímulos com venenos em relação à produção de IFN- γ (Figura 5A). Quando aumentamos as doses do veneno de *B. erythromelas* ocorreu um aumento gradual na produção de IL-10 e uma diminuição da liberação de NO (Figura 5B e C). Por outro lado, quando aumentamos a concentração do veneno de *C. d. cascavella* o efeito contrário foi observado, ou seja, o aumento induziu menor produção de IL-10 e maior liberação de NO (Figura 5B e C). Essas observações são importantes para a compreensão de diferenças moleculares e mecanismos de sinalização dos venenos em esplenócitos de camundongos.

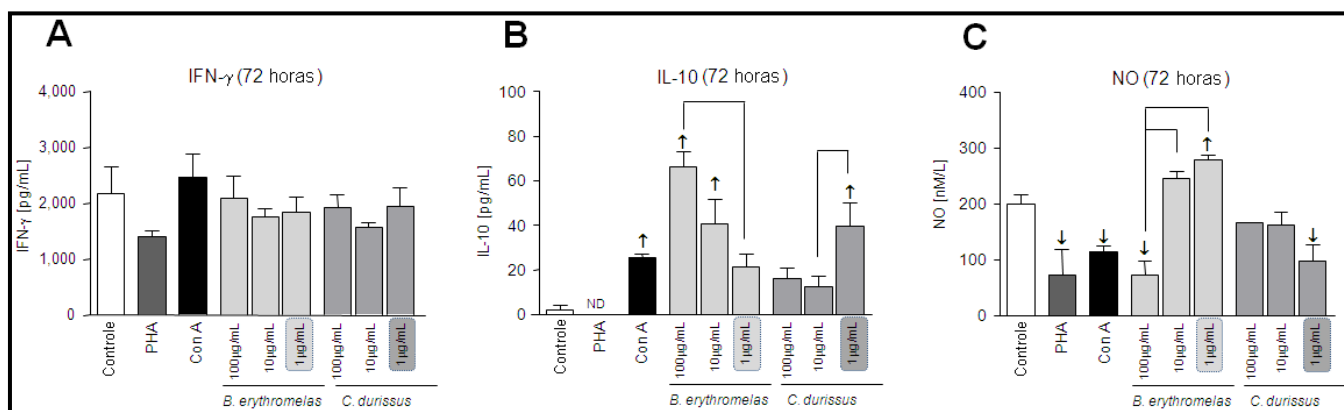


Figura 5: Análise comparativa na produção de IFN- γ , NO e IL-10 por esplenócitos de camundongos BALB/c após 72 horas de estímulo *in vitro* com veneno de serpente. Os esplenócitos foram incubados em diferentes condições experimentais, incluindo: ausência de estímulo exógeno – culturas controle (\square); na presença de PHA (\blacksquare); na presença de ConA (\blacksquare); na presença de diferentes concentrações (100 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ and 1 $\mu\text{g/mL}$) dos venenos de *B. erythromelas* (\square) ou *C. durissus* (\blacksquare). Os resultados estão expressos como média dos níveis de IFN- γ , NO e IL-10 (pg/mL) \pm erro padrão. Diferenças significativas com $p < 0.05$ quando comparados a culturas controle são detectadas por setas (\uparrow / \downarrow) e por linhas de ligação para comparação intra-grupo. Retângulos tracejados destacam a concentração do veneno (1 $\mu\text{g/mL}$) que induziu o perfil dicotômico entre *B. erythromelas* (pró-inflamatório) e *C. durissus* (regulatório). ND = não realizado. Barras horizontais representam a média de quatro experimentos independentes por grupo.

5.2.3 Análise da razão IFN- γ / IL-10 entre venenos das serpentes *Bothrops erythromelas* e *Crotalus durissus cascavella*

Um desequilíbrio na relação entre os eventos pró-inflamatórios e anti-inflamatório é possível. Para investigar essa afirmativa, a razão IFN- γ /IL-10 foi avaliada em 72 horas de cultura *in vitro*. A Figura 6 mostra que não foi observada diferença significativa nesta razão. Entretanto, altas doses do veneno de *B. erythromelas* (100 μ g/mL) foram capazes de promover um efeito imunorregulatório, caracterizado pela relação inversa na síntese de IFN- γ e IL10.

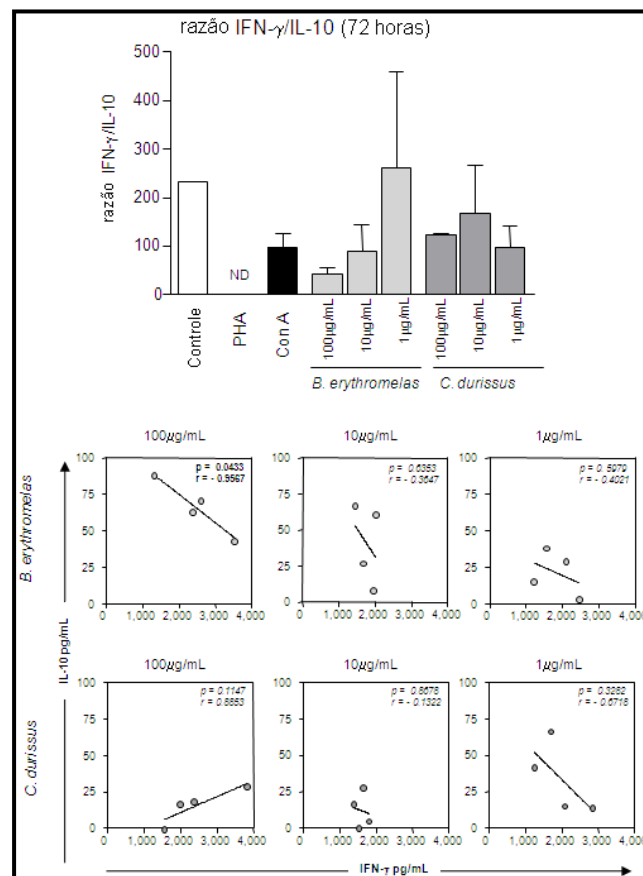


Figura 6. Perfil pró-inflamatório/regulatório em esplenócitos de camundongos BALB/C após 72 horas de estímulo *in vitro* com veneno de serpente. Painel superior representa a razão IFN- γ /IL-10, considerando condições experimentais distintas, tais como: ausência de estímulos exógenos - Controle (\square), presença de ConA (\blacksquare); presença de concentrações distintas (100 μ g/mL, 10 μ g/mL e 1 μ g/mL) dos venenos de *B. erythromelas* (\square) ou de *C. durissus cascavella* (\blacksquare). Os resultados são expressos em média da razão IFN- γ / IL-10 \pm erro padrão. Os painéis de baixo representam análise de correlação entre IFN- γ (pg / mL) e IL-10 (pg / mL) após estímulo *in vitro* com veneno de *B. erythromelas* (\circ) ou *C. durissus cascavella* (\bullet) em concentrações distintas (100 μ g/mL, 10 μ g/mL e 1 μ g/mL). O índice de correlação (valores de r e p) são apresentados na figura. Valores significativos considerando-se de p <0,05. Barras horizontais representam a média de quatro experimentos independentes por grupo.

5.3 Perfil de células viáveis indicou maior percentual de necrose induzida pelo veneno de *Bothrops erythromelas*

Paralelo a análise de citotoxicidade, possíveis danos celulares induzidos por venenos de serpentes em esplenócitos de camundongos foram investigados. Para tal finalidade, análises de apoptose, apoptose tardia e necrose para indicar a indução de morte celular e danos promovidos por ambos os venenos foram realizados. Células na ausência de estímulos exógenos foram utilizadas como controle. A Figura 7A e B mostram a viabilidade de esplenócitos de camundongos BALB/c após 24 horas de estímulos *in vitro* com veneno. A análise dos dados indicou que *B. erythromelas* (100, 10 e 1 µg / mL) induziu maior percentual de células em apoptose e necrose tardia (a 100 e 10 µg/mL) (Figura 7C e D). Por outro lado, *C. d. cascavella* mostrou maior indução da necrose na concentração 1µg/mL, (Figura 7A). A comparação entre os venenos também mostrou um maior percentual de células em apoptose tardia induzida por *B. erythromelas* (a 1 µg/mL) em relação ao controle e *C. d. cascavella* (Figura 7B).

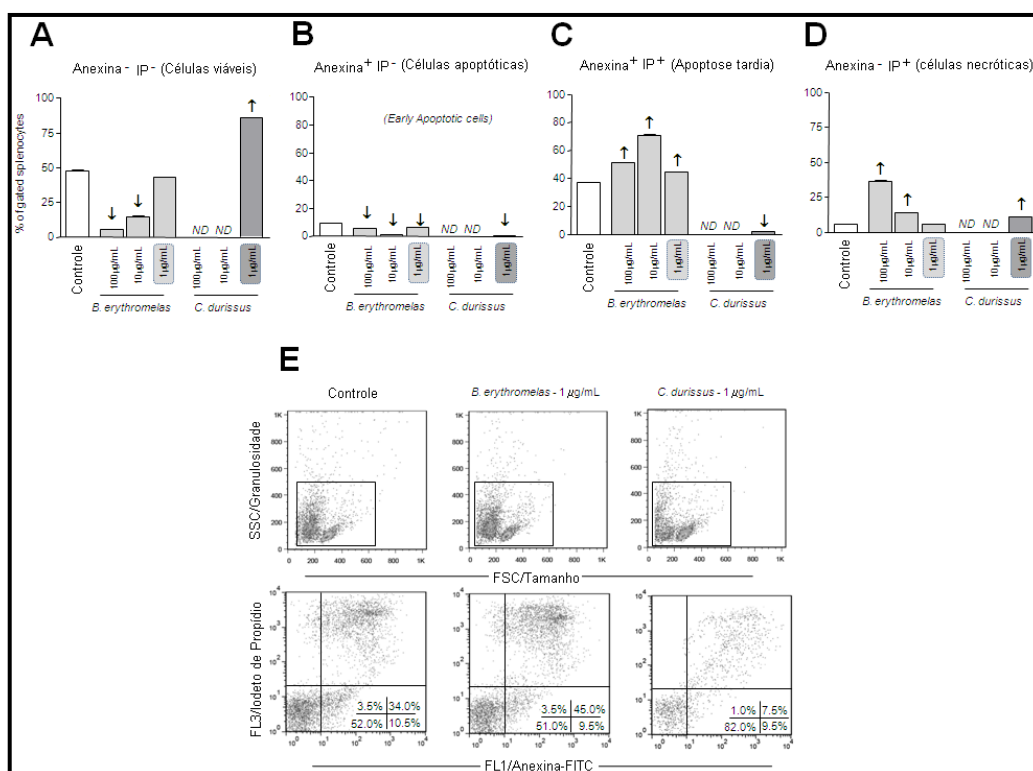


Figura 7. Viabilidade celular em esplenócitos de camundongos BALB/C após 24 horas de estímulo *in vitro* com veneno de serpente. Painel superior representa o estado de viabilidade celular, considerando as condições experimentais distintas, tais como: ausência de estímulos exógenos – Controle (□) e na presença de concentrações distintas de venenos (100 µg/mL, 10 µg/mL e 1 µg/mL) de *B. erythromelas* (▨) ou *C. durissus cascavella* (■). Os resultados são expressos em porcentagem média de células viáveis (Anexina⁻ PI⁻), no início de células em apoptose (Anexina⁺ PI⁻), no final das células apoptóticas (PI⁺ Anexina⁺) e células mortas (Anexina⁺ PI⁺) ± erro padrão. Os painéis de baixo representam distribuições de fenótipos celulares destacando a porcentagem de células viáveis e em apoptose tardia. Diferenças significativas em $p < 0,05$ em relação ao controle são destacados por setas (↓ ↑).

5.4 Caracterização da população de estudo

5.4.1 Pacientes do Centro de Toxicologia do Hospital da Restauração (HR) de Recife, Pernambuco (CEATOX-HR-PE)

Foram analisados 72 casos de acidentes ofídicos, no período de junho de 2007 a junho de 2008. Os casos atendidos referem-se a pacientes de aproximadamente 42 municípios, para os quais, o HR é referência neste tipo de acometimento. Outrossim, o soro antiofídico é distribuído apenas para Recife, Caruaru e Petrolina, no Estado de Pernambuco, este fato reforça (ou corrobora com) uma maior procura dos pacientes pelo HR.

Do total de casos, 69 (95,8%) receberam alta hospitalar, 01 (1,38%) foi à óbito e 01 (1,38%) foi transferido para outra unidade. Apenas 01 paciente

(1,38%) recebeu alta por atendimento telefônico, fato ocorrido por uma solicitação feita pelo Hospital Regional do Agreste (HRA), em Caruaru. Neste caso, os atendentes do HRA solicitaram orientação para realização de procedimentos e tratamento ao staff do CEATOX-HR.

Do total de casos, 50 (69,44%) foram notificados como acidente crotálico e 22 (30,55%) como botrópico. Foram notificados 54 casos para o sexo masculino (75%) e 18 (25%) para o feminino.

O grau de instrução não foi informada em 59,72% dos casos. Entre os demais 23,6% (17 casos) tinham primeiro grau incompleto, 8,33% (06) ignorados, 5,55% (04 casos) analfabetos, 1,38% (01) primeiro grau completo e 1,38% (01) segundo grau completo. A faixa etária mais acometida pelos acidentes ofídicos foi entre 01 e 10 anos, com 14 casos (19,4%), seguida pelas outras faixas: 11-20/31-40 anos com 11 (15,3%) para cada faixa, 21-30/41-50 anos com 09 (12,5%) cada, 61-70 anos com 08 (11,1%), 51-60 anos com 07 (9,72%), e apenas 03 casos ocorreram em pessoas com mais de 70 anos.

Analisando o tempo decorrido, em horas, entre o acidente e a admissão hospitalar, 15 pacientes (21%) chegaram a unidade hospitalar em até 3 horas após o acidente, 19 (27%) chegaram entre 3 e 6 horas e 34 (48%) chegaram após 6 horas (Figura 8). Em 3 casos (4%) não foi informado o tempo decorrido na ficha de atendimento.

O maior número de acidentes por acidente botrópico foi com pacientes da forma moderada, uma vez que o número de ampolas utilizadas para o tratamento com soro antiofídico foi de oito. O mesmo perfil foi observado para os acidentes crotálicos, ou seja, acidentes moderados, tratados com 10 ampolas.

A prevalência dos acidentes, em relação ao local do evento mostrou que 34 casos ocorreram na própria residência. O ambiente de trabalho representou 18 casos (25%), ambiente externo 04 (5,5%), trajeto de trabalho 02 (2,7%), em 14 (19,4%) não foram informados os locais de ocorrência. A zona de maior ocorrência foi a rural, com 55 casos (76,4%), na zona urbana ocorreram 13 casos (18,05%).

Em 42 municípios de Pernambuco foram notificados casos de acidentes ofídicos. O maior número de casos ocorreu no município de Jaboatão dos Guararapes com 07 casos (9,72%), seguido pelos municípios de Igarassú com

06 (8,3%), Brejo da Madre de Deus com 05 (7%) e os municípios de São Lourenço da Mata e Ipojuca com 03 (4,1%) cada. Um caso foi proveniente do município de Murici (Alagoas). Em 02 casos não foi informado o município de ocorrência. Os demais municípios apresentaram 01 ou 02 casos representados na tabela 4. Os municípios de Água Preta, Águas Belas, Amaraji, Jacuipe, Camaragibe, Carpina, Caruaru, Casinhas, Catende, Congo, Floresta, Gameleira, Gravatá, Iputinga, Itamaracá, Jataúba, Moreno, Palmares, Pombos, São Bento do Uma, São Caetano, Serra Talhada, Surubim, Tabira, Toritama, Umbuzeiro, Vertentes e Vitória apresentaram 1 caso em cada. E os municípios de Belo Jardim, Cabo, Cortês, Itapissuma, Paudalho, Paulista e Pesqueira apresentaram 2 casos.

Em relação à sazonalidade, houve um pico de acidentes no mês de agosto de 2007 e março de 2008 com 10 casos (13,8%), seguido pelos meses de abril de 2008 com 09 (12,5%), maio e junho de 2008 com 08 (11,1%). A menor incidência foi registrada no mês de outubro de 2007 com apenas 01 caso (1,38%).

Dentre os 22 acidentes botrópicos, ocorridos no período estudado, as manifestações clínicas mais freqüentes foram edema (63%), dor (45%) e gengivorragia (18%). Apenas em um caso (4,5%) houve a presença de bolhas. Do total de acidentes ocorridos, apenas 02 (9,1%) permaneceram assintomáticos. As alterações laboratoriais mais freqüentes nos acidentes por jararaca foram o tempo de coagulação prolongado (50%), tempo de sangria aumentado (25%) e aumento da creatina quinase (20%).

Em relação aos 50 casos de acidentes crotálicos, as manifestações clínicas mais freqüentes foram ptose palpebral (78,2%), visão turva (67,3%), mialgia (37%), edema (34,7%). Apenas um caso (2,17%) foi a óbito e 04 (8,7%) permaneceram assintomáticos. A causa do óbito foi insuficiência renal aguda. Os casos assintomáticos referem-se a indivíduos que não apresentaram sinais e sintomas referentes a esse tipo de envenenamento. Quanto aos parâmetros laboratoriais avaliados que mais sofreram alterações, destacaram-se creatina quinase aumentada (66%), desidrogenase láctica aumentada (32%) e tempo de coagulação prolongado (32%).

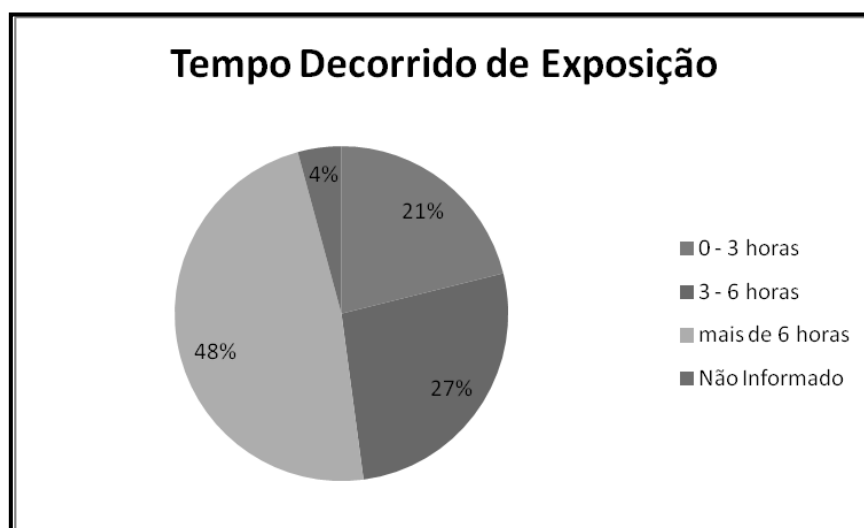


Figura 8. Distribuição dos acidentes ofídicos atendidos pelo CEATOX – HR no período de junho de 2007 a junho de 2008, em relação ao tempo decorrido do acidente e admissão hospitalar.

5.4.2 Pacientes do Centro de Toxicologia do Hospital de Urgência e Emergência de Campina Grande, Paraíba (CEATOX-HUECG-PB)

Os pacientes do HUECG-PB foram avaliados considerando-se as mesmas variáveis dos pacientes do CEATOX-HR-PE.

Os resultados mostraram que as observações clínicas e exames laboratoriais confirmaram envenenamento botrópico em 16 pacientes avaliados. Nove pacientes foram classificados como envenenamento leve, quatro como envenenamento moderado e 3 como envenenamento grave. A contagem de plaquetas foi abaixo dos valores de referência em apenas três pacientes, tendo dois deles apresentado envenenamento moderado e um grave.

Todos os pacientes apresentaram o tempo de coagulação alterado, estando aumentado 12 horas após o tratamento. Esse comportamento foi diferente para dois pacientes, uma vez que os mesmos apresentaram incoagulabilidade após o tratamento. No entanto, o tempo de sangramento não foi alterado em nenhum paciente.

O quadro 1 apresenta os aspectos clínicos e epidemiológicos dos pacientes do presente estudo.

Os resultados mostram que a média de idade dos pacientes foi 46, sendo o sexo masculino (93,75%) o mais acometido por esse tipo de

envenenamento, além todos os pacientes serem provenientes de área rural. Os dados demonstraram que os acidentes ofídicos ocorreram de forma irregular de junho a dezembro e a região anatômica do corpo mais acometida foi o pé (56,25%). A Tabela 5 mostra também que a maioria dos acidentes botrópicos foram classificados como envenenamento leve (56,25%).

Paciente	Idade	Sexo	Tipo de Envenenamento	Região da picada	Mês de Ocorrência	Manifestação Local	Manifestação Sistêmica
01	86	Masculino	Leve	Mão	Junho	Edema, dor	Vômito
03	25	Masculino	Moderado	Pé	Julho	Edema, dor, equimose	N.I.
04	22	Masculino	Grave	Pé	Julho	Edema, dor	gengivorragia
05	62	Masculino	Leve	Dedo do pé	Julho	Edema, dor, equimose	Cefaléia
13	60	Masculino	Leve	Dedo da mão	Julho	Edema, dor	N. I.
14	62	Masculino	Leve	Dedo da mão	Julho	Edema	Enjoo
15	60	Masculino	Leve	Pé	Agosto	Edema, dor	N. I.
16	60	Masculino	Moderado	Pé	Agosto	Edema, dor, Parestesia	cefaléia, vômito
17	22	Masculino	Leve	Pé	Agosto	Edema, dor, Parestesia	vômito
18	26	Masculino	Grave	Pé	Agosto	Edema, dor, Equimose, Parestesia	Gengivorragia, vômito, diarreia
20	32	Masculino	Leve	Perna	Agosto	Edema, dor, Parestesia	NO
23	58	Masculino	Moderado	N.I.	Agosto	Edema, dor	N. I.
24	28	Masculino	Leve	pé	Setembro	Dor, Parestesia	N. I.
26	63	Masculino	Moderado	Dedo do pé	Setembro	Dor	NO
29	65	Masculino	Leve	Pé	Setembro	Edema, Parestesia	NO
35	15	Feminino	Grave	Pé	Novembro	Dor, Equimose	gengivorragia, cefaléia

Quadro 1 – Características clínicas e epidemiológicas do grupo de estudo PB.

Nota: NI = não informado; n = 16

Vale ressaltar que os pacientes receberam cuidados hospitalares até 3 horas após o envenenamento (56,25%). Mais prevalente nesses pacientes

foram as manifestações clínicas da dor e edema (81,25% para ambos), alterações sistêmicas (25%), além da observação de hemorragia e dor de cabeça. A Figura 9 destaca algumas manifestações (edema e gengivorragia) que podem ser observadas no envenenamento botrópico.



Figura 9. Manifestações clínicas características do envenenamento botrópico. A= edema e B=gengivorragia.

5.5 Avaliação da resposta imune humoral em pacientes do Centro de Toxicologia do Hospital de Urgência e Emergência de Campina Grande, Paraíba (CEATOX-HUECG-PB), envenenados pela serpente *Bothrops erythromelas*

5.5.1 Avaliação do padrão antigênico reconhecido por pacientes envenenados pela serpente *Bothrops erythromelas*

Para determinar se os anticorpos dos pacientes reagiriam aos antígenos do veneno mostrando um padrão de produção de IgM, *pools* de soro de cada grupo do estudo foram obtidos antes do tratamento. Em todos os grupos, a principal proteína detectada foi de 38kDa. Essa mesma proteína foi observada ao avaliar o padrão de anticorpos IgM reconhecido pelos mesmos grupos de pacientes 24 horas após tratamento soroterápico (Figura 10). Os resultados mostraram que essa proteína de 38 kDa não foi neutralizada pelo soro

antibotrópico que é comercializado no Brasil, uma vez que o mesmo não inclui o veneno da espécie *B. erythromelas* na produção do soro.

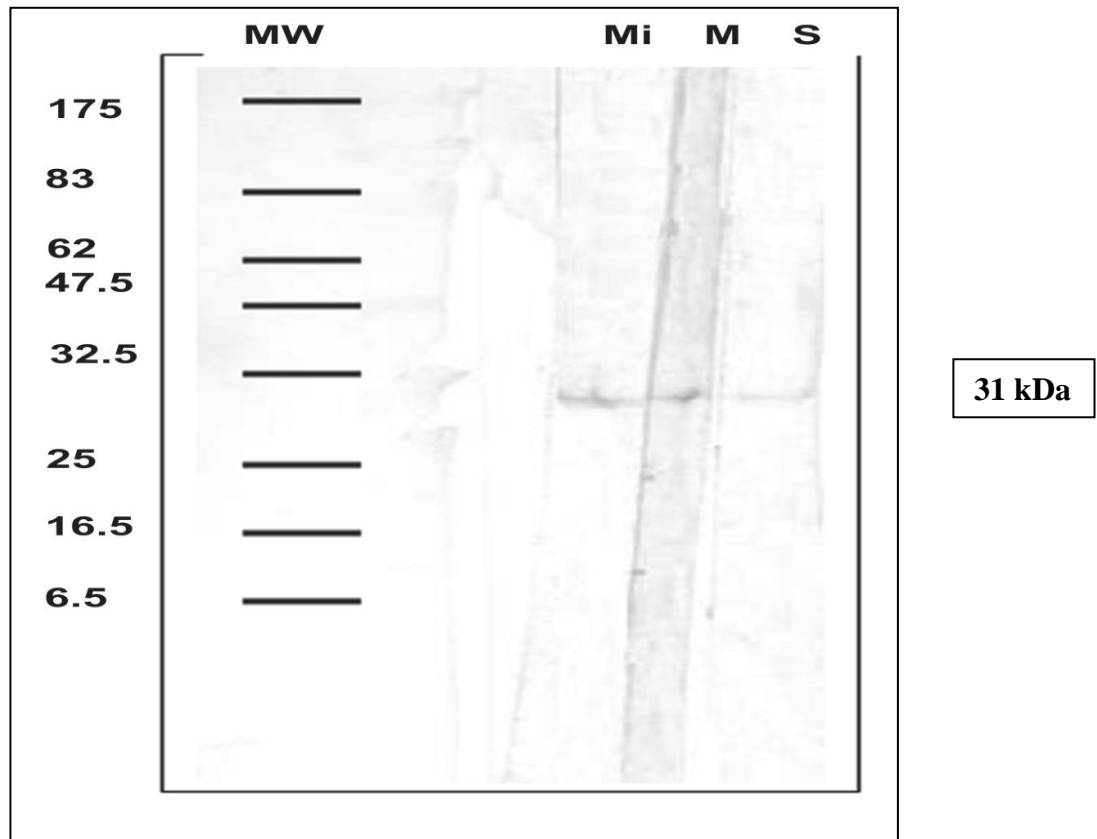


Figura 10. Western blot representativo do padrão antigênico reconhecido pelo “pool” de soro de pacientes envenenados por *Bothrops erythromelas* 24 horas após tratamento soroterápico. 25 µg de veneno de *Bothrops erythromelas* foram diluídos 1:100, submetidos a eletroforese em condições desnaturantes, transferidos para membrana de nitrocelulose que foi bloqueada com 5% de leite mais 0,05% de Tween 20. A membrana foi incubada na presença dos “pools” de soros durante a noite a 4°C e, posteriormente, submetida a uma sonda enzimática (anti-IgM conjugada a peroxidase). Envenenamentos leve (Mi), moderado (M) e grave (S).

5.6 Quantificação das citocinas IL-10 e IFN- γ nos sobrenadantes das culturas de sangue periférico dos pacientes envenenados por *Bothrops erythromelas*

Os níveis de IL-10 e IFN- γ foram determinados através do ELISA de captura. Os sobrenadantes de cultura dos pacientes leves foram analisados durante o envenenamento (0h) e em dois momentos após a soroterapia (12h e 24h). Já os pacientes com envenenamento moderado + grave tiveram seus

sobrenadantes avaliados em 0h e 12 horas após o tratamento soroterápico. Não foi detectada produção de IL-10 (dados não mostrados).

Quanto a produção de IFN- γ , a Figura 11 mostra que, em T0h, na presença dos mitógenos e de diferentes concentrações do veneno botrópico, os pacientes com diferentes graus de envenenamento produziram menores concentrações da citocina em relação ao grupo controle, com diferença estatística significativa. Neste tempo, embora os pacientes com envenenamento moderado + grave tenham apresentado uma menor produção da citocina quando estimulados por PHA, não houve diferença significativa em relação ao grupo controle.

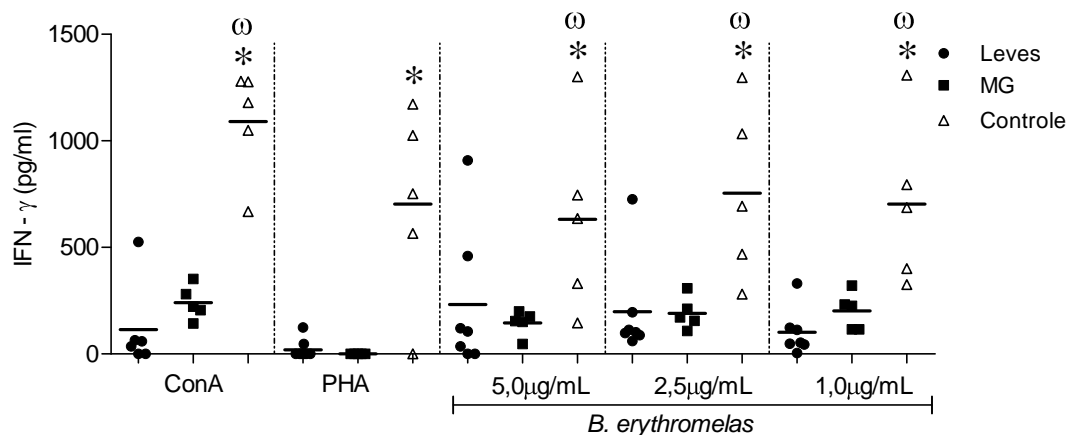


Figura 11. Produção de IFN- γ em pacientes leve e moderado + grave envenenados e grupo controle em antes da soroterapia (T0h) em resposta a ConA (2,5 μ g/ml), PHA (5 μ g/ml) e veneno botrópico em diferentes concentrações (5 μ g/ml, 2,5 μ g/ml e 1 μ g/ml). Os asteriscos e a letra grega ω representam os níveis significativos da citocina observados no grupo controle em relação aos grupos leve e moderado, respectivamente. As barras horizontais representam a média dos grupos.

Doze horas após a soroterapia, os pacientes de ambos os grupos apresentaram níveis significativamente menores de IFN- γ em relação ao grupo controle. Em contraste, não houve diferença estatística na produção da citocina entre os grupos de pacientes e controle sob estímulo de PHA. Resultado estatístico semelhante foi observado ao comparar os pacientes com envenenamento moderado + grave e indivíduos não-envenenados sob estímulo do Veneno em 5,0 μ g/mL.

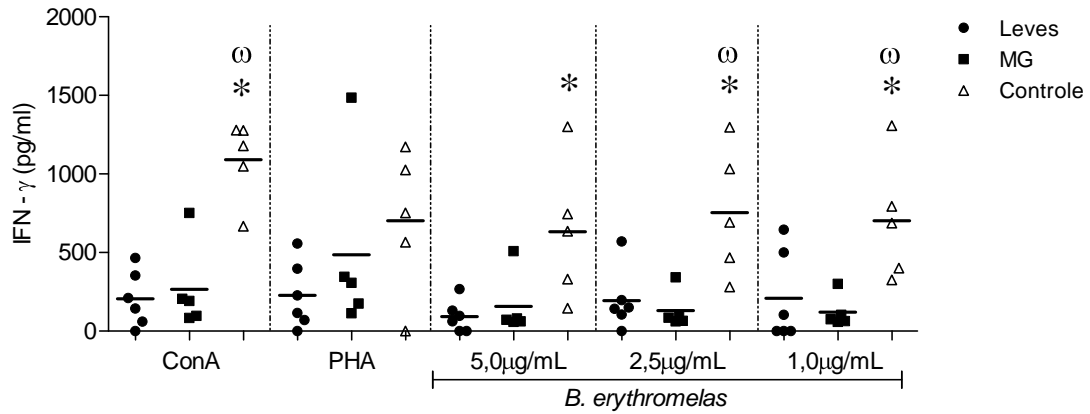


Figura 12. Produção de IFN- γ em pacientes leve e moderado + grave envenenados e grupo controle 12 horas após soroterapia (T12h) em resposta a ConA (2,5 μ g/ml), PHA (5 μ g/ml) e veneno botrópico em diferentes concentrações (5 μ g/ml, 2,5 μ g/ml e 1 μ g/ml). Os asteriscos e a letra grega ω representam os níveis significativos da citocina observados no grupo controle em relação aos grupos leve e moderado, respectivamente. As barras horizontais representam a média dos grupos.

Diferente dos tempos anteriores, em 24 horas após o tratamento soroterápico os pacientes leves e com envenenamento moderado + grave tenderam a produzir menores concentrações de IFN- γ em comparação ao grupo controle, embora sem diferença significativa. A menor concentração do Veneno, porém, estimulou significativa produção da citocina no grupo controle em relação aos pacientes leves.

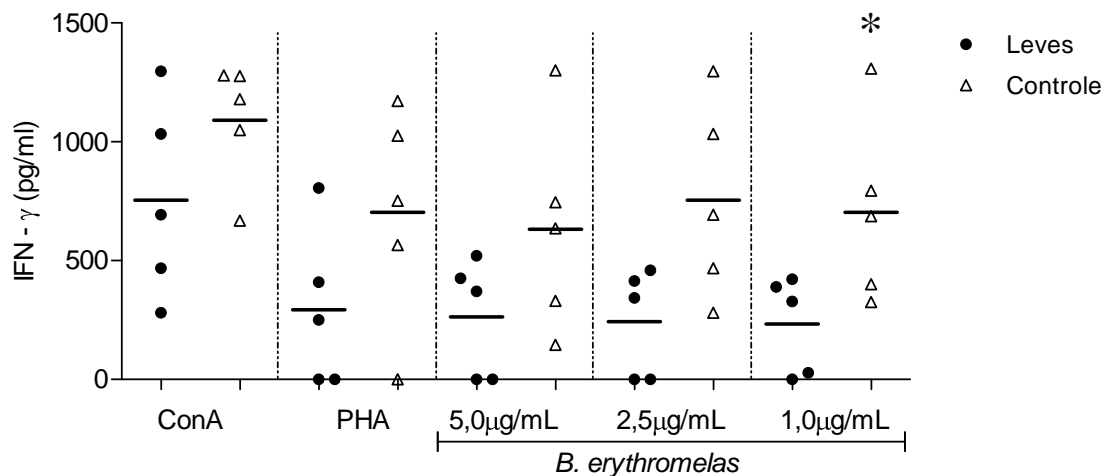


Figura 13. Produção de IFN- γ em pacientes leve e moderado + grave envenenados e grupo controle 24 horas após soroterapia (T24h) em resposta a ConA (2,5 μ g/ml), PHA (5 μ g/ml) e veneno botrópico em diferentes concentrações (5 μ g/ml, 2,5 μ g/ml e 1 μ g/ml). Os asteriscos e a letra grega ω representam os níveis significativos da citocina observados no grupo controle em

relação aos grupos leve e moderado, respectivamente. As barras horizontais representam a média dos grupos.

5.7 Avaliação da produção de óxido nítrico nos sobrenadantes das culturas de sangue periférico dos pacientes envenenados por *Bothrops erythromelas*

A produção de óxido de nitrito apresentou-se em altos níveis nos sobrenadantes de culturas de células do sangue dos pacientes envenenados por *B. erythromelas*. Na presença do veneno botrópico, os sobrenadantes das culturas de células do sangue periférico dos pacientes levemente envenenados apresentaram produção significativa de NO em todos os tempos analisados (Figura 14 A-C). Con A e o veneno botrópico nas concentrações de 5 e 1 µg/mL apresentaram os maiores valores de NO em relação ao controle (células sem estímulo) antes do tratamento soroterápico, 12 e 24 horas após tratamento (tempo -T0, T12h e T24h, respectivamente). O estímulo com PHA apresentou resultados significativos em T12 e T24h (Figura 14 B e C) e o veneno botrópico na concentração de 2,5 µg/ml induziu maior produção de NO no T0 e em T24h (Figura 14 A e C). Em 12 e 24 horas de cultura, pacientes acometidos de envenenamento moderado + grave também demonstraram níveis elevados de NO nas culturas de células estimuladas com veneno botrópico nas concentrações de 5 e 1 µg/ml e estimuladas com PHA (Figura 15 A e B). O veneno botrópico na concentração de 2,5 µg/ml e ConA induziram produção maior de NO 24h após tratamento (Figura 15 A). Sobrenadantes de cultura de células do sangue periférico de indivíduos sem acometimento botrópico, mostraram maior liberação de NO induzida por Con A, PHA e venenos botrópicos (5, 2,5 e 1 mg / mL) em relação ao controle (células sem estímulo) (Figura 16).

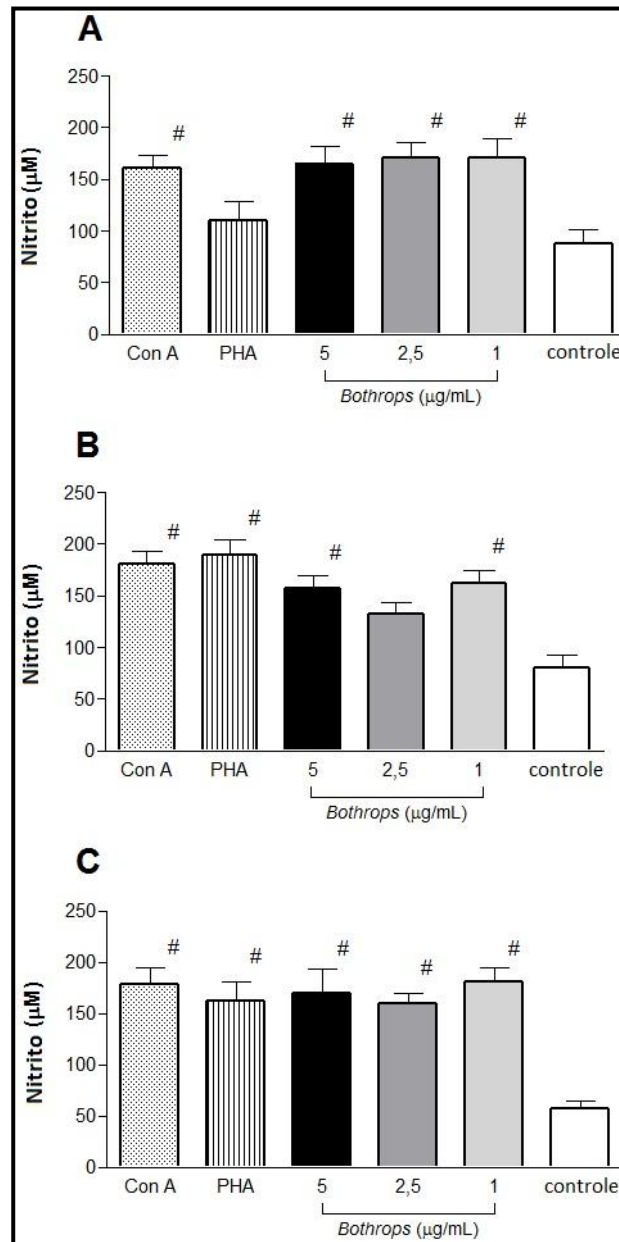


Figura 14. Produção de óxido nítrico induzido por diferentes estímulos em culturas de células de pacientes com envenenamento leve. A, B e C indicam os tempos experimentais T0, T12 e T24h, respectivamente. Con A e venenos botrópicos (a 5 e 1 µg/ml, respectivamente) proporcionaram os maiores valores em relação ao controle em todos os tempos experimentais. PHA induziu resultados estatísticos em T12 e T24h (B e C) e o veneno botrópico (2,5 µg/ml) induziu maior produção de NO no T0 e no T24h (A e C). As barras horizontais representam a média de quatro experimentos independentes. # $p \leq 0.05$.

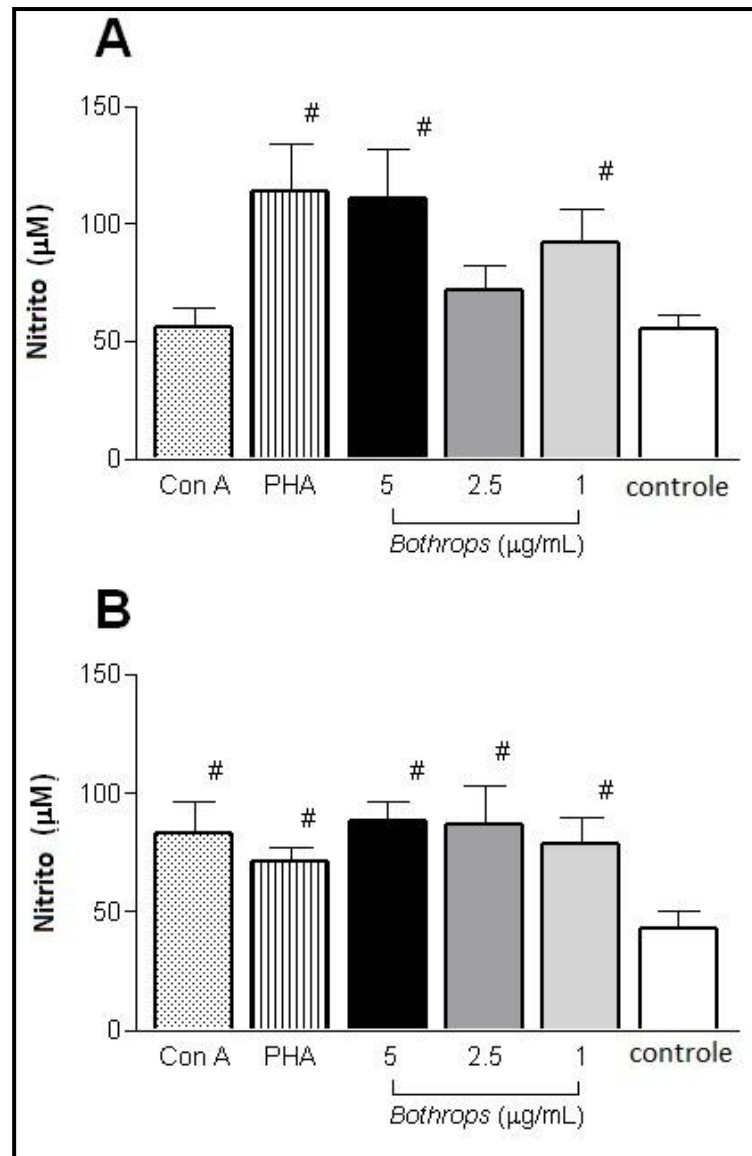


Figura 15. Produção de óxido nítrico induzido por diferentes estímulos em culturas de células de pacientes com envenenamento grave. A e B indicam os tempos experimentais de T12 e T24h, respectivamente. Veneno botrópico (5 e 1 µg/ml) e PHA apresentaram maior indução da liberação de NO em 12 e 24 horas de cultura (A e B). Por outro lado, o veneno botrópico (2,5 µg/mL) e ConA apenas induziu maior produção de NO apenas em 24 horas (A). Barras horizontais representam a média de 4 experimentos independentes. # $p \leq 0.05$.

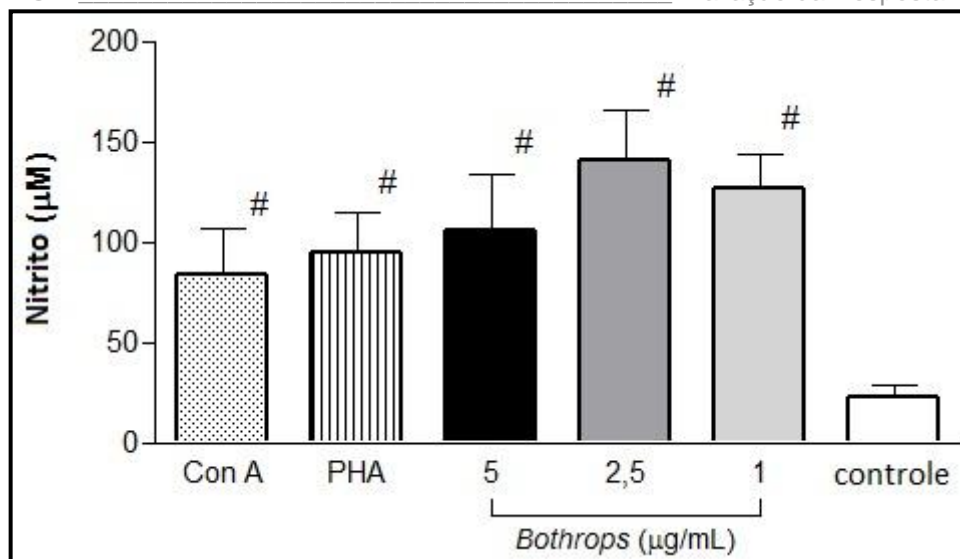


Figura 16. Produção de óxido nítrico induzido por diferentes estímulos em cultura de células de indivíduos saudáveis. Con A, PHA e veneno botrópicos (5, 2,5 e 1 µg/ml) induziu maior liberação de NO em relação ao controle. As barras horizontais representam a média de quatro experimentos independentes. # $P \leq 0,05$.

5.8 Avaliação dos marcadores de superfície em sangue periférico de pacientes envenenados por *Bothrops erythromelas*

A caracterização dos marcadores de superfície celular (CD3, CD4, CD8, CD16, CD25, CD55, CD11b, CD35, CD88, CD32 e CD18) do sangue periférico dos pacientes envenenados por *B. erythromelas* foi realizada antes do tratamento soroterápico, 12 e 24 horas após esse tratamento.

No que se refere à população linfocitária, os marcadores variaram de acordo com a gravidade do envenenamento e com o tempo da administração do tratamento (Figura 17A e B 1 e 2).

O marcador CD3, que caracteriza os linfócitos T, apresentou o seguinte perfil: em T0, pacientes leves apresentavam um percentual inferior aos controles (CT), enquanto os moderados e graves apresentavam um percentual de expressão superior. Após a administração das ampolas de soro antiofídico e avaliação em T12h, foi vista uma queda no percentual dessas células no sangue periférico dos pacientes leves. Isso se reverteu após 24h, voltando para níveis próximos ao T0, enquanto que se nos pacientes moderados e graves observou-se um aumento em T12h, seguindo-se de níveis próximos ao inicial em T24h. Para investigar do que se constituíam esses linfócitos CD3⁺, os marcadores CD8, CD4 e CD25 foram isoladamente avaliados.

Em relação às células T CD8, linfócitos T citotóxicos, foi visto que em T0, pacientes leves apresentavam uma quantidade inferior aos CT e os pacientes moderados + graves uma quantidade superior e significativa em relação aos CT. Em T12h os pacientes leves apresentaram um aumento de desses marcadores no sangue periférico, os pacientes moderados + graves apresentaram uma diminuição. O percentual de ambos os grupos estabilizou-se 24h após o tratamento (Figura 18A).

No que se refere ao percentual de células T CD4 e linfócito T auxiliar na circulação, os pacientes graves + moderados apresentavam valores abaixo dos CT. Valores esses que tendiam a aumentar 12h após o tratamento com soro antiofídico, voltando a diminuir após 24h de tratamento. Já os pacientes leves apresentaram uma diminuição no percentual dessas células 12h após o tratamento com aumento posterior no tempo de 24h.

Em relação a CD25, receptor de IL-2 e associado às células T regulatórias, todos os pacientes apresentavam níveis superior aos controles, sendo a proporção de células T CD25⁺ significativa nos pacientes leves. Essa população de células comportou-se de maneira semelhante ao padrão observado com CD4. Os pacientes leves apresentaram diferenças significativas comparados as controles, em todos os tempos avaliados. Os moderados + graves apresentaram diferença significativa 24h após o tratamento (Figura 19)

Em relação aos linfócitos NK, avaliados através da expressão de CD16, observamos que pacientes leves apresentaram níveis estáveis de linfócitos CD16⁺ no sangue periférico, enquanto os pacientes graves diminuíram seu percentual 24h após o tratamento. É interessante destacar que 24h após o tratamento com soro antiofídico, os marcadores CD3, CD4, CD8 e CD16, tenderam a apresentar valores percentuais próximos entre os grupos de pacientes avaliados (Figura 18B).

O percentual de células CD19⁺, marcador de linfócitos B, também foi avaliado no sangue periférico. O percentual de linfócitos B foi semelhante entre os grupos avaliados e os controles. No que se refere à expressão de CD32, co-receptor do domínio Fc da IgG (FcγRII) a interação desse receptor com o IgG desencadeia várias respostas biológicas e fornece uma ligação entre a resposta imune humoral e celular no sistema imune. Outrossim, CD32 atua como um moduladores da resposta imune, promovendo a diminuição da

produção de anticorpos na presença de IgG. Foi observado que os pacientes leves apresentavam no T0 uma menor e significativa expressão desse co-receptor. Em T12h após a administração do soro antiofídico foi visto um ligeiro aumento da expressão desse co-receptor nesses pacientes, condizendo com a sua recuperação e conseqüente menor de produção de IgG, que inclusive foi significativa em T24h. Já nos pacientes moderados + graves observamos níveis semelhantes ao controle em T0 e uma diminuição lenta na sua expressão após o tratamento (Figura 20).

Em relação aos receptores do sistema complemento (CD11b, CD35, CD55 e CD88), observou-se que os CD11b e CD35 apresentaram um aumento na expressão em T12h, com posterior diminuição T24h (Figura 21A e B). Em relação ao CD88, houve aumento em T24h nos pacientes leves e uma diminuição nos pacientes moderados + graves. Após T24h, os pacientes moderados + graves aumentaram o seu percentual no sangue periférico, enquanto os pacientes leves diminuíram a expressão desse marcador (Figura 22B). Observamos, em relação ao CD55, um aumento em T12h, seguido de diminuição na sua expressão em T24h para todos os pacientes, progredindo para níveis semelhantes em T0 (Figura 22A). Por fim, o CD18 apresentou níveis mais altos de expressão em T0 nos pacientes leves, com tendência a diminuir após tratamento. O contrário foi visto no grupo dos pacientes moderados + graves, uma a expressão aumentada de CD18 após tratamento (Figura 23).

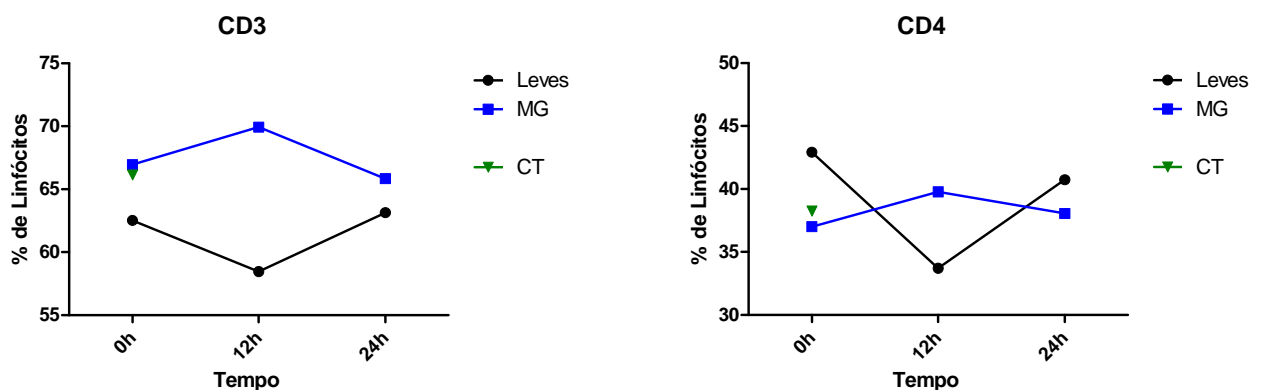


Figura 17. Gráficos representando o percentual de linfócitos CD3⁺ e CD4⁺ em pacientes com envenenamento Leves e Moderados e Graves (MG) em 0h, 12h e 24h após o tratamento.

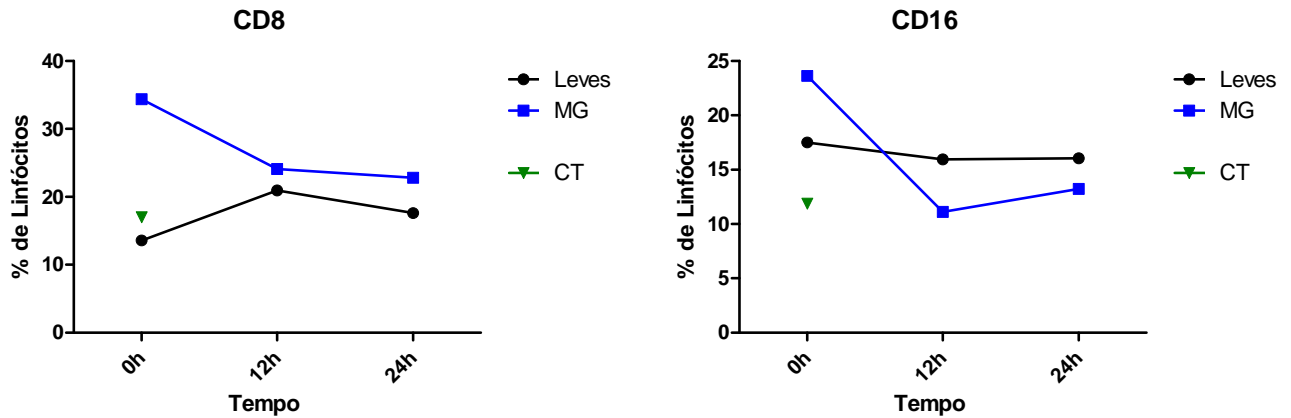


Figura 18. Gráficos representando o percentual de linfócitos CD8⁺ e CD16⁺ em pacientes com envenenamento Leves e Moderados e Graves (MG) em 0h, 12h e 24 após o tratamento.

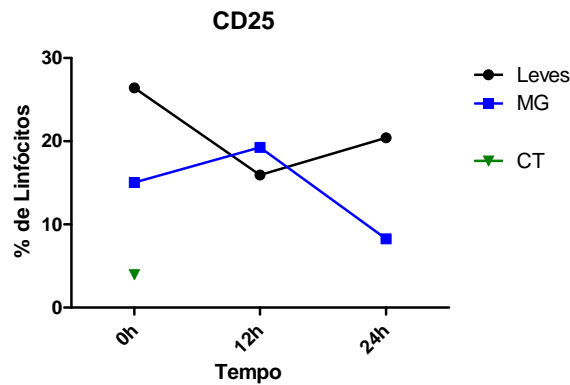


Figura 19. Gráfico representando o percentual de linfócitos CD25⁺ em pacientes com envenenamento Leves e Moderados e Graves(MG) em 0h, 12h e 24 após o tratamento.

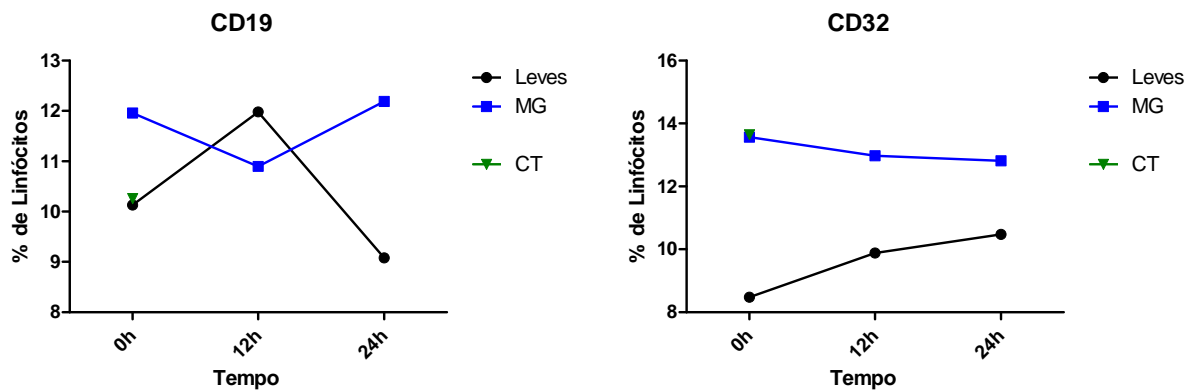


Figura 20. Gráficos representando o percentual de linfócitos CD19⁺ e CD32⁺ em pacientes com envenenamento Leves e Moderados e Graves (MG) em 0h, 12h e 24 após o tratamento.

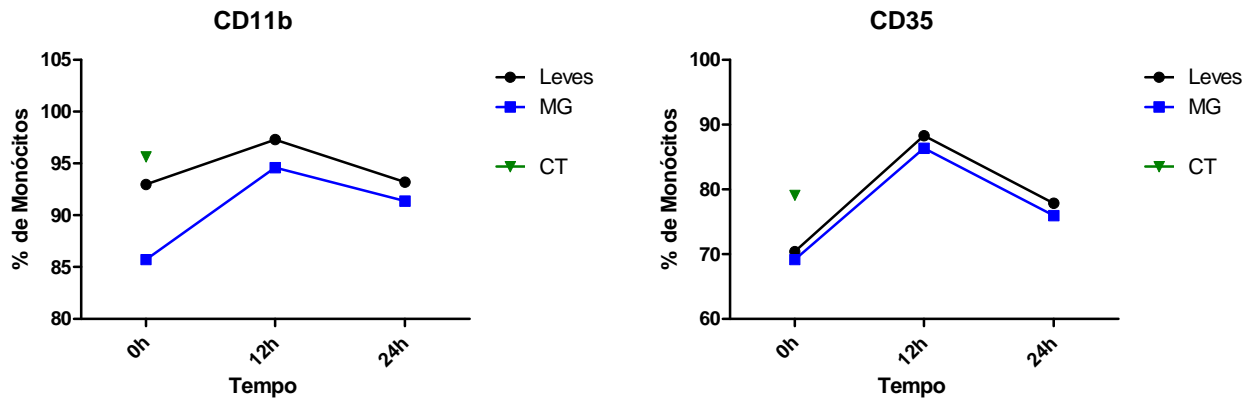


Figura 21. Gráficos representando o percentual de monócitos CD11b⁺ e CD35⁺ em pacientes com envenenamento Leves e Moderados e Graves (MG) em 0h, 12h e 24 após o tratamento.

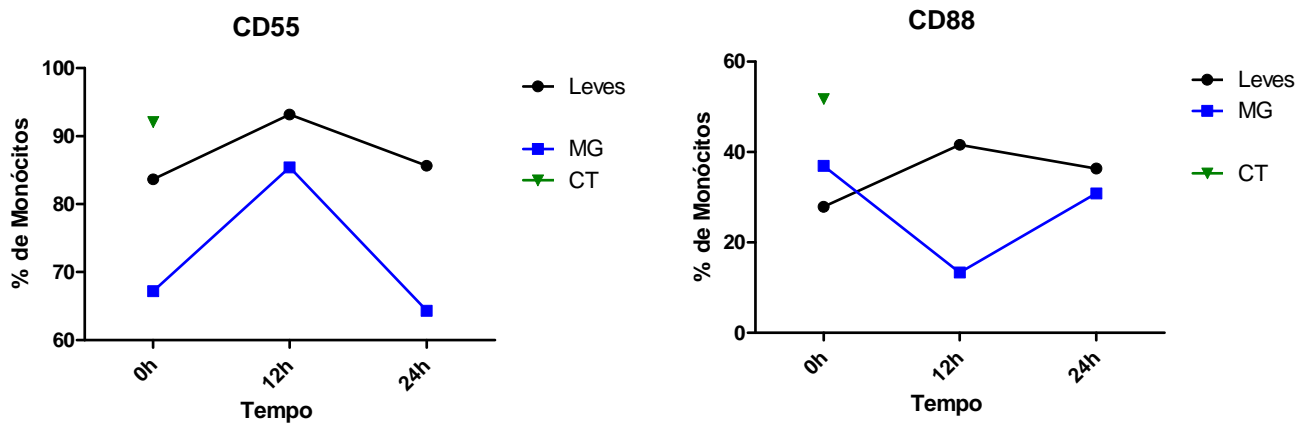


Figura 22. Gráficos representando o percentual de monócitos CD11b⁺ e CD35⁺ em pacientes com envenenamento Leves e Moderados e Graves (MG) em 0h, 12h e 24 após o tratamento.

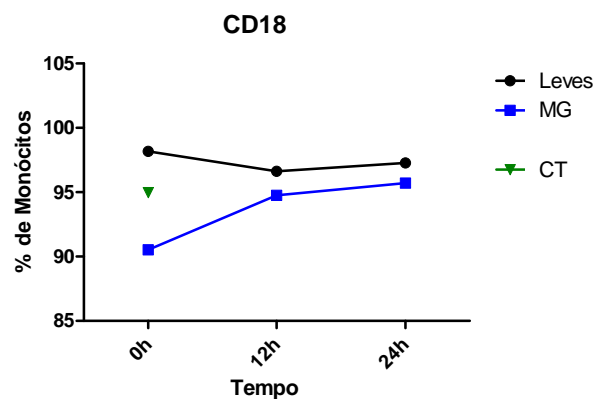


Figura 23. Gráfico representando o percentual de monócitos CD18⁺ em pacientes com envenenamento Leves e Moderados e Graves (MG) em 0h, 12h e 24 após o tratamento.

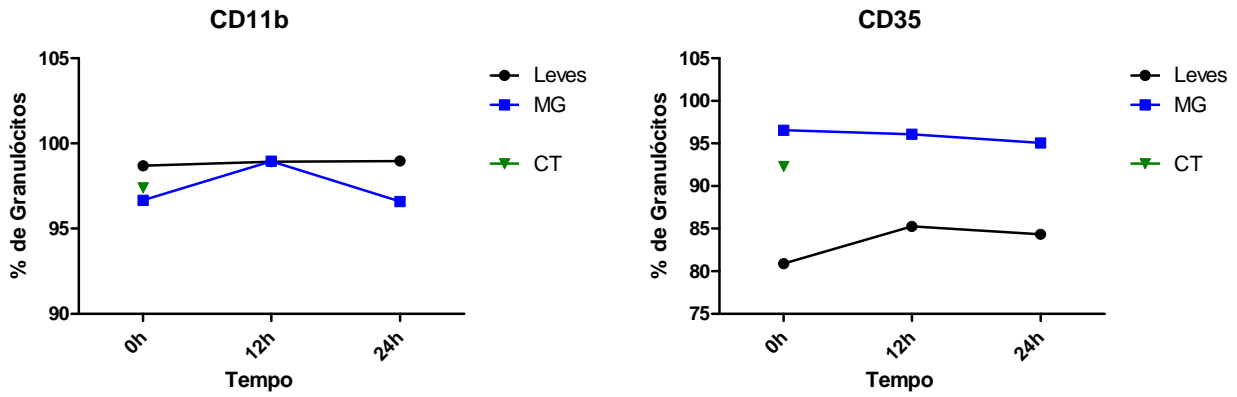


Figura 24. Gráficos representando o percentual de granulócitos CD11b⁺ e CD35⁺ em pacientes com envenenamento Leves e Moderados e Graves (MG) em 0h, 12h e 24 após o tratamento.

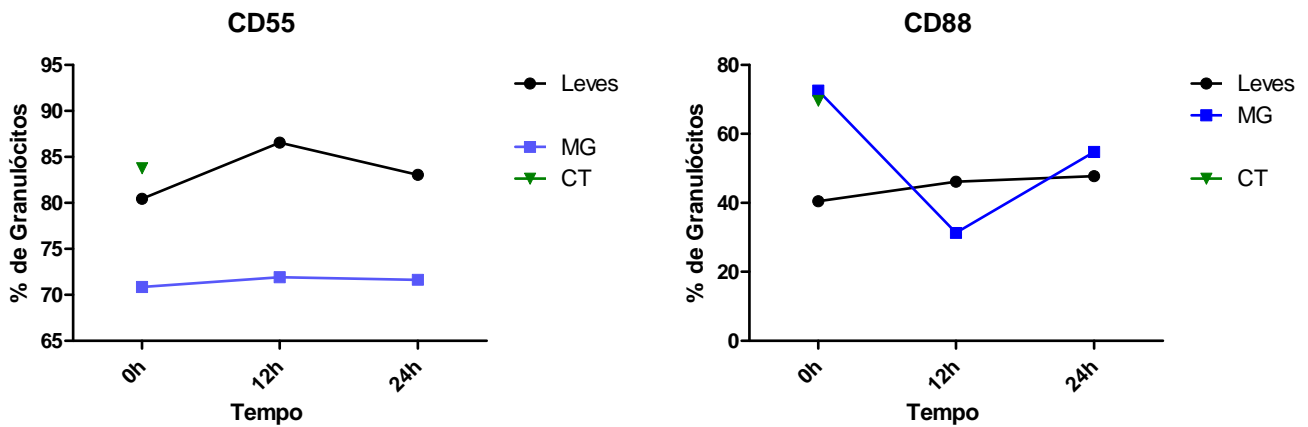


Figura 25. Gráficos representando o percentual de granulócitos CD55⁺ e CD88⁺ em pacientes com envenenamento Leves e Moderados e Graves (MG) em 0h, 12h e 24 após o tratamento.

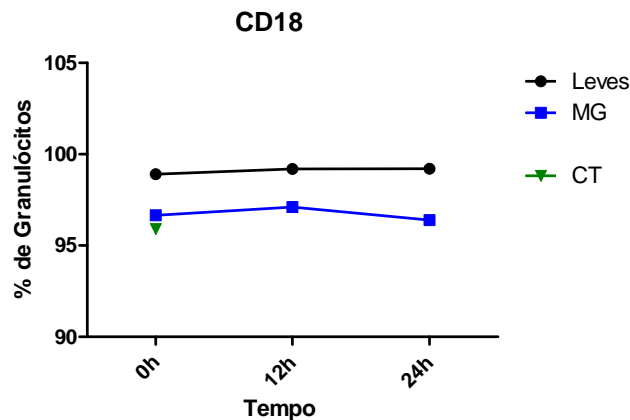


Figura 26. Gráfico representando o percentual de granulócitos CD18⁺ em pacientes com envenenamento Leves e Moderados e Graves (MG) em 0h, 12h e 24 após o tratamento.

5.9 Níveis séricos de citocinas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α e IFN- γ) e quimiocinas (IL-8, Rantes, MIG, MCP-1 e IP-10) de pacientes envenenados por *Bothrops erythromelas*

Os níveis de citocinas e quimiocinas foram analisados em amostras de soro de pacientes com diferentes manifestações clínicas do envenenamento colhidas após a internação, e antes do início do tratamento antiveneno. Tabelas 7 e 8 mostram a concentração média das citocinas / quimiocinas analisadas. Análise de Mann-Whitney foi então realizada, a fim de comparar os níveis de proteínas diferentes entre os indivíduos que sofrem manifestações clínicas leve e moderada + grave. De acordo com os resultados, os níveis de todas as citocinas/quimiocinas analisadas foram estatisticamente semelhantes entre essas manifestações.

Tabela 5- Níveis de citocinas Th1 e Th2 em pacientes com diferentes manifestações clínicas de envenenamento por *B. erythromelas* snake. Valores são mostrados em pg/mL.

Manifestação clínica	IFNg		TNF-A		IL-10		IL-6		IL-4		IL-2	
	Avg	SD	Avg	SD	Avg	SD	Avg	SD	Avg	SD	Avg	SD
Leve	1	1	0.4	0.6	6	13	5	71	0.3	0.6	1	1
Moderado + Grave	1	1	0.7	1	4	1	9	1	1	1	1	1

Avg = média
SD = desvio padrão

Tabela 6 - Níveis de quimiocinas em pacientes com diferentes manifestações clínicas de envenenamento por *B. erythromelas* snake. Valores são mostrados em pg/mL.

Manifestação clínica	IL-8		RANTES		MIG		MCP-1		IP-10	
	Avg	SD	Avg	SD	Avg	SD	Avg	SD	Avg	SD
Leve	119	73	75	17	414	339	5091	1169	13	16
Moderado + Grave	243	238	95	32	718	660	5060	1446	11	10

Avg = média
SD = desvio padrão

6. DISCUSSÃO

Os envenenamento por serpentes constituem um problema de saúde pública, principalmente nas áreas rurais de países tropicais e subtropicais (KASTURIRATNE et al, 2008). No Brasil, vinte mil acidentes por serpentes peçonhentas são relatados a cada ano, sendo aproximadamente 90% deles são causados pela gênero *Bothrops* (BRASIL, 2003). No Nordeste do Brasil, a espécie endêmica é a *Bothrops erythromelas*, localmente conhecida como jararaca-da-seca. Pessoas picadas por espécies desse gênero apresentam manifestações locais e sistêmicas, como edema, dor, equimose, bolhas, mionecrose, sangramento gengival, hematúria, epistaxe, hemorragia sistêmica e infiltração de leucócitos (FLORES, 1993; GUTIÉRREZ, 1995; FARSKY, 1997; ÁVILA-AGUERO, 2001).

A patogênese dos efeitos sistêmicos nos envenenamentos botrópicos é complexa, envolvendo a ação direta dos componentes do veneno nos tecidos e a liberação de vários mediadores endógenos. Embora algumas citocinas e o óxido nítrico estejam implicados no processo patogênico, seus papéis nesse processo têm sido negligenciados. Particularmente relevante tem sido os estudos realizados com o veneno de *Bothrops erythromelas*, pois apesar de ser a espécie de jararaca típica e endêmica, existente na região Nordeste, o mesmo não participa do grupo de venenos utilizados para fabricação do soro anti-botrópico. Dessa forma, o uso desse soro pode ocasionar complicações tais como infecções secundárias e necrose local na pele. Portanto, este trabalho além de chamar a atenção para a forma de avaliação clínica-epidemiológica dos acidentes ofídicos, investigou a resposta imune de vítimas de *B. erythromelas* antes e após o tratamento soroterápico, com particular interesse na identificação de marcadores imunes diferenciais, possivelmente envolvidos no desenvolvimento das manifestações clínicas.

Inicialmente um estudo *in vitro* foi realizado em células do baço de camundongos BALB/c para determinar uma potencial atividade imunomoduladora do veneno de *B. erythromelas* em células de mamíferos. Para isso, culturas de células esplênicas foram expostas ao veneno de *B. erythromelas* em diferentes concentrações. Ensaio de citotoxicidade e de viabilidade celular foram realizados para avaliar, possíveis danos induzidos

pelo veneno. Esses experimentos possibilitaram observações relevantes, uma vez que pôde-se verificar a eficácia de um método para avaliar a citotoxicidade de linfócitos T específicos.

Na investigação da resposta imunomoduladora induzida pelo veneno de *B. erythromelas* em células esplênicas, os níveis de óxido nítrico, de IL-2, IL-6, IL-10 e IFN- γ foram comparados com a resposta induzida por *C. d. cascavella*.

As serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* são responsáveis pela maioria dos acidentes ofídicos na América Latina e, especificamente, no Brasil (SVS, 2009). Em humanos e em animais experimentais, os sintomas do envenenamento botrópico ocorrem devido à presença de uma variedade de toxinas presentes no veneno (CARDOSO, 1992; FRANÇA, 2003). Por outro lado, o envenenamento por *Crotalus* não induz uma importante reação inflamatória no local da picada, mas exerce neurotoxicidade sistêmica grave, com efeitos nefro-, hepato, neuro- e miotóxicos (CRUZ, 2008).

Estudos têm investigado os efeitos imunomoduladores induzidos por diferentes venenos de serpentes e as alterações imunológicas foram observadas tanto na resposta celular como na humoral (CROCKER et al., 2010; CARDOSO;MOTA, 1997; DOMINGOS et al.,1990). Para estudar os aspectos imunológicos e o perfil de estimulação exercido pelos venenos de *B. erythromelas* e de *C. d. cascavella*, investigamos a citotoxicidade promovida por ambos os venenos em esplenócitos de BALB/c. Os resultados mostraram maior efeito citotóxico induzido por venenos de serpentes na concentração acima de 1 $\mu\text{g/mL}$. Lomonte et al. (1993), investigando o veneno da serpente *Bothrops asper* mostraram resultados semelhantes e afirmam que o veneno exibiu citotoxicidade *in vitro* em células do baço na forma dose e tempo-dependente. Torres et al. (2010) também mostrou que a fração PLA₂ do veneno de serpente *Bothrops marajoensis* apresentou maior citotoxicidade em macrófagos murinos incluindo a ruptura da membrana e lise celular. Além disso, o veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*, induziu efeitos citotóxicos nos esplenócitos tratados, *in vitro*, com 5 $\mu\text{g/mL}$ e diminuiu a viabilidade celular induzida (RANGEL-SANTOS et al., 2004).

Muitos estudos têm descrito o envolvimento de citocinas no envenenamento, incluindo veneno de escorpiões, serpentes e aranhas (CHAVES et al., 2005, 2006; SOARES et al., 2006) . Para identificar o impacto

do veneno de serpente em termos de atividade inflamatória, o perfil de IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-10 e a produção de NO em cultura de esplenócitos de BAL/c estimuladas, *in vitro*, com os venenos das serpentes *B. erythromelas* e *C. d. cascavella* foram investigados. Observou-se que o melhor momento da cultura para analisar a liberação de citocinas foi em 72 horas. Na realidade, ambos os venenos de serpentes foram capazes de induzir IFN- γ , IL-6, IL-10 e produção de NO, mas essa produção foi diferente entre os venenos. A produção de IL-2 induzida pelos venenos das serpentes não foi significativa. No entanto, ambos os venenos de serpentes induziram níveis semelhantes de IFN- γ e IL-6. *B. erythromelas* induziu maior produção de IL-10 que *C. d. cascavella*, e apenas *B. erythromelas* induziu níveis estatísticos de óxido nítrico. Além disso, observou-se uma dicotomia desses venenos, indicando possíveis diferenças moleculares e mecanismos de sinalização induzida por ambos. Resultados semelhantes foram demonstrados por Rangel-Santos et al. (2004). Estes autores afirmam que esplenócitos tratados com veneno de *Crotalus durissus terrificus* não mostrou liberação de citocinas IL-2 e IL-10.

De fato, outros estudos têm demonstrado, através de experimentos *in vivo* e *in vitro*, o mesmo perfil de liberação de citocinas observado em nosso estudo. Escocard et al. (2006) mostraram a produção de IL-6 induzida pelo veneno bruto de *Bothrops atrox*. Petricevich et al. (2000), investigando venenos de *Bothrops asper* e *Bothrops jararaca*, demonstraram que ambos os venenos induziram elevações de destaque na produção de IL-6, IL-10 e IFN- γ , e Lomonte et al. (1993) mostraram que a injeção de veneno de *Bothrops asper* em patas de rato também invocou o aumento dos níveis de IL-6 no soro.

Maior liberação de NO foi observada em esplenócitos estimulados, *in vivo*, com *B. erythromelas*, pode ser uma consequência das características induzidas pelo veneno nos tecidos da vítima, danos tais como, necrose proeminente, hemorragia e edema que são característicos do envenenamento pelo gênero *Bothrops* (CAMPBELL, 2004). Além disso, estudos experimentais mostraram que o veneno de *Bothrops asper* induz a fagocitose e aciona funções microbicidas dos leucócitos peritoneais, *in vivo*, com um consequente aumento na produção de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico por macrófagos seguido pela geração de peroxynitritos tóxicos (RUVACADO, 2002). Esse

veneno induziu a síntese de NO após injeções intramuscular e intraperitoneal em camundongos, principalmente através da indução da expressão de óxido nítrico sintase induzida (iNOS), promovido pelo aumento na liberação de IFN- γ . Além disso, um papel protetor do NO foi demonstrado na atividade letal do veneno (PETRICEVICH et al., 2000). Barros et al. (1998) também mostraram resultados semelhantes, indicando que a baixa produção de IFN- γ foi seguido por níveis detectáveis de óxido nítrico em sobrenadante de culturas. Estes estudos mostraram respostas similares pró-inflamatórias como observado em nossos ensaios.

Ações distintas dos venenos de *B. erythromelas* e de *C. d. cascavella* mostradas neste estudo podem ser explicadas pela composição de diferentes toxinas e as manifestações clínicas apresentadas por esses venenos em humanos e camundongos envenenados, como explicado anteriormente. Outras espécies do gênero Bothrops, como *B. asper*, *B. jararaca* e *B. atrox*, mostraram indução similar de histamina, bradicinina, eicosanóides, prostaglandinas e citocinas envolvidas nos envenenamentos botrópicos (ÁVILA-AGUERO et al., 2001, BARRAVIERA et al., 1995; CHAVEZ et al., 1992; COSTA et al., 2002; DIAS-DA-SILVA, 1995; FARSKY, 2000; GUTIÉRREZ, 1980). Outrossim, semelhantemente aos nossos dados, outros estudos afirmam haver uma maior resposta Th1 induzida por envenenamento botrópico promovida em associação com aumento da resposta pró-inflamatória observada em envenenamentos ofídicos (BARRAVIERA et al., 1995; ÁVILA-AGUERO, 2001). Embora os acidentes crotálicos induzam hemorragia e dano tecidual semelhante aos efeitos observados em acidentes botrópico, a produção de prostaglandinas (potentes mediadores pró-inflamatórios) induzida por venenos do gênero *Crotalus* ainda permanece desconhecida (PETRICEVICH et al., 2000). No entanto, alguns estudos têm mostrado o perfil anti-inflamatório deste veneno (CRUZ et al., 2008; CARDOSO et al., 2001).

Embora muitos estímulos possam induzir respostas imunomoduladoras, como venenos de serpentes, por exemplo, é necessário verificar se essa resposta é benéfica para a célula imune estimulada, pois alguns estudos afirmam que estímulos específicos (químicos ou biológicos) podem induzir danos, tais como apoptose ou necrose nas células-alvo através de acúmulo excessivo de radical livre (HOGG, 1992). Em nosso teste de viabilidade celular,

o veneno de *B. erythromelas* induziu maior dano às células que o veneno de *C. d. cascavella*. Teixeira et al. (2003) também relataram resultados semelhantes, demonstrando depleção de neutrófilos em camundongos tratados com veneno de *Bothrops asper* e da fração PLA₂. Além disso, Angulo e Lomonte (2009) analisando o mecanismo de ação da miotoxina II, uma Phospholipase A₂ de *Bothrops asper*, mostraram que esta toxina pode induzir através de eventos degenerativos relacionados ao influxo de Ca²⁺, a morte celular por necrose. Estudos dos efeitos do veneno crotálico foram realizados com a fração isolada (toxinas) do veneno e tem-se demonstrado que essas toxinas causam uma redução no potencial de repouso da membrana e um aumento na condutância. Rangel-Santos et al. (2004) mostraram que veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* induziu maior inibição da resposta proliferativa celular em culturas estimuladas com Con A, com o veneno bruto e a fração isolada do veneno (crotoxina). Por este aspecto, o teste de viabilidade celular realizado por eles não mostrou resultados significativos. Em nosso estudo, utilizamos veneno crotálico total e sugerimos que esta metodologia pode ser a chave para promover danos celulares baixos em comparação com *B. erythromelas*. Muitos estudos têm investigado o dano celular induzido por venenos de serpentes Viperidae, correlacionando o papel das toxinas do veneno na resposta inflamatória. Díaz et al. (2005), tratando células endoteliais humanas com BaP-1, observaram que essa fração do veneno induz a apoptose através da ativação da caspase-8. Além disso, Gallagher et al. (2005) observaram em seu estudo que os fibroblastos tratados com jararagina ativou uma cascata apoptótica através do receptor de morte (extrínsecos) de apoptose.

Venenos de serpentes são muito complexos, contendo centenas de compostos biologicamente ativos associados ao processo inflamatório (GALLAGHER et al., 2005). Neste estudo observou-se que os venenos de *B. erythromelas* e *C. d. cascavella* induziram uma resposta imunomoduladora marcada, *in vitro*, através de citocinas e produção de NO. Mas ficou claro que *B. erythromelas* promove um perfil pró-inflamatório e o veneno de *Crotalus durissus cascavella* produz o efeito oposto, ou seja, anti-inflamatório.

Portanto, a partir dos resultados com os venenos de *B. erythromelas* e *Crotalus durissus cascavella* em células esplênicas de BALB/c, sugerimos que esses dados podem melhorar a nossa compreensão das conseqüências

imunológicas induzidas por envenenamento ofídico, especialmente em relação às espécies sul-americanas, e promover um melhor entendimento para futuras estratégias terapêuticas de tratamento anti-ofídico.

Paralelo ao estudo para determinar *in vitro*, a citotoxicidade, a produção de óxido nítrico, IL-10, IFN- γ , IL-2, IL-6 e a viabilidade de células esplênicas de camundongos BALB/C na presença do veneno de *Bothrops erythromelas*, a presente tese avaliou os aspectos clínicos e epidemiológicos dos indivíduos picados por *B. erythromelas* em Pernambuco e na Paraíba.

No Centro de Assistência Toxicológica (CEATOX) no Hospital da Restauração (HR) – Recife (PE), o presente estudo analisou 72 casos de acidentes ofídicos Botrópicos e Crotálicos ocorridos entre junho de 2007 a junho de 2008. O número dos acidentes Crotálicos foi superior aos Botrópicos, diferindo com o encontrado por Bochner e Struchiner (2003), Cagliari et al. (2008) e Lemos (2009), que verificaram o acidente Botrópico como de maior ocorrência. Esta mudança no perfil dos acidentes ofídicos pode estar relacionada à ação antrópica do homem, que tem destruído as áreas endêmicas dessas serpentes, bem como a presença de criadouros clandestinos e o aumento de lixo nas residências e conseqüentemente o aumento de roedores, elevando com isso a oferta de alimentos nestes locais. Estes aspectos têm favorecido a migração destas serpentes de seu habitat natural (zona rural) para a zona urbana. Isso não ocorre com as serpentes do gênero *Bothrops*, que são endêmicas da caatinga e, provavelmente, menos adaptáveis ao ambiente urbano. Este é um dado novo e, apesar de não corroborado por alguns autores, revela a mudança de hábitos desses animais.

Apesar de algumas cidades estarem localizadas a poucos quilômetros de Recife, faz-se necessária a observação de que a maioria dos atendimentos levou mais de 6 horas para que ocorresse. Isso se deve ao fato de que os indivíduos envenenados freqüentemente realizam tratamentos alternativos (ingestão de álcool, aplicação de garrote, perfurações no local da picada, etc.), esperando uma rápida melhora em seu estado geral, o que leva a uma demora até o atendimento hospitalar. Além disso, como esses indivíduos realizam sua atividade laborativa em área rural, é difícil conseguir transporte rapidamente para a unidade de tratamento mais próxima. Vale chamar atenção para o fato de que, apesar de algumas cidades estarem mais próximas de Caruaru do que

de Recife, nem sempre a unidade hospitalar de Caruaru dispõe do soro antiofídico, fazendo com que o paciente seja transferido para Recife.

Os parâmetros para diferenciação de um acidente entre crotálico ou botrópico é baseado nos sinais e sintomas apresentados pelo paciente no momento em que o mesmo chega a unidade de atendimento hospitalar. Edema, dor, hemorragia e distúrbios da coagulação sangüínea são características de envenenamento Botrópico. Visão turva, ptose palpebral, apontam para a evidência de envenenamento do tipo crotálico (BRASIL, 2003).

A evolução clínica em nosso estudo foi considerada satisfatória, ou seja, com os pacientes evoluindo sem a presença de insuficiência renal, fasciotomia, amputações, problemas visuais ou infecções secundárias. Observou-se que 96% dos pacientes atendidos no período estudado receberam alta sem mais complicações, e apenas um caso evoluiu a óbito. Isto corrobora com os achados de Cagliari et al. (2008) , que estudando os acidentes ofídicos notificados no CEATOX de Campina Grande, Paraíba, verificaram 100% de alta médica recebida pelos pacientes atendidos neste centro.

O tempo decorrido entre o acidente e o atendimento tem sido considerado importante para o prognóstico do envenenamento ofídico. Nossos resultados mostraram que 48% dos pacientes foram atendidos em até 6 horas após o acidente, o que contribuiu para uma terapêutica bem sucedida, ou seja, com a total neutralização dos efeitos decorrentes do envenenamento e conseqüente melhor evolução clínica do paciente, com internação de, em média, 3 dias tanto para acidentes Botrópicos quanto para Crotálicos.

De acordo com os dados encontrados, a maior incidência de acidentes ofídicos foi registrada no mês de agosto de 2007 e de março a junho de 2008. Isto pode estar relacionado às altas temperaturas e aumento dos índices pluviométricos nesses meses do ano, visto que estes períodos coincidem com os picos de chuva, com o aumento da atividade agrícola relacionada ao plantio, colheita e limpeza das áreas de cultivo, o que também foi observado por Nascimento (2000) e Albuquerque, Costa e Cavalcanti (2004).

O maior número de acidentes envolveu pessoas do sexo masculino e o local de maior ocorrência foi a própria residência, seguido do ambiente de trabalho, visto que, são pessoas que moram em regiões rurais e que exercem uma atividade agrícola. Com isso, são pessoas consideradas pertencentes a

um grupo mais exposto às serpentes e conseqüentemente aumentando o risco de acidentes com estes tipos de animais. Isto foi concordante com Ministério da Saúde (2003) e com o estudo de Moreno et al. (2005).

Devido às características dos acidentes em relação ao sexo mais acometido, a zona e o local de ocorrência se faz necessário o uso de equipamentos de proteção como botas e luvas. Orientar a população em relação aos riscos deste tipo de acidente, como também as conseqüências, os benefícios de uma conduta pré-hospitalar adequada, para que com isso se consiga minimizar ou reduzir as condutas inadequadas que levam ao agravamento deste tipo de acidente.

A escolaridade não foi uma variável considerada satisfatória, em decorrência da não notificação deste dado na ficha de atendimento do CEATOX – HR na maioria dos pacientes.

Em relação às manifestações neurológicas, as mais freqüentes e características são ptose uni ou bilateral e visão turva ou diplopia, isto está relacionado com as características da peçonha Crotálica, que possui principalmente atividade neurotóxica. Estes dados foram observados por Ribeiro e Jorge (1992) e Ministério da Saúde (2003) e foram concordantes com o encontrado neste estudo.

As alterações laboratoriais mais freqüentes decorrentes de um acidente Botrópico e que foram observadas neste estudo, podem ser atribuídas às características da peçonha Botrópica, por possuir potentes atividades proteolítica, coagulante e hemorrágica, ocasionando lesões locais e destruição tecidual. Estes dados também corroboram com o estudo de Ribeiro e Jorge (1992) e Ministério da saúde (2003).

Em relação às alterações encontradas nos acidentes por cascavéis, nossos dados corroboram com os descritos pelo Ministério da Saúde (2003) provavelmente devido à potente atividade miotóxica apresentada pelas serpentes desta espécie.

Vários estudos epidemiológicos de acidentes ofídicos foram realizados. Estes visavam traçar um perfil epidemiológico preciso. Porém, diante da problemática de que nestes estudos sempre são relatados os elevados índices de dados que são ignorados, subnotificados ou não informados, e que também foi encontrado neste estudo, torna-se difícil traçar um perfil preciso. Assim, faz-

se necessário o devido preenchimento das fichas de notificação, para que se possam minimizar estas imprecisões.

Neste estudo pode-se observar que alguns pacientes foram tratados com um número de ampolas diferente do preconizado pelo Ministério da Saúde. Isso, provavelmente, deve-se ao fato da falta de soro específico em quantidade correta para o tratamento, o que é muito comum principalmente nos períodos de alta incidência dos acidentes ofídicos. Além disso, apesar dessa informação ser crucial para o acompanhamento da evolução do paciente, a soroterapia empregada não foi notificada em 12 fichas.

Com os pacientes do Centro de Toxicologia do Hospital de Urgência e Emergência de Campina Grande, Paraíba (CEATOX-HUECG-PB), a presente tese apresenta evidências de aspectos clínicos, epidemiológicos e imunológicos dessa região.

Há uma grande quantidade de componentes nos venenos botrópicos que comprometem a hemostasia. Assim, é comum uma alta frequência de sangramento causado por este tipo de envenenamento. Essas hemorragias podem ser locais ou sistêmicas (SANO-MARTINS; SANTORO, 2003). Na maioria dos casos o sangramento é interrompido após soroterapia, embora a hemorragia cerebral tenha sido caracterizada em alguns casos, o que pode levar o paciente a óbito (KOUYOUMDJIAN et al., 1991). No presente estudo, quatro pacientes apresentaram hemorragia após envenenamento, voltando ao normal após o tratamento. Todos os quatro pacientes foram classificados como envenenamentos moderados ou graves e o tipo de hemorragia foi epistaxe e hemorragia gengival.

A predominância entre indivíduos do sexo masculino entre 20 a 30 anos de idade mostra que essa faixa etária é a mais afetada por picadas de cobra. Esses dados podem indicar a inserção dos jovens homens no trabalho mais do que mulheres. O Ministério da Saúde (BRASIL, 2003) mostra que em 52,3% das notificações, a prevalência é de 15 a 49 anos, o que corresponde à força de trabalho. O sexo masculino foi o mais exposto a esta lesão, com incidência de 70% dos acidentes.

Neste estudo foi observada a prevalência da atividade agrícola e na área rural. Na região Nordeste do Brasil observa-se uma maior atividade em períodos de plantio e colheita. Assim que ela pode ter correlação entre a

frequência dos acidentes ofídicos e a época de plantio e colheita (LEMOS et al., 2009). Essas conclusões reforçam o fato de acidentes ofídicos como acidentes de trabalho. Além disso, estes dados confirmam os resultados obtidos por Kasturiratne et al. (2008) que relataram que toda a atividade agrícola mundial é um fator de risco para acidentes ofídicos.

A sazonalidade dos acidentes ofídicos deve ser tida como um fato importante que pode conduzir a prevenção educativa. No Sul e no Sudeste do Brasil os acidentes ofídicos geralmente ocorrem de outubro a abril, que é o período mais quente e chuvoso do ano para essas regiões (BRASIL, 2003). No Nordeste os acidentes ocorrem principalmente entre maio e setembro, com declínio a partir de outubro (LEMOS et al., 2009).

No presente estudo observou-se que as vítimas foram mais afetados nos membros inferiores como pés e os dedos dos pés. Ribeiro et al (1995) e Moreno et al. (2005) também relacionam pés (43,1%) como a região mais afetada do corpo. Assim que a utilização de equipamentos de proteção como luvas e botas são indicadas.

Os envenenamentos leves foram os mais observados neste estudo. Isto está de acordo com o tempo decorrido entre a picada e o atendimento hospitalar, o que também é corroborado por outros trabalhos (FRANÇA et al., 2003; RIBEIRO et al., 2001). Embora Santoro et al. (2008) tenham mostrado que o tempo entre a picada e o atendimento hospitalar não estão relacionados.

As características clínicas mais observadas neste estudo foram dor e edema. É sabido que envenenamentos botrópicos são caracterizados por dor, edema, hemorragia, necrose local, equimose, bolhas (ROSENFELD, 1971; BRASIL, 2003). A hemorragia foi a manifestação sistêmica mais observada neste estudo, o que também pôde ser observado por outros autores (SANO-MARTINS, 1995; SANTORO et al., 2008), seguido por cefaléia. Essa hemorragia logo foi interrompida após a soroterapia, com exceção de um paciente que apresentava epistaxe e o sangramento permaneceu por mais dois dias após o tratamento.

A resposta imunológica dos pacientes envenenados por *B.erythromelas* na região Nordeste do Brasil ainda não foi completamente caracterizada. Além disso, poucos estudos têm sido publicados até agora (AQUINO, 1999),

enfocando aspectos clínicos e epidemiológicos envolvidos em envenenamento por essa espécie de serpente nessa região. Assim, a fim de melhor compreender a participação do sistema imune após o envenenamento por *B. erythromelas*, alguns aspectos da resposta imune inata e adaptativa foram avaliados, tais como os níveis das citocinas IFN- γ , e IL-10, de óxido nítrico nos sobrenadantes das culturas dos sangues periféricos dos pacientes envenenados por *Bothrops erythromelas*, antes, 12 e 24 horas após tratamento soroterápico; além da caracterização de marcadores de superfície celular (CD3, CD4, CD8, CD16, CD25, CD55, CD11b, CD35, CD88, CD32 e CD18) e de níveis séricos de citocinas e quimiocinas nesse mesmo período.

Para avaliar o padrão de anticorpos IgM reconhecido após 24 h de tratamento, os pacientes foram novamente analisados e a mesma proteína foi detectada foi 31kDa.

Deve-se ressaltar que, apesar de soroterapia, a resposta de anticorpos para *B. erythromelas* seguido de uma resposta imune humoral, que é um clássico para muitas doenças: a produção primária IgM. Neste trabalho, a principal proteína 38kDa foi observado antes e 24h após a terapia. É importante ressaltar que este poderia servir como um marcador para o envenenamento botrópico pela espécie *B. erythromelas*, uma vez que esta proteína não é bem neutralizada pelo antiveneno comercial utilizado no Brasil, talvez porque o grupo dos venenos para o soro antibotrópico não inclui a espécie *B. erythromelas*. Em outro estudo, os autores já haviam observado que o veneno de *B. jararaca* não é bem neutralizado pelo antiveneno comercial, já que os pacientes analisados apresentaram diferentes padrões de reconhecimento, o que poderia implicar o caráter genético de cada paciente ou o grau de absorção dos componentes do veneno (DOMINGOS et al., 1990).

Considerando que mediadores imunológicos são instrumentos relevantes para a compreensão das ações do veneno de *B. erythromelas*, no presente estudo, as produções de IL-10 e IFN- γ foram analisadas no sobrenadante da cultura do sangue periférico dos pacientes em diferentes fases da soroterapia.

Citocinas são proteínas solúveis e atuam como importantes mediadores da resposta inflamatória do corpo humano (ROMAGNANI, 2000). No presente

estudo, a produção de IFN- γ foi avaliada em sobrenadantes de culturas do sangue periférico de pacientes em diferentes fases da soroterapia. É interessante notar que, antes e 12h após tratamento soroterápico, os pacientes com diferentes tipos de envenenamento (leve, moderado e grave) apresentaram concentrações significativamente menores de citocinas em relação ao grupo controle, em resposta a ConA. O veneno de jararaca apresentou resposta com o mesmo perfil. Vinte e quatro horas após a soroterapia, não houve estatística significativa entre as médias de IFN- γ produzida por pessoas com envenenamento leve e indivíduos saudáveis. A partir destes dados, pode-se postular que o veneno botrópico exerce algum efeito imunossupressor sobre a resposta imune dos pacientes. A imunossupressão exercida pelos venenos de serpentes foi anteriormente apontado por Rangel-Santos et al. (2004) e Cardoso et al. (2001), que estudou a influência da crotoxina, uma proteína do veneno cascavel (*Crotalus durissus terrificus*), na proliferação celular, viabilidade e produção *in vitro* de citocinas em camundongos.

A produção de óxido nítrico desses pacientes foi também avaliada. O óxido nítrico é um mediador importante que tem sido envolvido na gênese de uma variedade de condições patológicas em processo inflamatório após lesão, edema e formação de infiltrado inflamatório (NETO et al., 2006). Síntese de óxido nítrico pode ser induzida através do aumento da NOS induzível (iNOS) e isso pode induzir dano tecidual, como necrose, hemorragia e edema e contribuir para a ação vasodilatadora forte (HOGG et al., 1992; LOMONTE et al., 1993; PETRICEVICH et al., 2000). Além disso, como NO pode promover a migração dos leucócitos (CIRINO et al., 2003) e como neutrófilos desempenham um papel é a regeneração muscular em venenos de serpentes (TEIXEIRA et al., 2003), este mediador tinha sido investigada como possível agente terapêutico contra envenenamento botrópico (NETO et al., 2006).

Ensaio anteriores realizados por nosso grupo (LUNA et al., 2010), também apresentaram maior liberação de NO em ratos que receberam spleocytes culturas, *in vitro*, estímulos botrópico (100, 10 e 1 $\mu\text{g/mL}$). Os resultados mostraram o perfil pró-inflamatório deste veneno de cobra. Semelhante aos nossos estudos, muitos estudos têm demonstrado um incremento significativo de óxido nítrico no soro de amostras com

envenenamento botrópico (BARROS et al., 1998; TAMBOURGI et al., 1998; PETRICEVICH et al., 2000; ESCOCARD et al., 2006). Zamuner et al. (2001) para compreender melhor a capacidade dos venenos para induzir NO, analisou a expressão da iNOS em macrófagos peritoneais e mostrou que o veneno de Bothrops induziu um aumento significativo da concentração de nitrito, liberados para os macrófagos em cavidades peritoneal, em 48 horas após a injeção do veneno em camundongos. Além disso, outros estudos tinham sido mostra que o óxido nítrico exerce um papel citoprotetor e contribui para a homeostase vascular (WALFORD; LOSCALZO, 2003; ENDRES et al., 2004).

A busca por marcadores imunológicos para ajudar a determinar a gravidade dos casos são ferramentas úteis para a indicação de que a terapia é uma realidade da pesquisa de envenenamento. Desde que venenos de serpentes são ricos em proteínas e toxinas peptídicas que têm especificidade para uma ampla variedade de receptores de tecidos, tornou-se importante estudar alguns desses marcadores para determinar o efeito do envenenamento e da administração do soro sobre os mesmos.

Através da identificação de alguns marcadores nas células do sangue periférico, observa-se uma diminuição 12h após o tratamento em relação ao percentual de linfócitos T CD3, CD4 e CD25 (em CD25 alguns pontos foram significativos em relação ao controle), seguida de manutenção de níveis semelhantes nos pacientes leves e um ligeiro aumento seguido de leve diminuição ou manutenção de níveis semelhantes antes do tratamento em pacientes graves ou moderados. Isso pode sugerir duas realidades: na primeira a diminuição indicaria a migração dessas células para os tecidos e sistemas afetados, contribuindo e/ou regulando os quadros inflamatórios observados; com isso, sua diminuição no sangue periférico. No entanto, com o fim do tratamento e remissão dos sintomas se restabeleceria o equilíbrio percentual desses linfócitos nos pacientes leves, o que não foi observado inicialmente nos pacientes moderados e graves. Apenas 24h após o tratamento. Já a segunda situação refletiria a variação normal da expressão desses marcadores observada em uma população, uma vez que não foi visto diferença significativa em relação ao controle (com exceção de alguns pontos do CD25).

Em relação aos linfócitos T CD8⁺, células T citotóxicas, vimos o seu aumento percentual em pacientes leves, e uma ligeira diminuição em pacientes

moderados e graves. Já os linfócitos CD16⁺, indicadores de células NK, apresentaram uma diminuição na sua expressão em pacientes moderados e graves e foi interessante notar que pacientes leves apresentaram percentuais relativamente constantes antes e após o tratamento. Isso pode sugerir o papel desses dois subtipos no restabelecimento da homeostasia dos sistemas em pacientes envenenados ao contribuir para a morte e apoptose de células danificadas.

No que se refere aos linfócitos B, identificados pelo marcador CD19, e do co-receptor de IgG (CD32), foi observado que o nível antes e 24h após do tratamento com soro antiofídico, permaneceram semelhante. Possivelmente isso ocorreu devido à administração do soro antiofídico em quantidades adequadas para resolução do envenenamento, reflexo da importância da resposta imune humoral para resolução dos casos com produção de imunoglobulinas neutralizantes do veneno. Em relação ao CD32 (FcγRII), dado a sua ação imunomodulatória em presença de IgG (LISI et al.,2010), pacientes leves apresentaram inicialmente valores abaixo do controle com posterior aumento significativo da expressão desse co-receptor, condizente com a presença do soro antiofídico e conseqüente feedback negativo para produção endógena. Já nos pacientes graves se observou nível semelhante ao controle, o que poderia está contribuindo para o seu estado mais grave, com diminuição posterior discreta em 24h.

Em relação aos receptores do sistema complemento (CD11b, CD35, CD55, CD88 e CD18), analisados nos monócitos e granulócitos, foi visto que o CD11b e o CD35 apresentaram comportamentos semelhantes, com um ligeiro aumento 12h após tratamento em pacientes. Em 24h houve uma manutenção ou ligeira diminuição dos níveis observados, indicando possivelmente a maior ativação do sistema complemento com conseqüente fagocitose dos imunocomplexos resultantes da interação das imunoglobulinas do soro antiofídico com o veneno. Em relação ao CD88, receptor do C5a do complemento que é um potente mediador da inflamação (GASQUE et al.,97), os resultados indicam um leve aumento da expressão desse marcador em pacientes leves e uma diminuição em pacientes moderados. Diminuição esta a níveis semelhantes entre pacientes leves antes e 24h após o tratamento, condizendo com a gravidade dos casos dos pacientes e conseqüentemente

com danos observados e resolução da doença. Já a expressão de CD55 aumentou 12h após o tratamento. Em 24h ocorreu uma diminuição, o que é positivo para os pacientes a medida que o CD55 inibe a ativação do complemento (BOMM et al., 1991) e conseqüentemente compromete a formação de imunocomplexos que poderiam desencadear processos inflamatórios e se depositar em outros sistemas causando danos, como complicações renais (JANCAR; CRESPO, 2004). Por fim o CD18, relacionado ao extravasamento dos leucócitos para o endotélio (KLING et al., 1992; SCHENKEL, 2004) apresentou níveis mais altos inicialmente em pacientes leves, indicando uma maior migração dessas células, e níveis aumentados em pacientes graves após o tratamento (referente especialmente aos monócitos), relacionados com a recuperação dos pacientes e migração mais efetiva de suas células.

É importante notar que a maioria dos marcadores estudados apresentou valores de expressão, 24h após a administração do tratamento, semelhante entre pacientes dos 2 grupos ou que tenderam ao mesmo resultados (diminuição ou aumento). Isso sugere que após o tratamento se tem um equilíbrio da resposta imunológica. Esse fato sendo caracterizado como maior número de pacientes auxiliará no tratamento e no prognóstico desses pacientes.

A variação observada nos marcadores poder refletir vários aspectos como: tempo de envenenamento e encaminhamento ao hospital, número de ampolas administradas, quantidade de veneno presente no sistema, dano tecidual antes da administração das ampolas e migração das células para os tecidos e sistemas afetados. Para obtenção de resultados mais significativos os estudos continuarão com a avaliação de um número maior de pacientes, visando a utilização desses marcadores para auxiliar na identificação da gravidade dos casos e para melhor entender a importância dos mesmos para resolução clínica da doença.

A tecnologia do CBA (Cytometric Bead Array) kit Th1/Th2 permite avaliar de maneira específica as citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas séricas envolvidas no envenenamento. De acordo com os resultados preliminares de citocinas e quimiocinas apresentados no soro dos pacientes avaliados, observou-se que os resultados foram similares entre as formas clínicas de

envenenamento. Isso pode refletir o número de pacientes utilizados no presente estudo; portanto, mostrando a necessidade de mais estudos com essa abordagem.

Finalmente, uma compreensão mais profunda e abrangente dos aspectos clínicos, epidemiológicos e imunológicos associados como envenenamento por *B. erythromelas* fornecem informações para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas destinadas a neutralizar os efeitos deletérios envolvidos neste tipo de envenenamento.

7. CONCLUSÕES

- Os venenos de *Bothrops erythromelas* e *Crotalus durissus cascavella* induziram em cultura de células esplênicas de camundongos BALB/c uma resposta imunomoduladora através de citocinas (IFN- γ e IL-6) e produção de óxido nítrico. Enquanto o veneno de *B. erythromelas* promoveu um perfil pró-inflamatório, o de *Crotalus durissus cascavella* mostrou um efeito anti-inflamatório;
- No soro de pacientes acometidos por acidente botrópico, 12 e 24 horas após terapia foi identificada uma proteína de 38 kDa. O resultado sugere que esta proteína pode constituir um importante marcador para o envenenamento por *B. erythromelas*, uma vez que o grupo de soro polivalente utilizado no Brasil mostrou baixa eficácia na neutralização do veneno dessa espécie;
- A avaliação clínico-epidemiológica dos pacientes acometidos pelos envenenamentos Botrópicos estudados corrobora com a epidemiologia dos acidentes ofídicos ocorridos no Brasil; já no que diz respeito a distribuição dos envenenamentos Crotálicos percebe-se uma inversão dos dados, com maior incidência na área urbana;
- A produção de IFN- γ e óxido nítrico nos sobrenadantes de cultura de pacientes acometidos por envenenamento botrópico mostram o perfil pró-inflamatório deste veneno;
- A variação observada nos marcadores de superfície celular avaliados no sangue periférico dos pacientes envenenados por *Bothrops erythromelas* pode ser conseqüência do tempo de envenenamento e encaminhamento ao hospital, do número de ampolas administradas, da quantidade de veneno inoculada no paciente, do dano tecidual antes da administração das ampolas e da migração das células para os tecidos e sistemas afetados.

- Não foi observada diferença na produção de citocinas e quimiocinas avaliadas no soro de pacientes acometidos por envenenamento botrópico, refletindo a necessidade de mais estudos nesse tipo de abordagem.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, H. C.; COSTA, T.B.G.; CAVALCANTI, M.L.F. Estudo dos acidentes ofídicos provocados por serpente do gênero *Bothrops* notificados no estado da Paraíba. Revista de Biologia e Ciências da Terra, Campina Grande, v. 5, n.1, p.49-56, 2005.

ANGULO, Y.; LOMONTE, B. Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. Toxicon, Oxford, v. 54, n. 7, p. 949-57, 2009.

AQUINO, W. K. Epidemiologia e clínica dos acidentes ofídicos no Estado de Pernambuco. 1999. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1999.

AVILA-AGUERO, M. L. et al. Systemic cytokine response in children bitten by snakes in Costa Rica. Pediatric Emergency Care, Philadelphia, v. 17, n. 6, p. 425-429, 2001.

BARRAVIERA, B. Acute-phase reactions including cytokines in patients bitten by *Bothrops* and *Crotalus* snakes in Brazil. Journal of Venomous Animals and Toxins, Botucatu, v.1, p. 11-22, 1995.

BARROS, S. F. et al. Local inflammation, lethality and cytokine release in mice injected with *Bothrops atrox* venom. Mediators of Inflammation, Nova York, v. 7, p. 339-346, 1998.

BOCHNER, R. S.; STRUCHINER, C. J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v.19, p. 7-16, 2003.

BOMM, M. A. et al. Decreased expression of decay-accelerating factor on endothelial cells of immune complex-mediated vasculitic skin lesions. Journal of Dermatological Science, Japan, v. 2, p. 308-15, 1991.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**. 3ª edição revisada. Brasília: FUNASA (FUNASA) MS, 2003.

BRAZIL, V. Contribution à l'étude de l'intoxication d'origine ophidienne. Paris, Editor: A. Maloine, 1905.

BRAZIL, V. Contribuição ao estudo do veneno ofídico: tratamento das mordeduras de cobra. Revista de Medicina de São Paulo, São Paulo, p. 265-278, 1903.

CALVETE, J. J. et al. Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops colombiensis*, a medically important pitviper of the *Bothrops atrox-asper* complex endemic to Venezuela: Contributing to its taxonomy and snakebite management. Journal of Proteomics, Oxford, v. 72, p. 227-40, 2009.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere. Nova York, Editor: Ithaca, 2004.

CARDOSO, D. F. et al. Role of crotoxin, a phospholipase A2 isolated from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on inflammatory and immune reactions. Mediators of Inflammation, Nova York, v. 10, p. 125-33, 2001.

CARDOSO, D. F.; MOTA, I. Effect of *Crotalus* venom on the humoral and cellular immune response. Toxicon, Oxford, v.35, p. 607-612, 1997.

CARDOSO, D. F. Produção de soros antitoxinas e perspectivas na modernização por técnicas de biologia molecular. Haddad Jr., V. et al. 1ª. Ed., Sarvier, 2003. In: Haddad Jr., V. Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. 1ª. ed, São Paulo, cap. 36, p. 367 – 379, editora Sarvier, 2003.

CHAVES, F.; BARBOZA, M.; GUTIERREZ, J. M. Pharmacological study of edema induced by venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo) in mice. Toxicon, Oxford, v.33, p. 31-9, 1995.

CHAVES, F.; GUTIERREZ, J. M.; BRENES, F. Pathological and biochemical changes induced in mice after intramuscular injection of venom from newborn specimens of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). Toxicon, Oxford, v. 30, p. 1099-109, 1992

CHAVES, F. et al. Pharmacological modulation of edema induced by Lys-49 and Asp-49 myotoxic phospholipases A2 isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). Toxicon, Oxford, v.36, p. 1861-9, 1998

F. CHAVES, TEIXEIRA, C. F. P.; GUTIERREZ, J. M. Role of TNF-alpha, IL-1beta and IL-6 in the local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom: an experimental assessment in mice. Toxicon, Oxford, v. 45, p. 171-8, 2005

CHAVES, F.; TEIXEIRA, C. F. P.; GUTIERREZ, J. M. Role of nitric oxide in the local and systemic pathophysiological effects induced by Bothrops asper snake venom in mice. Inflammation Research, Nova York, v. 55, p. 245-53, 2006

CLISSA, P. B. et al. Importance of jararhagin disintegrin-like and cysteine-rich domains in the early events of local inflammatory response. Toxicon, Oxford, v. 47, p. 591-6, 2006

CLISSA, P. B. et al. The effect of jararhagin, a metalloproteinase from Bothrops jararaca venom, on pro-inflammatory cytokines released by murine peritoneal adherent cells. Toxico. Toxicon, Oxford, v. 39, p. 1567-1573, 2001

COSTA, E. P. et al. Importance of metalloproteinases and macrophages in viper snake envenomation-induced local inflammation. Inflammation, Nova York, v. 26, p. 13-7, 2002

CRUZ, A. H. et al. Pro and anti-inflammatory cytokines release in mice injected with Crotalus durissus terrificus venom. Mediators of Inflammation, Nova York, 2008.

DIAS-DA-SILVA, W. T. et al. Complement activation by an animal venoms. Journal of Toxicology - Toxin Reviews, Londres, v. 14, n. 3, p. 375-400, 1995.

DIAZ, C. et al. Characterization of events associated with apoptosis/anoikis induced by snake venom metalloproteinase BaP1 on human endothelial cells. Journal of Cellular Biochemistry, Malden, v. 94, p. 520-528, 2005.

DOMINGOS, M. O. C.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; MOTA, I. The humoral immune responses of patients bitten by the snake Bothrops jararaca (jararaca). Toxicon, Oxford, v. 28, p. 723-726, 1990.

EBNET, D.; VESTWEBER, D. Molecular mechanisms that control leukocytes extravasation: the selectins and the chemokines. Histochemistry and Cell Biology. Nova York, v. 112, p. 1-23, 1999.

ESCOCARD, R. C. M. et al. Neutrophils regulate the expression of cytokines, chemokines and nitric oxide synthase-nitric oxide in mice injected with Botrops atrox venom. Immunobiology, Nova York, p. 37-46, 2006.

FARSKY, S. H. P. et al. Leukocyte response induced by Bothrops jararaca crude venom: in vivo and in vitro studies. Toxicon, Oxford, v. 35, p. 185-93, 1997.

FARSKY, S. H. P. et al. Bothrops asper snake venom and its metalloproteinase BaP1 activate the complement system. Mediators of Inflammation, Nova York, v. 9, p. 213-221, 2000.

FERNANDES, C. M. Z. et al. Inflammatory effects of BaP1 a metalloproteinase isolated from Bothrops asper snake venom: leukocyte recruitment and release of cytokines. Toxicon, Oxford, v. 47, p. 549-559, 2006.

FLORES, C. A.; ZAPPELLINI, A.; PRADO-FRANCESCHI, J. Lipoxygenase-derived mediators may be involved in in vivo neutrophil migration induced by Bothrops erythromelas and Bothrops alternatus venoms Toxicon, Oxford, v. 31, p. 1551-1559, 1993.

FRANÇA, F. O. S.; MÁLAQUE, C. M. S. Acidente Botrópico. In: Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. Haddad Jr., V. et al. 1ª. ed., cap. 6, p. 72-86, ed. Sarvier, 2003.

GALLAGHER, P. et al. Role of the snake venom toxin jararhagin in proinflammatory pathogenesis: in vitro and in vivo gene expression analysis of the effects of the toxin. Archives of Biochemistry and Biophysics, Harvard, v. 441, p. 1-15, 2005.

GASQUE, P. et al. Expression of the receptor for complement C5a (CD88) is up-regulated on reactive astrocytes, microglia, and endothelial cells in the inflamed human central nervous system. American Journal of Pathology, v. 150, p. 31-41, 1997.

GILMAN, G. As bases farmacológicas da terapêutica, Rio de Janeiro, Editor: McGraw Hill, 1996.

GONÇALVES, L. R.; MARIANO, M. Local hemorrhage induced by Bothrops jararaca venom: relationship to neurogenic inflammation. Mediators of Inflammation, Nova York, v. 9, p. 101-107, 2000.

GUTIERREZ, J. M. et al. Myonecrosis induced in mice by a basic myotoxin isolated from the venom of the snake Bothrops nummifer (jumping viper) from Costa Rica. Toxicon, Oxford, v. 27, p. 735-45, 1989.

GUTIERREZ, J. M. et al. Snake venomomics and antivenomics: Proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. Journal of Proteomics, Oxford, v. 72, p. 165-82, 2009.

GUTIERREZ, J. M. et al. Blood flow is required for rapid endothelial cell damage induced by a snake venom hemorrhagic metalloproteinase. Microvascular Research, Oxford, v. 71, p. 55-63, 2006.

GUTIERREZ, J. M. et al. Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). Toxicon, Oxford, v. 33, p. 19-29, 1995.

GUTIERREZ, J. M. et al. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. Toxicon, Oxford, v. 45, p. 997-1011, 2005.

GUTIERREZ, J. M. et al. Snake venomomics of the Lesser Antillean pit vipers *Bothrops caribbaeus* and *Bothrops lanceolatus*: correlation with toxicological activities and immunoreactivity of a heterologous antivenom. Journal of Proteome Research, Oxford, v. 7, p. 4396-408, 2008.

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

GUTIÉRREZ, J. M.; BOLAÑOS, R. A. Mionecrosis, hemorragia y oedema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en ratón blanco. Toxicon, Oxford, v. 18, p. 603-610, 1980.

HAWGOOD, B. J. Pioneers of anti-venomous serotherapy: Dr Vital Brazil (1865-1950). Toxicon, Oxford, v. 30, p. 573-579, 1992.

HAWGOOD, B. J. Doctor Albert Calmette 1863-1933: founder of antivenomous serotherapy and of antituberculous BCG vaccination. Toxicon, Oxford, v. 37, p. 1241-1258, 1999.

HOGUE, A. R.; ROMANO-HOGUE, S. A. R. W. L. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. Memórias do Instituto Butantan, São Paulo, v. 42 - 43, p. 373 - 496, 1978 - 1979.

HOGG, N. et al. Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. Biochemical Journal, Portland, v. 281, p. 419 - 424, 1992.

HOPKINS, J. The pathophysiological role of cytokines. Legal Medicine, Oxford, v. 5, p. S45-S57, 2003.

HUTTON, R. A.; WARRELL, D. A. Action of snake venom components on the haemostatic system. Blood Reviews, Oxford, v. 7, p. 176-89, 1993.

JENNINGS, B.; SPEARMAN, W.; SHEPHARD, E. A novel 25 kDa protein from the venom of *Bitis arietans* with similarity to C-type lectins causes fibrinogen-dependent platelet agglutination. Toxicon, Oxford, v. 46, p. 687-98, 2005.

KAMIGUTI, A. S. et al. Alterations of the blood coagulation system after accidental human inoculation by *Bothrops jararaca* venom. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, Rio de Janeiro, v. 19, p. 199-204, 1986.

KAMIGUTI, A. S. et al. Coagulopathy and hemorrhage in human victims of *Bothrops jararaca* envenoming in Brazil. Toxicon, Oxford, v. 28, p. 961 - 972, 1991.

KASTURIRATNE, A. et al. The Global Burden of Snakebite: A Literature Analysis and Modelling Based on Regional Estimates of Envenoming and Deaths. PLoS Medicine, p. 5 - 11, 2008.

KLING, D.; FINGERLE, J.; HARLAN, J. M. Inhibition of leukocyte extravasation with a monoclonal antibody to CD18 during formation of experimental intimal thickening in rabbit carotid arteries. Arteriosclerosis and Thrombosis, Dallas, v. 12, p. 997-10, 1992.

KOUYOUMDJIAN, J. A. et al. Fatal extradural haematoma after snake bite (*Bothrops moojeni*). Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, London, v. 85, p. 552, 1991.

LAINING, D. G. et al. Inflammatory pathogenesis of snake venom metalloproteinase-induced skin necrosis. European Journal of Immunology, Weinheim, v. 33, p. 3458-3463, 2003.

LEMOS, J. A. et al. Epidemiologia dos acidentes ofídicos notificados pelo centro de assistência e informação toxicológica de campina grande (Ceatox-CG), Paraíba. Revista Brasileira de Epidemiologia, São Paulo, v. 12, p. 50-59, 2009.

LISI, S. M. et al. Advances in the understanding of the Fc gamma receptors-mediated autoantibodies uptake. Clinical and Experimental Medicine, Nova York, In Press, 2010.

LOMONTE, B. et al. Snake venomics and antivenomics of the arboreal neotropical pitvipers *Bothriechis lateralis* and *Bothriechis schlegelii*. Journal of Proteome Research, Oxford, v. 7, p. 2445-2457, 2008.

LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L. A.. Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. Inflammation, Nova York, v. 17, p. 93-105, 1993

LOPES, D. S. et al . Characterization of inflammatory reaction induced by neuwiedase, a P-I metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* venom. Toxicon, Oxford, v. 54, p. 42-49, 2009

LUNA, K. P. O. et al. *Bothrops erythromelas* and *Crotalus durissus cascavella* snake venoms induce pro-inflammatory response in mice splenocytes. International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research, v.3, p.9-18. 2010.

LUNA, K. P. O. et al. Humoral immune response of patients bitten by the snake *Bothrops erythromelas*. Revista Brasileira de Medicina Tropical, São Paulo, In press, 2010.

MALBRANQUE, S. et al. Fatal diffuse thrombotic microangiopathy after a bite by the "Fer-de-Lance" pit viper (*Bothrops lanceolatus*) of Martinique. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Stanford, v. 78, p. 856-61, 2008.

MANDELBAUN, F. R. Isolamento e caracterização de dois fatores hemorrágicos do veneno de *Bothrops jararaca*. 1976. Tese (Doutorado). São Paulo: Escola Paulista de Medicina, 1976.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. Toxicon, Oxford, v. 36, p. 1749-1800, 1998.

MARUYAMA, M. et al. Mihara and et al. Studies on blood coagulation and fibrinolysis in patients bitten by *Bothrops jararaca* (jararaca). Journal of Thrombosis and Haemostasis, Londres, v. 63, p. 449-53, 1990.

MEIER, J.; WHITE, J. Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons. Florida, editor: Boca Raton, 1995.

MEKI, A. R. M. A.; EL-DEAN, Z. M. M. Serum interleukin-1 β , interleukin-6, nitric oxide and α 1-antitrypsin in scorpion envenomed children. Toxicon, Oxford, v. 36, p. 1851-1859, 1998.

MELGAREJO, A. R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: Hadad Jr. Animais Peçonhentos do Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. 1a. edição, cap. 4, p. 33-61, São Paulo: Editora Sarvier, 2009.

MORENO, E. et al. Características clínico epidemiológicas dos acidentes ofídicos em Rio Branco, Acre. . Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, São Paulo, v. 38, p. 15-21, 2005

MOSMANN, T. R.; COFFMANN, R. L. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review Immunology, Palo Alto, v. 7, p. 145-173, 1989.

MOURA-DA-SILVA, A. M. et al. Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. Toxicon, Oxford, v. 29, p. 713 - 723, 1991

NASCIMENTO, S. Aspectos epidemiológicos dos acidentes ofídicos ocorridos no Estado de Roraima, Brasil, entre 1992 e 1998. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 16, p. 271-276, 2000.

NETO, H. S.; VOMERO, V. U.; MARQUES, M. J.. L-arginine enhances muscle regeneration after experimental envenomation by *B. jararacussu*: a future for nitric oxide-based therapy? Toxicon, Oxford, v. 48, p. 353-7, 2006.

NUMERIC, P. et al. Multiple cerebral infarctions following a snakebite by *Bothrops caribbaeus*. Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Stanford, v. 67, p. 287-8, 2002

PETRICEVICH, V. L. et al. Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venom. Toxicon, Oxford, v. 38, p. 1253-1266, 2000

RADI, R. B. et al. Peroxynitriteoxidation of sulphhydryls: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. The Journal of Biological Chemistry, Bethesda, v. 266, p. 4244 - 4250, 1991.

RANGEL-SANTOS, A. et al. Immunosuppressive role of principal toxin (crotoxin) of *Crotalus durissus terrificus* venom. Toxicon, Oxford, v. 44, p. 609-616, 2004

RIBEIRO, L. A., JORGE, M. T.; IVERSSON, L. B. Epidemiology of accidents due to bites of poisonous snakes: a study of cases attended in 1988. Revista de Saúde Pública, São Paulo, v. 29, p. 380-388, 1995.

RIBEIRO, L. A.; JORGE, M. T. Alteração do tempo de coagulação sanguínea em pacientes picados por serpente *Bothrops jararaca* adulta e filhote. Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo, São Paulo, v. 44, p. 143 - 145, 1989.

ROCHA E SILVA, M.; BERALDO, W. T.; ROSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. American Journal of Physiology, Stanford, v. 156, p. 261 - 273, 1949.

RODRIGUES, F. G. P. et al. The complement system is involved in acute inflammation but not in the hemorrhage produced by a *Bothrops atrox* snake venom low molecular mass proteinase. Molecular Immunology, Oxford, v. 40, p. 1149-1156, 2004.

ROJNUCKARIN, P. et al. Prognostic factors of green pit viper bites. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Stanford, v. 58, p. 22-5, 1998.

ROMAGNANI, P. et al. Th1/Th2 cells, their associated molecules and role in pathophysiology. European Cytokine Network, Montrouge, v. 11, p. 510-1, 2000.

ROSENFELD, G.; KALEN, E. M. Measurement of the coagulation activity of snake venoms: importance to scientific research and therapeutic application]. Revista Paulista de Medicina, São Paulo, v. 77, p. 149-50, 1971.

RUCAVADO, A. et al. Characterization of the local tissue damage induced by LHF-II, a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity isolated from *Lachesis muta muta* snake venom. Toxicon, Oxford, v. 37, p. 1297-312, 1999

RUCAVADO, A. et al. Increments in cytokines and matrix metalloproteinases in skeletal muscle after injection of tissue-damaging toxins from the venom of the snake *Bothrops asper*. Mediators of Inflammation, Oxford, v. 11, p. 121-128, 2002

RUCAVADO, A.; GUTIÉRREZ, J. M. Blister formation and skin damage induced by BaP1, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. International Journal of Experimental Pathology, Nova Jersey, v. 79, p. 245-256, 1998.

SANO-MARTINS, I. et al. Platelet aggregation in patients bitten by the Brazilian snake *Bothrops jararaca*. Thrombosis Research, Oxford, v. 87, p. 183-95, 1997.

SANO-MARTINS, I.; SANTORO, M. L. Distúrbios hemostáticos em envenenamentos por animais peçonhentos no Brasil. In: Hadad Jr. Animais Peçonhentos do Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. 1a. edição, cap. 31, p. 289-309, São Paulo: Editora Sarvier, 2009.

SANTORO, M. L.; Sano-Martins. I. Platelet dysfunction during *Bothrops jararaca* snake envenomation in rabbits. Thrombosis Haemostasis, Londres, v. 92, p. 369-383, 2004.

SANTORO, M. L. et al. In Vivo Platelet Activation Induced by *Bothrops jararaca* Venom in Rabbits. Platelets, Abindon, v. 5, p. 162-70, 1994.

SANTORO, M. L. et al. - Butantan Institute Antivenom Study Group. Haematological evaluation of patients bitten by the jararaca, *Bothrops jararaca*, in Brazil. Toxicon, Oxford, v. 15, p. 1440-8, 2008.

SARAVIA, N. G. et al. Heterogeneity, geographic distribution, and pathogenicity of serodemes of *Leishmania viannia* in Colombia. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Stanford, v. 66, p. 738-44, 2002.

SCHENKEL, A. R.; MAMDOUH, Z.; MULLER W. A. Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation. Nature Immunology, Nova York, v. 5, p. 393 - 400, 2004

SILVA JR., N. J.; BUCARETCHI, F. Mecanismo de ação do veneno elapídico e aspectos clínicos dos acidentes. In: Hadad Jr. Animais Peçonhentos do Brasil: biologia clinica e terapêutica dos acidentes. 1a. edição, cap. 31, p. 289-309, São Paulo: Editora Sarvier, 2009

STYLIANOU, E.; SAKLATVALA, J. Molecules in focus: interleukin-1. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, Oxford, v. 30, p. 1075-1079, 1998.

TAMBOURGHY, D. et al. Pro-inflammatory activities in elapid snake venoms. Brazilian Journal of Pharmacology, São Carlos, v. 112, p. 723-727, 1998.

TEIXEIRA, C. F. P. et al. Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 100, p. 1812-1814, 2005.

THOMAS, L. et al. Thrombotic stroke following snake bites by the "Fer-de-Lance" *Bothrops lanceolatus* in Martinique despite antivenom treatment: a report of three recent cases. Toxicon, Oxford, v. 48, p. 23-8, 2006.

TORRES, A. F. C. et al. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: Phospholipase A2 and L-amino acid oxidase. Toxicon, Oxford, v. 55, p. 795-804, 2010.

WALFORD, G.; LOSCALZO, J.. Nitric oxide in vascular biology. Journal of Thrombosis and Haemostasis, Londres, v. 1, p. 2112-8, 2003.

WARRELL, D. A. Geographical intraspecies variation in the clinical manifestation of envenoming by snakes. In: Thorpe, W.; Malhorta, A. Venomous snakes: ecology, evolution and snake bites. Oxford, editora: Clarendon Press, 1997.

WHITE, J. Snake venoms and coagulopathy. Toxicon, Oxford, v. 45, p. 951-967, 2005.

WILLIAMS, D. et al. The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snake bite. Lancet, Londres, v. 375, p. 89-91, 2010.

WUSTER, W.; GOLAY, P.; WARRELL, D. A.. Synopsis of recent developments in venomous snake systematics, No. 3. Toxicon, Oxford, v. 37, p. 1123-9, 1999

XAVIER DA SILVA, V.; RODRIGUES, M. T. Taxonomic revision of the *Bothrops neuwiedi* complex (Serpentes, Viperidae) with description of a new species. Phyllomedusa, São Paulo, v. 7, p. 45-90, 2008.

ZAMUNER, S. R. et al. *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms trigger microbicidal functions of peritoneal leukocytes in vivo. Toxicon, Oxford, v. 39, p. 1505-13, 2001.

APÊNDICES

Apêndice A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-paciente



Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde

Centro de Pesquisas



AGGEU MAGALHÃES

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – Grupo Paciente (Apêndice A)

Projeto: “Aspectos da resposta imune em vítimas de envenenamento por *Bothrops erythromelas* (jararaca) antes e após tratamento soroterápico.”.

Eu,, concordo em participar voluntariamente neste projeto que será desenvolvido no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ). Fui informado que o objetivo principal do referido projeto é a investigação da defesa do organismo dos pacientes picados por jararaca antes e após tratamento soroterápico.

Como faço parte do grupo de pacientes, serei submetido a coleta de 10 ml de sangue venoso antes (1 vez) e após (2 vezes) tratamento soroterápico e a exames que incluirão tempo de coagulação, tempo de trombina, tempo de protrombina, tempo de sangria, dosagem de uréia, creatinina, CPK e LDH. O tempo de coagulação é realizado através de retirada de sangue venoso com equipamento a vácuo, o que diminui o risco de contaminação. O tempo de sangria é realizado através de pequeno corte na região da orelha e espera para a tomada do tempo em que o sangue estanca. Todas as informações e os detalhes dos exames que serão realizados serão esclarecidos para mim. Além disso, também fui informado que receberei os resultados desses exames. Todo procedimento será realizado com material estéril descartável e por profissionais de saúde de reconhecida capacidade para executar os procedimentos. Fui informado que a coleta de sangue é um método que utiliza seringa e agulha, por isso pode causar desconforto no local, na hora da picada e que não devo friccionar o local para não haver formação de hematoma, ou seja, pequena mancha roxa. O esquema terapêutico utilizado dependerá da gravidade do envenenamento. Fui informado que se ocorrer qualquer alteração em meu organismo, deverei procurar o médico do posto de saúde. Esse trabalho trará grande benefício, pois indicará se componentes do sistema de defesa do organismo que poderão ser usados como indicadores da resposta terapêutica e se outras células do sistema de defesa do organismo participam na que participam no desenvolvimento do envenenamento em pacientes picados por jararaca em Pernambuco. Antes de minha participação no referido projeto, fui incentivado a pedir esclarecimento adicional que julgasse necessário, esclarecida por um participante do projeto. Estou ciente que poderei recusar ou retirar meu consentimento, em qualquer momento da investigação, sem qualquer punição ou prejuízo. Autorizo a Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ) a utilização das informações obtidas através dos resultados dos procedimentos em reuniões, congressos e publicações científicas preservando, neste caso, a minha identidade. Autorizo, também que o CPqAM/FIOCRUZ poderá estocar amostra biológica para posteriores estudos. Fui informado que para usar a amostra biológica estocada, um pesquisador do projeto entrará em contato comigo.

Estou ciente que este documento é feito em duas vias, ficando uma em minha posse e a outra com a equipe do projeto.

Assinatura do paciente _____

_____ data

Endereço do sujeito da pesquisa: _____

Assinatura do médico responsável – CPqAM/FIOCRUZ _____

_____ data

Pesquisador responsável: Dra. Valéria Rêgo Alves Pereira. Telefone para contato: 81 21012500

Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Av. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Cx. Postal 7472, CEP: 50670-420, Recife – PE, Brasil. Tel.: (081) 3301 2500; Fax: (081) 3453 2449; <http://www.cpqam.fiocruz>.

Apêndice B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupo Paciente
menor (15 a 18 anos)



Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde

Centro de Pesquisas



AGGEU MAGALHÃES

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – Grupo Paciente menor (15 a 18 anos) (Apêndice B)

Projeto: “Aspectos da resposta imune em vítimas de envenenamento por *Bothrops erythromelas* (jararaca) antes e após tratamento soroterápico.”.

Eu,, concordo em participar voluntariamente neste projeto que será desenvolvido no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ). Fui informado que o objetivo principal do referido projeto é a investigação da defesa do organismo dos pacientes picados por jararaca antes e após tratamento soroterápico.

Eu,, responsável por, estou ciente da realização da pesquisa intitulada “Aspectos da resposta imune em vítimas de envenenamento por *Bothrops erythromelas* (jararaca) antes e após tratamento soroterápico” e autorizo o mesmo a participar da referida pesquisa.

Como faço parte do grupo de pacientes, serei submetido a coleta de 10 ml de sangue venoso antes (1 vez) e após (2 vezes) tratamento soroterápico e a exames que incluirão tempo de coagulação, tempo de trombina, tempo de protrombina, tempo de sangria, dosagem de uréia, creatinina, CPK e LDH. O tempo de coagulação é realizado através de retirada de sangue venoso com equipamento a vácuo, o que diminui o risco de contaminação. O tempo de sangria é realizado através de pequeno corte na região da orelha e espera para a tomada do tempo em que o sangue estanca. Todas as informações e os detalhes dos exames que serão realizados serão esclarecidos para mim. Além disso, também fui informado que receberei os resultados desses exames. Todo procedimento será realizado com material estéril descartável e por profissionais de saúde de reconhecida capacidade para executar os procedimentos. Fui informado que a coleta de sangue é um método que utiliza seringa e agulha, por isso pode causar desconforto no local, na hora da picada e que não devo friccionar o local para não haver formação de hematoma, ou seja, pequena mancha roxa. O esquema terapêutico utilizado dependerá da gravidade do envenenamento. Fui informado que se ocorrer qualquer alteração em meu organismo, deverei procurar o médico do posto de saúde. Esse trabalho trará grande benefício, pois indicará se componentes do sistema de defesa do organismo que poderão ser usadas como indicadores da resposta terapêutica e se outras células do sistema de defesa do organismo participam que participam no desenvolvimento do envenenamento em pacientes picados por jararaca em Pernambuco. Antes de minha participação no referido projeto, fui incentivado a pedir esclarecimento adicional que julgasse necessário, esclarecida por um participante do projeto. Estou ciente que poderei recusar ou retirar meu consentimento, em qualquer momento da investigação, sem qualquer punição ou prejuízo. Autorizo a Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ) a utilização das informações obtidas através dos resultados dos procedimentos em reuniões, congressos e publicações científicas preservando, neste caso, a minha identidade. Autorizo, também que o CPqAM/FIOCRUZ poderá estocar amostra biológica para posteriores estudos. Fui informado que para usar a amostra biológica estocada, um pesquisador do projeto entrará em contato comigo.

Estou ciente que este documento é feito em duas vias, ficando uma em minha posse e a outra com a equipe do projeto.

Assinatura do paciente

data

Assinatura do Responsável

data

Endereço do sujeito da pesquisa:

Assinatura do médico responsável – CPqAM/FIOCRUZ

Pesquisador responsável: Dra. Valéria Rêgo Alves Pereira. Telefone para contato: 81 21012500 Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Av. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Cx. Postal 7472, CEP: 50670-420, Recife – PE, Brasil. Tel.: (081) 3301 2500; Fax: (081) 3453 2449; <http://www.cpqam.fiocruz>.

Apêndice C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupo Controle

**Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde**

Centro de Pesquisas

**AGGEU MAGALHÃES****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – Grupo Controle (Apêndice 3)****Projeto: “Aspectos da resposta imune em vítimas de envenenamento por *Bothrops erythromelas* (jararaca) antes e após tratamento soroterápico.”.**

Eu,, concordo em participar voluntariamente neste projeto que será desenvolvido no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ). Fui informado que o objetivo principal do referido projeto é a investigação da defesa do organismo dos pacientes picados por jararaca antes e após tratamento soroterápico.

Como faço parte do grupo controle, serei submetido a coleta de 10 ml de sangue venoso (1 vez) e a exames que incluirão tempo de coagulação, tempo de trombina, tempo de protrombina, tempo de sangria, dosagem de uréia, creatinina, CPK e LDH. O tempo de coagulação é realizado através de retirada de sangue venoso com equipamento a vácuo, o que diminui o risco de contaminação. O tempo de sangria é realizado através de pequeno corte na região da orelha e espera para a tomada do tempo em que o sangue estanca. Todas as informações e os detalhes dos exames que serão realizados serão esclarecidos para mim. Além disso, também fui informado que receberei os resultados desses exames. Todo procedimento será realizado com material estéril descartável e por profissionais de saúde de reconhecida capacidade para executar os procedimentos. Fui informado que a coleta de sangue é um método que utiliza seringa e agulha, por isso pode causar desconforto no local, na hora da picada e que não devo friccionar o local para não haver formação de hematoma, ou seja, pequena mancha roxa. O esquema terapêutico utilizado dependerá da gravidade do envenenamento. Fui informado que se ocorrer qualquer alteração em meu organismo, deverei procurar o médico do posto de saúde. Esse trabalho trará grande benefício, pois indicará se componentes do sistema de defesa do organismo que poderão ser usados como indicadores da resposta terapêutica e se outras células do sistema de defesa do organismo que participam no desenvolvimento do envenenamento em pacientes picados por jararaca em Pernambuco. Antes de minha participação no referido projeto, fui incentivado a pedir esclarecimento adicional que julgasse necessário, esclarecida por um participante do projeto. Estou ciente que poderei recusar ou retirar meu consentimento, em qualquer momento da investigação, sem qualquer punição ou prejuízo. Autorizo a Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ) a utilização das informações obtidas através dos resultados dos procedimentos em reuniões, congressos e publicações científicas preservando, neste caso, a minha identidade. Autorizo, também que o CPqAM/FIOCRUZ poderá estocar amostra biológica para posteriores estudos. Fui informado que para usar a amostra biológica estocada, um pesquisador do projeto entrará em contato comigo.

Estou ciente que este documento é feito em duas vias, ficando uma em minha posse e a outra com a equipe do projeto.

Assinatura do paciente _____

_____ data

Endereço do sujeito da pesquisa: _____

Assinatura do médico responsável – CPqAM/FIOCRUZ _____

_____ data

Pesquisador responsável: Dra. Valéria Rêgo Alves Pereira. Telefone para contato: 81 21012500

Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Av. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Cx. Postal 7472, CEP: 50670-420, Recife – PE, Brasil. Tel.: (081) 3301 2500; Fax: (081) 3453 2449; <http://www.cpqam.fiocruz>.

Apêndice D – Artigo publicado

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 43(4):, jul-ago, 2010

Communication/Comunicação**Humoral immune response of patients bitten by the snake *Bothrops erythromelas***Resposta imune humoral em pacientes picados pela serpente *Bothrops erythromelas***Karla Patricia Oliveira Luna^{1,2}, Edeneide Maria Xavier ², Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal³, Olindo Assis Martins-Filho³ and Valéria Rêgo Alves Pereira²**

1. Department of Biology, Center of Biological and Health Sciences, State University of Paraíba, Campina Grande, PB, Brazil. 2. Department of Immunology, Research Center Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE, Brazil. 3. Laboratory of Biomarkers and Monitoring, Department Research Center René Rachou, Belo Horizonte, MG, Brazil.

Address to: Dra. Karla P. Oliveira Luna. Departamento de Imunologia/Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães. Avenida Moraes Rego S/N, Cidade Universitária, 50.670-420 Recife, PE, Brasil.

Phone: 55 81 2101-2631

e-mail: karlaceatox@yahoo.com.br

Received in 23/03/2010

Accepted in 12/05/2010

ABSTRACT

Introduction: Snake envenomings are a health problem in rural areas of tropical and subtropical countries, but little is known regarding the immune response presented by bitten individuals. The IgM production of patients bitten by *Bothrops erythromelas* snake was analyzed to identify the effectiveness of treatment in this type of envenomation. **Methods:** *Bothrops erythromelas* venom was submitted to electrophoresis and transferred to a nitrocellulose sheet, following incubation with patients' sera. **Results:** A 38 KDa protein was detected before and 24 h after therapy. **Conclusions:** The result suggests that this protein could be used as a marker for individuals envenomed by *Bothrops erythromelas*.

Key-words: Snake venom. Western blotting. IgM. *Bothrops erythromelas*.

RESUMO

Introdução: Envenenamentos ofídicos consistem problema de saúde pública em áreas rurais de países tropicais e subtropicais, mas pouco sabe-se sobre a resposta imune apresentada pelos indivíduos picados, por isso a avaliação da produção de IgM por pacientes picados por *Bothrops erythromelas* identificando a eficácia do tratamento nesse tipo de envenenamento. **Métodos:** O veneno de *Bothrops erythromelas* foi submetido a eletroforese e transferido para nitrocelulose, seguindo incubação com soro de pacientes. **Resultados:** Foi observada proteína de 38KDa antes e 24 horas após o tratamento. **Conclusões:** Os resultados sugerem que essa proteína poderia ser utilizada como marcador para indivíduos envenenados pela serpente *Bothrops erythromelas*.

Palavras-chaves: Veneno ofídico. Western blotting. IgM. *Bothrops erythromelas*.

Snakebites occur worldwide and are a public health problem, victimizing around 421,000 people every year and involving 20,000 deaths¹. The *Bothrops* genus is responsible for 90.6% of the reported envenomings². In Northeastern Brazil, the endemic species is *Bothrops erythromelas*, locally known as *jararaca-da-seca*. *Bothrops* venoms induce local and systemic hemorrhaging, coagulopathy, edema, local necrosis and can lead to death and/or permanent disabilities³⁻⁵. Since little is known regarding the isotype and specificity of antibodies produced by patients bitten by the *Bothrops erythromelas* snake, this paper describes the immune response in three groups of patients bitten by this snake in the city of Campina Grande, Paraíba State, Brazil.

Serum samples before treatment, 12 and 24 h posttreatment were collected from patients bitten by the snake *Bothrops erythromelas*. At the hospital, these patients were separated into three groups, according to the severity of envenomation: mild⁴, moderate⁴ and severe³. All patients were submitted to serum therapy at the same hospital. Those who agreed to participate in this study signed a term of free,

informed consent. This study was approved by the Ethics Comitee of the Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). Blood was collected immediately after patient admittance to the hospital. Serum was collected, centrifuged and stored at -20°C till the moment of analysis. Antigens of *Bothrops erythromelas* venom that react with patient antibodies were analyzed by western blotting, following Towbin et als.

To determine whether patient antibodies reacted to venom antigens showing an IgM production pattern, pools of serum from all the patients collected before treatment were analyzed. In all patients, whether classified as mild, moderate or severe envenomation, the main 38KDa protein was detected.

To evaluate the pattern of antibodies recognizing IgM after 24 h of treatment, all patients were again analyzed and the same protein was detected (**Figure 1**).

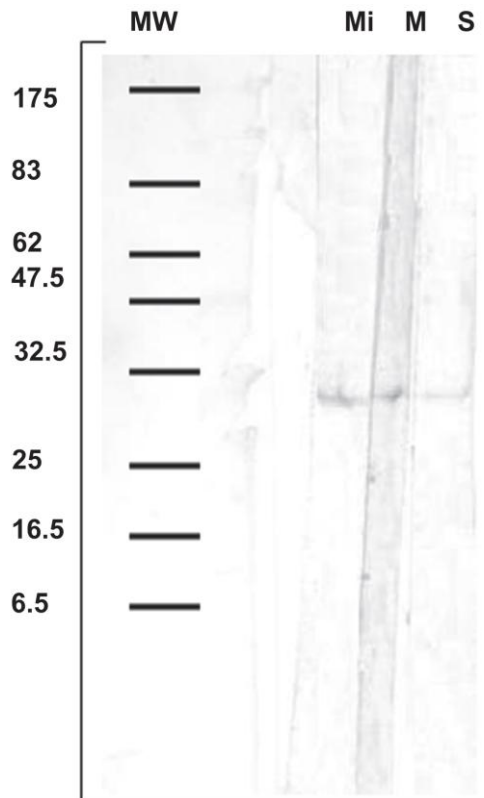


Figure1 - Immunoblotting showing the reaction of *Bothrops erythromelas* venom and serum of patients after 24hours treatment; 25µg of *Bothrops erythromelas* venom diluted 1:100 were electrophorased on 10% SDS-PAGE under non reducing conditions and transferred to a nitrocellulose paper, blocked with 5% milk containing 0,05% Tween 20 and incubated with patients serum under 4°C overnight. Estimated molecular markers are shown.

(Mi) mild, (M) moderate, (S) strong envenomation.

It should be emphasized that despite serum therapy, the antibody response to *Bothrops erythromelas* followed a humoral immune response which is classic for many diseases: primary IgM production. This IgM production was previously observed using *Bothrops jararaca* venom with patients bitten by this snake⁷.

In this work, the main 38KDa protein was observed before and 24h after therapy. It is important to highlight that this could serve as a marker for *Bothrops erythromelas* envenomation, since this protein is not well neutralized by the commercial antivenom used in Brazil, perhaps because the antivenom pool does not include the *Bothrops erythromelas* species. The pool of antivenom used in Brazil may have a low efficacy for *B. erythromelas* venom neutralization.

In another study, the authors had previously observed that *Bothrops jararaca* venom is not well neutralized by the commercial antivenom, since patients analysed showed different patterns of recognition, which could implicate the genetic background of each patient or the degree of absorption of venom components⁷. In this study, the authors elucidated a clearer understand regarding the humoral immune response elicited by patients bitten by *Bothrops erythromelas* as a way of developing a potential new therapy approach.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank CEATOX-Campina Grande, PB, where patients were selected and Répteis da Caatinga, from where venom was purchased.

CONFLICTS OF INTERESTS

The authors declare that there is no conflict of interest.

FINANCIAL SUPPORT

Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ.

REFERENCIES

1. Kasturiratne A, Wickremasinghe AR, de Silva N, Gunawardena NK, Pathmeswaran A, Premaratna R, et al. The global burden of snakebite: a literature analysis and modeling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS Medicine* 2008; 11:e218.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Acidentes ofídicos: contribuição ao estudo da morbidade; 1990.
3. Markland FS. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon* 1998; 36:1749-1800.
4. Bjarnason JB, Fox JW. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacol Ther* 1994; 62:325-372.
5. Gutiérrez JM, Lomonte B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. *Mem Inst Butantan* 1989; 51:211-223.
6. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76:4350-4354.
7. Domingos MO, Cardoso JL, Moura-da-Silva AM, Mota I. The humoral immune response of patients bitten by the snake *Bothrops jararaca* (jararaca). *Toxicon* 1990; 28:723-726.

Apêndice E – Artigo aceito

Evaluation of immune response of individuals envenomed by *Bothrops erythromelas* serpent

Karla P. O. Luna ^{1, 2}, Andresa Pereira de Oliveira¹, Amanda Ferreira de Almeida¹, Cristiane Moutinho Lagos de Melo¹, Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro¹, Marina de Assis Souza¹, Sayonara M. L. Fook², Eduardo J. M. Nascimento³, Valéria R. A. Pereria^{1*}

¹Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães CPqAM/FIOCRUZ, Pernambuco, Brazil, ²Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, Brazil, ³Center for Vaccine Research, University of Pittsburgh, Pennsylvania, USA.

***Correspondence address:** Valéria Rêgo Alves Pereira, Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Av. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, CEP: 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil.

Fax: 55-81-21012640, Phone: 55-81-21012631.

e-mail: valeriaph@gmail.com

Abstract

Snake bites are a neglected health problem, mainly in rural areas of the world. The clinical, epidemiological and immunological knowledge of envenomings by health professionals provides a better identification and implementation of appropriate treatment. This paper aimed to evaluate these aspects related to *B.*

erythromelas envenomation of the patients attended at Hospital Regional de Urgência e Emergência de Campina Grande. Results showed that cellular immune response was highly selected for various cells and immune system markers, even after treatment, independent of the severity of envenomation. It is important to achieve the knowledge of a range of signs and symptoms of snake envenomings, once it will lead to a better understand and treatment of the individuals bitten.

Key-words: epidemiology, *Bothrops erythromelas*, nitric oxide, cytokines, cytometry.

1. Introduction

Snake envenoming are a health problem mainly in rural areas of tropical and subtropical countries. In Brazil, almost 30.000 snake bites are reported annually, resulting in more than 100 deaths (0.4%) (Brasil, 2003). In northeastern region of Brazil, *Bothrops erythromelas* is the endemic species, being responsible for 210 bites in Paraíba state (SINAN, 2009). People bitten by *B. erythromelas* snake, present local effects at the region of the bite, such as edema, ecchymosis and blisters. On the most severe cases, systemic manifestations such as gengival bleeding, hematuria and epistaxis and coagulation disturbances may occur (Rosenfeld, 1971). Since *B. erythromelas* venom is not miotoxic (Vasconcelos et al., 1996) people bitten by this snake do not present lysis of skeletal muscle cells

Since most of envenomed individuals do not see the snake at the moment of the bite, evidences of the striking snake are missing for the clinician, thus diagnosis is mostly based on clinical features (Santoro et al, 2009). The clinical manifestation can be classified as mild, moderate or severe, each one requires a different regimen of treatment (França and Málaque, 2003).

Immunological response after *B. erythromelas* envenomation has not been fully characterized. In addition, few studies have been published thus far focusing on clinical and epidemiological aspects involved on envenomation by this serpent specie in Northeastern of Brazil. So that, in order to better understand the status of immune system after *B. erythromelas* envenomation, some aspects of innate and adaptive immune response were assessed, such as plasma level of inflammatory and anti-inflammatory cytokines as well as production ex vivo of IFN- γ and nitric oxide (NO) in subjects bitten by *B. erythromelas* snake. In this study we presented evidences that suggest a immunosuppression caused by the envenomation by *B. erythromelas*.

2. Material and methods

2.1 Patients

16 patients admitted at the hospital (Hospital de Urgência e Emergência de Campina Grande) in Paraíba, Brazil, with clinical diagnosis of *Bothrops* envenoming were included in this study. After a clinical evaluation, envenomed patients were classified as mild, moderate or severe according to the extension of the swelling and bleeding at the region of snake bite and occurrence of hemorrhage. The mild group was characterized by local swell and bleeding

as well as hemorrhage; the moderate group was characterized by more severe local swelling and bleeding as well as hemorrhage; the severe group presented severe swelling, local bleeding and blisters as well as severe hemorrhage. The individuals received specific antivenom treatment and the dose was dependent on the clinical manifestations according to the Brazilian Ministry of Health guidelines (Ministério da Saúde, 2001). The mild, moderate and severe cases were treated with 4, 8 and 12 vials of antivenom respectively. As a control group, healthy individuals with no history of envenomation by snakes were included in this study.

Blood samples (20 ml) were collected by venipuncture at the time of hospital admission (before treatment) as well as 24 hours and 48 hours after envenomation using both heparinized and dry tubes (vacuette). This study was approved by the ethics committee of the Aggeu Magalhães Research Center (Oswaldo Cruz Foundation) and all patients consented to participate of this study (CAEE – 000.50095.000.08).

2.2 Clinical and epidemiological evaluation

Medical staff of the participating hospital performed clinical evaluation of all patients. Epidemiological analysis was carried out in order to evaluate important parameters, such as local of occurrence of the accident (whether rural or urban areas and city of occurrence), name, sex, age, local of bite, hemorrhage, swelling, clotting time, platelets number, complete blood count, bleeding time, local necrosis and systemic bleeding. All clinical aspects were considered in relation to the time length between snake bite and patient hospital admission.

Blood coagulation time was assessed using two tubes incubated in water bath for 30 minutes at 37°C. Platelets were counted electronically in a automatized system (hematological counter Advia 60).

2.3 Cytokine determination in culture supernatants

Whole-blood collected before and after antivenom treatment were cultured at 37 °C and 5% CO₂, in 24-well plates (TPP, Switzerland) with *Bothrops erythromelas* venom (5, 2.5 and 1 µg/mL), Phytohemagglutinin (5 µg/mL) or Concanavalin A – Con A (2.5 µg/ml) during 24h. Blood cultured in culture medium only was used as negative control. Then, plates were centrifuged at 1800 x g for 10 minutes, at room temperature (RT) and the supernatants were harvested and stored at -80°C until analysis. IFN-γ levels were measured in the supernatants using capture ELISA OptEIA Set (BD Biosciences) according to the manufacturer direction using half-area ELISA plates (Costar). The plates were developed with 2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate and the reaction was stopped with sulfuric acid 1M. Subsequently, the plates were read in a plate reader (Bio-Rad 3550) at 415 nm. Cytokine concentration in the samples was calculated, at pg/ml, based on the linear curve of cytokine standard using the Microplate Manager Version 4.0 software (Bio-Rad Laboratories, Vienna, VA). The threshold of IFN-γ detection was 1.95 pg/mL.

2.4 Nitrite detection by Griess method

Whole blood collected before and after antivenom treatment was used to evaluate the production of nitrite after stimulation with either *Bothrops*

erythromelas venom at different concentration (5, 2.5 and 1 $\mu\text{g/mL}$) or polyclonal stimulus, such as Concanavalin A (2.5 $\mu\text{g/mL}$) or Phytohemagglutinin (5 $\mu\text{g/mL}$) for 24hs, 48hs, 72hs and 6 days. As negative control, whole blood was cultured with media only. Twenty-five microliters of culture supernatants were added, in duplicate, into a 96-well half area ELISA plates (Costar) followed by the addition of 25uL of Griess reagent (Ding et al., 1988). NO concentration was estimated by the standard curve (3.12 - 100 $\mu\text{mol/mL}$) dissolved in RPMI medium supplemented with 2% of fetal calf serum (Cultilab, Brazil). The plates were read in a plate reader (Bio-Rad 3550) at 450 nm. NO concentration in the samples was calculated, at $\mu\text{mol/mL}$, based on the linear curve of NO standard using the Microplate Manager Version 4.0 software (Bio-Rad Laboratories, Vienna, VA).

2.5 Flow Cytometry analysis

Peripheral blood 100 μl aliquots of patients and controls, collected with EDTA, were transferred to cytometry tubes containing monoclonal antibodies specific for the following cell surface markers: CD3 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA), CD4 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA), CD8 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA), CD16 (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA), CD19 (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA), CD25 (E-Bioscience, San Diego, CA, USA), CD55 (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA), CD11B (E-Bioscience, San Diego, CA, USA), CD35 (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA), CD88 (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA), CD32 (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) and CD18 (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). After homogenization in a vortex, the mixture was incubated for 30 minutes. After

that, the samples were submitted to erythrocytes lysis, followed by 2 washes with PBS and 2 centrifugations (400 x g), with posterior resuspension in 400 μ l of 1% paraformaldehyde. The cells immunophenotypic and morphometric parameters were determined by flow cytometry (FACSCalibur- Becton Dickinson) using the CELLQuestPro™ (BD Biosciences) for acquisition and analysis of data (50.000 events). Analysis was performed using lymphocyte, monocyte or granulocyte region, according to the marker, and data were analyzed using nonparametric tests.

Analysis of Th1 and Th2 cytokines and chemokines in sera samples from envenomed individuals

Levels of cytokines Th1 (IL-2, IFN- γ and TNF- α) and Th2 (IL-4, IL-6 and IL-10) as well as the chemokines IL-8, RANTES, MIG, MCP-1 and IP-10 were analyzed through cytometric bead array (BD Biosciences) following the manufacturer directions. The concentration of each cytokine/chemokines was calculated using the BD CBA software (BD Biosciences).

2.7 Statistical analysis

To detect differences (of averages) between groups, the Mann-Whitney *U* test and Kruskal-wallis were used. All results were expressed by mean values of groups \pm standard deviation and were analyzed considering $p < 0.05$ as statistically significant.

3. Results

3.1 Demographic data

Results showed that clinical observations and laboratorial tests confirmed *Bothropic* envenoming in 16 patients available. 9 patients were classified as mild envenomation, 4 patients were classified as moderate envenomation and 3 were classified as severe envenomation. Platelet count was lower in only three patients being two mild and one severe.

Clotting time was altered in all 16 patients and raising 12 hours after treatment. This behavior was different for two of them which were yet uncoagulable after treatment. However, bleeding time was not altered in any patients.

Clinical and epidemiological aspects were available in envenomed patients (Table 1). Results showed that the average of age of envenomed patients was 46.years old. Beyond, men patients was the most affected in envenoming (93.75%) and all patients were resident in rural area.

Data demonstrated that bites occurred irregularly from June to December and feet were the body anatomical region most affected by snake bites (56.25%). Table 1 also shows that the most *Bothropic* accidents were classified as mild envenomation (56.25%) and patients received hospital care until 3 hours after envenomation (56,25%). Finally, clinical manifestations most prevalents were pain and edema (81.25% for both) and hemorrhage and head ache were systemic disorders observed in 25% of patients (see Table 1).

3.2 Levels of cytokines and chemokines in sera samples from subjects envenomed by *B. erythromelas*

Levels of cytokines and chemokines were analyzed in sera samples collected after hospital admission, and before start of antivenom treatment, from subjects with diferente clinical manifestations. Tables 2 and 3 depict the average concentration of the cytokines/chemokines analyzed. Mann-Whitney analysis was then carried out in order to compare the levels of different proteins between subjects suffering mild and moderate/severe clinical manifestations. According to the results, the levels of all cytokines/chemokines analyzed were statistically similar between mild and moderate/severe clinical manifestations.

3.3 *IFN- γ* were not produced from the patient's cell after stimulation with venom

Interferon-gamma levels were determined as above described. The measurements were made before serum therapy (0h) and in two moments after treatment (12h and 24h) to the mild-envenomed patients, and at 0h and 12h moments to the ones with moderate envenomation. In 0h and 12h moments, in the presence of the mitogen, lower amounts of the cytokine were produced by the patients with mild (Figure 1) (0h: $113,8 \pm 203,3$, $P=0,008$; 12h: $205,8 \pm 176,8$, $P=0,004$) and moderate + severe envenoming (Figure 2) (0h: $240,6 \pm 79,34$, $P=0,0079$; 12h: $266,6 \pm 277,3$, $P=0,015$) in relation to the control group ($1080 \pm 254,2$). Similar results were found in response to the snake venom, which stimulated higher *IFN- γ* levels in non-bitten individuals ($754,2 \pm 413,2$) in comparison to the bitten ones (mild – 0h: $197,7 \pm 236,7$, $P= 0,018$; 12h: $194,5 \pm 195,6$, $P=0,017$ / Moderate – 0h: $191,2 \pm 75,17$, $P=0,015$; 12h: $131,6 \pm 118,8$,

P=0,016). The production of IL-10 was minimal or undetectable in the control group and patients (data not show).

3.4 Nitric oxide was produced on statistical levels by the patients

Nitric oxide was release in higher levels in cultures of supernatants of envenomed patients. Cells cultured with *Bothropic* venom, *in vitro*, by mild envenomed patients, showed higher and statistical NO production at all times analyzed (Figure 6). Con A and *Bothropic* venoms (at 5 and 1 µg/mL) induced higher values in relation to control (cells without stimulus) in 0, 12 and 24 hours of assay. PHA induced statistical results at 12 and 24h (Figure 7) and *Bothrops* venom (at 2.5 µg/mL) induced higher NO production at 0 and 24h (Figure 4 A and C).

Moderate + severe envenomed patients also demonstrated higher levels, in cultures of supernatants, of NO. Cells cultures stimulated, *in vitro*, with *Bothrops* venoms (Figure 8) and PHA showed higher induction of NO release at 12 and 24hours of culture (Figure 9). *Bothropic* venom (at 2.5 µg/mL) and Con A stimulus only induced higher NO production at 24 hours (Figure 5A). Control cutures were performed for analyze NO production by cells of health (not bite peoples) and results showed higher NO release induced by Con A, PHA and *Bothropic* venoms (5, 2.5 and 1 µg/mL) in relation to control (cells without stimulus) (Figure 10).

3.5 Cytometric analysis

With respect to the lymphocyte population we realized that the markers varied according to the severity of poisoning and with the time for the treatment administration (Figures 11).

The marker CD3, that characterize T-lymphocytes, showed the following profile: At 0 h, patients with mild envenoming had a inferior percentage than CT, while the patients with moderate or severe envenoming had superior percentage of expression.

After administration of ampoules of antivenom and evaluation with 12h, it was seen a decrease in the percentage of these cells in the peripheral blood of patients with mild envenoming that was reversed after 24 hours, returning to levels close to 0h, while in moderate and severe patients was observed an increase within 12 hours, followed by the return to levels near to the initial ones at 24 hours. To investigate these CD3⁺ lymphocytes, we also assessed the markers CD8, CD4 and CD25 alone.

With regards to CD8 cytotoxic T lymphocytes, it was observed that mild envenoming patients had lower quantity at 0h than the CT, and that moderate and severe patients had a higher and a significant amount when compared to controls. With 12 hours the mild patients showed an increase in the presence of these markers in the peripheral blood, the patients with moderate and severe envenoming decreased and the percentage of both groups had stabilized 24 h after treatment. Concerning, the percentage of CD4⁺ T cells, helper T lymphocytes, in the circulation it was seen that severe and moderate patients had values below CT, which tended to increase 12 h after treatment with antivenom but decreased 24h after treatment. Regarding CD25, IL-2 receptor

and also associated with regulatory T cells, it was found that all patients had levels higher than controls, with the proportion of CD25⁺ T cells being significant in mild patients, and that populations behaved in a similar way with the pattern observed with CD4. The patients with mild envenomning had significantly differences in all evaluated times, compared to control, and the moderate and severe patients had a significant difference 24 h after treatment (Figure 12)

Regarding NK, evaluated through the expression of CD16, we found that mild patients had stable levels of CD16⁺ lymphocytes in peripheral blood, while moderate and severe patients decreased their percentage 24 h after treatment. It is interesting to note that 24 h after treatment with antivenom the markers CD3, CD4, CD8 and CD16, tended to have similar percentages values between the groups of patients (Figure 13).

It is known that the response to poisoning is mainly a humoral response, and therefore we evaluated the percentage of CD19⁺ cells in peripheral blood, since that is a marker of B lymphocytes. The percentage of B lymphocytes was similar among the groups and controls. In regard to the expression of CD32, co-receptor of the Fc domain of IgG (FcγRIIA), it is known that the interaction of this receptor with IgG triggers many biological responses and provides a link between the humoral and cellular response in the immune system. It is also known that CD32 acts as an immune modulator, with decreased production of antibodies in the presence of IgG.

Knowing that it was observed an interesting data: the patients with mild envenomning at 0h had a significant lower expression of this co-receptor and that 12 hours after the administration of antivenom it was seen a slight and significant increase in the expression of this co-receptor in these patients,

consistent with their recovery and consequent reduced need for production of IgG, which expression was also significant at 24h. In the moderate and severe patients it was observed levels similar to controls at 0h, and a slow decrease in its expression after treatment.

Monocytes and granulocytes (neutrophils, eosinophils and basophils) are the cells that show receptors of the complement system, CD11, CD35, CD55 and CD88. In the patients we saw, regarding CD11 and CD35, that the patients showed an increased expression of these markers 12 h after treatment with antivenom, with subsequent decrease after 24 h of treatment. Regarding CD88, we saw an increase in its expression by mild patients 12 hours after treatment and a decrease in moderate and severe patients; 24h after treatment the patients with moderate and severe increased their percentage in the peripheral blood while the mild patients markedly decreased their expression of the marker. We observe, in relation to CD55, an increase 12 h after treatment followed by a decrease in the expression of all patients 24 h after treatment, with progression to levels similar to 0h. Finally, the CD18 had higher expression levels by mild patients before treatment, which tended to decrease after treatment, while the opposite was seen in moderate and severe patients, which had their CD18 expression levels increased with treatment.

4. Discussion

Bothrops erythromelas envenomation is a public health problem in northeastern Brazil. The main toxins in *Bothrops* genus elicits, among other alterations, coagulopathy, thrombocytopenia, edema and inflammation (Kamiguti et al., 1996). As clinical, epidemiological and immunological studies of

B.erythromelas envenomation in human are little, the aim the present paper was investigated the clinical and epidemiological aspects and the involvement of immunological mediators related to *B. erythromelas* envenomation of the patients in northeastern Brazil. Our group observed that of the twenty-seven patients evaluated only 3 presented low levels of platelet counts before treatment. This result is in agreement with previous studies (Hutton et al., 1990; Cardoso, 1993). Blood platelets play an important role in hemostasis, starting the development of hemostatic plugs (Cardoso et al., 1993). As low levels of platelet counts is related to the severity of envenomation, we can suggest that the patients included in this study presented most mild envenomation as their platelet counts were normal. Santoro et al. (2003) observed that patients bitten by smaller *B. jararaca* presented a higher platelet counts which could not be completely understood, as incoagulability is more commonly observed in individuals bitten by smaller than larger *B. jararaca*.

Simple coagulation tests can be used to diagnose systemic envenoming and control the antivenom doses (Sano-Martins et al., 1994). In this study we observed 81,4% of patients presenting prolonged clotting time (data not shown), which corroborate with other studies (Kamiguti et al., 1996; Kamiguti, 1988; Santoro et al., 2008), as it is known that *Bothrops* venoms has the ability of activate blood coagulation (Sano-Martins et al, 1994).

Envenomation inflicted by snakes of the Viperidae family is usually characterized by prominent local effects such as necrosis, haemorrhage, edema forming and pain (Gutiérrez and Lomonte, 1989; 1997; Warrel, 1995, Teixeira, 2003). Those effects, however, are not well neutralized by the antivenom used (Cardoso, 1993; Picolo et al., 2002), even though, they are the

only effective treatment for snake bite envenomation (Warrel, 1992). In the present study we observed that pain was the most referred local manifestation by the individuals bitten by the snake *B. erythromelas*, followed by edema. These data corroborate with other studies, either experimental (Chacur et al., 2001; Picolo et al., 2002) or with humans (Cardoso et al, 1993; Jorge et al., 1995).

There is a high quantity of components on *Bothrops* venoms that compromise haemostasy. So that it is common a high frequency of bleeding caused by this type of envenomation. Those bleedings can be distinguished as local and systemic (Sano-Martins e Santoro, 2003). In the majority of the cases bleeding is stopped after antivenom therapy, although some brain bleeding has been related in some cases which can lead patient to death (Kouyoumdjian et al., 1991). In the present study 4 patients presented haemorrhage after envenoming returning to normal after treatment. All 4 patients were classified as moderate or severe envenomation and the type of haemorrhage was epistaxis and gingival haemorrhage.

The predominance among male aging between 20 to 30 years old shows that this age range is the most affected by snake bites. These data may indicate the insertion of young men in the work more than women. The Brazilian Ministry of Health data (2003) show that in 52,3% of notifications the prevalence is for 15 to 49 years old, which correspond to the work force. Male were the most exposable to this injury with 70% of the bites. In this study was observed the prevalence of the agriculture activity and the rural area. In Northeast region of Brazil it is observed a greater activity in the planting and harvest periods. So that it may have a correlation between the frequency of snake bites and the

period for planting and harvest (Lemos et al., 2009). Those inferences reinforce the fact that snake bites as a work accident. Furthermore, these data confirm the results obtained by Kastiriratne et al (2008) who related that all over the world agricultural activity is a risk factor for snake bites. Seasonality for snake bites must be taken as an important fact which can drive educational prevention. In Southern and South of Brazil snake accidents usually occur from October to April which is the most warm and rainy period of the year for those regions (Brasil, 2003). In Northeastern the accidents occur mostly between May and September with decay after October (Lemos et al., 2009).

Victims were most affected in the inferior members as feet and finger feet. Ribeiro et al (1995) and Moreno et al. (2005) also related feet (43,1%) as the most affected region of the body. So that the use of protection equipments as gloves and boots are indicated.

Mild envenomations were the most observed in this study. This is in accordance with period between bite and hospital care and also with other authors (França et al, 2003; Ribeiro et al, 2001). Although Santoro et al. (2008) showed that time between bite and hospital care is not related.

The most clinical features observed in this study were pain and edema. It is well known that *Bothrops* envenomings are characterized by pain, edema, haemorrhage, local necrosis, ecchymosis, blisters (Rosenfeld, 1971; Brasil, 2003). Haemorrhage was the most systemic manifestation observed in this study, as also related by other authors (Sano-Martins, 1995; Santoro et al., 2008) followed by cephalgia. This haemorrhage was soon stopped after antivenom therapy, except for one patient who presented epistaxis and remained bleeding for more 2 days after treatment.

Considering that mediators immunologicals are relevant tools for understanding the actions of the *B. erythromelas* venom, in the present study, the production of IFN- γ e IL-10 was analyzed in culture supernatants of patients in different stages of the serum therapy. Cytokines are soluble protein mediators important for the orchestration of inflammatory responses of the human body (Romagnani, 2000). Although IL-10 has not been produced, it is interesting to notice that, before treatment (0h moment) and after 12h that, the patients with both envenomment degrees exhibited significantly lower concentrations of the IFN- γ comparing to the control group, in response to ConA. Jararaca venom elicited the same response profile. Within 24h after serum therapy, there was not statistical significance between the means of IFN- γ presented by mild-envenomed individuals and health donors. From these data, one can postulate that *Bothropic* venom exerts somehow an immunosuppressive effect on the immune response of the patients. Immunossuppression exerted by snake venoms was previously pointed by Rangel-Santos et al. (2004) and Cardoso et al. (2001), who studied the influence of crotoxin, a protein from rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom, in cell proliferation, viability and *in vitro* production of cytokines in mice.

The production of NO for these patients was also evaluated. Nitric oxide is an important mediator that has been involved in the genesis of a variety of pathological conditions into inflammatory process after injury, as edema and formation of inflammatory infiltrate (Neto et al., 2006). Nitric oxide synthesis may be induced through increased of inducible NOS (iNOS) expression and this NO produced may induce tissue damage, as necrosis, hemorrhage and edema and contribute to strong vasodilating action (Hogg et al., 1992; Lomonte et al.,

1993; Petricevich et al., 2000). Beyond, as NO can promote leukocyte migration (Cirino et al., 2003) and as neutrophils play a role in muscle regeneration in snake venoms (Teixeira et al., 2003), this mediator had been investigated as possible therapeutic agent against *Bothrops* envenomation (Neto et al., 2006).

Previous assays, performed by our group (*in press* data), also showed higher NO release in mice splenocytes cultures that received, *in vitro*, *Bothropic* stimulus (100, 10 and 1 µg/mL). Results showed the pro-inflammatory profile of this snake venom. Similar to our studies, many studies has been demonstrated a significant increment of nitric oxide in serum of *Bothrops* envenomation (Barros et al., 1998; Tambourgi et al., 1998; Petricevich et al., 2000; Escocard et al., 2006). Zamuner et al. (2001) to better understand the ability of the venoms to induce NO, analyzed iNOS expression from peritoneal macrophages and showed that *Bothrops* venoms induced a significant increase of nitrite concentrations, released for macrophages into peritoneal cavities, at 48 hours after venom injection in mice. In addition, others studies had been shows that nitric oxide exerts a cytoprotective role and contributes to vascular homeostasis (Walford and Loscalzo 2003; Endres et al., 2004).

The search for immunological markers that help in determining the severity of cases are useful accessories for the indication that therapy is a reality of the research of envenoming. Since snake venoms are rich in protein and peptide toxins that have specificity for a wide range of tissue receptors, it became important to verify some known cellular markers to determine the effect of poisoning and administration of the antivenom on their expression. By identifying certain markers in cells from peripheral blood, we realized that, in relation to T lymphocytes, a decrease is observed 12 h after treatment followed

by maintenance of similar levels before treatment of CD3, CD4 and CD25 T lymphocytes (in the case some significant points of CD25 compared to control) in mild envenoming patients and a slight increase followed by a slight decrease or maintenance of similar levels before treatment in severe or moderate patients. This may suggest two realities: first a decrease would indicate the migration of these cells into tissues and systems affected, contributing and/or regulating the inflammatory conditions observed and hence its decrease in peripheral blood, however, by the end of treatment and remission symptoms it recover the equilibrium rate in patients with mild envenoming, which was not initially observed in patients with moderate and severe only 24 hours after treatment; The second situation would reflect the normal variation of expression of these markers observed in a population, since it was not seen significant difference compared to control (with some exception in the expression of CD25).

Regarding CD8⁺ T lymphocytes, cytotoxic T cells, we saw its percentage increase in the mild envenoming patients, and a slight decrease in moderate and severe patients. The CD16⁺ lymphocytes, indicative of NK cells, showed a decrease in its expression in moderate and severe patients and it was interesting to observe that mild envenoming patients had a relatively constant percentage of expression before and after treatment. This may suggest the role of these two subtypes in the restoration of homeostasis of the systems in poisoned patients contributing to the death and apoptosis of damaged cells.

With regard to B lymphocytes, identified by the marker CD19, and by the co-receptor for IgG (CD32), it was observed that its expression before treatment and 24 hours after administration of antivenom, remained similar, possibly due

to the administration of serum snakebites in adequate quantities to solve the poisoning, reflecting the importance of the humoral immune response to the resolution of cases with the production of immunoglobulin that neutralize the venom. Regarding CD32 (FcγRIIA), given its immunomodulatory action in the presence of IgG (Lisi et al, 2010), mild envenomed patients had initially percentual values below the control group with subsequent significant increase in the expression of this co-receptor, consistent with the presence of serum snakebites and consequent negative feedback to the endogenous production, while in severe and moderate envenomed patients it was observed a similar level to control, what could you contribute their worse condition, with further slight decrease at 24 hours.

Concerning the complement system receptors, analyzed on monocytes and granulocytes, CD11b, CD35, CD55, CD88 and CD18 was seen that the CD11 and CD35 showed similar behavior, with a slight increase observed in patients within 12 hours and in 24 hours maintenance or slight decrease, possibly indicating a greater activation of the complement system with subsequent phagocytosis of the resulting immune complexes from the interaction of antivenom the immunoglobulin with venom. Regarding CD88, complement C5a receptor that is a potent mediator of inflammation (Gasque et al, 1997), the results indicated a slight increase in the expression of this marker in mild envenomed patients and a decrease in moderate and severe patients to levels similar to those of mild patients before and 24 hours after treatment, in accordance to the gravity of cases of patients and consequently with the observed damage and disease resolution.

The expression of CD55 increased 12h after treatment and then after 24 hours, decreased, which was good for patients to since CD55 inhibits complement activation (Bomm et al, 1991) and consequently jeopardize the formation of immune complexes that could trigger inflammatory processes and deposit in other systems, causing damage and renal complications (Jancar and Crespo, 2004). Finally, CD18, related to extravasation of leukocytes to the endothelium (Kling et al, 1992; Schenkel, 2004) showed higher levels in patients with initially mild envenoming, indicating an increased migration of these cells, and increased levels in moderate and severe patients after treatment (especially in monocytes) related with the recovery of patients and most effective migration of its cells.

It is important to observe that most of the markers studied showed expression values, 24h after treatment administration, similar in both groups of patients or who tended to the same results (decrease or increase). This suggests that after the treatment there is a equilibrium of the immune response that when better characterized will aid the treatment and prognosis of patients.

The variation observed in markers can reflect various aspects such as: time of poisoning and referral to the hospital, number of ampoules administered, amount of venom present in the system, tissue damage prior to administration of the ampoules and migration of cells into tissues and systems affected. To obtain more significant results studies will continue with the evaluation of a larger number of patients aiming to use these markers to help identify the severity of cases and to better understand their importance to the clinical resolution of disease.

The technology of CBA (Cytometric bead array) Th1/Th2 kit allows the evaluation of serum specific inflammatory cytokines and chemokines involved in envenomation. According to preliminary results of cytokines and chemokines produced in the serum of patients, we observed that the results were similar among the clinical forms of envenoming. This may reflect the number of patients used in this study, therefore showing the need for more studies using this approach.

Finally, a comprehensive and deeper understanding of clinical, epidemiological and immunological envenoming associated with *B. erythromelas* provide information for developing new therapeutic approaches aimed at counteracting the deleterious effects involved in this kind of envenomation.

References

Barros, S.F., Friedlanskaia, I., Petricevich, V.L., Kipnis, T.L., 1998. Local inflammation, lethality and cytokine release in mice injected with *Bothrops atrox* venom. *Mediators Inflamm.* 7, 339–346.

Endres M, Laufs U, Liao JK, Moskowitz MA. Targeting eNOS for stroke protection. *Trends Neurosci.* 2004; 27: 283–9.

Walford G, Loscalzo J. Nitric oxide in vascular biology. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 2112–8.

Neto, HS, Vomero, VU, Marques, MJ. L-arginine enhances muscle regeneration after experimental envenomation by *B. jararacussu*: A future for nitric oxide-based therapy? *Toxicon* 48 (2006) 353–357.

Hogg, N., Darley-Usmar, V.M., Wilson, M.T., Moncada, S., 1992. Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. *Biochem. J.* 281, 419–424.

Lomonte, B., Tarkowski, A., Hanson, L.A., 1993. Host response to *Bothrops asper* snake venom: analysis of edema formation, inflammatory cells and cytokine release in a mouse model. *Inflammation* 17, 93±105.

Petricevich VL, Teixeira CFP, Tambourgi DV, Gutierrez JM. Increment in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms. *Toxicon* 2000; **38**: 1253–1266.

Cirino, G., Fiorucci, S., Sessa, W.C., 2003. Endothelial nitric oxide synthase: the Cinderella of inflammation? *Trends Pharmacol. Sci.* 24, 91–95.

Teixeira, C.F.P., Zamuner, S.R., Zuliani, J.P., Fernandes, C.M., Cruz-Höfling, M.A., Fernandes, I., Chaves, F., Gutiérrez, J.M., 2003. Neutrophils do not contribute to local tissue damage, but play a key role in the skeletal muscle regeneration, in mice injected with *Bothrops asper* snake venom. *Muscle Nerve* 28, 449–459.

Tambourgi DV, Petricevich VL, Magnoli FC, Assaf SLMR, Jancar S, Dias da Silva W. The endotoxemic-like shock induced by *Loxosceles* spider venom: pathological changes and putative cytokine mediators. *Toxicon* 1998; **36**: 391–403.

Escocard RCM, Kanashiro MM, Petretski JH, Azevedo-Silva J, Carvalho ECQ, Silva WD, Kipnis TL (2006) Neutrophils regulate the expression of cytokines, chemokines and nitric oxide synthase/nitric oxide in mice injected with *Bothrops atrox* venom. *Immunobiol.* 211: 37–46.

Zamuner SR, Gutiérrez JM, Muscará MN, Teixeira SA, Teixeira CFP (2001) *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms trigger microbicidal functions of peritoneal leukocytes in vivo. *Toxicon* 39: 1505-1513.

Romagnani, S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, vol. 85, no. 1, p. 9–21, 2000.

Cardoso, D.; Lopes-Ferreira, M.; Faquim-Mauro, E. L.; Macedo, M. S.; Farsky, S. H. P. Role of crotoxin, a phospholipase A2 isolated from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on inflammatory and immune reactions. *Mediators of Inflammation*, vol. 10, p. 125–133, 2001.

Rangel-Santos, A.; Lima, C. Lopes-Ferreira, M.; Cardoso, D. F. Immunosuppressive role of principal toxin (crotoxin) of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon*, vol. 44, p. 609–616, 2004.

Gasque P, Singhrao SK, Neal JW, Götze O, Morgan BP. Expression of the receptor for complement C5a (CD88) is up-regulated on reactive astrocytes, microglia, and endothelial cells in the inflamed human central nervous system. *Am J Pathol.* 1997 Jan;150(1):31-41.

Lisi S, Sisto M, Lofrumento DD, D'Amore S, D'Amore M. Advances in the understanding of the Fc gamma receptors-mediated autoantibodies uptake. *Clin Exp Med.* 2010 May 9. [Epub ahead of print]

Boom BW, Mommaas AM, Daha MR, Vermeer BJ. Decreased expression of decay-accelerating factor on endothelial cells of immune complex-mediated vasculitic skin lesions. *J Dermatol Sci.* 1991 Jul;2(4):308-15.

Alan R Schenkel, Zahra Mamdouh & William A Muller. Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation *Nature Immunology* 5, 393 - 400 (2004)

D Kling, J Fingerle and JM Harlan. Inhibition of leukocyte extravasation with a monoclonal antibody to CD18 during formation of experimental intimal thickening in rabbit carotid arteries. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, Vol 12, 997-1007.

Sonia Jancara and Mariano Sánchez Crespo. Immune complex-mediated tissue injury: a multistep paradigm. *Trends in Immunology*, Volume 26, Issue 1, 48-55, 1 January 2005

Luna, K. P. O. M., Xavier, E. M.; Pascoal, V. P. M.; Martins-Filho, O. A.; Pereira, V. R. A. (2010). "Bothrops erythromelas and Crotalus durissus cascavella snake venoms induce pro-inflammatory response in mice splenocytes." *International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research* In press.

Acknowledgements

We are grateful to Lucas Ferreira da Rocha and Maria da Conceição Batista for technical assistance. This study took place with help of the Poison Information Centre (CEATOX-Campina Grande), a service offered by the Pharmacy Department of the State University of Paraíba (UEPB) with the partnership of the Regional Hospital of Campina Grande. This work was

supported by Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE processo APQ-0493-2.11/08) and the Aggeu Magalhães Research Center of the Oswaldo Cruz Foundation in Recife, Brazil (CPqAM/FIOCRUZ).

Table 1 - The clinical and epidemiological characteristics of the study group

Age	Sex	Type of Envenoming	Bite site	Month of occurrence	Local Manifestation	Systemic Manifestation
86	Male	Mild	Hand	June	Edema, Pain	throw up
25	Male	Moderate	Feet	July	Edema, Pain, Echimosis	N.I.
22	Male	Severe	Feet	July	Edema, Pain	gengival hemorrhage
62	Male	Mild	Finger of Feet	July	Edema, Pain, Echimosis	headaches
60	Male	Mild	Finger of hand	July	Edema, Pain	N.I.
62	Male	Mild	Finger of hand	July	Edema	dizziness
60	Male	Mild	Feet	August	Edema, Pain	N.I.
60	Male	Moderate	Feet	August	Edema, Pain, Paresthesia	headaches, throw up
22	Male	Mild	Feet	August	Edema, Pain, Paresthesia	throw up
26	Male	Severe	Feet	August	Edema, Pain, Echimosis, Paresthesia	gengival hemorrhage, throw up, diarrhea
32	Male	Mild	Leg	August	Edema, Pain, Paresthesia	NO
58	Male	Moderate	N.I.	August	Edema, Pain	N.I.
28	Male	Mild	Feet	September	Pain, Paresthesia	N.I.
63	Male	Moderate	Fingers of Feet	September	Pain	NO
65	Male	Mild	Feet	September	Edema, Paresthesia	NO
15	Female	Severe	Feet	Novembre	Pain, Echimosis	gengival hemorrhage, headaches

N.I. = not informed

NO = negative

Table 2. Levels of Th1 and Th2 cytokines in subjects with diferente clinical manifestation of envenomation by *B. Erythromelas* snake. Values are shown in pg/mL.

Clinical Manifestation	IFN- γ		TNF- α		IL-10		IL-6		IL-4		IL-2	
	Avg	SD	Avg	SD	Avg	SD	Avg	SD	Avg	SD	Avg	SD
Mild	1	1	0.4	0.6	6	13	5	71	0.3	0.6	1	1
Moderate + Severe	1	1	0.7	1	4	1	9	1	1	1	1	1

Avg = Average of groups

SD = Standard deviation

Table 3. Levels of chemokines in subjects with diferente clinical manifestation of envenomation by *B. Erythromelas* snake. Values are shown in pg/mL.

Clinical Manifestation	IL-8		RANTES		MIG		MCP-1		IP-10	
	Avg	SD	Avg	SD	Avg	SD	Avg	SD	Avg	SD
Mild	119	73	75	17	414	339	5091	1169	13	16
Moderate + Severe	243	238	95	32	718	660	5060	1446	11	10

Avg = Average of groups

SD = Standard deviation

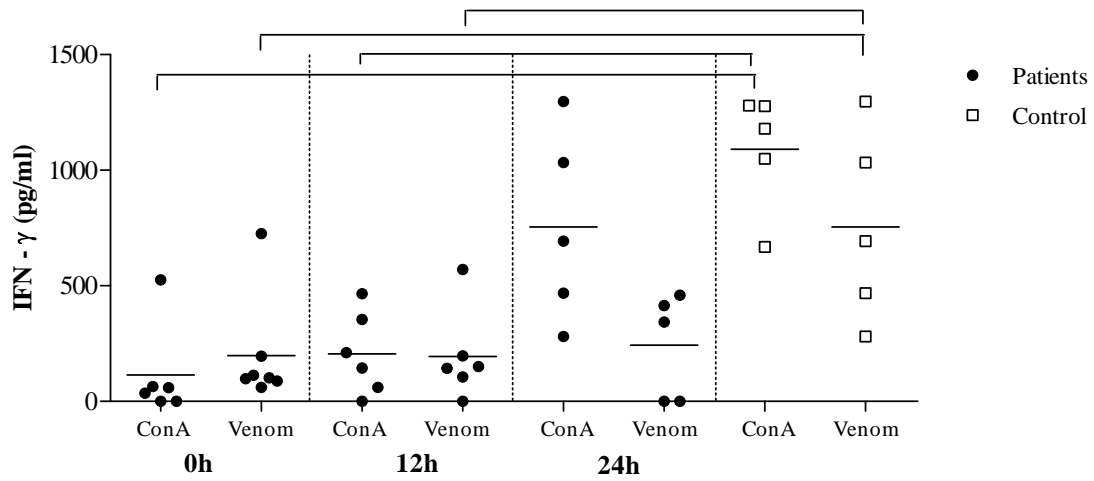


Figure 1: Interferon-gamma (IFN- γ) production by mild-envenomed patients and healthy individuals (Control) in response to Con A and *Bothropic* venom (both 2.5 μ g/ml). The brackets represent the significant results. The horizontal bars represent the mean of the groups.

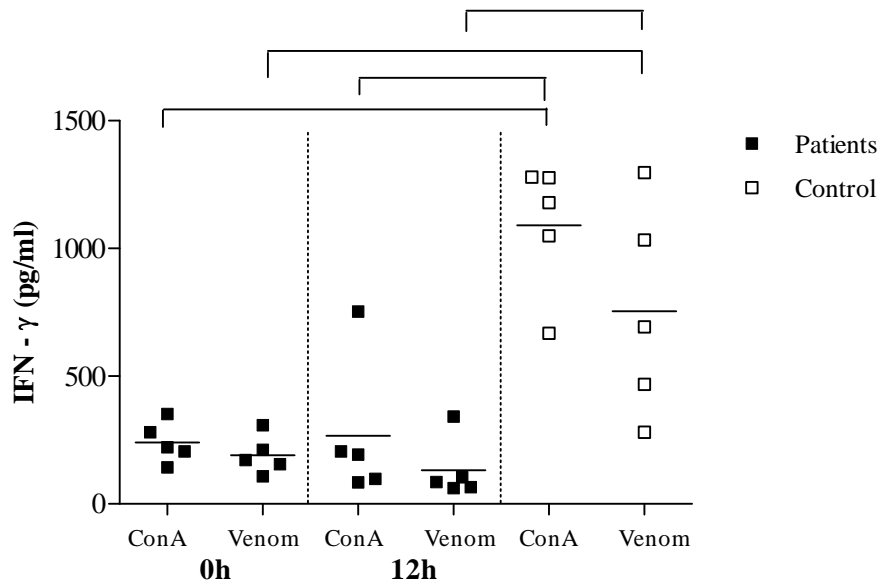


Figure 2: Interferon-gamma (IFN- γ) production by moderately-venomated patients and healthy individuals (Control) in response to Con A and *Bothropic* venom (both 2.5 μ g/ml). The bracket represents the significant results. The horizontal bars represent the mean of the groups.

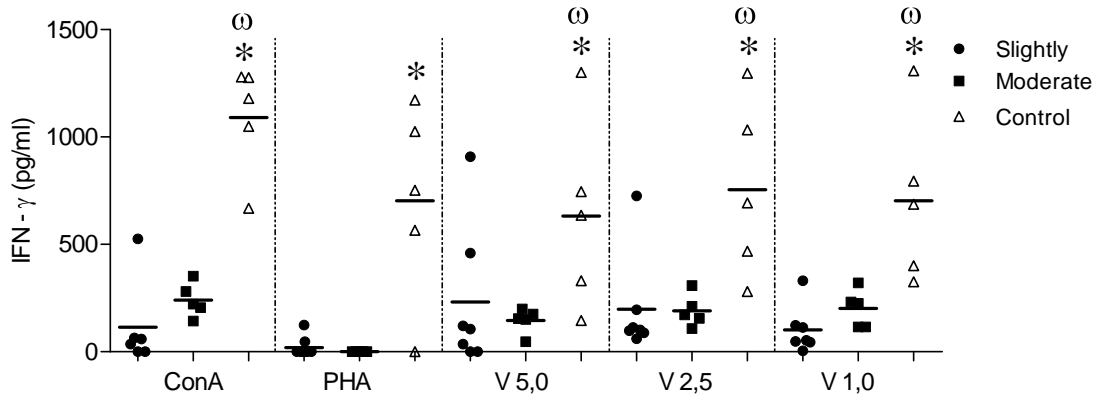


Figure 3: Interferon-gamma production by mild and moderate-venom patients at T0h and healthy individuals (Control) in response to Con A, PHA and bothropic venom in different concentrations. The brackets and the greek letter ω represent the significant levels of the cytokine showed in control group in relation to mild and moderate-venom patients, respectively. Horizontal bars represent the mean of the groups.

Tabela do gráfico T0h

T0					
Stimuli	Mild	valor de P	Mod/Severe	Valor de P	Controls
Con A	114±204	0,008	241±80	0,007	1090±254
PHA	100±176	0,0148	306±97	0,06	703±458
Ven 5,0	232±338	0,001	145±58	0,010	632±444
Ven 2,5	198±237	0,001	191±75	0,010	754±413
Ven 1,0	102±109	0,002	202±87	0,035	703±390

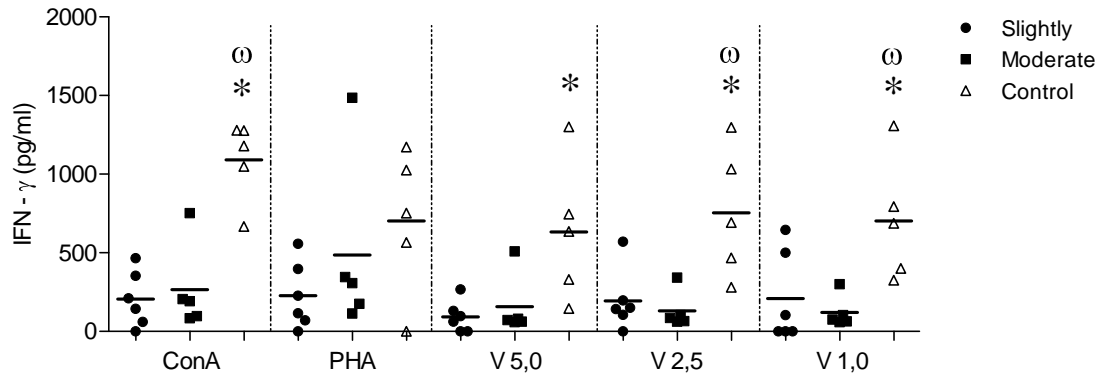


Figure 4. Interferon-gamma production by mild and moderate-venom patients at T12h and healthy individuals (control) in response to ConA, PHA and *Bothropic* venom in different concentrations. The brackets and the greek letter ω represent the significant levels of the cytokine showed in control group in relation to mild and moderate-venom patients, respectively. Horizontal bars represent the mean of the groups.

Tabela do gráfico T12h

T12h					
Stimuli	Mild	valor de P	Mod/Severe	Valor de P	Controls
Con A	206±177	0,004	267±277	0,015	1090±254
PHA	228±213	0,310	485±567	0,240	703±458
Ven 5.0	188±239	0,014	157±197	0,06	632±444
Ven 2.5	195±196	0,017	132±119	0,030	754±413
Ven 1.0	208±289	0,015	120±102	0,035	703±390

Gráfico T24h

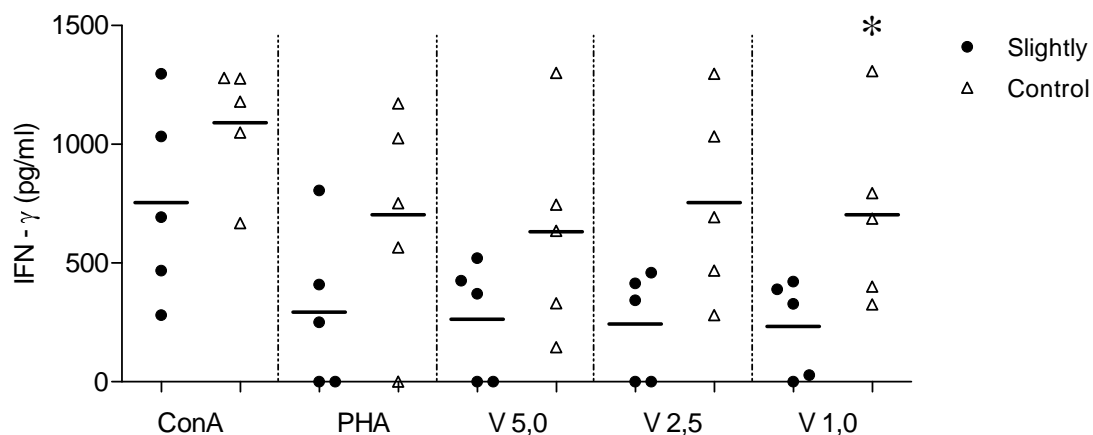


Figure 5: Interferon-gamma production by mild-venom patients at T24h and healthy individuals (Control) in response to Con A, PHA and *Bothropic* venom in different concentrations. The bracket represents the significant levels of the cytokine showed in control group in relation to patients. Horizontal bars represent the mean of the groups.

Tabela do gráfico T24h

T24h					
Stimuli	Mild	valor de P	Mod/Severe	Valor de P	Controls
ConA	341±337	0,059	x	x	1090±254
PHA	293±336	0,230	x	x	703±458
Ven5,0	264±247	0,200	x	x	632±444
Ven2,5	243±226	0,060	x	x	754±413
Ven1,0	233±203	0,017	x	x	703±390

* = Diferença significativa dos controles em relação aos pacientes leves, sob determinado estímulo.

ω = Diferença significativa dos controles em relação aos pacientes moderados, sob determinado estímulo.

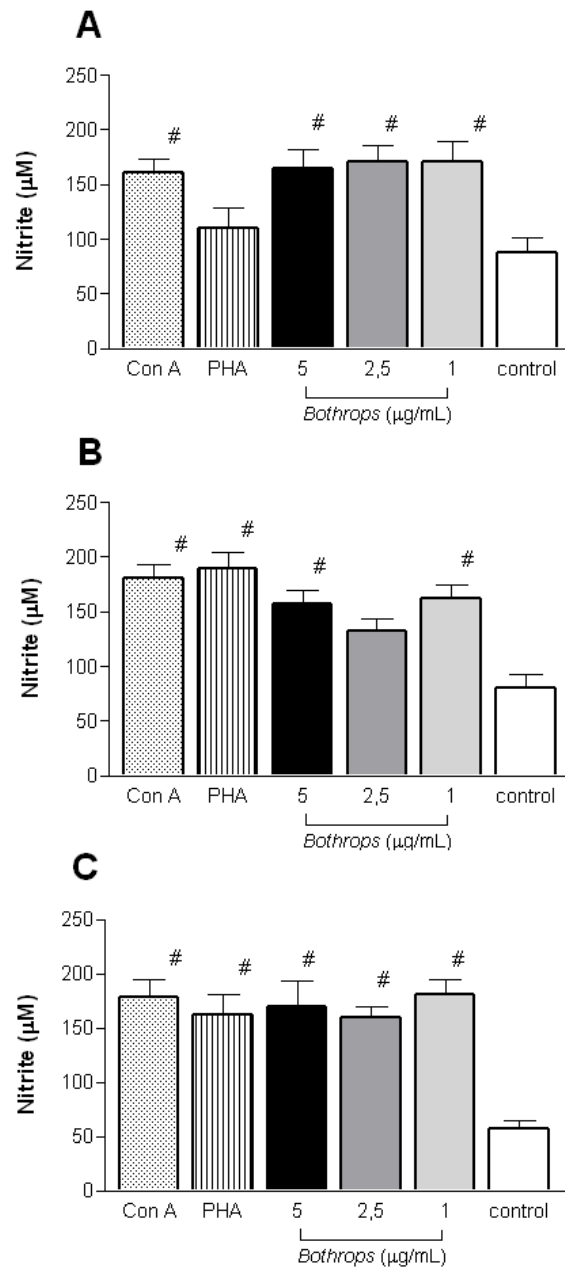


Figure 6: Nitric oxide production induced by different stimulus in cells cultures of mild envenoms patients. **A**, **B** and **C** indicate the experimental times T_0 , T_{12} and T_{24h} , respectively. Con A and *Bothropic* venoms (at 5 and 1 $\mu\text{g/mL}$, respectively) induced higher values in relation to control in all the experimental times. PHA induced statistical results at T_{12} and T_{24h} (**B** and **C**) and *Bothropic* venom (at 2.5 $\mu\text{g/mL}$) induced higher NO production at T_0 and T_{24h} (**A** and **C**). Horizontal bars represent the average of four independent experiments. # $p \leq 0.05$.

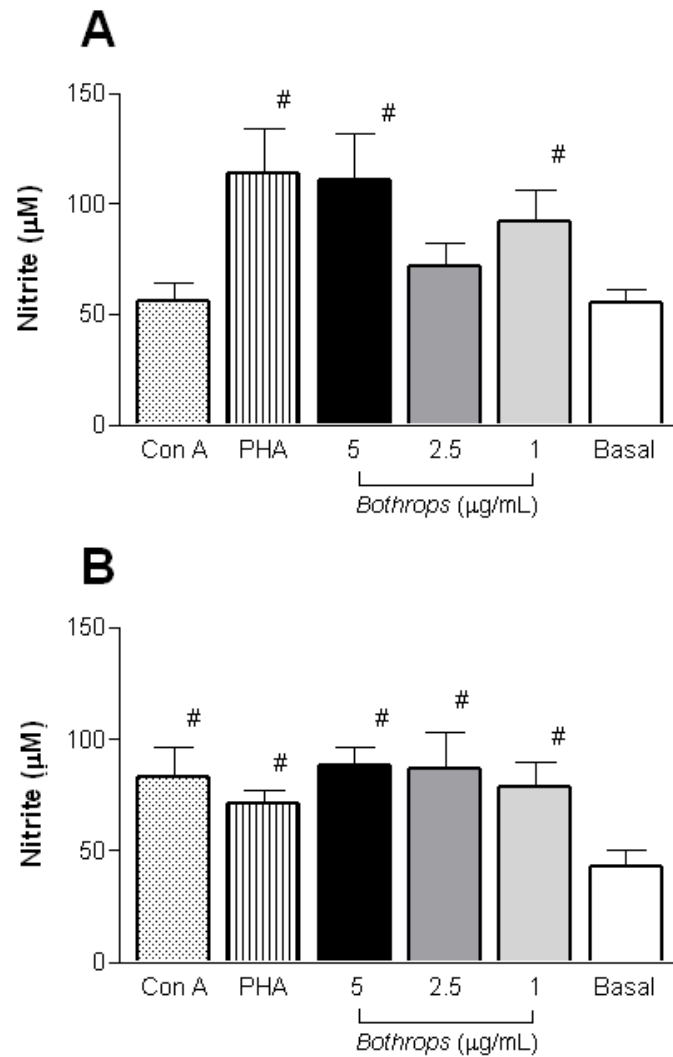


Figure 7: Nitric oxide production induced by different stimulus in cells cultures of severe envenoms patients. **A** and **B** indicate the experimental times T_{12} and T_{24h} , respectively. *Bothropic* venoms (5 and 1 $\mu\text{g/mL}$) and PHA showed higher induction of NO release at 12 and 24hours of culture (**A** and **B**). On the other hand, *Bothropic* venom (at 2.5 $\mu\text{g/mL}$) and Con A stimulus only induced higher NO production only at 24 hours (**A**). Horizontal bars represent the average of four independent experiments. # $p \leq 0.05$.

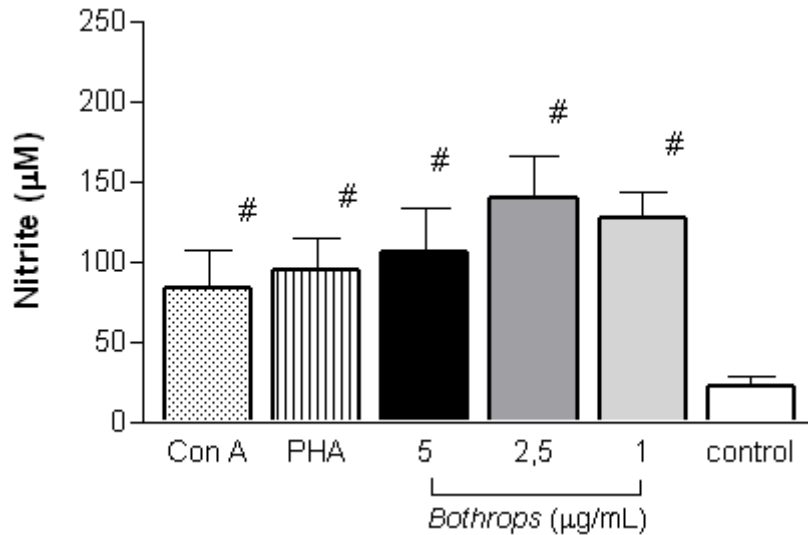


Figure 8: Nitric oxide production induced by different stimulus in cells cultures of health people. Con A, PHA and *Bothropic* venoms (5, 2.5 and 1 µg/mL) induced higher NO release in relation to control. Horizontal bars represent the average of four independent experiments. # $p \leq 0.05$.

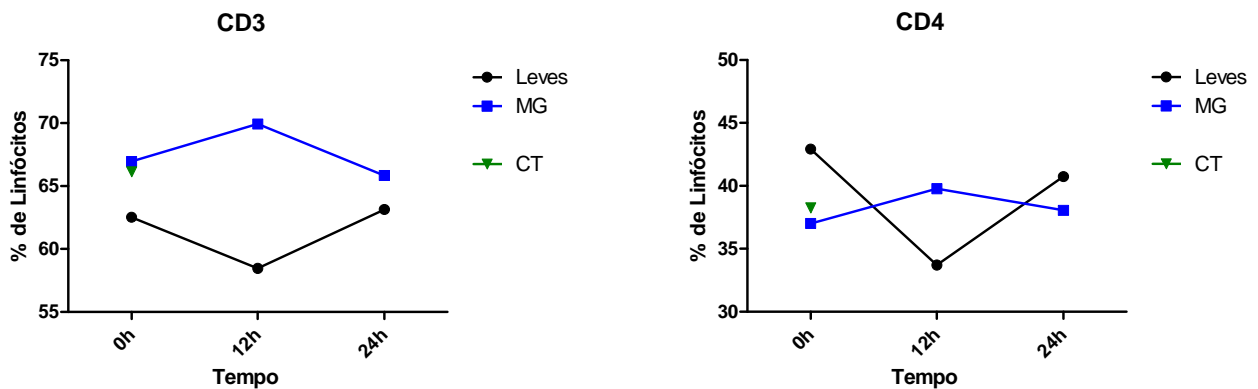


Figure 9. Gráficos representando o percentual de linfócitos CD3⁺ e CD4⁺ em pacientes com envenenamento Leves e Moderados e Graves(MG) em 0h, 12h e 24 após o tratamento.

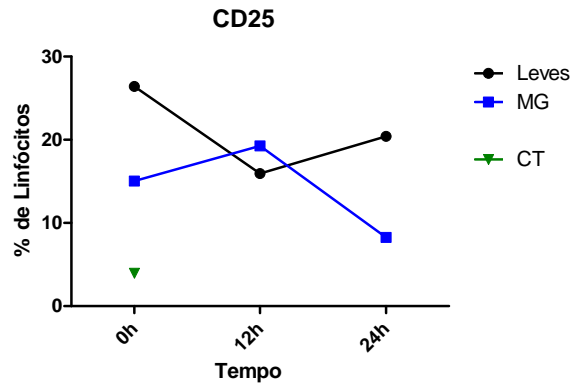


Figure 10. Gráfico representando o percentual de linfócitos CD25⁺ em pacientes com envenenamento Leves e Moderados e Graves(MG) em 0h, 12h e 24 após o tratamento.

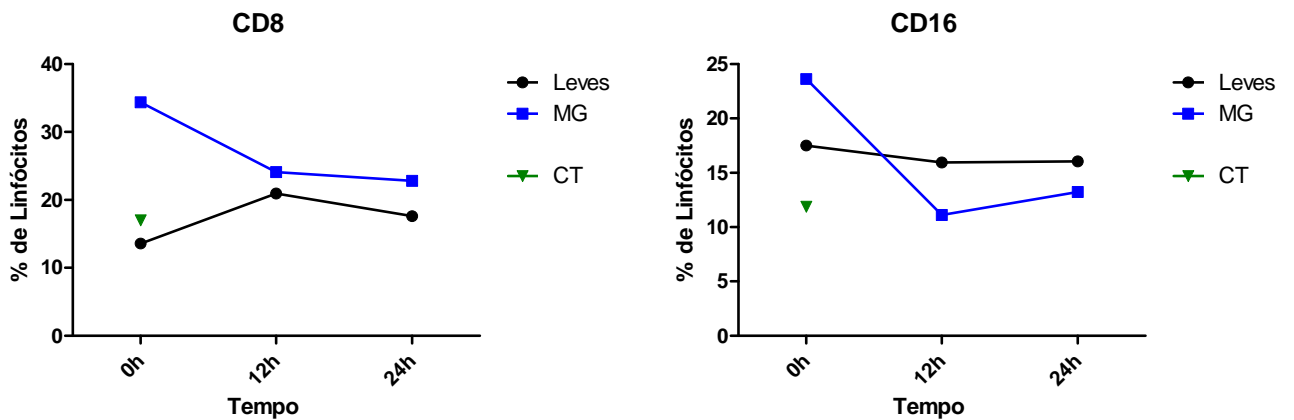


Figure 11. Gráficos representando o percentual de linfócitos CD8⁺ e CD16⁺ em pacientes com envenenamento Leves e Moderados e Graves (MG) em 0h, 12h e 24 após o tratamento.

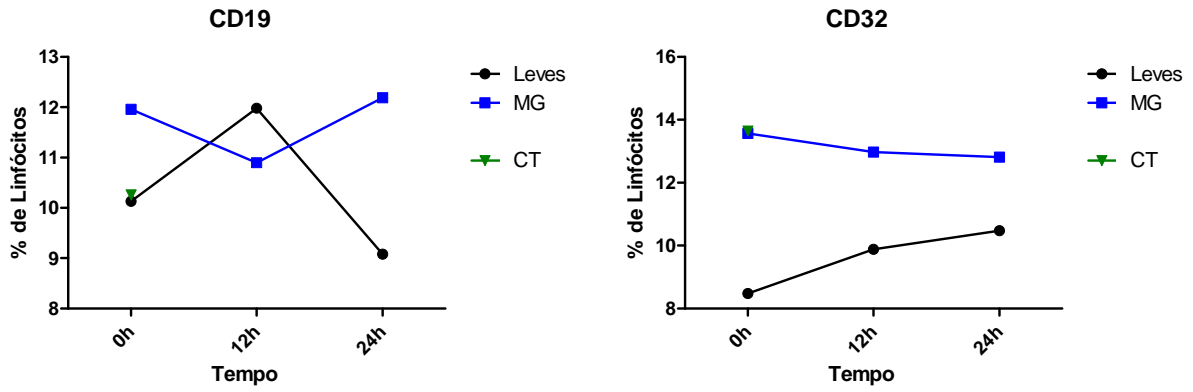


Figure 12. Gráficos representando o percentual de linfócitos CD19⁺ e CD32⁺ em pacientes com envenenamento Leves e Moderados e Graves (MG) em 0h, 12h e 24 após o tratamento.

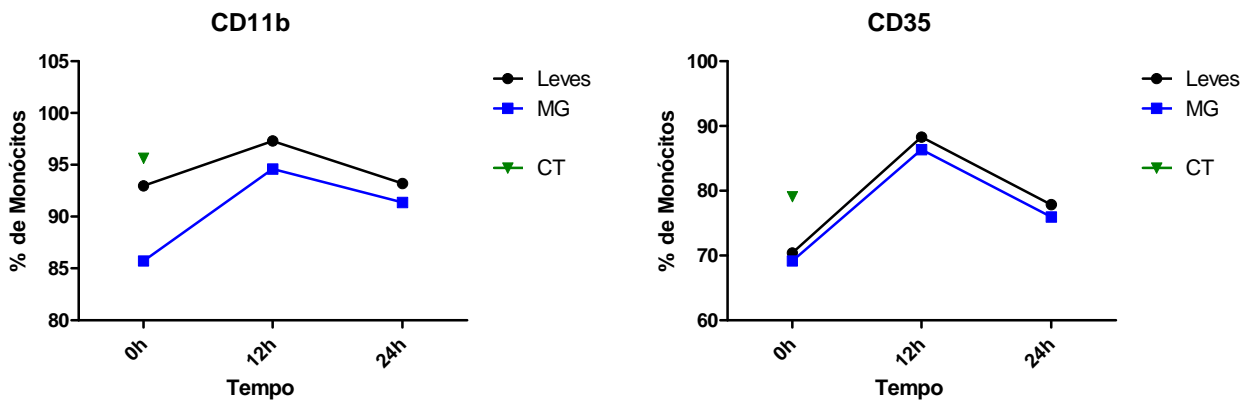


Figure 13. Gráficos representando o percentual de monócitos CD11b⁺ e CD35⁺ em pacientes com envenenamento Leves e Moderados e Graves (MG) em 0h, 12h e 24 após o tratamento.

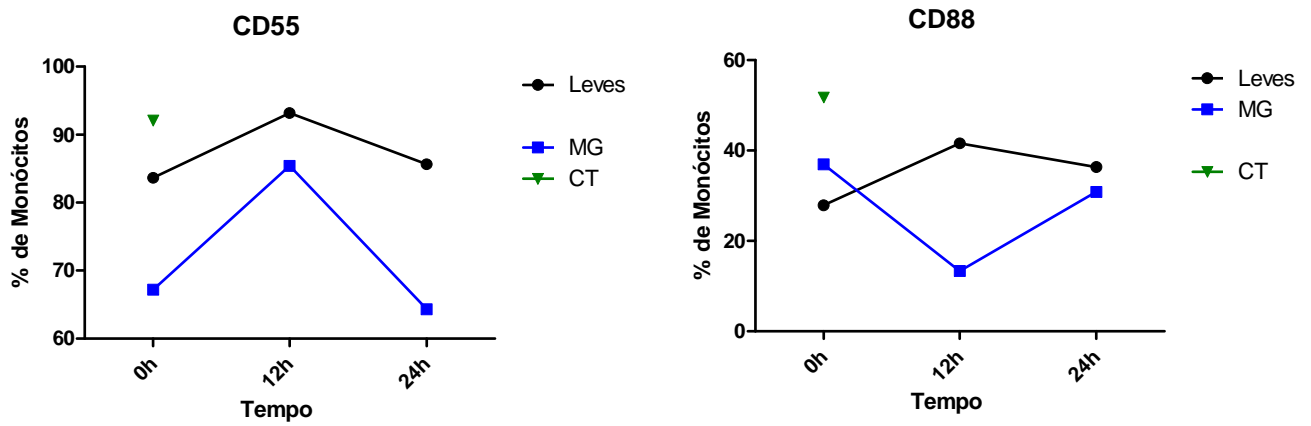


Figure 14. Gráficos representando o percentual de monócitos CD11b⁺ e CD35⁺ em pacientes com envenenamento Leves e Moderados e Graves (MG) em 0h, 12h e 24 após o tratamento.

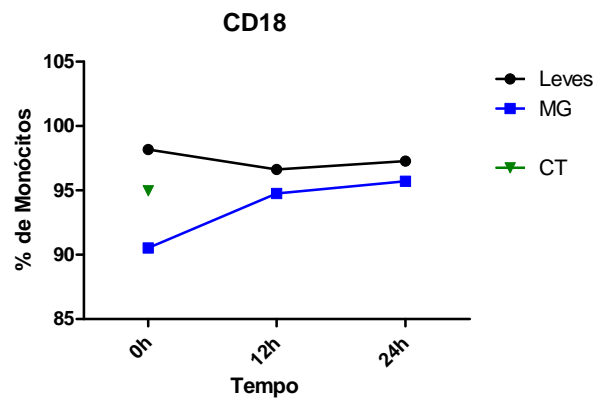


Figure 15. Gráfico representando o percentual de monócitos CD18⁺ em pacientes com envenenamento Leves e Moderados e Graves (MG) em 0h, 12h e 24 após o tratamento.

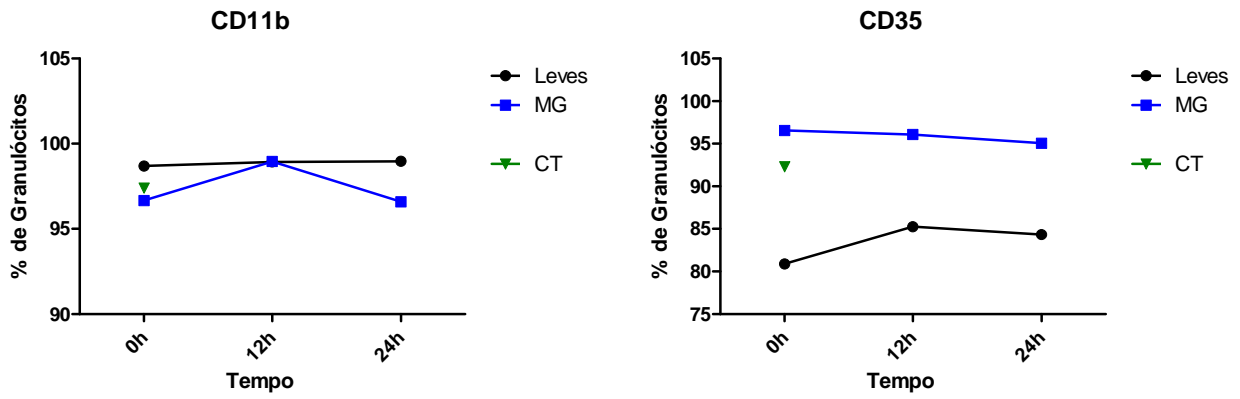


Figure 16. Gráficos representando o percentual de granulócitos CD11b⁺ e CD35⁺ em pacientes com envenenamento Leves e Moderados e Graves (MG) em 0h, 12h e 24 após o tratamento.

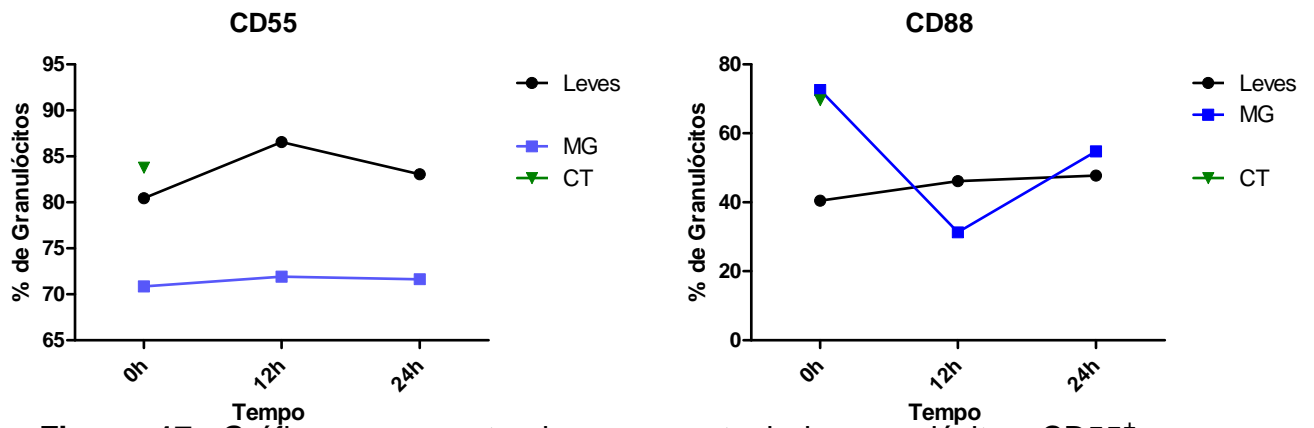


Figure 17. Gráficos representando o percentual de granulócitos CD55⁺ e CD88⁺ em pacientes com envenenamento Leves e Moderados e Graves (MG) em 0h, 12h e 24 após o tratamento.

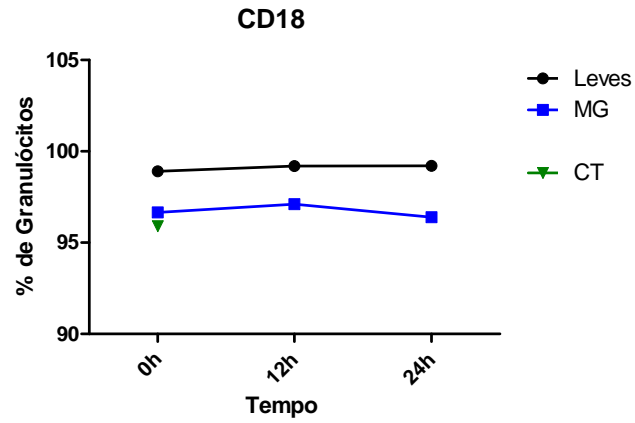


Figure 18. Gráfico representando o percentual de granulócitos CD18⁺ em pacientes com envenenamento Leves e Moderados e Graves (MG) em 0h, 12h e 24 após o tratamento

Apêndice F – Artigo enviado

***Bothrops erythromelas* and *Crotalus durissus cascavella* snake venoms induce pro-inflammatory response in mice splenocytes**

^{1,2}Karla Patrícia de Oliveira Luna, ¹Cristiane Moutinho Lagos de Melo, ³Vanessa Peruhype Magalhães, ³Olindo Martins Assis-Filho, ¹Valéria Rêgo Alves Pereira.

¹Departamento de Imunologia, Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ, Pernambuco, Brazil, ²Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, Brazil, ³Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ, Minas Gerais, Brazil.

Correspondence address: Valéria Rêgo Alves Pereira, Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Av. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, CEP: 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil.

Fax: 55-81-21012640, Phone: 55-81-21012631.

e-mail: valeriaph@gmail.com

ABSTRACT

Snake venoms are a complex biological mixture used for immobilization and killing of prey for alimentation. Many effects are inflicted by these venoms, such as coagulation, necrosis, bleeding, inflammation and shock. This study aimed to evaluate the inflammatory activity promoted by *Bothrops erythromelas* and *Crotalus durissus cascavella* snake venoms. It could be observed that both *B. erythromelas* and *C. d. cascavella* venoms induced higher IFN- γ and IL-6 production. Nitric oxide was significantly produced only by *B. erythromelas* venom, which also showed a higher rate of cell death induction when compared to *C. d. cascavella*. Results showed that *B. erythromelas* and *C. d. cascavella* venoms induced a marked immunomodulatory

response, *in vitro*, through cytokines and NO production. However, *B. erythromelas* induces a pro-inflammatory response and a higher rate of cell death in relation to *C. d. cascavella* venom.

Key-words: snake venom, *Bothrops*, nitric oxide, necrosis, *Crotalus*.

INTRODUCTION

Snake envenomation is a health problem mainly in rural areas of tropical and subtropical countries^{1,2}. In Brazil, twenty-thousand bites by venomous snakes are reported each year, and approximately 90% of them are inflicted by the genus *Bothrops*³. People bitten by *Bothrops* species manifest local and systemic manifestations like edema, pain, ecchymosis, blisters, myonecrosis, gingival bleeding, hematuria, epistaxis, hemorrhage and leukocyte infiltration^{4,5}.

On the other hand, the genus *Crotalus* contains several species of snakes, as *Crotalus durissus cascavella* (usually found in scrublands of the Brazilian Northeast), responsible for approximately 1500 cases of snakebite annually^{6,7}. *Crotalus* species envenomation is caused by a complex mixture of biologically active substances, such as toxins, enzymes and peptides⁸. Clinical manifestations induced by *Crotalus* venom in South America are neurotoxicity, myotoxicity and renal damage, as well as having antithrombotic, platelet-aggregating activities, an analgesic effect, and acute renal failure^{9,10,11}.

Many studies show that different snake venoms induce specific immunomodulatory responses *in vitro* and *in vivo*^{12,13,14}. These responses are divided between Th1 and Th2 cells and are mediated by specific cytokines that determine effective functions of immune system compounds¹⁵. Different cytokines are involved in both Th1 and Th2 responses. Interleukin-2 (IL-2) has multiple, sometimes opposing,

functions during an inflammatory response and is a potent inducer of T-cell proliferation and T-helper 1 (Th1) and Th2 effector T-cell differentiation¹⁶. IL-6 is a critical factor for hematopoiesis through regulation of the entry of hematopoietic stem cells into the cell cycle, proliferation of cells committed to the myeloid and lymphoid lineage, and maturation of B-cells into antibody-producing cells¹⁷. IL-10 is an important immunoregulatory cytokine that influences innate and adaptive immune responses¹⁸. IFN- γ is a cytokine secreted by activated T and natural killer cells and regulates host defense, inflammation, and autoimmunity. The balance of these cytokines determines which response is predominant, whether Th1 or Th2¹⁹.

Ophidian envenomation induces physiological and immunological consequences. To investigate the immunomodulatory response induced by both *Bothrops erythromelas* and *Crotalus durissus cascavella* Brazilian snake venoms, the present study analyzed nitric oxide, IL-2, IL-6, IL-10 and IFN- γ production on stimulated mice splenocyte cultures. Cytotoxic assays and cell viability tests were also performed to evaluate, when possible, the damage induced by both snake venoms. We believe that these preliminary studies involving immune response in mice splenocytes may promote a better understanding about new *Bothrops* and *Crotalus* antivenom therapeutic in the future

MATERIALS AND METHODS

Animals. Male BALB/c mice (6 to 8 weeks old) were raised at the animal facilities of the Oswaldo Cruz Foundation (Rio de Janeiro, Brazil) and maintained at the animal facilities of the Aggeu Magalhães Research Center of the Oswaldo Cruz Foundation in Recife, Brazil. All mice were treated and sacrificed in accordance with the Oswaldo

Cruz Foundation Commission for Experiments with Laboratory Animals (Ministry of Health, Brazil, 0266/05).

Preparation of *Bothrops erythromelas* and *Crotalus durissus cascavella* venoms

Male and female specimens of *B. erythromelas* and *C. d. cascavella* snakes were milked and their venoms were maintained at a temperature of 4°C until use. The protein concentration of the venoms was analyzed by Lowry (1951) test²⁰.

Preparation of splenocytes. Splenocytes were obtained according to Pereira et al. (2004)²¹. After euthanizing each animal with CO₂ gas, the spleen was removed aseptically and placed in a Falcon tube containing RPMI 1640 with fetal calf serum (complete medium). In a vertical flow, each spleen was transferred to a Petri dish where it was macerated. The cell suspensions obtained were transferred to Falcon tubes containing approximately 10 mL of incomplete medium per spleen, centrifuged at 4°C, 200 x g for 5 minutes. After discarding the supernatant, distilled water was added to the sediment to promote lysis of red blood cells. The supernatant, containing no cellular debris, was collected and centrifuged at 4°C, 200 x g for 5 minutes. The sediment (containing cells) was resuspended in complete RPMI 1640. An aliquot of each cell suspension was separated, diluted in trypan blue to be quantified in a Neubauer chamber and cell viability was determined.

***In vitro* cytotoxicity assays.** The cytotoxicity of the venoms was determined using BALB/c mice splenocytes (6×10^5 cells/well) cultured in 96-well plates in RPMI 1640 media (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) supplemented with 10% fetal bovine serum (FCS; Cultilab, Campinas, SP, Brazil) and 50 µg/mL of gentamycin (Novafarma,

Anápolis, GO, Brazil). Each venom was evaluated at six concentrations (1, 5, 10, 25, 50 and 100 µg/mL), in triplicate on two independent assays. Cultures were incubated in the presence of ^3H -thymidine (Amersham Biosciences) (1 µCi/well) for 24 h at 37°C and 5% CO_2 . After this period, the content of the plate was harvested to determine the ^3H -thymidine ($[\text{}^3\text{H}]\text{TdR}$) incorporation using a beta-radiation counter (β -matrix 9600, Packard). The toxicity of the venoms was determined by comparing the percentage of ^3H -thymidine incorporation (as an indicator of cell viability) of venom-treated wells in relation to untreated wells. Saponine (0.05%), cytotoxic compound, was used as positive control. Con A and PHA were used as references for immunological assays. Non-cytotoxic concentrations were defined as those causing a reduction of ^3H -thymidine incorporation below 30% in relation to untreated controls.

Measurement of cytokine levels in splenocyte supernatants. Splenocytes were cultured in 24-well plates (TPP) at a density of 10^6 cells/well. Cytokines were quantified in 24, 48, 72 h and 6 day supernatants from cultures stimulated with *Bothrops erythromelas* snake venom (100, 10 and 1 µg/mL), *Crotalus durissus cascavella* snake venom (100, 10 and 1 µg/mL), Concanavalin A (2.5 µg/mL), Phytohemagglutinin (5 µg/mL) or maintained only in culture medium (control). The levels of IL-2, IL-6, IL-10 and IFN- γ were measured by sandwich ELISA, according to the manufacturer's suggested protocols. The monoclonal antibodies used were from Kit OptEIA (BD Biosciences), being previously titered. Plates with 96 wells (Nalge Nunc International Corporation) were sensitized with specific anti-cytokine antibodies (according to the manufacturer's instructions) and incubated "overnight" at 4°C. Cytokine standards were added after serial dilution from their initial concentration (800, 10000, 8000 and 8000 pg/mL, for IL-2, IL-6, IL-10 and IFN- γ , respectively). After

washes, 50 μ l of all samples and standards were added in duplicate and the plate incubated for 2 hours at room temperature. Subsequently, the specific antibodies were combined with biotin (according to the manufacturer's instructions) and incubated for 1h30min at room temperature. Revealer solution was added containing 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS). The reaction was blocked with 1 M sulphuric acid and the reading was carried out in a spectrophotometer (Bio-Rad 3550, Hercules, CA) at 415 nm. Sample concentrations were calculated in the linear region of the titration curve of cytokine standards, and final concentrations were expressed in pg/mL, using the Microplate Manager Version 4.0 software (Bio-Rad laboratories).

Analysis of cell viability by Annexin V-FITC and Propidium iodide staining.

Splenocytes were treated with *Bothrops erythromelas* venom (100, 10 and 1 μ g/mL), *Crotalus durissus cascavella* venom (100, 10 and 1 μ g/mL), Concanavalin A (2.5 μ g/mL) and Phytohemagglutinin (5 μ g/mL). These treated cells were maintained in culture in 24-well plates (TPP) for 24 hours to analyze their cell viability. Untreated cells (control) were used as a negative control. Following this, lymphocytes were centrifuged at 4°C, 450 x g for 10 minutes. After discarding the supernatant, 1 mL of PBS 1X was added to the sediment and the mixture was centrifuged at 4°C, 450 x g for 10 minutes. After discarding the supernatant, the pellet was resuspended in a binding buffer (10 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, and 1.8 mM CaCl₂) and annexin V conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) (1:500) and propidium iodide (PI, 20 μ g/mL; 10⁶ cells) were added to each labeled cytometer tube. Flow cytometry was performed on a FACSCalibur (Becton Dickinson Biosciences, Mountain View, Ca, USA) and analyzed using Cell Quest Pro software (Becton

Dickinson). Results analysis was performed on graphs by dot plot. Double negatives (Annexin-FITC⁻/PI) were considered viable cells. Annexin-FITC⁺/PI represented splenocytes in the early stage of apoptosis. Double positive (Annexin-FITC⁺/PI⁺) were considered to be spleen cells in the late stage of apoptosis and only PI⁺ cells were considered necrotic.

***In vitro* nitrite analysis:** Splenocytes were used to evaluate the concentration of nitrite, after treatment with *Bothrops erythromelas* venom (100, 10 and 1 µg/mL), *Crotalus durissus cascavella* venom (100, 10 and 1 µg/mL), Concanavalin A (2.5 µg/mL), Phytohemagglutinin (5 µg/mL) or maintained only in culture medium (control) after 24, 48, 72 h and 6 days of incubation. Culture media were carefully collected for subsequent measurement by the colorimetric Griess method (Ding et al., 1988). NO concentration was estimated by the standard curve (3.12 - 100 µmol/mL) and the reading was carried out in a spectrophotometer (Bio-Rad 3550, Hercules, CA) at 490 nm.

Statistical analysis. Data were analyzed using non-parametric tests. Differences among groups were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by either Tukey's *t* test or Kruskal-wallis non-parametric test. All results were expressed as mean values of groups ± standard deviation of four independent experiments per group and were analyzed considering the value of $p < 0.05$ as statistically significant.

RESULTS

The cytotoxicity threshold was expressed as the highest concentration tested that was not cytotoxic for the splenocytes. Saponine was used as a positive control. Results

showed that Saponine (0.05%), known for its cytotoxicity, demonstrated a higher inhibition. Con A and PHA, used as references for immunological assays, did not show toxic activity at 50 to 1 µg/mL concentrations for Con A and neither concentration for PHA. Both *Bothrops erythromelas* and *Crotalus durissus cascavella* venoms were cytotoxic above 1 µg/mL concentration, indicating the higher toxic effect induced by these snake venoms in splenocyte cultures (Table 1). Because higher toxic effect induced by both venoms, all immunomodulatory assays in this study (ELISA, nitrite detection and flow cytometry) were performed using a non-toxic dose, i.e., 1 µg/mL.

Snake venoms promoted different values to IFN- γ production

Immunological investigations of splenocytes stimulated, *in vitro*, with *B. erythromelas* snake venom were performed comparing which compared this group with splenocytes stimulated with *C. d. cascavella* snake venom. Because of their immunological properties, Concanavalin A (Con A) and Phytohemagglutinin (PHA) mitogens were used as positive controls and unstimulated cells (cells + medium) were used as a negative control. Four experimental times, i.e., 24, 48, 72h and 6 days were used in our assays. In 24 hours, Con A (2149 \pm 311) showed higher and statistically significant values in relation to the control ($p \leq 0.05$). However, at the same time, *B. erythromelas* venom (1422 \pm 480 and 1214 \pm 380 at 100 and 1 µg/mL concentrations, respectively) and *C. d. cascavella* (1234 \pm 348 at 1 µg/mL concentration) induced higher, but not statistically significant, IFN- γ production. At 48 hours, only *C. d. cascavella* (1374 \pm 288 at 1 µg/mL) showed statistically significant values in relation to the control ($p \leq 0.05$). The time of greatest IFN- γ production for all stimuli, *in vitro*, was 72 hours (Figure 1A-E). At this time, we observed that both *B. erythromelas* and *C. d. cascavella* (at 100 µg/mL) showed significant values (Figure 1D-E). Finally, after 6

days of assay, only Con A (6032 ± 2545) and *C. d. cascavella* (3090 ± 601 at $100 \mu\text{g/mL}$) showed significant IFN- γ production ($p \leq 0.05$). As shown in Figure 1, IFN- γ levels in supernatant cultures showed peak values at 72 hours of assay. Thus, 72 hours was the time chosen to analyze other cytokines in this study such as IL-2, IL-6, IL-10 and nitric oxide.

Profile of cytokine release and comparative analysis at 72 hours of assay

Other cytokines, such as IL-2, IL-6, IL-10 and nitric oxide, were measured in our study. IL-2 was not produced at significant levels for any treatment with snake venom at all experimental times. Only Con A showed statistically significant induction of production of this cytokine at 24, 48 and 72 hours (628 ± 42 , 768 ± 13 and 151 ± 1.9 and $p < 0.05$, respectively) (data not shown). Similar to IFN- γ , IL-6 was also produced in statistically significant values by *B. erythromelas* (13.235 ± 1850 at $1 \mu\text{g/mL}$) and by *C. d. cascavella* (11606 ± 1038 at $10 \mu\text{g/mL}$) at 72 hours of assay. The same result was observed for IL-10 and NO production at 72 hours (Figure 2B and C). IL-10 was detected in splenocytes stimulated with *B. erythromelas* venom (100 and $10 \mu\text{g/mL}$ concentrations) and *C. d. cascavella* venom ($1 \mu\text{g/mL}$) when compared with the control (Figure 2B). Although nitric oxide production showed higher levels, only *B. erythromelas* venom ($1 \mu\text{g/mL}$) showed higher values ($p \leq 0.05$) in relation to the control at 72 hours of assay (Figure 2C). In addition, we could also see that although there were no differences among venom stimulus in relation to IFN- γ production (Figure 2A), we observed a dichotomy in the synthesis of NO and IL-10 at 72 hours. In fact, when we increased doses of venom from *B. erythromelas* a gradual increase in the IL-10 production and decrease of NO release occurred (Figure 2B and C). The opposite effect was observed, i.e., an increased *C. d. cascavella* dose induced lower IL-10

production and higher NO release (Figure 2B and C). These observations are very important for understanding venom molecular differences and signaling mechanisms in mice splenocytes.

Analysis of IFN-g/IL-10 balance between snake venoms

Imbalance in the ratio between pro-inflammatory and anti-inflammatory events is possible. To analyze this characteristic, we assessed the balance in the synthesis of IFN/IL-10 at 72 hours of *in vitro* stimuli. Figure 3 shows that although no significant difference has been observed in this ratio, high doses of *B. erythromelas* venom (100 µg/mL) were able to promote an immunoregulatory effect, characterized by an inverse relationship in the synthesis of IFN-γ and IL-10.

Profile of cell viability indicated higher necrosis induced by B. erythromelas venom

After the cytotoxicity analysis, we investigated possible cell damage induced by snake venoms in mice splenocytes. For this analysis we used apoptosis, late apoptosis and necrosis parameters to indicate the induction of death and cellular damage promoted by both venoms (Figure 4A-E). Absence of exogenous stimuli was used as a control. Figure 4A shows the cell viability status of BALB/c mice splenocytes following 24 hours of *in vitro* stimuli with snake venom. The data analysis indicated that *B. erythromelas* (at 100, 10 and 1 µg/mL concentrations) induced higher late apoptosis and necrosis (at 100 and 10 µg/mL) (Figure 4C and D). On the other hand, *C. d. cascavella* venom only showed higher necrosis induction at 1 µg/mL concentration (Figure 4D). Comparison between venoms also showed higher late apoptosis induced by *B. erythromelas* (at 1 µg/mL concentration) in relation to *C. d. cascavella* venom (Figure 4C).

DISCUSSION

Snakes of the genera *Bothrops* and *Crotalus* are responsible for the majority of the ophidian accidents in Latin America and, specifically, Brazil. In humans and experimental animals, *Bothrops* envenomation induces systemic haemorrhage and blood incoagulability in addition to intense tissue damage at the site of injection. Symptoms are due to the presence of a variety of toxins in the venom^{22,13}. On the other hand, *Crotalus* envenomation does not induce a significant inflammatory reaction at the site of the bite, but exerts severe systemic neuro-, nephro-, hepato- and myotoxic effects²³.

Many studies have investigated immunomodulatory effects induced by different snake venoms and these immunological alterations were observed as both cellular and humoral responses^{24,25}. The aim of this study was the same, but before analyzing immunological aspects and the stimulation profile exerted by *Bothrops erythromelas* and *Crotalus durissus cascavella* snake venoms, it was necessary to make an investigation of cytotoxicity levels promoted by both venoms in against mice splenocytes.

We used tritiate thymidine ($[^3\text{H}]\text{TdR}$) in our assays, given that thymidine acts through the incorporation of tritium into the DNA of cells and is the most commonly used technique today for proliferation and that this method is effective for evaluation of specific lymphocyte cytotoxicity²⁶. Our results showed higher cytotoxic effects induced by snake venoms above a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration. Lomonte et al. (1993)²⁷, investigating *Bothrops asper* snake venom, showed similar results and affirm that the venom displayed *in vitro* cytotoxicity in spleen cells in a dose and time-dependent manner. Torres et al. (2010)²⁸ also showed that the PLA₂ fraction from *Bothrops marajoensis* snake venom presented higher cytotoxicity in murine macrophages including membrane disruption and cell lysis. In addition, *Crotalus durissus terrificus* venom induced

cytotoxic effects in splenocytes treated, *in vitro*, with a 5 µg/mL dose and induced decreased cell viability (Rangel-Santos et al., 2004)²⁴.

Many studies have described the involvement of cytokines in envenomation, including snake, scorpion and spider venom models^{29,30,31}. To identify the impact of snake venom in terms of inflammatory activity, we analyzed the profile of IFN-γ, IL-2, IL-6, IL-10 and NO production in mice splenocytes stimulated, *in vitro*, with *Bothrops erythromelas* and *Crotalus durissus cascavella* snake venoms. In our study, we observed that the best time of culture to analyze cytokine release was 72 hours. In fact, both snake venoms were capable of inducing IFN-γ, IL-6, IL-10 and NO production, but this cytokine release showed different results between venoms. Our data showed that the induction of IL-2 production was not significant for produced by either snake venom, the induction of IFN-γ and IL-6 was equally produced by both snake venoms, the induction of IL-10 production was significant for produced more by *Bothrops erythromelas* than *C. d. cascavella* and nitric oxide was only induced produced at statistical levels by *Bothrops erythromelas* venom. Furthermore, a dichotomy was observed between those venoms indicating possible molecular differences and signaling mechanisms induced by both snake venoms.

Similar results were demonstrated by Rangel-Santos et al. (2004)²⁴. These authors affirm that splenocytes treated with *Crotalus durissus terrificus* venom did not show IL-2 and IL-10 cytokine release. In fact, other studies have demonstrated, through *in vivo* and *in vitro* assays, the same profile of cytokine release observed in our study. Escocard et al. (2006)²⁹ showed IL-6 production induced by crude venom of *Bothrops atrox*, Petricevich et al. (2000)³², investigating venoms of *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca*, demonstrated that both venoms induced prominent elevations on the production of IL-6, IL-10 and IFN-γ and Lomonte et al. (1993)²⁷ showed that injection

of *Bothrops asper* venom into mouse paws also invoked increased levels of serum IL-6 in the serum.

Higher NO release observed in splenocytes stimulated, *in vivo*, with *Bothrops erythromelas* venom may be a consequence of characteristics induced by this venom in host tissue, such as damage, prominent necrosis, hemorrhage and edema that are characteristic of *Bothrops* envenomation^{33,34}. Furthermore, experimental studies showed that *Bothrops asper* venom induces phagocytosis and triggers microbicidal functions of peritoneal leukocytes, *in vivo*, with a consequent increase in the production of hydrogen peroxide and nitric oxide by macrophages followed by the generation of toxic peroxynitrites²⁵. In fact, NO is also produced during the host response evoked by *Bothrops asper* venom. This venom induced the synthesis of NO following intramuscular and intraperitoneal injections in mice, mainly through induction of expression of the inducible nitric oxide synthase (iNOS) promoted by higher IFN- γ release. In addition, a protective role of NO was demonstrated against the lethal activity of this venom^{25,35}. Barros et al. (1998)³⁶ also showed similar results, indicating that low IFN- γ production was followed by undetected nitric oxide levels in supernatant cultures. These studies corroborate our findings, as they showed showed similar pro-inflammatory responses as achieved in our assays.

Distinct actions of both *B. erythromelas* and *C. d. cascavella* venoms showed in this study may be explained by the to different toxin composition and different clinical manifestations induced presented by these venoms in humans and mice envenomated, as previously explained. Others species of *Bothrops* genus, as *B. asper*, *B. jararaca* and *B. atrox*, shows similar induction of histamine, bradykinin, eicosanoids, prostaglandins and cytokines production involved in *Bothrops* envenomations^{27,28,29,35,39,29,30}. Beyond, similar to our data, others studies affirm the higher Th1 response induced by *Bothrops*

envenomations promoted in association with higher pro-inflammatory response observed on ophidian envenomation^{35,38}. Although *Crotalus* envenomations induce similar hemorrhagic and tissue damaging effects observed in *Bothrops* envenomations, the production of prostaglandins (potent pro-inflammatory mediators) induced by *Crotalus* venoms is still unclear^{40,23}. Beyond, many some studies have showed been showing the anti-inflammatory profile of this venom^{41,42}.

Although many stimuli can induce immunomodulatory responses, as snake venoms for example, it is necessary to verify whether if this response is beneficial for the stimulated immune cell because some studies affirm that specific stimuli (biological or chemical) could induce damage, such as apoptosis or necrosis on target cells through excessive free radical accumulation^{43,44}. In our cell viability assay, *B. erythromelas* induced more cell damage than *C. d. cascavella* venom. Teixeira et al. (2003)⁴⁵ also reported similar results, showing depletion of neutrophils in mice treated with *Bothrops asper* venom and amyotoxic PLA₂ fraction. In addition, Angulo and Lomonte (2009)³⁰ analyzing the mechanism of action of myotoxin II, a Phospholipase A₂ of *Bothrops asper* venom, showed that this toxin can induce, through degenerative events related to Ca²⁺ influx, necrotic cell death. Studies analyzing *Crotalus* venom effects were performed with isolated fraction (toxins) of this venom and it has been shown that these toxins cause a reduction in the resting potential of the membrane and an increase in membrane conductance^{46,47}. Rangel-Santos et al. (2004)²⁴ showed in their assays that *Crotalus durissus terrificus* venom induced higher inhibition of the cellular proliferative response, in cultures stimulated by Con A, in both crude venom and crotoxin (isolated fraction) and, for this aspect, the cell viability test realized by them did not show significant results. In our study we used total *Crotalus* venom and we suggest that this methodology may be key to promoting low cell damage in comparison to *B.*

erythromelas. Many studies have investigated the cell damage induced by these viperid snake venoms, correlating the role of venom toxins in inflammatory responses. Díaz et al. (2005)⁴⁸, treating human endothelial cells with BaP1, observed that this venom fraction induces apoptosis through caspase-8 activation. In addition, Gallagher et al. (2005)⁴⁹ observed in their study that fibroblasts treated with jararhagin activated an apoptotic cascade through death-receptor (extrinsic) apoptosis pathways.

Snake venoms are very complex, containing hundreds of biologically active compounds associated with the inflammatory process (Gallagher et al. 2005)⁴⁹. In this study we observed that *B. erythromelas* and *C. d. cascavella* venoms induced a marked immunomodulatory response, *in vitro*, through cytokines and NO production. But, it is evident that *B. erythromelas* promotes a pro-inflammatory profile and *Crotalus durissus cascavella* venom has the opposite effect, i.e. anti-inflammatory.

We suggest that these data can enhance the our understanding of immunological consequences induced by ophidian envenomation, especially concerning to South American species, and promote a better understanding for future therapeutic strategy by anti-ophidic venom treatment.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Lucas Ferreira da Rocha and Maria da Conceição Batista for technical assistance. This work was supported by the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE processo APQ-0493-2.11/08) and the Aggeu Magalhães Research Center of the Oswaldo Cruz Foundation in Recife, Brazil (CPqAM/FIOCRUZ).

REFERENCES

1. Kasturiratne A, Wickremasinghe AR, Silva N, Gunawardena NK, Pathmeswaran A, Premaratna R, Savioli L, Lalloo DG, Silva HJ. The Global Burden of Snakebite: A Literature Analysis and Modelling Based on Regional Estimates of Envenoming and Deaths. *PLoS Medicine*. 2008; 4;5(11):e218.
2. Harrisson RA, Hargreaves A, Wagstaff SC, Faragher B, Laloo DG. Snake envenoming: a disease of poverty. *Plos Negl Trop Dis*. 2009; 3 (12):e569.
3. Ministério da Saúde de Brasil. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Fundação Nacional de Saúde. 2001.
4. Teixeira CFP, Cury Y, Oga S, Jancar S. Hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* in rats: role of eicosanoids and platelet activating factor. *Toxicon*. 1994; 32, 419–426.
5. Nascimento NG, Sampaio MC, Olivo RA, Teixeira C. Contribution of mast cells to the oedema induced by *Bothrops moojeni* snake venom and a pharmacological assessment of the inflammatory mediators involved. *Toxicon*. 2010; 55:343–352.
6. Santoro, M. C., M. C. Sousa-e-Silva, R. L. Gonçalves, S. M. Almeida-Santos, D. F. Cardoso, I. L. Laporta-Ferreira, M. Saiki, C. A. Peres & I. S. Sano-Martins: Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collilineatus*). *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol*. 1999; 122: 61–73.
7. Martins A. M. C., Lima A. A. M., Toyama M. H., Marangoni S., Fonteles M. C., Monteiro H. S. A. Renal Effects of Supernatant from Macrophages Activated by *Crotalus durissus cascavella* Venom: The Role of Phospholipase A2 and Cyclooxygenase. *Pharmacology & Toxicology*. 2003, 92: 14–20.
8. Bercovici D, Chudziniski AM, Dias NO, Esteves MI, Hirachi E, Oishi NY, Picarelli ZP, Rocha MC, Ueda CMPM, Yamanouye N, Raw I. A systematic fraction of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Mem Inst Butantan*. 1987; 49:69–78.
9. Evangelista JSAM, Martins AMC, Nascimento NRF, Sousa CM, Alves RS, Toyama DO, Toyama MH, Evangelista JF, Menezes DB, Fonteles MC, Moraes MEA, Monteiro HAS. Renal and vascular effects of the natriuretic peptide isolated from *Crotalus durissus cascavella* venom. *Toxicon*. 2008;52:737–744.
10. Nancy, G., M. D. Ahlstrom, M. D.W. Luginbuhl & M. D. C. Tisher: Acute anuric renal failure after pygmy rattlesnake bite. *South Med. J*. 1991, 84, 783–785.
11. Martins, A. M. C., H. S. A. Monteiro, E. O. G. Ju´nior, D. B. Menezes & M. C. Fonteles: Effects of *Crotalus durissus cascavella* venom in the isolated rat kidney. *Toxicon*. 1998; 36: 1441–1450.
12. Zamuner SR, Zuliani JP, Fernandes CM, Gutiérrez JM, Teixeira CFP. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom: release of proinflammatory cytokines and eicosanoids, and role of adhesion molecules in leukocyte infiltration. *Toxicon*. 2005; 46: 806–813
13. Chaves F, Teixeira CFP, Gutiérrez JM. Role of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in the local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom: an experimental assessment in mice. *Toxicon*. 2005; 45:171–178.
14. Teixeira CFP, Chaves F, Zamuner SR, Fernandes CM, Zuliani JP, Cruz- Hofling MA, Fernandes I, Gutiérrez JM. Effects of neutrophil depletion in the local pathological alterations and muscle regeneration in mice injected with *Bothrops jararaca* snake venom. *Int. J. Exp. Pathol*. 2005; 86: 107–115.

15. Kourilsky P, Truffa-Bachi P. Cytokine fields and the polarization of the immune response. *Trends Immunol.* 2001; 22:502-509.
16. Hoyer KK, Dooms H, Barron L, Abbas AK. Interleukin-2 in the development and control of inflammatory disease. *Immunol. Rev.* 2008; 226: 19–28.
17. Rezaee F, Rellick SL, Piedimonte G, Akers SM, O’Leary HA, Martin K, Craig MD, Gibson LF. Neurotrophins Regulate Bone Marrow Stromal Cell IL-6 Expression through the MAPK Pathway. *PLoS ONE.* 2010;5(3):e9690. doi:10.1371/journal.pone.0009690.
18. Moore KW, De Waal Malefyt R, Coffman RL, O’Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:683–765.
19. Küsters S, Gantner F, Künstle G, Tiegs G. Interferon gamma plays a critical role in T cell-dependent liver injury in mice initiated by Concanavalin A. *Gastroent.* 1996; 111: 462–471.
20. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J. Biol. Chem.* 1951; 193:265-275.
21. Pereira VRA, Lorena VMB, Galvão da Silva AP, Coutinho EM, Silva ED, Ferreira AGP, Miranda P, Krieger MA, Goldenberg S, Soares MBP, Correa-Oliveira R, Gomes Y. Immunization with cytoplasmic repetitive antigen and flagellar repetitive antigen of *Trypanosoma cruzi* stimulates a cellular immune response in mice. *Parasitology.* 2004; 129:563-570.
22. Battellino C, Piazza R, Silva AMM, Cury Y, Farsky SHP. Assessment of efficacy of bothropic antivenom therapy on microcirculatory effects induced by *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon.* 2003; 41:583–593.
23. Moreira V, Zamuner SR, Wallace JL, Teixeira CFP. *Bothrops jararaca* and *Crotalus durissus terrificus* venoms elicit distinct responses regarding to production of prostaglandins E2 and D2, and expression of cyclooxygenases. *Toxicon.* 2007; 49:615–624.
24. Rangel-Santos A, Lima C, Lopes-Ferreira M, Cardoso DF. Immunosuppressive role of principal toxin of *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon.* 2004; 44: 609-616.
25. Zamuner SR, Gutiérrez JM, Muscará MN, Teixeira SA, Teixeira CFP. *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms trigger microbicidal functions of peritoneal leukocytes in vivo. *Toxicon.* 2001; 39: 1505-1513.
26. Pechhold K, Craighead N, Wesch D, Kabelitz D. Measurement of cellular proliferation. *Met. Microb.* 2002; 32:77-97.
27. Lomonte B, Tarkowski A, Hanson LA. Host response to *Bothrops asper* snake venom: analysis of edema formation, inflammatory cells and cytokine release in a mouse model. *Inflammation.* 1993; 17:93–105.
28. Barraviera, B., Lomonte, B., Tarkowski, A., Hanson, L.A., Meira, D.A. Acute-phase reactions, including cytokines, in patients bitten by *Bothrops* and *Crotalus* snakes in Brazil. *J. Venom. Anim. Toxins.* 1995; 1:11-22.
29. Zamuner, S.R., Teixeira, C.F. Cell adhesion molecules involved in the leukocyte recruitment induced by venom of the snake *Bothrops jararaca*. *Mediators Inflamm.* 2002; 11:351–357.
30. Angulo Y, Lomonte B. Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxicon.* 2009; 54: 949–957.
31. Torres AFC, Dantas RT, Toyama MH, Filho ED, Zara FJ, Queiroz MGR, Nogueira NAP, Oliveira MR, Toyama DO, Monteiro HSA, Martins AMC. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its

- fractions: Phospholipase A2 and L-amino acid oxidase. *Toxicon*. 2010; 55: 795–804.
32. Escocard RCM, Kanashiro MM, Petretski JH, Azevedo-Silva J, Carvalho ECQ, Silva WD, Kipnis TL. Neutrophils regulate the expression of cytokines, chemokines and nitric oxide synthase/nitric oxide in mice injected with *Bothrops atrox* venom. *Immunobiol*. 2006; 211:37–46.
 33. Meki ARMA, El-Dean ZMM. Serum interleukin-1b, interleukin-6, nitric oxide and α 1-antitrypsin in scorpion envenomed children. *Toxicon*. 1998; 36:1851–1859.
 34. Tambourgi DV, Petricevich VL, Magnoli FC, Assaf SLMR, Jancar S, Dias da Silva W. The endotoxemic-like shock induced by *Loxosceles* spider venom: pathological changes and putative cytokine mediators. *Toxicon*. 1998; 36:391–403.
 35. Petricevich VL, Teixeira CFP, Tambourgi DV, Gutiérrez JM. Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms. *Toxicon*. 2000; 38:1253-1266.
 36. Gutiérrez JM, Lomonte B. Local tissue damage by *Bothrops* snake venoms: a review *Mem. Inst. Butantan*. 1989; 51:211-223.
 37. Gutiérrez JM, Lomonte B. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. In: Kini, R.M. (Ed.), *Venom Phospholipase A2 Enzymes: Structure, Function and Mechanism*. Wiley, UK, 1997:321-352.
 38. Chaves F, Teixeira CFP, Gutiérrez JM. Role of nitric oxide in the local and systemic pathophysiological effects induced by *Bothrops asper* snake venom in mice. *Inflamm. Res*. 2006; 55:245–253.
 39. Barros, S. F.; Friedlanskaia, I.; Petricevich, V. L E Kpinis, T. L. Local Inflammation, Lethality And Cytokine Release In Mice Injected With *Bothrops Atrox* Venom. *Mediators Of Inflammation*. 1998;7: 339-346.
 40. Kanaoka, Y., Urade, Y., 2003. Hematopoietic prostaglandin D synthase. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 69, 163–167.
 41. Crocker P., Zad O., Milling T., Maxson T., King B., Whorton E. Human cytokine response to Texas crotaline envenomation before and after antivenom administration. *American Journal of Emergency Medicine*. 2010; 28:871-979.
 42. Nunes F. P.B., Sampaio S.C., Santoro M. L., Sousa-e-Silva M. C. C. Long-lasting anti-inflammatory properties of *Crotalus durissus terrificus* snake venom in mice. *Toxicon*. 2007; 49: 1090–1098
 43. Feske S Calcium signaling in lymphocyte activation and disease. *Nat Rev Immunol*. 2007; 7:690-702.
 44. Melo CML, Paim BA, Zecchin KG, Morari J; Chiarrati MR, Correia MTS, Coelho LCBB, Paiva PMG. Cramoll 1,4 lectin increases ROS production, calcium levels and cytokine expression in treated spleen cells of rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*. *Mol Cell Biochem*. 2010; 339(1) Apr 30. DOI: 10.1007/s11010-010-0480-z
 45. Teixeira CFP, Zamunér SR, Zuliani JP, Fernandes CM, Cruz-Hofling MA, Fernandes I, Chaves F, Gutiérrez JM. Neutrophils do not contribute to local tissue damage, but play a key role in skeletal muscle regeneration, in mice injected with *Bothrops asper* snake venom. *Muscle Nerve*. 2003; 28: 449–459.
 46. Hong SJ, Chang CC. Electrophysiological studies of myotoxin a isolated from prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom on murine skeletal muscle. *Toxicon*. 1985; 23: 927–937.

47. Brazil OV, Fontana MD. Toxin as tools in the study of sodium channels distribution in the muscle fibre membrane. *Toxicon*. 1993; 31:1085–1098.
48. Díaz C, Valverde L, Brenes O, Rucavado A, Gutiérrez JJM. Characterization of events associated with apoptosis/anoikis induced by snake venom metalloproteinase BaP1 on human endothelial cells. *Cell. Biochem*. 2005; 94:520–528.
49. Gallagher P, Bao Y, Serrano SMT, Laing GD, R. Theakston DG, Gutiérrez JM, Escalante T, Zigrino P, Moura-da-Silva AM, Nischt R, Mauch C, Moskaluk C, Fox JW. Role of the snake venom toxin jararhagin in proinflammatory pathogenesis: In vitro and in vivo gene expression analysis of the effects of the toxin. *Arch. Biochem. Biophys*. 2005; 441:1–15.

Table 1: Cytotoxic effect induced by *Bothrops erythromelas* and *Crotalus durissus cascavella* venoms. Assay using splenocytes of BALB/c mice cultured, *in vitro*, with *Bothrops erythromelas* and *Crotalus durissus cascavella* venoms, Con A, PHA, Saponin and unstimulated cells stained with [³H]-thymidine.

Compounds	lectins concentrations (µg/mL)					
	100	50	25	10	5	1
	Inhibition (%)*					
<i>Bothrops erythromelas</i>	62	55	44	35	33	-
<i>Crotalus durissus cascavella</i>	61	56	53	36	31	-
Con A	58	-	-	-	-	-
PHA	-	-	-	-	-	-
Saponin	94	91	90	89	88	88

* Percent of cellular proliferation inhibition.

(-) = Non-cytotoxic concentrations were defined as those causing a reduction of [³H]-thymidine incorporation below 30% in relation to untreated controls.

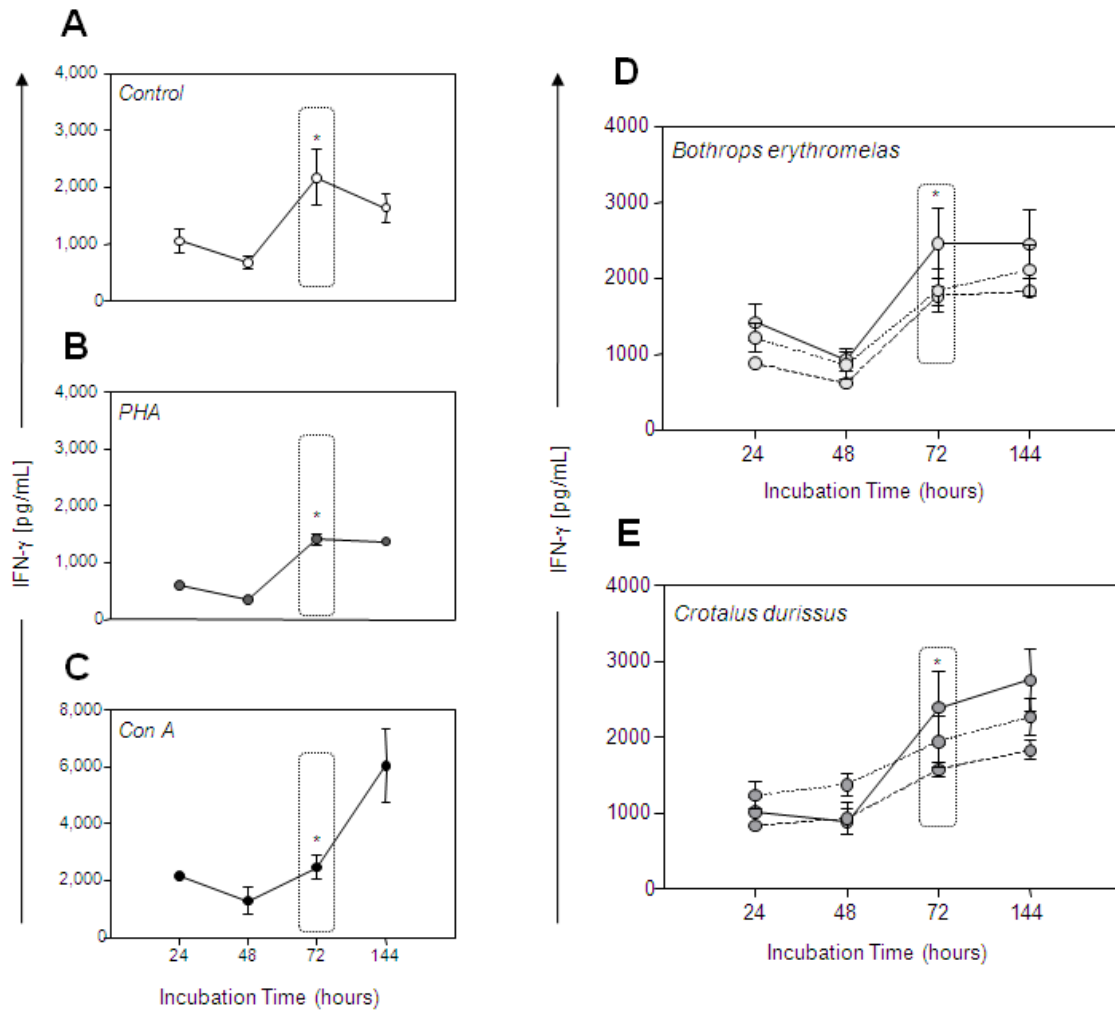


Figure 1: Profile of IFN- γ production by BALB/c mice splenocytes following *in vitro* stimuli with snake venom. Splenocytes were incubated under distinct experimental conditions, including: **A)** the absence of exogenous stimuli – Control Culture (O); **B)** in the presence of PHA (●); **C)** in the presence of ConA (●); **D)** in the presence of distinct concentrations (— 100 μ g/mL, --- 10 μ g/mL and — 1 μ g/mL) of *B. erythromelas* (O) or **E)** *C. durissus* venoms (●). Data are expressed as mean levels of IFN- γ (pg/mL) \pm standard error. Rectangles highlight the data points at 72 hours of incubation, identified as the first statistically significant ($p < 0.05$) time point for IFN- γ production as compared to 24 and 48 hours of incubation (*) and therefore selected for further analysis.

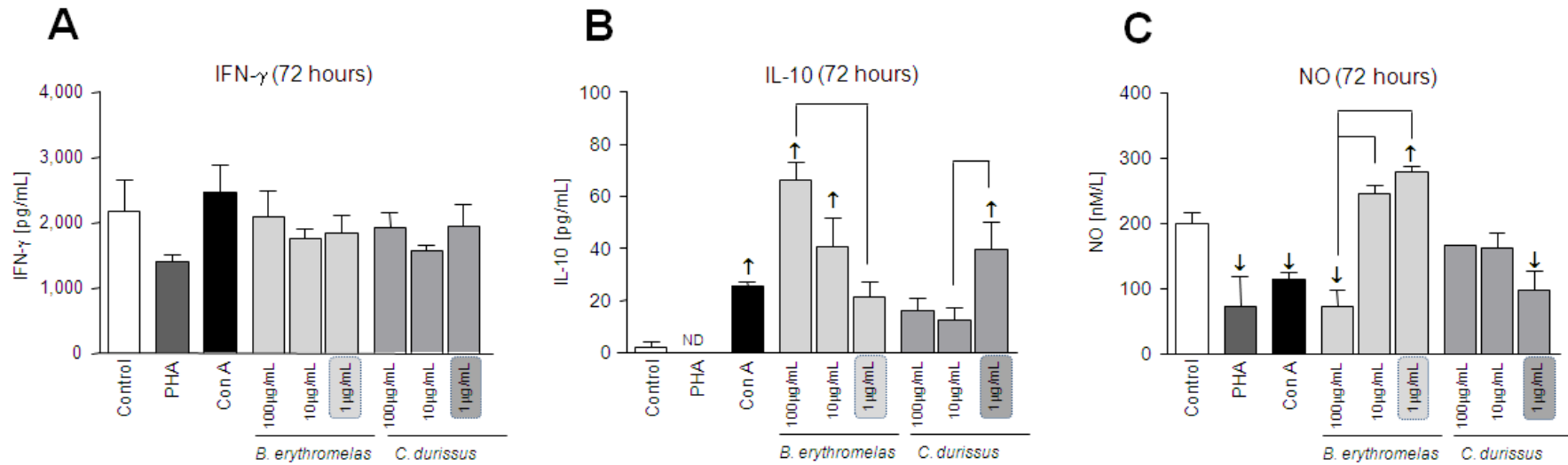


Figure 2: Comparative analysis of IFN- γ , NO and IL-10 production by BALB/c mice splenocytes following 72 hours of *in vitro* stimuli with snake venom. Splenocytes were incubated under distinct experimental conditions, including: the absence of exogenous stimuli – Control Culture (\square); in the presence of PHA (\blacksquare); in the presence of ConA (\blacksquare); in the presence of distinct concentrations (100 μ g/mL, 10 μ g/mL and 1 μ g/mL) of *B. erythromela* (\square) or *C. durissus* venoms (\square). The results are expressed as mean levels of IFN- γ , NO and IL-10 (pg/mL) \pm standard error. Significant differences at $p < 0.05$ are highlighted by $\uparrow\downarrow$ as compared to Control Cultures and by connecting lines for intra-group comparisons. Dashed rectangles highlight the venom concentration (1 μ g/mL) that induced a dichotomous profile between *B. erythromela* (pro-inflammatory) and *C. durissus* (regulatory). ND = not done.

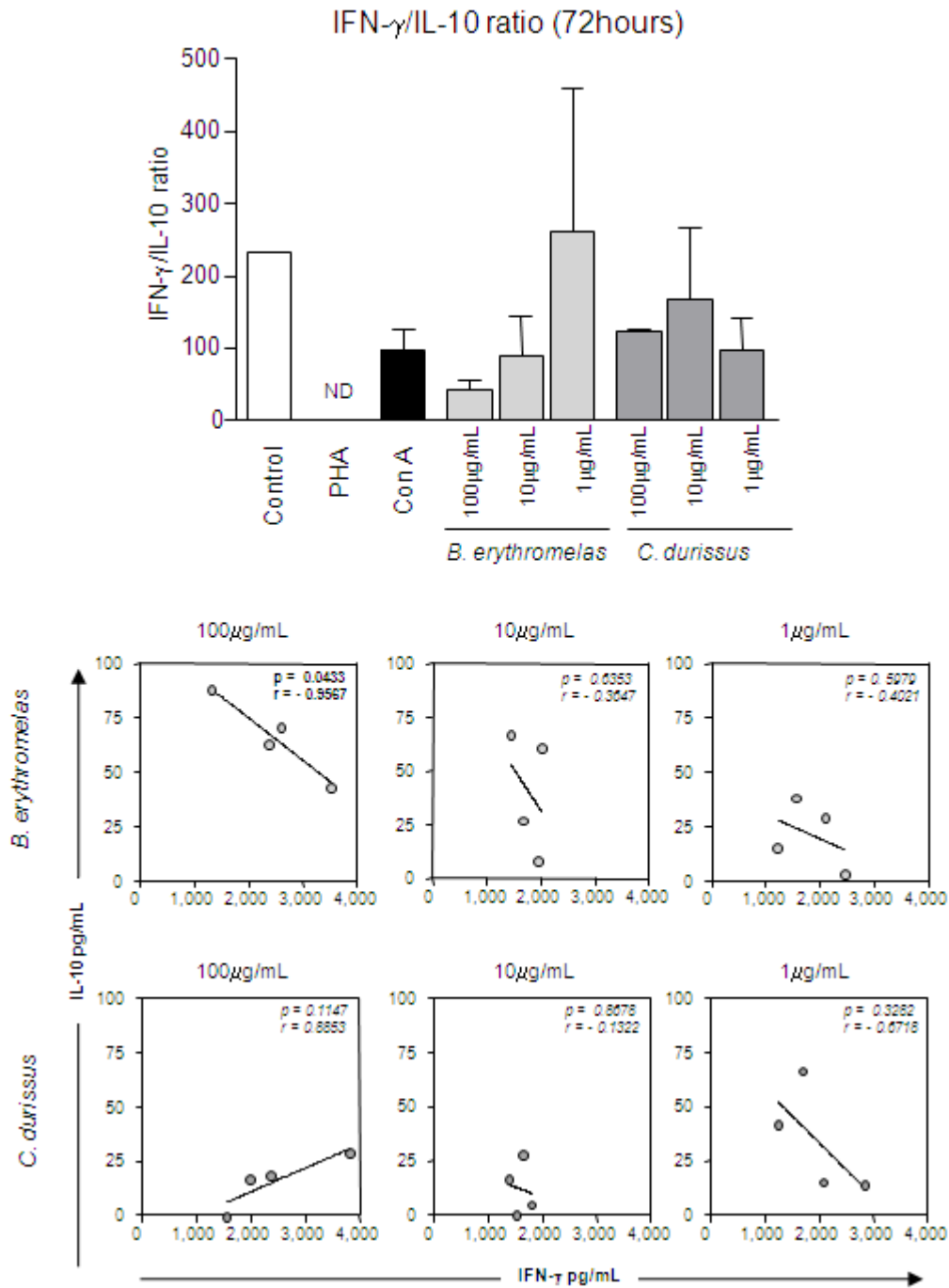


Figure 3: Analysis of IFN-g/IL-10 balance produced by BALB/c mice splenocytes following 72 hours of *in vitro* stimuli with snake venom. Top panel represents the IFN- γ /IL-10 ratio, considering the distinct experimental conditions, including: absence of exogenous stimuli – Control Culture (\square); presence of ConA (\blacksquare); presence of distinct concentrations (100 μ g/mL, 10 μ g/mL and 1 μ g/mL) of *B. erythromela* (\square) or *C.*

durissus venons (■). The results are expressed as mean IFN- γ /IL-10 ratio \pm standard error. Bottom panels represent correlation analysis between IFN- γ (pg/mL) and IL-10 (pg/mL) following *in vitro* stimuli with *B. erythromela* (○) or *C. durissus* (●) at distinct concentrations (100 μ g/mL, 10 μ g/mL and 1 μ g/mL). Correlation indices (*r* and *p*-values) are provided in the figure. Significance was considered at $p < 0.05$ and highlighted in bold.

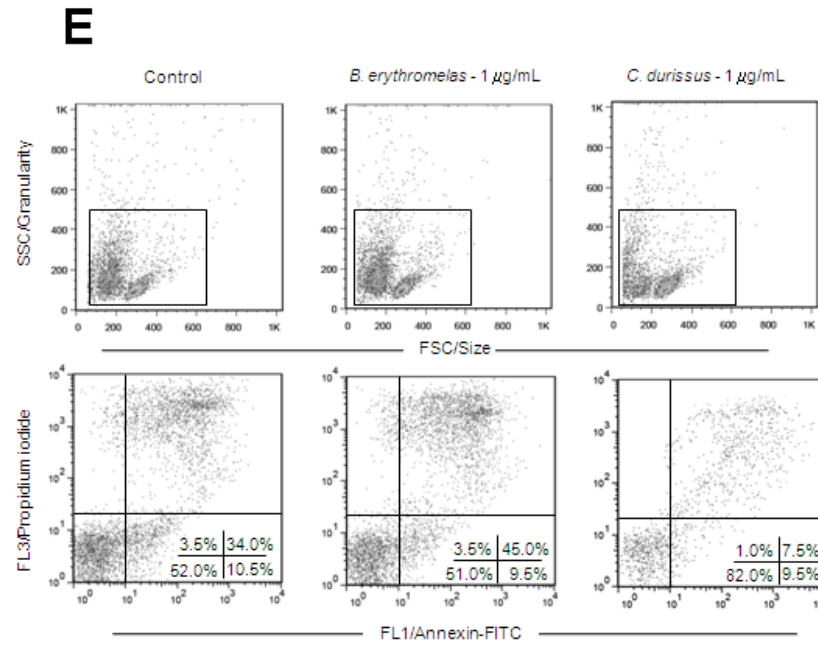
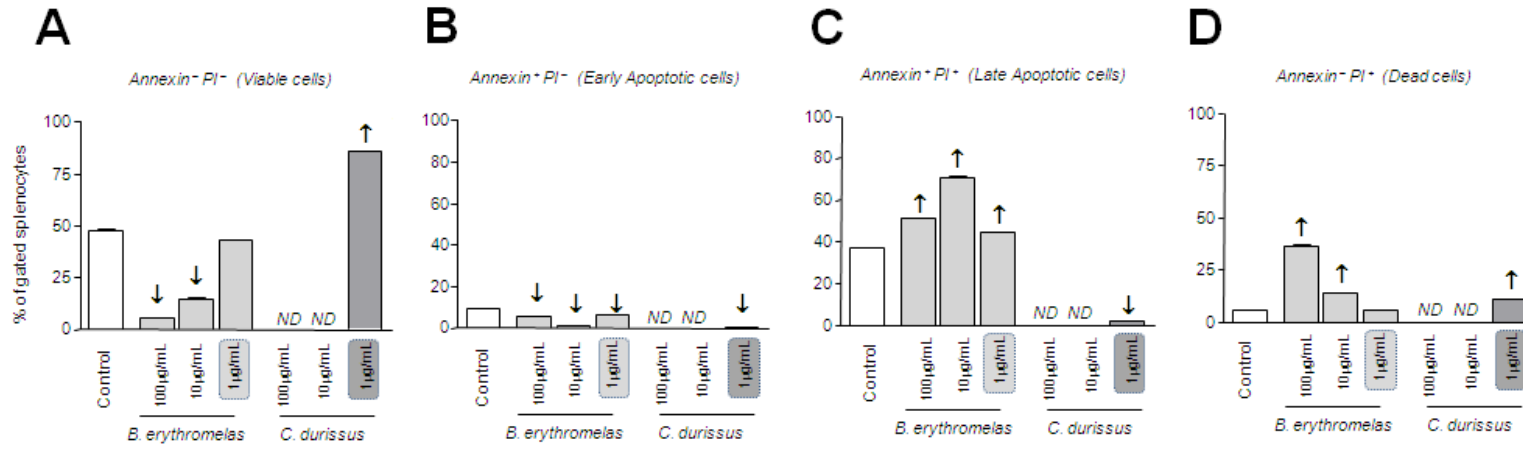


Figure 4: Profile of cell viability, apoptotic and necrotic BALB/c mice splenocytes following in vitro stimuli with snake venom. Top panel represents the cell viability status, considering the distinct experimental conditions, including: absence of exogenous stimuli – Control Culture (□) and presence of distinct concentrations (100µg/mL, 10µg/mL and 1µg/mL) of *B. erythromela* (▣) or *C. durissus* venoms (■). The results are expressed as mean percentage of viable cells (Annexin⁻ PI⁻), early apoptotic cells (Annexin⁺ PI⁻), late apoptotic cells (Annexin⁺ PI⁺) and dead cells (Annexin⁻ PI⁺) ± standard error. Bottom panels display representative dot plot distributions of cell phenotypes highlighting the percentage of viable and late apoptotic cells. Significant differences at $p < 0.05$ are highlighted by ↑↓ as compared to Control Cultures.

Apêndice G – Artigo enviado

**CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL ASPECTS OF ENVENOMINGS BY
SNAKES OF THE *BOTHROPS* GENUS**

Luna, K. P. O. (1 and 2), Márcia Bezerra da Silva (2) and Pereira, V. R. A. (3)

Correspondence: Karla P. O. Luna

Av. Moraes Rego 1235, Cidade Universitária, Recife, PE, Brazil, CEP 50670-420

(1) University of Paraíba – Campina Grande, PB, (2) Federal University of Pernambuco, Recife, PE, (3) Research Center Aggeu Magalhães/FIOCRUZ – Recife, PE

SUMMARY

Accidents caused by snakes, especially in tropical and subtropical countries, still constitute a serious public health problem due to the lack of knowledge of health professionals and the precariousness of health systems in places where most accidents occur. Snake venoms contains a range of molecules that can cause local swelling, pain and renal and respiratory insufficiency. The study of what each molecule may cause in the individual can help with complementary therapy. The knowledge of clinical aspects on envenomings provides a better identification and implementation of appropriate treatment. In addition, to understand this type of envenoming and improve the therapeutic strategy, it is necessary to understand and

study the role of important inflammatory mediators, specially NO (nitric oxide), cytokines and the complement system.

Keywords: Snakes, envenoming, clinical aspects, immunology.

1. INTRODUCTION

Occurring snake bite is an important neglected public health problem, which occurs worldwide. This is particularly relevant in rural areas of tropical and subtropical countries where bites are more common and where there is limited access to health services and the antivenom. The actual magnitude of the threat of snake envenomings to public health in these countries is unknown, which makes it difficult for the responsible institutions to optimize the prevention and treatment (1).

Authors conducted a work estimating the global reality for snake bites. In the world 1.8 million people are envenomed and 94,000 die annually. In addition, the study estimated that India is the country with the largest number of envenomings, 81,000 per year, followed by Sri Lanka (33,000), Vietnam (30,000), Mexico (28,000) and Nepal (20,000). Brazil appears along with Vietnam, with approximately 30,000 accidents per year (1).

Recently snake bite was introduced by the World Health Organization in the list of neglected tropical diseases (2). Global Snake Bite Initiative (SBI)(2010) (3) was founded, performing a greater coverage of snake bites worldwide, especially concerning the notification of accidents (4,5). According to SBI mortality for individuals envenomed by snakes is greater than for Chagas disease, dengue, cholera, leishmaniasis and eschistosomiasis. Most snake bites occurring in Latin America are caused by species of the *Bothrops* genus (6). Snakes of the *Bothrops*

genus are responsible for 90.6% of the accidents reported, with a lethality index of 0.45% of cases handled. Accidents often occur at the beginning and end of the year, with men, rural workers, in productive age (between 19 and 45 years), reaching mostly lower limbs (7).

To understand this type of envenoming and improve the therapeutic strategy, in addition to clinical and epidemiological studies, it is necessary to understand and study the role of important inflammatory mediators as nitric oxide (NO), cytokines and the complement system. Many studies describe the involvement of cytokines in the envenoming by snakes, scorpions and spiders (8,9,10). NO also participates in the pathogenesis of snake envenomings by a number of mechanisms such as: (a) it can lead to induction of tissue damage due to its ability to generate peroxynitrite and hydroxyl radicals after interaction with superoxide ions (11,12) and b) it can contribute to the hypotension characteristic of this type of envenomation, due to its vasodilating action. The precise function of NO in snake envenomings has yet to be investigated, but it is probably important in the systemic changes that have occurred resulting from snake envenomations (8). Moreover, the mechanism by which snake venoms induce the production of cytokines and NO is unknown (8). It has been observed that animals injected with Bothrops venoms showed leukocyte accumulation which is dependent on eicosanoid release and chemotactic factors derived from serum (13). However, the latter effect is probably due to the complement activation (14).

The study of clinical and immunological aspects on Bothrops envenomation would help us to understand the patient's evolution, aiming new therapies.

2. VENOM

Usually the actions of snake venoms involve coagulopathy, thrombocytopenia, edema, inflammation, shock, intracranial hemorrhage, pituitary hemorrhage, renal failure, thrombosis and pulmonary embolism. These actions occur because snake venoms are complex biological mixtures used for immobilization and death of prey for food. Instant immobilization is caused by respiratory or cardiac failure. The venoms contain approximately 25% of solid weight, from which 70% to 90% are proteins and polypeptides of relative high molecular weight. The remaining 10%-30% corresponds to low molecular weight substances such as carbohydrates, amino acids, small peptides, amines, nucleotides, inorganic compounds and ions (15).

Coagulopathy is an effect triggered by many snake venoms. The main problems of coagulopathy are to reduced blood coagulability, increasing tendency to bleeds; bleeding due to damaged veins; and progressive systemic side effects such as hemorrhage, shock, intracranial hemorrhage, pituitary hemorrhage, renal failure, thrombosis and pulmonary embolism. A range of components can activate the coagulation system, which does not necessarily result in thrombosis; actually it results in consumption of coagulation factors, leading to the incoagulability. Snake venoms can inhibit or activate platelets, as well as form an activation surface for the coagulation cascade. In addition, thrombocytopenia can occur, which leads to an increased bleeding (16).

The consumption of coagulation factors can also lead to hemorrhagic disorders, by reducing the number of platelets and by the direct action of hemorrhagic toxins on vessel wall (17). These toxins, known as hemorrhagins, have between 55 and 105 kDa and can act degrading components of the basal lamina of

vessels and promoting their disruption (18); or, producing direct lesion on endothelial cells (19).

The first hemorrhagin that causes inflammation, isolated from a venomous snake, was BAP-1 (metalloproteinase) from *Bothrops asper* (20). This hemorrhagin of class P-I (snake venom metalloproteinase type I) is edematogenic when injected into mice paw. After intramuscular injection bubbles and leukocyte infiltrate were observed in the dermis, which was associated with the degranulation of mast cells and enlargement of macrophages (21, 22).

It was showed that the main mediators of the edema caused by *B. jararaca* venom are derivatives of the aradonic acid. In addition, the authors claim that serotonin is also involved in the development of paw edema in mice. According to the authors, the mechanism of edema formation differs from the mechanism of hemorrhage, since the aradonic acid do not participate in local hemorrhage induced by this venom. Interestingly, animals pre-treated with guanetidina, capsaicin or subjected to surgical denervation had attenuated hemorrhage, but not edema. This suggests that hemorrhage and edema are a multimediated phenomena (23).

Variable degrees of thrombocytopenia are commonly found in patients envenomed by Viperidae and by some species of Elapidae and Colubridae (24, and references therein). Whether or not thrombocytopenia correlates with spontaneous systemic bleeding depends on the venom involved, especially if platelets are inactivated as well as being depleted in numbers (25, 26). The combination of thrombocytopenia with prolonged clotting time has been reported to increase the risk of bleeding (16, 25). Results of platelet counts suggest that thrombocytopenia contributes to the development of systemic bleeding in *Bothrops* envenoming, as previously reported (16), and is generally correlated with the severity of envenoming.

In addition to thrombocytopenia, impairment of platelet function is also observed in patients bitten by *B. jararaca* (27). The pathophysiology of platelet disorders is complex (25, 26, 27), but their association with coagulation disturbances (16; 28) and endothelial cell damage (29) certainly contributes to the development of systemic bleeding (30).

However, platelet counts of patients envenomed by *B. jararaca* with systemic and/or local bleeding recover promptly after antivenom therapy, reaching values almost identical to those showing no bleeding as early as 6 h after antivenom infusion. Antivenom therapy alone was effective in rapidly restoring the platelet count in these patients, without the need for platelet replacement therapy (30). The findings suggest that the rise in platelet count following venom neutralization by antivenom may be due to the dramatic production of interleukin-6, a potent promoter of thrombopoiesis and megakaryocytopoiesis (31, 32, 33). This has been observed in both experimental and human envenoming by some *Bothrops* venoms (34, 35, 36, 8). Sequestered platelets apparently do not account for the rapid increase in platelet counts observed in patients following antivenom therapy, as the return of sequestered platelets does not occur in rabbits experimentally injected with *B. jararaca* venom (26).

Blood platelets control the inflammation at several steps (37, 38) and may contribute to the extent of the hemorrhage and inflammatory processes induced by *B. jararaca* venom. Thus, the toxins responsible for thrombocytopenia (39) might increase local swelling indirectly (30).

Three patients bitten by the snake *Bothrops lanceolatus* were studied. The first patient, even though arrived at the hospital 45 minutes after the bite, presented

coagulopathy and thrombocytopenia, and was treated with 20ml of antivenom. Magnetic resonance imaging (MRI) showed acute bilateral infarcts and, on this basis, the patient was diagnosed with a grade 4 envenoming and more 20ml of antivenom was given to the patient. Blood coagulation returned to normal in 3 days and the patient was discharged from the hospital. Another patient showed what seemed to be a 'dry bite' and after tetanus prophylaxis took place, he was sent home. Neurological examination resulted normal and the patient received 20ml of BothroFav[®]. Although discharged in the same day from the hospital, the next day the patient returned with acute ischemic stroke. Blood tests showed the occurrence of coagulopathy. On this basis, the patient was then treated with more 40ml of antivenom. A third patient was admitted to hospital 2 hours after the bite and was treated with 20ml of antivenom. Still, 24 hours after the bite, he presented thrombocytopenia and after MRI it was observed acute bilateral infarcts, so he received more 40ml of antivenom. The authors observed that even though the patients received antivenom doses within the required time, two of them presented brain infarcts, so they claim that the knowledge on the variability of venom composition may be important for the development of a more effective antivenom (40).

Also regarding to this species it was reported a case where a 74-year-old individual was bitten. After two days treating the envenomation with popular medicine, the patient sought for a hospital. Although blood coagulation was normal, the platelet counting was too low and 80ml of BothroFav[®] were applied to the victim. Results of a MRI were normal. Cerebral and myocardial infarctions were observed and the patient was declared dead after 10 days. The authors claim that *B. lanceolatus* e *B. caribbaeus* envenomation present activation of vascular endothelium, with release of immature forms of vWF (von Willebrand Factor),

expressing adherent surfaces for platelet agglutination or by VEGF-type (vascular endothelial growth factor) factor (41).

Bothrops caribbaeus is another snake found in Central America, it is also characterized as having a thrombotic venom. Numeric et al (2002) reported for the first time a case of *B. caribbaeus* envenoming (Island of Santa Lucia). In this case the patient presented local pain and swelling limited to the affected leg 6 hours after the bite, when the patient was treated. One week after the bite the patient showed left hemiplegia with left facial paralysis. MRI revealed multiple areas of cerebral ischemia, in addition, the patient presented bloody leakage at the site of the bite, extensive swelling of the right lower limb, and edema at the abdominal wall and upper chest. Necrosis was also observed at the site of the bite. After 2 months, released from the hospital, the patient presented neurological sequelae. The authors discuss that this envenoming developed signs and symptoms very similar to those developed in *B. lanceolatus* envenomation in Martinique. Phylogenetic studies suggest that the venoms of the two Caribbean species of *Bothrops* are very close and may have the same thrombogenic potential (43). So, monospecific antivenom for *B. lanceolatus* envenomations could be useful for the treatment of *B. caribbaeus* envenomations as well, since a non-specific one for the last is available (42).

In *Bothrops* envenomings occurs the rapid development of the edema and inflammation at the bite site. The edema induced by these venoms are connected to the action of various substances such as hemorrhagins, toxins that act directly on the endothelium of capillaries and small veins, increasing permeability; cytotoxins, that induce the release of histamine, PLA₂, arachidonic acid, which frees the membrane phospholipids, starting the synthesis of prostaglandins (which increases capillary permeability); proteases, which break kininogen releasing kinins and leads to the

production of nitric oxide and prostaglandins; vasoactive peptides, inhibiting the action of the enzyme converting angiotensin (ECA), boosting the action of bradykinin; components of the complement cascade (44, 45).

Myonecrosis is a common result in envenomings caused by snakes of the *Bothrops* genus. *Bothrops* venoms affect muscle cells by myotoxins on ionic channels affecting the permeability of the cell membrane, and by the indirect action of proteases, causing disruption of vessels, which leads to muscle cell ischemia (34). The greatest myotoxic activity of the *Bothrops* genus belongs to *B. jaracussu* species (46).

Shock is one of the effects caused by *Bothrops* toxins through the activation of hypotensor substances. These substances activate the kallikreins-kininogen-kinin system, increasing vascular permeability and facilitating the net circulatory. The substances responsible for this purpose in non pathological states are kinins (47).

The study of *Bothrops jararaca* venom led the Brazilian researchers Rocha e Silva et al. (1949) to the discovery of bradykinin, which directed to the formulation of Captopril, widely used in the treatment of hypertension, heart failure, congestive heart failure and coronary artery disease. Therefore, the study of venoms have provided the elucidation of various pharmacological mechanisms (48).

3. PARTICIPATION OF CYTOKINES, NITRIC OXIDE AND COMPLEMENT SYSTEM

Several studies describe the involvement of cytokines in envenomings by snakes, scorpions and spiders (8,9,10). Figure 1 shows the production and activation of mediators by snake venoms.

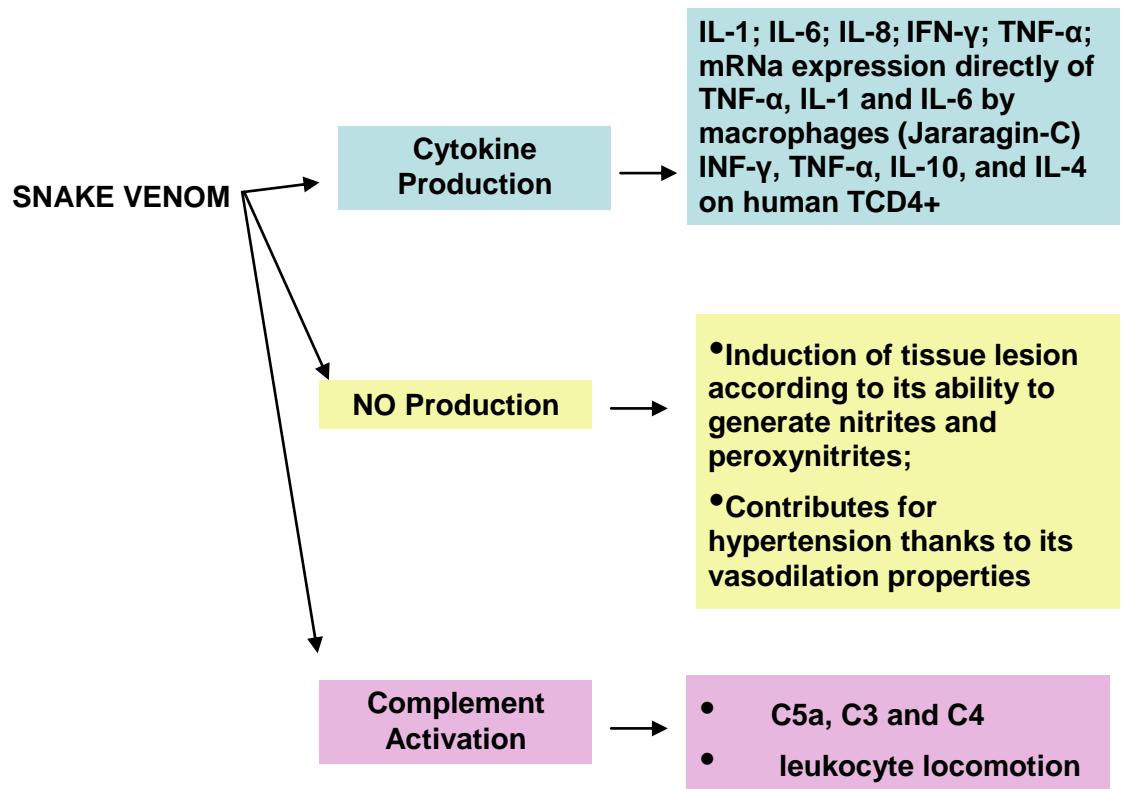


Figure 1. The production and activation of mediators by snake venoms.

The pathogenesis of systemic effects on *Bothrops* envenomations is complex. The role of cytokines, NO and Complement in the pathology has been the subject of studies (8; 13, 14, 35).

It has been showed that individuals bitten by *Bothrops jararaca* and *C. d. terrificus* from Brazil, showed increase in levels of IL-6 and IL-8. The increase of IL-6 could explain the lymphopenia and leukocytosis, since this cytokine is able to increase the secretion of adrenocorticotropic and glucocorticoids. These authors suggest that snake envenomings relate to acute trauma, inducing a typical acute response (36).

It was found that the subcutaneous injection of *B.atrox* venom (from Instituto Butantan Serpentarium) in mice induced chronic inflammation with signs of plasma

exsudate, leukocyte migration and vascular damage that resulted in hemorrhage and disruption of skeletal muscle cells. This study showed that IL-6 was not produced by esplenocytes; IL-10 was produced by esplenocytes and peritoneal cells; IFN- γ was produced by peritoneal cells, not esplenocytes. In addition, authors hypothesize that plasma exudation can be mediated by bradykinin local release and histamine; leukocyte migration and adhesion can be initiated by C3a, C5a and/or IL-8; endothelial cells can be activated and p-selectin expressed, as well as e-selectin, through paracrine activation by histamine, Thrombin-like and TNF- α ; accumulation of basophils and leukocytes can be mediated by IL-8; disruption of skeletal muscle cells can be driven directly by proteases as PLA₂, hemorrhagins or cytolytic compounds present on venoms, or indirectly by mediators released by leukocytes (49).

Studies on *B. asper* and *B. jararaca* venoms (from the Serpentarium of the Instituto Clodomiro Picado) showed that the seriousness of envenomings would probably be linked to high levels of IL-1, TNF- α and IL-6, while on moderate or light envenomings, IL-6 would show a moderate level, and IL-1 and TNF- α were not increased. In their experiments, Petricevich et al. (2000) showed the presence of IFN- γ and IL-10 in envenomed mice serum (8).

The effects of neutrophil depletion on cytokine expression, chemokines and iNOs induced by *B. atrox* venom (from the Instituto Butantan Serpentarium) were studied with the objective to understand tissue lesions caused by this venom. Their results showed that neutrophil depleted animals didn't have significant neutrophil influx in the peritoneal cavity or the gastrocnemius, compared to the animals not depleted. Levels of IL-6, MIP-1 β , MIP-2 and NO, but not of IL-1 β , were significantly larger in serum of depleted animals. When mRNA of cytokines of depleted and not

depleted animals were analyzed, the authors concluded that IL-1 β , IL-6, iNOS, RANTES, MIP-2 and CXCR2 were detected in cells of both groups of mice; TNF- α and TGF- β were not detected; and CCR1, CCR5 and MIP-1 β were detected only in cells of depleted animals. These findings indicate that neutrophils negatively regulate the expression of MIP-1 β , CCR1 and CCR5 by cells in the location of injuries, what is important for cell migration on inflammation (49).

Investigating the effects of jararagin-c, toxin composed only of a type-desitegrin and type-cysteine domain, in the induction of leukocyte rolling and release of pro-inflammatory cytokines at the site of injection, Clissa et al. (2006) showed that the jararagin-c stimulated the interaction between leucocytes and post capillaries veins, since the number of rolling leucocytes increased by 250% after treatment *in vivo* with the isolated toxin. In addition, the toxin was able to induce the release of cytokines such as IL-1 β , IL-6, and TNF- α (51).

The investigation of the induction of inflammation by neuwiedase, a P-I class hemorrhagin isolated from *Bothrops neuwied* (synonyms: *B. n. goyazensis*, *B. n. meridionalis*, *B. n. paranaensis* and *B. n. urutu*) (51) took place. This study was conducted in gastrocnemius cell cultures. Their findings showed that infiltrated cellular cultures treated with neuwiedase were composed mainly of polimorphonuclear cells in acute stages; and in late stages macrophages appeared (52). These results supports the study of Fernandes et al. (2006), using the BAP-1 from *B. asper*. Jararagin was also able to induce the accumulation of leucocytes in mice air pouch (51). Regarding to the release of cytokines induced by neuwiedase, (53) showed a significant increase in KC (chemokine like the human IL-8) in muscle homogenate 2 hours after inoculation with neuwiedase. Significant increase of IL-6 and IL-1 β has also been verified. This information corroborate with studies in BAP-1,

with the increase of IL-6 and IL-1 muscular homogenate (54) and the increase in levels of IL-1 β and peritoneal exsudate of mice injected with the same hemorrhagin (55).

There has been noted that the increase in IL-1 would lead to increased expression of IL-6 and IL-8 (KC). IL-1 and IL-6 induced the expression of adhesion molecules by endothelial cells, i.e. the same induced leukocyte migration (56, 57, 58). The authors conclude that muscle can have an important role in inflammation induced by hemorrhagins (SVMPs), this being the most important tissue responsible for the production of cytokines by neuwiedase (52). The release of IL-1 and IL-6 after the injection of BAP-1 on muscles suggests that, in addition mediate mast cell, cytokines may also be involved in local inflammatory response induced by BAP-1 (54). According to this hypothesis, increasing levels of IL-1 were observed in mice peritoneal exsudate after injection of BAP-1 (54).

Subsequent investigation showed that jararahgin stimulates directly mRNA expression of TNF- α , IL-1 and IL-6 by macrophages (59). This suggests that the macrophages are important SVMP targets. Research with mice knock out to TNF- α and IL-6 receptors showed that both cytokines are relevant to the development of jararahgin induced necrosis, but not edema or hemorrhage (60).

The mechanism through which Bothrops venoms induce cytokine production is not known (8). In experiments with flow cytometry, Luna et al. (data not yet published), incubating mononuclear cells of healthy individuals with 1ug/ml of *B. erythromelas* venoms (from Northeastern Brazil) showed significant expression of IFN- γ , TNF- α , IL-10, and IL-4 on TCD4⁺ cells, comparing to non stimulated cells cultures through flow cytometry (61). These results indicate that the venom of that snake induces a TH1/TH2 cell type response, responsible for the activation of B

cells, macrophages and dendritic cells involved in phagocytosis (62). This is especially important in the inflammation for this type of envenoming, by cleaning necrotic tissue at the bite site.

Investigating whether *B. asper* venom (from the Atlantic region of Costa Rica) would have the ability to activate Complement, Farsky, et al. (2000) (63) showed that C5a is involved in leukocyte locomotion in the presence of the venom *in vivo* and *in vitro*. In addition, metalloproteinase BaP-1, isolated from the same venom, was able to activate the Complement system, which can be observed by the decrease in serum hemolytic activity. The authors also claim that the BaP-1 activated the chemotaxis for neutrophils, which has not happened with none of the PLA₂ of the venom (63).

Luna et al (2010) observed that both *B. erythromelas* and *C. d. cascavella* (from Northeastern Brazil) venoms induced higher IFN- γ and IL-6 production on mice splenocytes. Nitric oxide was significantly produced only by *B. erythromelas* venom, which also showed a higher rate of cell death induction when compared to *C. d. cascavella*. Results showed that *B. erythromelas* and *C. d. cascavella* venoms induced a marked immunomodulatory response, *in vitro*, through cytokines and NO production. However, *B. erythromelas* induced a pro-inflammatory response and a higher rate of cell death in relation to *C. d. cascavella* venom (64).

In order to assess to what extent the Complement system would be involved in the pathogenesis of inflammation and/or hemorrhage, it was isolated Hi5 protein from *B. atrox* venom (from the Serpentarium of the Instituto Butantan), which has haemorrhagic activity and activates the Complement system. When incubated with normal human serum, this hemorrhagin loses its hemolytic activity. This effect was dose-dependent and was accompanied by consumption of C3 and C4. In the same study, C3 semipurified was incubated with Hi5 being cleaved into smaller fragments.

Protein HI-5 was then injected into gastrocnemius mouse inducing inflammation characterized by edema and inflow of PMN. Haemorrhage was not changed. The authors also claim that, apparently, the Complement system, as a source of endogenous mediators of the primary effects of acute inflammation, such as C3a and C5a, and also participates in recruiting leukocytes, but not in the induction of hemorrhage (65).

Thus, studies involving the participation of the NO, cytokines and Complement provide experimental evidence that the direct action of venom toxins in various tissues have a relevant role in the pathogenesis of systemic alterations characteristic of Bothrops envenomations.

4. THERAPY

At the end of the 19th century Vital Brazil (1865-1950) described, for the first time in the world, specific therapy for the treatment of envenomings symptoms caused by snakes. After reading a report of Calmette's anti-Naja serum, Vital Brazil purchased monovalent serum against the venom of *Bothrops jararaca* and the venom of *Crotalus durissus terrificus*. In 1989 this led to the first demonstration of the specificity of anti-venomous serum and later to the first production of polyvalent serum for therapeutic use (66, 67). At the time, the scientist immunized horses with the venoms of *Lachesis lanceolatus* (today *Bothrops jararaca*) and *Crotalus terrificus* (today *Crotalus durissus terrificus*). Since then serum therapy was introduced definitively in clinic. In Brazil the antivenom producers are Instituto Butantan, Fundação Ezequiel Dias and Vital Brazil Institute (6, 68, 69).

The antibodies used for an efficient neutralization of venom toxins need to be specifically addressed to the main toxins responsible for local and systemic actions.

Generally, the antivenom must be specific, except in cases where the clinic is similar, as in cases of accidents by *Lachesis* and *Bothrops*. Nevertheless, poly-specific antivenom present disadvantages in their use due to its low efficiency. On account of structural differences of each toxin, some may lead to the production of antibodies against the predominant toxins of the given venom to the detriment of another. In addition, they reduce the immunized animal response, consequently reducing the quantity of antibodies produced, due to the immunosuppressor activity of some venoms such as *C. d. terrificus* and *L. muta muta*. Variability between species and between individuals must also be considered, since there are variations between periods of time in the year, age of the specimen and geographical distribution (70).

Thus, to reduce problems with hypersensitivity some producers digest the immunoglobulin molecule into their independent fragments, featuring as final product only the portion $f(ab)'_2$ or Fab (70).

Currently studies around genetic correlating snakes of the same genre have been performed. The characterization of venoms by Proteomics contributes to a greater understanding of biology, ecology and physiopathology of envenomings caused by these animals. In addition, the knowledge of different families of toxins may be relevant for the generation of immunization protocols with the production of antibodies with greater specificity and effectiveness than the conventional ones, produced in horses (70).

Studying the humoral immune response presented by individuals bitten by the snake *Bothrops erythromelas*, Luna et al (2010) showed a marked 31KDa protein which was not neutralized by the commercial antivenom used in Brazil. This discover claims that some venom components are not well neutralized when the venom does not make part of the pool of the venoms used to purchase the antivenoms (64).

Nowadays understanding the molecular mechanisms that underline venom variations, like ontogenetic and geographical, and a deep knowledge of venom toxins may lead to a great impact in the treatment of snake bite victims, as well as in the selection of specimens for the generation of improved antidotes (71).

The heterogeneity observed in inter- and intra-species in venom composition should be considered in the presentation of symptoms of envenoming in humans, especially with regard to envenoming triggered by the same species in different geographic regions (72). Understanding the antigenic variation of the toxins of snake venoms from different geographical origins can lead to the design of new therapeutic approaches, specific to each toxin, based on the immunogenicity of these components. Furthermore, high levels in the inter- and intraspecific variation may be an impact in the treatment of victims and calls attention to the need of using a mixture of venoms for the production of more effective antivenoms. Thus, the development of specific antivenom is related to a detailed knowledge of the composition of venoms and the immunological profile established by each (73).

A good example of antivenomics (term used to identify toxins that are recognized by the antivenom by proteomics techniques (73) is the case of the genus *Crotalus*. The antivenom produced against the venom of *Crotalus simus simus*, Central America species, is ineffective for the neutralization of the neurotoxicity of the venom of *Crotalus durissus terrificus* from South America. Likewise, antivenoms produced in South America against the venom of *C. d. terrificus* are ineffective in neutralizing the hemorrhagic activity of other venoms of the *Crotalus* genus. This case illustrates how the knowledge of variations on snake venoms and their geographical distribution can lead to the generation of more effective antivenoms against the venoms of *Crotalus* in South and Central America (72).

One of the most studied species in terms of proteomics, with respect to individual variations, geographical and ontogenetic of its venom is the snake *B. asper*, the most important medical snake from southern Mexico to southern Central America (74). Recently it was used the venom to define in detail the molecular basis of complex *B. asper* and the ontogenetic changes in the composition of the venom. Notably, it was identified a similarity of 52% for the populations in the venom of *B. asper* from Caribbean and Pacific regions (74).

Those authors reported that *B. asper* snakes from Caribbean and Pacific present different venom protein profiles. Different venom patterns presented by same snake species could be used to identify the origin zone of the animals. The geographical venom variability reported by the authors points a possible impact in treatment of snake bite victims and the selection of specimens for antivenom production. This study shows the importance of using pooled venoms for antivenom production (74).

Important ontogenetic variations were identified in venom pool from neonates and adults of the species *B. asper* from the same geographic region (Caribbean and Pacific). The largest variations were observed in the ontogenetic shift to SVMP SVMPs-PIII-PI, and secretion of PLA₂ in adults, but in small amounts in newborns. Furthermore, this ontogenetic resulted in increased complexity of the venom, indicating that a change in the venom for the act of restraining and digest the prey is related to age of the snake (74).

Intraspecific diversity resulting in clinical variability of envenomation must be considered since bites by specific populations may require different treatments (75).

Evaluating the venom of *B. atrox* from Colombia, Brazil, Peru and Ecuador, it was showed that Colombian and Brazilian *B. atrox* venoms share a few toxins,

including batroxastatin, a BPP, two K49- and one D49-PLA2, a CRISP, and a LAO. These venoms also showed different proteins which may be useful as regional markers (75).

Evaluating the Costa Rican antivenom against these four venoms the authors showed that this antivenom neutralized in 100% the Ecuador venom. In the case of Brazil and Peru, more than 90% of the venoms were neutralized. This cross reactivity profile evidences the close evolutionary kinship between *B. asper* and *B. atrox* (75).

Polyspecific commercial antivenoms generated by horses subjected to additional venom injections, presented a higher neutralizing activity compared to the antivenoms prepared from horses' plasma subjected to only one immunization. Hence, the authors indicate repeated immunization cycles to increase the neutralizing potency of the hyperimmune plasma (76).

The isolation of a large number of toxins specific for immunization requires access to large amounts of venom, which is not always possible. Alternatively, the structural information of a specific toxin from the venom can facilitate the cloning and expression of particularly important venom toxins (76). Another alternative is immunization with DNA specific to a particular toxin (77, 78) or chimeric DNA which, together with a drawing of the molecule through bioinformatics, can predict whether the molecule is immunogenic enough to stimulate antibody production (79).

Therefore, complementary approaches related to the discovery of molecules that neutralize a variety of toxins in the venom are fundamental to reach advances on treating this type of envenoming.

CONCLUSIONS

It is important to study and understand the snake bite evidence to the world nowadays, as this is one of the neglected tropical diseases according to the WHO (2009) (2). The involvement of society, politicians and researches is necessary to improve educational, research and political actions, aiming to diminish the events caused by venomous snakes around the world.

Hence, studies with mediators of the immune response such as NO, cytokines and complement are necessary in order to clarify the role played by them in the evolution and emergence of clinical manifestations of patients with envenomation induced by Bothrops, enabling new advances in preventive strategies and immunochemotherapy (at regional and global levels).

References

- (1) KASTURIRATNE, A., WICKREMASINGHE A. R., DE SILVA, N., GUNAWARDENA, N. K., PATHMESWARAN, A. et al. The Global Burden of Snakebite: A Literature Analysis and Modelling Based on Regional Estimates of Envenoming and Deaths. *PLoS Medicine*. 2008; 5 – 11
- (2) WHO.2009 . Available: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/snakebites/en/index.html.
- (3) WILLIAMS, D., GUTIERREZ, J. M., HARRISON, R., WARRELL, D. A., WHITE, J., WINKEL, K., GOPALAKRISHNAKONE, P. The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snake bite. *Lancet*. 2010; 375 (9708):89-91
- (4) GUTIERREZ, J. M., WILLIAMS, D., FAN, H. W., WARRELL, D. A. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. 2010. *Toxicon*, 56(7): 1223-35.
- (5) GUTIERREZ, J. M., WILLIAMS, D., FAN, H. W. AND WARRELL, D. A. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. *Toxicon*. 2010; 56 (7):1223-35
- (6) HOGE, A. R. & ROMANO-HOGE, S. A. R. W. L. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. *Memórias do Instituto Butantan*, 1979, 2^a Edição, 42 (43): 373–496.
- (7) BOCHNER, R. S., STRUCHINER, C. J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. *Cadernos de Saúde Pública*, 2003; 19: 7-16. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. *Cadernos de Saúde Pública*. 2003; 19 7-16
- (8) PETRICEVICH, V. L. T., C. F. P.; TAMBOURGHY, D. V.; GUTIÉRREZ, J. M. . Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon*. 2000; 38 1253-1266
- (9) MEKI, A. R. M. A. e. EL-DEAN., Z. M. M. Serum interleukin-1 β , interleukin-6, nitric oxide and α 1-antitripsin in scorpion envenomed children. *Toxicon*. 1998; 36 1851-1859
- (10) TAMBOURGHY, D. V. D. S., M. C.; FURTADO, M. F. D.; DE FREITAS, M. C. W.; DIAS-DA-SILVA. W. e KIPNIS. T. L. . Pro-inflammatory activities in elapid snake venoms. *Braz. J. Pharmacol*. 1994; 112 723-727
- (11) RADI, R. B., J. S., BUSH, K. M. E FREEMAN, B. A. . Peroxynitriteoxidation of sulphhydryls: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J. Biol. Chem*. 1991; 266 4244 – 4250
- (12) HOGG, N., DARLEY-USMER, V. M., WILSON, M. T. e MONCADA, S. Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. *Biochem. J*. 1992; 281 419 – 424]
- (13) FARSKY, S. H., WALBER, J., COSTA-CRUZ, M., CURY, Y. AND TEIXEIRA, C. F. Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom: in vivo and in vitro studies. *Toxicon*. 1997; 35 (2):185-93
- (14) DIAS-DA-SILVA, W. T., D. V.; CAMPOS, A. C. M. R.; MAGNOLI, F.; PETRICEVICH, V. L. e KIPNIS, T. L. . Complement activation by a animal venoms. *J. Toxicol. Toxin. Rev.*, . 1995; 14 375-400
- (15) SILVA JR., N. J. E. BUCARETCHI., F. Mecanismo de ação do veneno elapídico e aspectos clínicos dos acidentes. Book V. e. a. Haddad Jr. *Animais Peçonhentos do Brasil*. Editora Sarvier. 2009
- (16) WHITE, J. Snake venoms and coagulopathy. *Toxicon*. 2005; 45 951-967

- (17) KAMIGUTI, A. S., Cardoso, J. L. C., THEAKSTON, R. D. G.; et al. Coagulopathy and hemorrhage in human victims of *Bothrops jararaca* envenoming in Brazil. *Toxicon*. 1991; 28 961 – 972
- (18) MANDELBAUN, F. R. Isolamento e caracterização de dois fatores hemorrágicos do veneno de *Bothrops jararaca*. 1976. São Paulo, Escola Paulista de Medicina
- (19) GUTIÉRREZ, J. M. A., O. e BOLAÑOS, R. Mionecrosis, hemorragia y oedema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en ratón blanco. *Toxicon*. 1980; 18 603-610
- (20) GUTIERREZ, J. M., ROMERO, M., DIAZ, C., BORKOW, G. AND OVADIA, M. Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon*. 1995; 33 (1):19-29
- (21) RUCAVADO, A. N., J. e GUTIÉRREZ, J. M. . Blister formation and skin damage induced by BaP1, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Int. J. Exp.Pathol*. 1998; 79 (4):245-256
- (22) RUCAVADO, A., FLORES-SANCHEZ, E., FRANCESCHI, A., MAGALHAES, A. AND GUTIERREZ, J. M. Characterization of the local tissue damage induced by LHF-II, a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity isolated from *Lachesis muta muta* snake venom. *Toxicon*. 1999; 37 (9):1297-312
- (23) GONÇALVES, L. R. e. MARIANO, M. Local hemorrhage induced by *Bothrops jararaca* venom: relationship to neurogenic inflammation. *Med. Inflamm*. 2000; 9 101-107
- (24) MEIER, J. e. WHITE, J. Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons. 1995, Florida
- (25) OJNUCKARIN, P., MAHASANDANA, S., INTRAGUMTHORNCHAI, T., SUTCHARITCHAN, P., SWASDIKUL, D. Prognostic factors of green pit viper bites. *Am J Trop Med Hyg*. 1998, 58(1): 22-5
- (26) TALLON, R. W. K., K. L.; BARNES, S. G.; BALLARD, J. O. envenomation coagulopathy from snake bites. *New England Journal of Medicine*. 1981; 305 1347
- (27) SANO-MARTINS, I. S., SANTORO, M. L., CASTRO, S. C., FAN, H. W., CARDOSO, J. L. AND THEAKSTON, R. D. Platelet aggregation in patients bitten by the Brazilian snake *Bothrops jararaca*. *Thromb Res*. 1997; 87 (2):183-95
- (28) SANTORO, M. L. AND SANO-MARTINS, I. S. Platelet dysfunction during *Bothrops jararaca* snake envenomation in rabbits. *Thromb Haemost*. 2004; 92 (2):369-8
- (29) SANTORO, M. L., SANO-MARTINS, I. S. AND CHAMONE, D. A. In Vivo Platelet Activation Induced by *Bothrops jararaca* Venom in Rabbits. *Platelets*. 1994; 5 (3):162-70
- (30) MARUYAMA, M., KAMIGUTI, A. S., CARDOSO, J. L., SANO-MARTINS, I. S., CHUDZINSKI, A. M., SANTORO, M. L., MORENA, P. ET AL. Studies on blood coagulation and fibrinolysis in patients bitten by *Bothrops jararaca* (*jararaca*). *Thromb Haemost*. 1990; 63 (3):449-53
- (31) SANTORO M, L., SANO-MARTINS. I., FAN, H. W., CARDOSO J.L., THEAKSTON R.D.G., WARRELL D.A. Butantan Institute Antivenom Study Group. Haematological evaluation of patients bitten by the jararaca, *Bothrops jararaca*, in Brazil. *Toxicon*. 2008 15 (51(8)):1440-8

- (32) ASANO, S., OKANO, A., OZAWA, K., NAKAHATA, T., ISHIBASHI, T., KOIKE, K. ET AL. In vivo effects of recombinant human interleukin-6 in primates: stimulated production of platelets. *Blood*. 1990; 75 (8):1602-5
- (33) HILL, R. J., M. K. WARREN, LEVIN, J. Stimulation of thrombopoiesis in mice by human recombinant interleukin 6. *J Clin Inves*. 1990, 85 (4): 1242-1247
- (34) ISHIBASHI, T., KIMURA, H., SHIKAMA, Y., UCHIDA, T., KARIYONE, S., HIRANO, T., ISHIMOTO, T. ET AL. Interleukin-6 is a potent thrombopoietic factor in vivo in mice. *Blood*. 1989; 74 (4):1241-4
- (35) AVILA-AGUERO, M. L., PARIS, M. M., HU, S., PETERSON, P. K., GUTIERREZ, J. M., LOMONTE, B. Faingezicht, I. Systemic cytokine response in children bitten by snakes in Costa Rica. *Pediatr Emerg Care*. 2001; 17 (6):425-9
- (36) BARRAVIERA, B. Acute-phase reactions including cytokines in patients bitten by Bothrops and Crotalus snakes in Brazil. *J. Venomous Anim. and Toxins*. 1995; 1 11-22
- (37) LOMONTE, B., TARKOWSKI, A. AND HANSON, L. A. Host response to Bothrops asper snake venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. *Inflammation*. 1993; 17 (2):93-105
- (38) SMITH, M. J. AND BOLAM., J. P. Anti-inflammatory effects of blood platelets in the rat. *J. Pathology*. 1979; 129 65-71
- (39) WEYRICH, A. S., LINDEMANN, S. AND ZIMMERMAN, G. A. The evolving role of platelets in inflammation. *J Thromb Haemost*. 2003; 1 (9):1897-905
- (40) THOMAS, L., CHAUSSON, N., UZAN, J., KAIKOMAR, S., VIGNES, R., PLUMELLE, Y., BUCHER, B., SMADJA, D. Thrombotic stroke following snake bites by the "Fer-de-Lance" Bothrops lanceolatus in Martinique despite antivenom treatment: a report of three recent cases. *Toxicon*. 2006; 48 (1):23-8
- (41) MALBRANQUE, S., PIERCECCHI-MARTI, M. D., THOMAS, L., BARBEY, C., COURCIER, D., BUCHER, B., RIDARCH, A. ET AL. Fatal diffuse thrombotic microangiopathy after a bite by the "Fer-de-Lance" pit viper (Bothrops lanceolatus) of Martinique. *Am J Trop Med Hyg*. 2008; 78 (6):856-61
- (42) NUMERIC, P., MORAVIE, V., DIDIER, M., CHATOT-HENRY, D., CIRILLE, S., BUCHER, B., THOMAS, L. Multiple cerebral infarctions following a snakebite by Bothrops caribbaeus. *Am J Trop Med Hyg*. 2002; 67 (3):287-8
- (43) Wuster, W., P. Golay, et al. Synopsis of recent developments in venomous snake systematics. 1999; *Toxicon*, 37(8): 1123-9
- (44) GUTIERREZ, J. M., CHAVES, F., GENE, J. A., LOMONTE, B., CAMACHO, Z. AND SCHOSINSKY, K. Myonecrosis induced in mice by a basic myotoxin isolated from the venom of the snake Bothrops nummifer (jumping viper) from Costa Rica. *Toxicon*. 1989; 27 (7):735-45
- (45) GILMAN, G. As bases farmacológicas da terapêutica. 1996
- (46) MOURA-DA-SILVA, A. M. D., H.; LAING, G. et al. Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of Bothrops snakes. *Toxicon*. 1991; 29 713 – 723
- (47) FRANÇA, F. O. S. e. MÁLAQUE, C. M. S. Acidente Botrópico. In: Animais Peçonhentos no Brasil – Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. Haddad Jr., V. et al. 1ª. Ed., Sarvier, 2003. Acidente Botrópico. Book V. e. a. Haddad Jr. Animais Peçonhentos no Brasil - Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. Sarvier. 2003.

- (48) ROCHA E SILVA, M. B., W. T. & ROSENFELD, G. Bradykinin, a hipotensive and smooth muscle stimulating fator released from plasma globulin by sanke venoms e by trypsin. 1949. Am J. Physiol., 156: 261 - 273
- (49) BARROS, S. F. F., I.; PETRICEVICH, V. L e KPINIS, T. L. Local inflammation, lethality and cytokine release in mice injected with Bothrops atrox venom. Mediators of Inflammation. 1998; 7 339-346
- (50) ESCOCARD, R. C. M. PETRETSKI, J. H.; AZEVEDO-SILVA, J.; CARVALHO, E. C. Q.; DIAS DA SILVA, W.; e KIPNIS, T. L. Neutrophils regulate the expression of cytokines, chemokines and nitric oxide synthase-nitric oxide in mice injected with B. atrox venom. Immunobiology. 2006; 37-46
- (51) CLISSA, P. B., LOPES-FERREIRA, M., DELLA-CASA, M. S., FARSKY, S. H. AND MOURA-DA-SILVA, A. M. Importance of jararhagin disintegrin-like and cysteine-rich domains in the early events of local inflammatory response. Toxicon. 2006; 47 (5):591-6
- (52) Xavier da Silva, V. e. R., M. T. Taxonomic revision of the Bothrops neuwiedi complex (Serpentes, Viperidae) with discription of a new species. 2008. Phyllomedusa 7 (1): 45-90.
- (53) LOPES, D. S. B., C.; OLIVEIRA, C. F.; ALCÂNTARA, T. M.; OLIVEIRA, J. D. D.; GOULART, L. R.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; CLISSA. P. B. e RODRIGUES, V. M. . Characterization of inflammatory reaction induced by neuwiedase, a P-I metalloproteinase isolated from Bothrops neuwiedi venom. Toxicon. 2009; 54 42-49
- (54) FERNANDES, C. M. Z., S. R.; ZULIANI, P.J.; RUCAVADO, A.; GUTIÉRRES, J. M. e TEIXEIRA, C. F. P. Inflammatory effects of BaP1 a metalloproteinase isolated from Bothrops asper snake venom: leukocyte recruitment and release of cytokines. Toxicon. 2006; 47 549-559
- (55) Gutierrez, J. M., M. Romero, et al. Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of the snake Bothrops asper (terciopelo). 1995, Toxicon 33, (1): 19-29.
- (56) COSTA, E. P., CLISSA, P. B., TEIXEIRA, C. F. AND MOURA-DA-SILVA, A. M. Importance of metalloproteinases and macrophages in viper snake envenomation-induced local inflammation. Inflammation. 2002; 26 (1):13-7
- (57) STYLIANOU, E. e. S., J. Molecules in focus: interleukin-1. Int. J. Biochem. Cell. Biol. 199830: 1075-1079.
- (58) EBNET, K. e. V., D. Molecular mechanisms that control leukocytes extravasation: the selectins and the chemokines. Histochem.Cell Biol. 1999,112: 1-23
- (59) HOPKINS, S. J. The patophysiological role of cytokines. 2003Leg. Med 5,(1): S45-S57
- (60) CLISSA, P. B. L., G. D.; THEAKSTON, R.D.G; MOTA, I.; TAYLOR, M. J. e MOURA-DA-SILVA. A. M. The effect of jararhagin, a metalloproteinase from Bothrops jararaca venom, on pro-inflammatory cytokines released by murine peritoneal adherent cells. Toxico. The effect of jararhagin, a metalloproteinase from Bothrops jararaca venom, on pro-inflammatory cytokines released by murine peritoneal adherent cells. Toxicon. 2001; 39 1567-1573
- (61) Clissa, P. B., M. Lopes-Ferreira, et al. Importance of jararhagin disintegrin-like and cysteine-rich domains in the early events of local inflammatory response. 2006, Toxicon 47, (5): 591-6.

- (62) LUNA, K. P. O. M., C. M. L.; PASCOAL, V. P. M.; MARTINS-FILHO, O. A.; PEREIRA, V. R. A. Bothrops erythromelas and Crotalus durissus cascavella snake venoms induce pro-inflammatory response in mice splenocytes. *International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research*. 2010; In press
- (63) MOSSMAN, T. R. AND COFFMAN, R. L. Th1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Rev. of Immunol.* 1989. **7**: 145-173
- (64) FARSKY, S. H. P. G., L. R. C.; GUTIÉRREZ, J. M.; CORREA, A. P.; RUCAVADO, A.; GASQUE, P. e TAMBOURGHI, D. V. Bothrops asper snake venom and its metalloproteinase BaP1 activate the complement system. *Med. Inflamm.* 2000; **9** 213-221
- (65) LUNA, K. P. O. XAVIER, E. M., PASCOAL, V. P. M.; MARTINS-FILHO, O. A.; PEREIRA, V. R. A. Humoral immune response of patients bitten by the snake Bothrops erythromelas. *Rev. Bras. Med. Trop.* 2010; In press
- (66) RODRIGUES, F. G. P., J. H.; KANASHIRO, M. M.; LEMOS. L.; DIAS DA SILVA, W. e KIPNIS, T. L. . The complement system is involved in acute inflammation but not in the hemorrhage produced by a Bothrops atrox snake venom low molecular mass proteinase. *Molec. Imm.* 2004; **40** 1149-1156
- (67) Hawgood, B. J. Pioneers of anti-venomous serotherapy: Dr Vital Brazil (1865-1950). 1992. *Toxicon* 30, (5-6): 573-9
- (68) Hawgood, B. J. Doctor Albert Calmette 1863-1933: founder of antivenomous serotherapy and of antituberculous BCG vaccination. 1999. *Toxicon*, 37(9): 1241-58
- (69) BRAZIL, V. C. Contribuição ao estudo do veneno ofídico: tratamento das mordeduras de cobra. *Ver. Med. S. Paulo.* 1903; (13):265-278
- (70) BRAZIL, V. Contribution à l'étude d'origine ophidienne. 1905, Paris.
- (71) CARDOSO, D. F. P. 2003. Produção de soro antitoxinas e perspectivas de modernização por técnicas de biologia molecular. *Animais Peçonhentos no Brasil - Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. V. Haddad Jr. São Paulo, Sarvier.
- (72) WARRELL, D. A. Geographical intraspecies variation in the clinical manifestation of envenoming by snakes. Book R. S. W. Thorpe, W.; Malhorta, A. editors. *Venomous snakes: ecology, evolution and snake bites*. Oxford. Clarendon Press. 1997. 189-204
- (73) GUTIERREZ, J. M., LOMONTE, B., LEON, G., ALAPE-GIRON, A., FLORES-DIAZ, M., SANZ, L., ANGULO, Y., CALVETE, J. J. Snake venomomics and antivenomics: Proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. *J Proteomics.* 2009; **72** (2):165-82
- (74) CALVETE, J. J., SANZ, L., ANGULO, Y., LOMONTE, B. AND GUTIERREZ, J. M. Venoms, venomomics, antivenomics. *FEBS Lett.* 2009; **583** (11):1736-43
- (75) ALAPE-GIRON, A., SANZ, L., ESCOLANO, J., FLORES-DIAZ, M., MADRIGAL, M., SASA, M., CALVETE, J. J. Snake venomomics of the lancehead pitviper Bothrops asper: geographic, individual, and ontogenetic variations. *J Proteome Res.* 2008; **7** (8):3556-71
- (76) LOMONTE, B., GUTIERREZ, J. M., CALVETE, J. J. Snake venomomics and antivenomics of Bothrops atrox venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Peru and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards paedomorphism. *J Proteomics.* 2009; **73** (1):57-78

- (77) Gutierrez, J. M., Sanz, L., Flores-Días, M., Figueroa, L., Madrigal, M., Herrera, M. et al. Impact of regional variation in *Bothrops asper* snake venom on the design of antivenoms: integrating antivenomics and neutralization approaches. 2010. *J. Proteomics*, 9: 564-577
- (78) ARCE-ESTRADA, V., AZOFEIFA-CORDERO, G., ESTRADA, R., ALAPE-GIRON, A. AND FLORES-DIAZ, M. Neutralization of venom-induced hemorrhage by equine antibodies raised by immunization with a plasmid encoding a novel P-II metalloproteinase from the lancehead pitviper *Bothrops asper*. *Vaccine*. 2009; 27 (3):460-6
- (79) AZOFEIFA-CORDERO, G., ARCE-ESTRADA, V., FLORES-DIAZ, M. AND ALAPE-GIRON, A. Immunization with cDNA of a novel P-III type metalloproteinase from the rattlesnake *Crotalus durissus durissus* elicits antibodies which neutralize 69% of the hemorrhage induced by the whole venom. *Toxicon*. 2008; 52 (2):302-8
- (80) WAGSTAFF, S. C., LAING, G. D., THEAKSTON, R. D., PAPASPYRIDIS, C. AND HARRISON, R. A. Bioinformatics and multiepitope DNA immunization to design rational snake antivenom. *PLoS Med*. 2006; 3 (6):e184

Apêndice H - Artigo enviado

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO E CLÍNICO-LABORATORIAL DOS
ENVENENAMENTOS CAUSADOS POR JARARACA E CASCAVEL ATENDIDOS
NO HOSPITAL DA RESTAURAÇÃO (RECIFE) ENTRE JUNHO DE 2007 E JUNHO
DE 2008**

**EPIDEMIOLOGICAL AND CLINIC-LABORATORIAL STUDY OF
ENVENOMINGS CAUSED BY JARARACA AND CASCAVEL ATTENDED AT THE
HOSPITAL DA RESTAURAÇÃO (RECIFE) BETWEEN JUNE 2007 AND JUNE 2008**

, Karla Patrícia de Oliveira Luna^{2,3}, Thassiany Rebeca Paiva Moura da Silva¹, ⁴Maria Lucineide Porto Amorim,
Valéria Rego Alves Pereira³,

¹Faculdade Maurício de Nassau, ² Universidade Estadual da Paraíba, ³ Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães/
FIOCRUZ; ⁴CEATOX, ⁴Hospital da Restauração.

Resumo

A epidemiologia dos acidentes ofídicos no Brasil mostra-se inalterada nos últimos 100 anos. Este trabalho objetivou um estudo epidemiológico e clínico-laboratorial dos acidentes por Jararaca e Cascavel, atendidos no Hospital da Restauração entre Junho de 2007 e Junho de 2008. Estudamos fichas de atendimento do Centro de Toxicologia avaliando: sexo do indivíduo, idade, escolaridade, sazonalidade, gênero da serpente, tempo decorrido entre o acidente e o atendimento, evolução clínica, município, local e zona de ocorrência, assim como dados clínicos e laboratoriais. Os acidentes Crotálicos somaram 69,4% e os acidentes Botrópicos 30,5%. Agosto de 2007 e Março a Junho de 2008 apresentaram maior incidência. Os acidentes predominaram no sexo masculino (75%) e na zona rural (76,4%). Observou-se que 54,1 % dos pacientes foram atendidos nas primeiras 10 horas decorridas do acidente. A faixa etária mais acometida foi de 01-10 anos (19,4%), seguida por: 11-20/31-40 anos (15,3%) cada. As manifestações clínicas mais frequentes nos acidentes Botrópicos foram: edema local (63%), dor (45%), e gengivorragia (18%); nos acidentes Crotálicos foram: ptose palpebral (78,2%), visão turva (67,3%), mialgia (37%) e edema local (34,7%). As alterações laboratoriais relevantes foram: tempo de coagulação em 50% dos acidentes Botrópicos; nos acidentados Crotálicos, creatino-kinase (66%), desidrogenase láctica (66%) e tempo de

coagulação (32%), isto pode remeter às características das peçonhas. Os resultados mostraram alterações no perfil dos acidentes ofídicos no estado de Pernambuco quanto ao tipo de serpente envolvida, isto pode estar relacionado à intervenção humana que tem provocado uma mudança no habitat desses animais.

Palavras- chave: epidemiologia, ofidismo, jararaca, cascavel, dados clínicos, dados laboratoriais

Abstract

The epidemiology of snakebites in Brazil remains unchanged over the past 100 years. This work aimed to conduct an epidemiological and clinical-laboratorial study, showing the profile of snakebites by Jararaca and Cascavel attended at the Hospital da Restauração between June 2007 and June 2008. We studied attendance sheets of the Center of Toxicology evaluating: sex of the individual, age, education, seasonality, snake genus, time between accident and care, clinical, municipality, location and area of occurrence, as well as clinical and laboratory data. Crotalic accidents were 69.4%, bothrops were 30.5%. August 2007 and March to June 2008 showed higher incidence. Snakebites predominated in male persons (75%) and in rural areas (76.4%). It was observed that 54.1% of patients were attended in the first 10 hours after the accident. The age group most affected was 01-10 years (19.4%), followed by other tracks: 11-20/31-40 years (15.3%) each. The most frequent clinical manifestations in bothrops accidents were: local edema (63%), pain (45%), and gengivorragia (18%); and in crotalic accidents were ptosis (78.2%), blurred vision (67.3%), myalgia (37%) and local swelling (34.7%). Most relevant laboratory changes were: clotting time in 50% bothrops envenomings; for crotalic envenomings, creatine-kinase (66%), lactate dehydrogenase (66%) and clotting time (32%), this may be related to features of each venom. The results of this study showed a

change in the profile of snakebites in Pernambuco related to the genus of the snake, this may be due to human intervention that has caused a change in the habitat of those animals.

Key-words: epidemiology, snakebite, jararaca, cascavel, clinical data, laboratory data

03

Conflito de Interesses: NÃO HÁ CONFLITO

Introdução

Os acidentes ofídicos têm representado um grave problema de Saúde Pública, especialmente para os habitantes dos países tropicais, pela mortalidade que ocasionam e em decorrência da frequência com que ocorrem.^{1,2} Embora ocorra no mundo todo, o acidente ofídico é um problema de saúde pública negligenciado. Isso é particularmente verdade pertinente em áreas rurais de países tropicais e subtropicais, onde os acidentes ofídicos são mais comuns, mas também onde há limitado acesso aos serviços de saúde e ao soro. A real magnitude da ameaça dos envenenamentos ofídicos à saúde pública nesses países é desconhecida, o que torna difícil aos órgãos responsáveis otimizar a prevenção e o tratamento.³ Recentemente (2009), o Boletim Eletrônico EPIDEMIOLÓGICO da SVS/MS, mostrou que os acidentes ofídicos no Brasil alcançaram a marca de 27.655 casos em 2009.⁴ O gênero responsável pela maioria dos acidentes é o gênero *Bothrops* (Jararacas) representando 90% dos acidentes.⁵ Entretanto, a porcentagem de acidentes pode variar de acordo com o gênero da serpente e a região do país.⁶

Vital Brazil em 1901 realizou o primeiro estudo epidemiológico de acidentes ofídicos, quando fez o levantamento do número de óbitos por picadas de serpentes peçonhentas no estado de São Paulo, onde registrou 63, 88 e 104 óbitos em 1897, 1899 e 1900, respectivamente.³

A epidemiologia dos acidentes ofídicos no Brasil mostra que seu perfil mantém-se inalterado. Nos últimos 100 anos os acidentes ocorreram no início e final de ano, com pessoas do sexo masculino, trabalhadores rurais, na faixa etária produtiva (entre 19 e 45 anos) e na maioria, eram atingidos membros inferiores.³

Segundo o Ministério da Saúde, os envenenamentos ofídicos são considerados leves, moderados ou graves, de acordo com a gravidade dos sinais e sintomas apresentados pelo paciente.⁵

A maioria dos acidentes ofídicos ocorridos na América Latina é causado por espécies do gênero *Bothrops*.⁶ A peçonha dessas serpentes caracteriza-se por causar reações no local da picada devido à ação combinada de componentes como proteases, fatores hemorrágicos, fosfolipases e a liberação de mediadores endógenos.^{7,8,9}

Nos envenenamentos botrópicos ocorre o rápido desenvolvimento do edema e inflamação no local da picada. O edema induzido por essas peçonhas está ligado à ação de várias substâncias como: hemorraginas, toxinas que agem diretamente no endotélio de capilares e vênulas, aumentando a permeabilidade; citotoxinas, que induzem a liberação de histamina; PLA₂, que liberam ácido araquidônico de fosfolipídeos de membrana, iniciando a síntese de prostaglandinas (as quais aumentam a permeabilidade capilar); proteases, que clivam cininogênio liberando cininas e levando à produção de óxido nítrico e prostaglandinas; peptídeos vasoativos que inibem a ação da enzima conversora de angiotensina (ECA), potenciando a ação da bradicinina; componentes da cascata do complemento.¹⁰

Tabela 1 – Envenenamentos Botrópico e Crotálico e seus tratamentos segundo o Ministério da Saúde, 2003

Tipo de acidente	Leve	Moderado	Grave	Tipo de soro
Botrópico	2-4 ampolas	4-8 ampolas	12 ampolas	SAB, SABC ou SABL
Crotálico	5 ampolas	10 ampolas	20 ampolas	SAC ou SABC

SAB: soro antibotrópico

SABC: soro antibotrópico-crotálico

SABL: soro antibotrópico-laquélico

Estudando a agregação plaquetária em pacientes picados pela serpente *B. jararaca*, Sano-Martins et al. (1997)¹¹ observaram o aumento estatisticamente significativo do fibrinogênio no sangue, o decréscimo dos produtos de degradação do fibrinogênio e aumento

do número de plaquetas, 24 horas após o tratamento com antiveneno botrópico. Além disso, pela primeira vez foi demonstrado que esses pacientes apresentaram hiperagregação plaquetária em sangue total. Em animais experimentais envenenados por serpentes do gênero *Crotalus* distúrbios da coagulação foram observados quando estudados por Santoro et al. (1999).¹²

As serpentes do gênero *Crotalus* (Cascavéis) são encontradas principalmente em regiões semi-áridas. Os acidentes provocados por essas serpentes somam cerca de 10% do total de envenenamentos ocorridos no Brasil, com letalidade de 3,3%.¹³

As peçonhas dessas serpentes deflagram envenenamento do tipo neurotóxico, uma vez que componentes dessas peçonhas têm tropismo pelo sistema nervoso central. Essa ação neurotóxica ocorre através da ação periférica em placa motora (neurotoxina pré-sináptica). Ocorre também ação miotóxica sistêmica e coagulante, por ação de toxinas trombina-símile, sendo comum a alteração de coagulação sem sangramento.¹³

Estudando pacientes envenenados por *Crotalus durissus terrificus* em São Paulo, Ribeiro e Jorge (1992)¹³ verificaram que as manifestações mais frequentes no local da picada foram: dor, edema, eritema e parestesia. As manifestações sistêmicas mais frequentes foram ptose palpebral, diplopia, turvação visual, mialgia e escurecimento da urina atribuído a mioglobulinúria. Dentre as manifestações detectadas através de exames laboratoriais destacaram-se, no referido estudo, alteração da coagulação sanguínea, que ocorreu em 48,1% dos pacientes. Em 21 pacientes foi analisada a atividade sérica da creatino-kinase (CK), sendo que 20 deles apresentaram alteração da mesma entre 2,5 e 2,33 vezes maior que o valor de referência. A desidrogenase láctica (LDH) alterou-se em 13 pacientes.

O presente estudo teve por objetivo realizar um estudo epidemiológico e clínico-laboratorial, apresentando o perfil dos acidentes ofídicos Botrópicos (Jararaca) e Crotálicos

(Cascavel) atendidos no Hospital da Restauração (HR - Recife-PE) entre Junho de 2007 e Junho de 2008.

Metodologia

LOCAL DE ESTUDO

Foram coletados dados através de fichas de atendimento do Centro de Toxicologia (CEATOX) do Hospital da Restauração (HR- Pernambuco - PE).

DESENHO DO ESTUDO

Neste estudo foram analisadas características epidemiológicas e clínico-laboratoriais dos pacientes atendidos. Estudo do tipo retrospectivo com abordagem quantitativa e descritiva, com as seguintes variáveis: as relacionadas ao indivíduo (sexo, faixa etária, escolaridade); ao evento (sazonalidade, município, zona de ocorrência, espécie responsável pelo acidente, tempo decorrido entre o acidente e o atendimento, local do evento e evolução clínica); dados clínicos (sinais e sintomas dos envenenamentos) e laboratoriais dos pacientes (TC, TS, CK, LDH).

05

AVALIAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL

Na avaliação clínica foram avaliados os sinais clínicos que ocorreram com maior frequência nos acidentes Botrópicos (presença de edema local, dor, gengivorragia, bolhas, mialgia) e Crotálicos (edema local, dor, gengivorragia, mialgia, ptose palpebral e visão turva) e os pacientes que permaneceram assintomáticos em ambos acidentes ofídicos. A Avaliação Laboratorial compreendeu análise dos exames laboratoriais do tipo: enzima creatina quinase (CK), desidrogenase láctica (LDH), tempo de sangria (TS) e Tempo de coagulação (TC). As

avaliações descritas acima foram realizadas pelo staff médico e biomédico do HR com o CETOX-HR, para todos os pacientes atendidos.

ENZIMA CREATINA QUINASE

A creatinofosfoquinase (CPK) ou creatinoquinase (CK) é uma enzima presente em vários sítios do nosso organismo, sendo encontrada em abundância no coração e, principalmente, nos nossos músculos. Sua elevação na corrente sanguínea é um forte indicador de lesão muscular, uma vez que a destruição das células dos músculos provoca um grande fluxo de CK em direção ao sangue. A creatinoquinase (CK) age transformando a creatina e fosfocreatina, um processo que libera energia para o funcionamento do músculo. Existem 3 subtipos de CK:

- a) CK-BB que está presente em vários tecidos do corpo
- b) CK-MM presente em grande quantidade nos músculos e no coração
- c) CK-MB presente em pequena quantidade nos músculos, mas em grande quantidade no coração.¹⁴

Quando se solicita a dosagem da CK sanguínea, recebemos um valor que corresponde a soma desses 3 subtipos. Por isso ela é comumente chamada de CK Total. Se a CK total estiver elevada por conta de um aumento na CK-MB e da CK-MM, isso é um forte indício de lesão no coração, sugerindo um infarto do miocárdio.¹⁴ Se a CK estiver alta por elevação apenas da CK-MM, uma grave lesão muscular (rabdomiólise) é o mais provável,¹⁴ acontecimento que pode ocorrer nos envenenamentos Crotálicos.

O sangue é colhido de uma veia ([punção venosa](#)), geralmente da prega do cotovelo ou dorso da mão. O local da punção é limpo com anti-séptico e um torniquete (uma tira elástica), ou um aparelho utilizado para medir a [pressão sanguínea](#), é colocado ao redor do braço para comprimi-lo e restringir o fluxo de sangue através da veia. Isto faz com que a porção da veia

abaixo do torniquete se distenda (se encha de sangue). Uma agulha é introduzida na veia e o sangue coletado em um tubo vedado ou seringa. Durante o procedimento, o torniquete é removido para restaurar a circulação. Quando o sangue tiver sido coletado, a agulha é removida e o local da punção coberto para evitar qualquer [sangramento](#).¹⁴

Valor Normal: A variação normal é de 24 a 194 U/ml.¹⁴

Obs.: U/ml = unidades por mililitro.¹⁴

DESIDROGENASE LÁTICA

A medição do LDH é mais utilizada para avaliar a presença de tecidos danificados. A [enzima](#) desidrogenase láctica (LDH) está presente em muitos tecidos, especialmente no coração, fígado, rins, [músculos](#) do esqueleto, células sangüíneas do cérebro e pulmões. A LDH cataliza a interconversão de piruvato e [lactato](#). Músculos que se exercitam convertem (e os glóbulos vermelhos [metabolizam](#)) glicose em lactato. O lactato é liberado no sangue e eventualmente absorvido pelo fígado. O fígado converte lactato de volta em glicose e libera glicose no sangue. Essa glicose é então absorvida pelos músculos em repouso, glóbulos vermelhos e por outros tecidos.¹⁴

O sangue é colhido de uma veia ([punção venosa](#)), geralmente da prega do cotovelo ou dorso da mão. O local da punção é limpo com anti-séptico e um torniquete (uma tira elástica), ou um aparelho utilizado para medir a [pressão sangüínea](#), é colocado ao redor do braço para comprimi-lo e restringir o fluxo de sangue através da veia. Isto faz com que a porção da veia abaixo do torniquete se distenda (se encha com sangue). Uma agulha é introduzida na veia e o sangue coletado em um tubo vedado ou seringa. Quando o sangue estiver sido coletado, a agulha é removida e o local da punção coberto para evitar qualquer [sangramento](#).¹⁴

Valor Normal: 105 a 333 UI/L.¹⁴

Obs.: UI/L = unidades internacionais por litro.¹⁴

TEMPO DE SANGRIA

O método mais comumente utilizado é o de Duke, em que é feita uma incisão, de tamanho padronizado, medindo-se a seguir o tempo decorrido até que cessar o sangramento, intervindo apenas os fatores plaquetário e vascular. Realiza-se a assepsia do lóbulo da orelha (pode-se usar também a polpa digital) com algodão embebido em álcool e deixa-se evaporar; com auxílio de uma lanceta específica e de um só golpe, faze-se uma incisão local, com cerca de 2 mm de profundidade; disparar o cronômetro; a cada 30 segundos recolher a gota de sangue em papel de filtro (tendo o cuidado de que o mesmo não toque o lóbulo ou a polpa), até que a última gota deixe apenas um sinal puntiforme no papel; anotar o tempo decorrido entre a primeira e a última gota recolhidas.¹⁴

Valor Normal: de 1 a 3 minutos.¹⁴

TEMPO DE COAGULAÇÃO

O Tempo de Coagulação (T.C.) mede o tempo necessário para que o sangue coagule “in vitro”. Proceda-se à punção venosa, procurando lesar os tecidos, o mínimo possível; dispare-se o cronômetro, assim que o sangue entrar na seringa; separar 3 tubos de ensaio (10 x 120 mm), colocar 1 ml de sangue em cada um e levá-los imediatamente em banho à 37°C; 3 minutos após a coleta, iniciar a observação do tubo 1, inclinando-o suavemente; repetir essa observação a cada 30 segundos até que o sangue coagule. Marcar o tempo transcorrido desde a coleta até a formação do coágulo; proceder do mesmo modo com os tubos 2 e 3. O **Tempo de Coagulação** será o obtido pela média dos tempos encontrados nos 3 tubos.¹⁴

Valor Normal: de 4 a 9 minutos.

ANÁLISE DE DADOS

Para análise dos dados obtidos, organização dos gráficos e tabela, foi utilizada técnica quantitativa, a partir da produção de frequências simples.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital da Restauração sob o número:

Resultados

Foram analisados 72 casos de acidentes ofídicos no período de junho de 2007 a junho de 2008. Os casos atendidos referem-se a uma área de cerca 42 municípios, para os quais o HR é a referência nesse tipo de agravo, já que o soro antiofídico só é distribuído para 3 cidades em Pernambuco: Recife, Caruaru e Petrolina.

A alta hospitalar foi obtida em 69 casos (95,8%), 01 caso (1,38%) foi à óbito, 01 caso (1,38%) foi transferido para outra unidade hospitalar e 01 caso (1,38%) foi atendimento telefônico. Exceto este último, todos os atendimentos foram presenciais. O atendimento telefônico referiu-se a um atendimento solicitado para um paciente atendido no Hospital Regional do Agreste (HRA), em Caruaru. Na ocasião, os atendentes do HRA solicitaram instruções de atendimento e tratamento ao staff do CEATOX-HR.

Cinquenta casos (69,44%) foram notificados como Crotálico e 22 casos (30,55%) como Botrópico (figura 1A). Foi observado que o sexo de maior ocorrência foi o masculino, com 54 casos (75%), no sexo feminino foram notificados 18 casos (25%) (figura 1B).

A escolaridade não foi informada em 59,72% dos casos. As informadas foram: primeiro grau incompleto 23,6% (17 casos), ignorado 8,33% (06 casos), analfabeto 5,55% (04 casos), primeiro grau completo 1,38% (01 caso) e segundo grau completo 1,38% (01 caso).

A faixa etária mais acometida pelos acidentes ofídicos foi de 01-10 anos com 14 casos (19,4%), seguida pelas outras faixas: 11-20/31-40 anos com 11 casos (15,3%) cada, 21-30/41-50 anos com 09 casos (12,5%) cada, 61-70 anos com 08 casos (11,1%), 51-60 anos com 07 casos (9,72%), e apenas 03 casos ocorreram em pessoas com mais de 70 anos.

Analisando o tempo decorrido, em horas, entre o acidente e a admissão hospitalar, 15 pacientes (21%) chegaram a unidade hospitalar em até 3 horas após o acidente, 19 (27%) chegaram entre 3 e 6 horas após o acidente e 34 pacientes (48%) chegaram após 6 horas de ocorrido o acidente (Figura 2). Em 3 casos (4%) não foi informado o tempo decorrido na ficha de atendimento..

Na tabela 1 observa-se que o número de ampolas mais utilizado para os acidentes Botrópicos foi o de 8 ampolas, o que condiz com um maior número de acidentes moderados. O mesmo perfil foi observado para os acidentes Crotálicos, que apresetaram maior número de ampolas referente a acidentes moderados (10 ampolas).

Neste estudo pode-se observar que alguns pacientes foram tratados com um número de ampolas diferente do preconizado pelo Ministério da Saúde. Isso, provavelmente, deve-se ao fato da falta de soro específico em quantidade correta para o tratamento, o que é bastante comum principalmente nos períodos de alta incidência dos acidentes ofídicos. Além disso, apesar dessa ser uma informação crucial para o acompanhamento da evolução do paciente, em 12 fichas a soroterapia empregada não foi informada.

A prevalência dos acidentes, em relação ao local do evento mostrou que 34 casos ocorreram na própria residência. Ambiente de trabalho representou 18 casos (25%), ambiente externo 04 casos (5,5%), trajeto de trabalho 02 casos (2,7%), em 14 casos (19,4%) não foram informados o local de ocorrência (figura 3A).

A zona de maior ocorrência foi a rural, com 55 casos (76,4%), na zona urbana ocorreram 13 casos (18,05%) (figura 3B).

Em 42 municípios de Pernambuco foram notificados casos de acidente ofídico. O maior número de casos ocorreu no município de Jaboatão dos Guararapes com 07 casos (9,72%), seguido pelos municípios de Igarassú com 06 casos (8,3%), Brejo da Madre de Deus com 05 casos (7%) e os municípios de São Lourenço da Mata e Ipojuca com 03 casos (4,1%) cada. Um caso foi encaminhado do município de Murici (Alagoas). Em 02 casos não foi informado o município de ocorrência. Os demais municípios apresentaram 01 ou 02 casos representados na tabela 4.

Em relação à sazonalidade, houve um pico de acidentes no mês de agosto de 2007 e março de 2008 com 10 casos (13,8%), seguido pelos meses de abril de 2008 com 09 casos (12,5%), maio e junho de 2008 com 08 casos (11,1%). A menor incidência foi registrada no mês de outubro de 2007 com apenas 01 caso (1,38%) (Figura 4).

Dentre os 22 acidentes Botrópicos ocorridos no período estudado, as manifestações clínicas mais frequentes foram: edema (63%), dor (45%) e gengivorragia (18%). Apenas em um caso (4,5%) houve a presença de bolhas. Do total de acidentes botrópicos, apenas 02 casos (9,1%) permaneceram assintomáticos (Tabela 3). As alterações laboratoriais mais frequentes nos acidentes por Jararaca foram: Tempo de coagulação (TC) prolongado com 50%, Tempo de Sangria (TS) aumentado com 25% e aumento da creatina quinase (CK) com 20%.

Em relação aos acidentes Crotálicos (50 casos) as manifestações clínicas mais frequentes foram: ptose palpebral (78,2%), visão turva (67,3%), mialgia (37%), edema (34,7%). Apenas um caso (2,17%) foi a óbito e 04 casos (8,7%) permaneceram assintomáticos. A causa do óbito foi insuficiência renal aguda. Os casos assintomáticos referem-se a indivíduos que não apresentaram sinais e sintomas referentes ao envenenamento Crotálico. Quanto aos parâmetros laboratoriais avaliados que mais sofreram alterações, destacaram-se: creatina quinase aumentada (66%), desidrogenase láctica aumentada (32%) e tempo de coagulação prolongado (32%).

Discussão

O presente estudo analisou 72 casos de acidentes ofídicos Botrópicos e Crotálicos ocorridos entre junho de 2007 a junho de 2008, atendidos pelo Centro de Assistência Toxicológica (CEATOX) no Hospital da Restauração (HR) – Recife (PE).

Neste estudo observou que o número dos acidentes Crotálicos foi superior aos Botrópicos, diferindo com o encontrado por Bochner e Struchiner (2003)³, Cagliari et al. (2008)¹⁵ e Lemos (2009)¹⁶, que verificaram o acidente Botrópico como de maior ocorrência. Esta mudança no perfil dos acidentes ofídicos pode estar relacionada à ação antrópica do homem, que tem destruído as áreas endêmicas dessas serpentes, bem como a presença de criadouros clandestinos e o aumento de lixo nas residências e conseqüentemente o aumento de roedores, elevando com isso a oferta de alimentos nestes locais. Estes aspectos têm favorecido a migração destas serpentes de seu habitat natural (zona rural) para a zona urbana, o que não ocorre com as serpentes do gênero *Bothrops*, que são endêmicas da caatinga e, provavelmente, menos adaptáveis ao ambiente urbano. Este é um dado novo e, apesar de não corroborado por alguns autores, revela a mudança de hábitos desses animais, o que deve ser considerado.

Apesar de algumas cidades estarem localizadas a poucos quilômetros de Recife, faz-se necessária a observação de que a maioria dos atendimentos levou mais de 6 horas para que ocorresse. Isso se deve ao fato de que os indivíduos envenenados frequentemente realizam tratamentos alternativos (ingestão de álcool, aplicação de garrote, perfurações no local da picada, etc.), esperando uma rápida melhora em seu estado geral, o que leva a uma demora até o atendimento hospitalar. Além disso, como esses indivíduos realizam sua atividade laborativa em área rural, é difícil conseguir transporte rapidamente para a unidade de tratamento mais próxima. Vale chamar atenção para o fato de que, apesar de algumas cidades estarem mais próximas de Caruaru do que de Recife, nem sempre a

unidade hospitalar de Caruaru está preparada com o soro antiofídico, fazendo com que o paciente seja transferido para Recife.

Os parâmetros para diferenciação de um acidente entre Crotálico ou Botrópico é baseado nos sinais e sintomas apresentados pelo paciente no momento em que o mesmo chega a unidade de atendimento hospitalar. Edema, dor, hemorragia e distúrbios da coagulação sanguínea são características de envenenamento Botrópico. Visão turva, ptose palpebral, apontam para a evidência de envenenamento do tipo Crotálico.^{5,6}

A evolução clínica foi considerada satisfatória, ou seja, com os pacientes evoluindo sem a presença de insuficiência renal, fasciotomia, amputações, problemas visuais ou infecções secundárias. Visto que 96% dos pacientes atendidos no período estudado obtiveram alta sem mais complicações, e apenas um caso evoluiu a óbito. Isto corrobora com os achados de Cagliari et al. (2008)¹⁵, que estudando os acidentes ofídicos notificados no CEATOX de Campina Grande, Paraíba, verificaram 100% de alta médica recebida pelos pacientes atendidos neste centro.

O tempo decorrido entre o acidente e o atendimento tem sido considerado importante para o prognóstico do envenenamento ofídico. Nossos resultados mostraram que 48% dos pacientes foi atendido em até 6 horas após o acidente, o que contribuiu para uma terapêutica bem sucedida, ou seja, com a total neutralização dos efeitos decorrentes do envenenamento e conseqüente melhor evolução clínica do paciente, com internação de, em média, 3 dias tanto para acidentes Botrópicos quanto para Crotálicos (Figuras 5 e 6).

De acordo com os dados encontrados, a maior incidência de acidentes ofídicos foi registrada no mês de agosto de 2007 e de março a junho de 2008. Isto pode estar relacionado às altas temperaturas e aumento dos índices pluviométricos nesses meses do ano, visto que estes períodos coincidem com os picos de chuva, com o aumento da atividade agrícola

relacionada ao plantio, colheita e limpeza das áreas de cultivo, o que também foi observado por Nascimento (2000)¹⁷ e Albuquerque, Costa e Cavalcanti (2004)¹⁸.

O maior número de acidentes envolveu pessoas do sexo masculino e o local de maior ocorrência foi a própria residência, seguido do ambiente de trabalho, visto que, são pessoas que moram em regiões rurais e que exercem uma atividade agrícola. Com isso, são pessoas consideradas pertencentes a um grupo mais exposto às serpentes e conseqüentemente aumentando o risco de acidentes com estes tipos de animais. Isto foi concordante com Ministério da Saúde (1998)⁵ e com o estudo de Moreno et al. (2005)². 08 11

Devido às características dos acidentes em relação ao sexo mais acometido, a zona e o local de ocorrência fazem-se necessário o uso de equipamentos de proteção como botas e luvas, orientar a população em relação aos riscos deste tipo de acidente, como também as conseqüências, os benefícios de uma conduta pré-hospitalar adequada, para que com isso se consiga minimizar ou reduzir as condutas inadequadas que levam ao agravamento deste tipo de acidente.

A escolaridade não foi uma variável considerada satisfatória, em decorrência da não notificação deste dado na ficha de atendimento do CEATOX – HR na maioria dos pacientes.

As manifestações clínicas mais freqüentes que caracterizam o acidente Botrópico são dor, edema, rubor, calor, bolhas e hemorragia no local da picada, e efeitos sistêmicos como gengivorragia e alteração da coagulação sanguínea, corroborando com o encontrado neste estudo e observado, também, por Albuquerque et al. (2004)¹⁸ e Moreno et al. (2005)².

No caso de acidente Crotálico, o quadro clínico geral inclui dor, edema e mialgia. Em relação às manifestações neurológicas, as mais freqüentes e características são ptose uni ou bilateral e visão turva ou diplopia, isto está relacionado com as características da peçonha Crotálica, que possui principalmente atividade neurotóxica. Estes dados foram observados por

Ribeiro e Jorge (1992)¹³ e Ministério da Saúde (1998)⁵ e foram concordantes com o encontrado neste estudo

As alterações laboratoriais mais frequentes decorrentes de um acidente Botrópico e que foram observadas neste estudo, podem ser atribuídas às características da peçonha Botrópica, por possuir potentes atividades proteolítica, coagulante e hemorrágica, ocasionando lesões locais e destruição tecidual. Estes dados também corroboram com o estudo de Ribeiro e Jorge (1992)¹³ e Ministério da saúde (1998)⁵.

Em relação às alterações encontradas nos acidentes por cascavéis, nossos dados corroboram com os descritos pelo Ministério da Saúde (1998).⁵ provavelmente devido à potente atividade miotóxica apresentada pelas serpentes desta espécie.

Vários estudos epidemiológicos de acidentes ofídicos foram realizados. Estes visavam traçar um perfil epidemiológico preciso. Porém, diante da problemática de que nestes estudos sempre são relatados os elevados índices de dados que são ignorados, subnotificados ou não informados, e que também foi encontrado neste estudo, torna-se difícil traçar um perfil preciso. Assim, faz-se necessário o devido preenchimento das fichas de notificação, para que se possam minimizar estas imprecisões.

12

Conclusão

Diante dos resultados encontrados podemos concluir que no Centro de Atendimento Toxicológico do Recife, Pernambuco, no período de Junho de 2007 a Junho de 2008, a maioria dos acidentes ofídicos registrados foi atribuída a serpentes do gênero *Crotalus*, majoritariamente com pessoas do sexo masculino, em suas residências e moradoras da zona urbana. Houve uma predominância de ocorrência no mês de agosto de 2007 e entre os meses de março a junho de 2008. Em relação aos acidentes Botrópicos, as principais manifestações clínicas e alterações laboratoriais evidenciadas destacaram-se dor, edema, gengivorragia,

alterações de coagulação sanguínea e atividade da enzima creatina quinase. No caso dos acidentes Crotálicos as mais frequentes foram ptose palpebral, visão turva, mialgia, edema, atividade das enzimas creatina quinase, desidrogenase láctica e distúrbios da coagulação sanguínea.

Referências

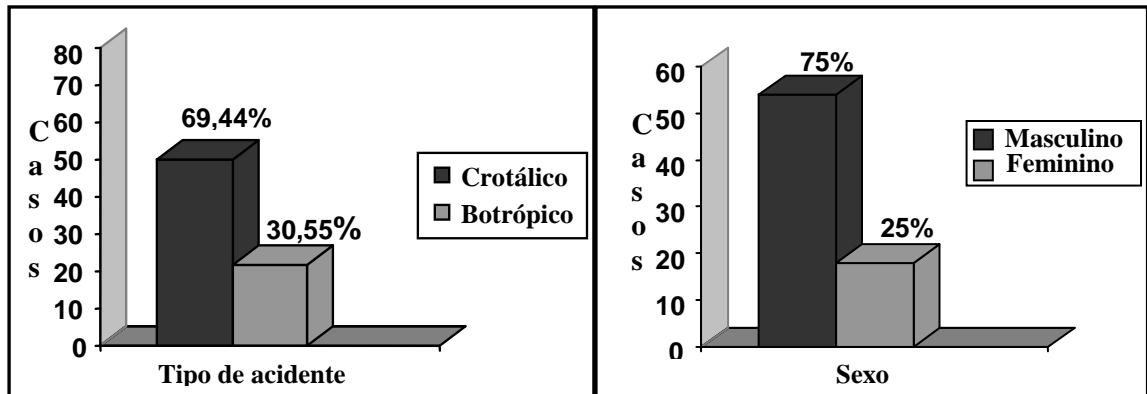
1. Pinho, FMO; Oliveira, ES; Faleiros, F. Acidente ofídico no estado de Goiás. Revista da Associação Médica Brasileira 2004: 50, n. 1, 93-96.
2. Moreno, E; Queiroz-Andrade, M; Lira-Da-Silva, RM; Tavares-Neto, J. Características clínico epidemiológicas dos acidentes ofídicos em Rio Branco, Acre. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2005: 38, 1, 15-21.
3. Bochner, R; Struchiner, CJ. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. Cadernos de Saúde Pública 2003: 19, 1, 7-16,.
4. Boletim eletrônico EPIDEMIOLOGICO-SVS/MS: 17 de abril de 2010, ano 10, nº 2
5. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. Brasília: MS/FUNASA, 2003.
6. Hoge, AR; Romano-Hoge, SA. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. São Paulo: Memórias do Instituto Butantan 1978/ 79: 42/43, 373-496.

7. Teixeira, CFP; Cury, Y; Jancar, S. Hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom in rats: role of eicosanoids and platelet activating factor (PAF). *Toxicon* 1994: 32, 4, 419-428.
8. Audebert, F; Urtizberea, M; Sabouraud, A; Scherrmann, JM; Bon, C. Pharmacokinetics of *Vipera aspis* venom after experimental envenomation in rabbits. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1994: 268, 1512 – 1517.
9. Farsky SHP; Walber, J; Costa-Cruz, M; Cury, Y; Teixeira, CFP. Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom: *In vivo* and *in vitro* studies. *Toxicon* 1997: 35, 2, 185 -193,.
10. Gilman, G. As bases farmacológicas da terapêutica. São Paulo, MacGraw Hill, 1996: 438 – 449,.
11. Sano-Martins, IS; Santoro ML; Castro, SCB; Fan HW; Cardoso JLC; Theakston RDG. Platelet aggregation in patients bitten by the brazilian snake *Bothrops jararaca*. *Thrombosis Research* 1997: 87, 2, 183-195.
12. Santoro, M. L. [Sousa-e-Silva MC](#), [Gonçalves LR](#), [Almeida-Santos SM](#), [Cardoso DF](#), [Laporta-Ferreira IL](#), [Saiki M](#), [Peres CA](#), [Sano-Martins IS](#). Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South América rattlesnake (*Crotallus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collilineatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1999: C, 61-73.

13. Ribeiro, LA; Jorge, MT. Epidemiologia e quadro clínico dos acidentes por cascavel sul – americana (*Crotalus dirissus*). Revista do Instituto de Medicina Tropical 1992: 34, 4, 347-354.
14. Ravel, R. Laboratório Clínico: Aplic. Clínicas dos Dados Laboratoriais. Rio de Janeiro, 1997.
15. Cagliari, MPP; Pinto, NM; Santos, RL; Fook, SML. Perfil epidemiológico dos acidentes ofídicos notificados no centro de atendimento toxicológico de Campina Grande, Paraíba. In: Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, 2008, São Paulo. Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos- SP.
16. Lemos, JC; Almeida, TD; Fook, SML; Paiva, AA; Simões, MOS. Epidemiologia dos acidentes ofídicos notificados pelo centro de assistência e informação toxicológica de campina grande (Ceatox-CG), Paraíba. Revista Brasileira de Epidemiologia 2009: 12, 1, 50-59,.
17. Nascimento, SP Aspectos epidemiológicos dos acidentes ofídicos ocorridos no Estado de Roraima, Brasil, entre 1992 e 1998. Cadernos de Saúde Pública 2000: 16, 1, 271-276.
18. Albuquerque, HN; Costa, TBG; Cavalcanti, MLF. Estudo dos acidentes ofídicos provocados por serpente do gênero *Bothrops* notificados no estado da Paraíba. Revista de Biologia e Ciências da Terra 2004 5, 1.

Figura 1- Distribuição dos acidentes ofídicos atendidos no CEATOX-HR de Junho de 2007 a Junho de 2008, relacionando tipo de envenenamento (A) e sexo (B),.

Figure 1- Distribution of snake envenomings attendend at CEATOX-HR from June 2007 to June 2008, relating type of envenomation (A) and sex (B),.



07

Figura 2 - Distribuição dos acidentes ofídicos atendidos pelo CEATOX – HR no período de junho de 2007 a junho de 2008, em relação ao tempo decorrido do acidente e admissão hospitalar.

Figure 2- Distribution of snake envenomings attendend at CEATOX-HR from June 2007 to June 2008, relating time from accident to hospital release.

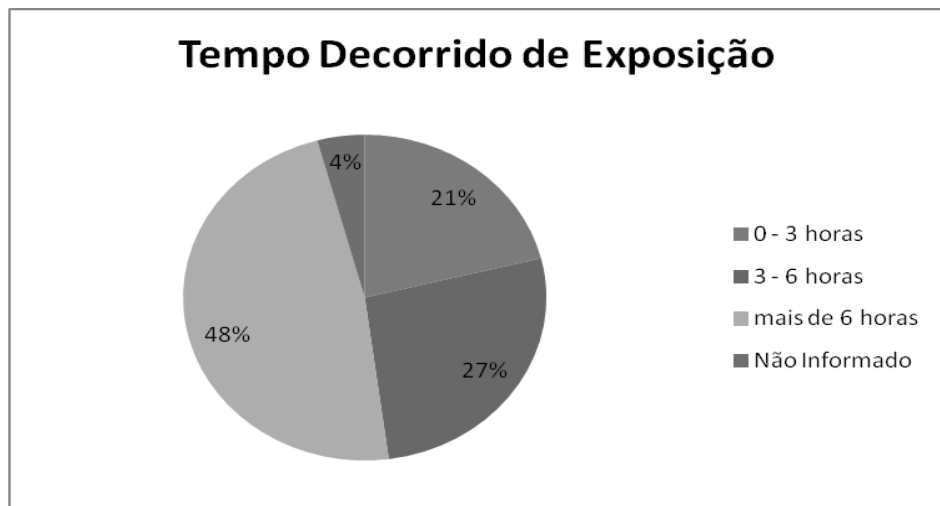


Figura 3 - Distribuição dos acidentes ofídicos atendidos pelo CEATOX – HR no período de junho de 2007 a junho de 2008, em relação ao local (A) e a zona de ocorrência (B).

Figure 3- Distribution of snake envenomings attendend at CEATOX-HR from June 2007 to June 2008, relating local (A) and zone of occurrence (B).

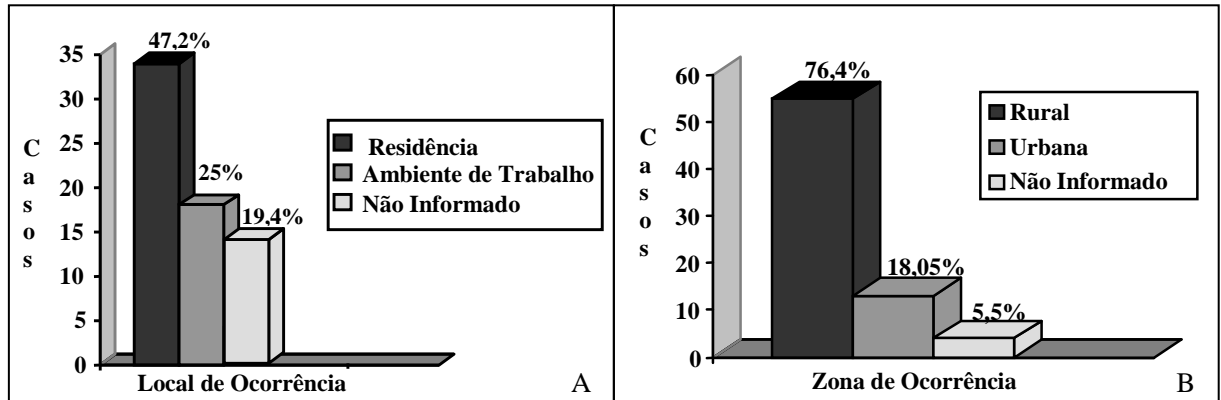


Figura 4 - Distribuição dos acidentes ofídicos atendidos no CEATOX- HR, em relação à sazonalidade, no período de Junho de 2007 a Junho de 2008

Figure 4- Distribution of snake envenomings attendend at CEATOX-HR from June 2007 to June 2008, relating seasonality.



Tabela 1. Número de ampolas utilizadas para tratamento de acidente Botrópico

Table 1. Number of vials used for Bothorps envenomations treatment

Número de ampolas de SAB	Pacientes
04	1
08	9
12	4

*01 paciente recebeu 06 ampolas de SAB;

*02 pacientes receberam 15 ampolas de SAB;

*01 paciente recebeu 20 ampolas de SAB;

*01 paciente recebeu 08 ampolas de SABL;

*01 paciente recebeu 10 ampolas de SABL.

Tabela 2. Número de ampolas utilizadas para tratamento de acidente Crotálico

Table 2. Number of vials used for Crotalus envenomations treatment

Número de ampolas de SAC	Pacientes
05	5
10	14
20	12

*01 paciente recebeu 04 ampolas de SAC;

*01 paciente recebeu 06 ampolas de SAC;

*01 paciente recebeu 08 ampolas de SAC;

*01 paciente recebeu 09 ampolas de SAC;

*02 pacientes receberam 15 ampolas de SAC;

*01 paciente recebeu 02 ampolas de SABC;

*01 paciente recebeu 04 ampolas de SABC;

*01 paciente recebeu 05 ampolas de SABC;

*04 pacientes receberam 10 ampolas de SABC;

*01 paciente recebeu 11 ampolas de SABC.

Tabela 3 - Manifestações clínicas mais frequentes dos acidentes ofídicos atendidos no CEATOX – HR, no período de junho de 2007 a junho de 2008.

Table 3 - Frequent clinical manifestations of snake envenomings attendend at CEATOX-HR from June 2007 to June 2008, relating frequent clinical manifestations.

Manifestação	Botrópico	Crotálico
clínica		
Edema	63%	34,7%
Dor	45%	0%
Gengivorragia	18%	0%
Bolhas	4,5%	0%
Ptose palpebral	0%	78,2%
Visão turva	0%	67,3%
Mialgia	0%	37%
Óbito	0%	2,17%
Assintomáticos	9,1%	8,7%

Tabela 4 - Número de casos e Municípios de ocorrência dos acidentes ofídicos atendidos pelo CEATOX – HR no período de junho de 2007 a junho de 2008, com evidência os municípios de maior ocorrência.

Table 4 – Relation between cases of snake envenomings and municipalities attended at CEATOX-HR from June 2007 to June 2008, evidencing municipalities with higher occurrence.

Município	Casos
Abreu e Lima	01
Água Preta	01
Águas Belas	01
Amaraji	01
Belo Jardim	02
Brejo	05
Cabo	02
Camaragibe	01
Carpina	01
Caruaru	01
Casinhas	01
Catende	01
Congo	01
Cortês	02
Floresta	01
Gameleira	01
Gravatá	01
Igarassu	06
Ipojuca	03
Iputinga	01
Itamaracá	01
Itapissuma	02
Jaboatão	07
Jacuipe	01
Jataúba	01
Moreno	01
Murici (AL)	02
Palmares	01
Paudalho	02
Paulista	02
Pesqueira	02
Pombos	01
São Bento do Una	01
São Caetano	01
São Lourenço	03
Serra Talhada	01
Surubim	01
Tabira	01
Toritama	01
Umbuzeiro	01
Vertentes	01
Vitória	01
Não Informado	02
Total	72

Figura 5. Tempo de permanência hospitalar – acidentes Botrópicos

Figure 5. Hospital care period – Bothrops envenomation

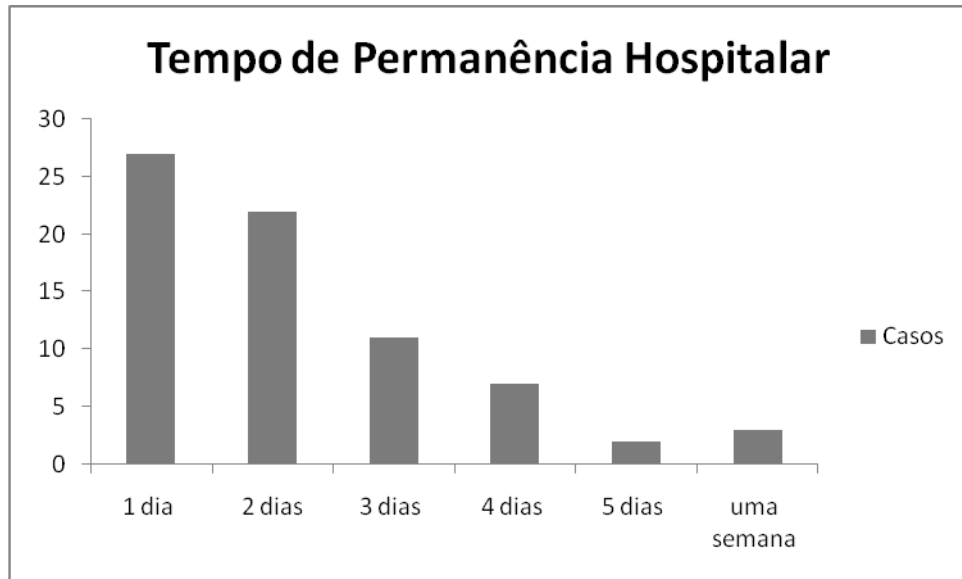
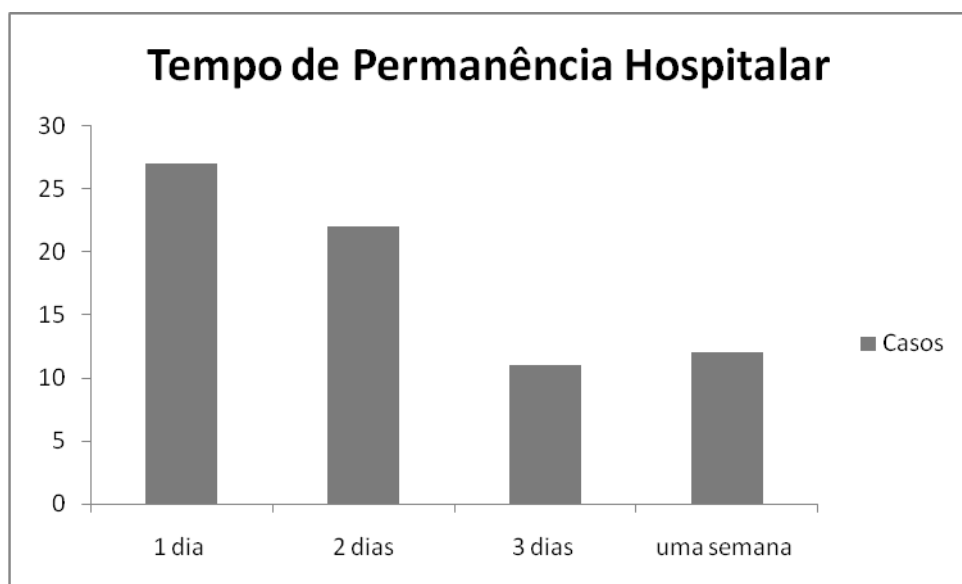
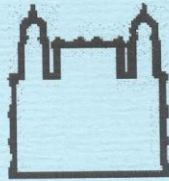


Figura 6. Tempo de permanência hospitalar – acidentes Crotálicos

Figure 6. Hospital care period – Crotalus envenomation



ANEXOS



MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Programa nº P-0266/05, intitulado “**Abordagens empregadas na verificação de efeitos anti-parasitários e imunomoduladores de drogas sobre T. cruzi e L. brasiliensis**” sob a responsabilidade da Dra. Valéria Rego Alves Pereira, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - FIOCRUZ) em reunião de 03/04/2006. Na presente formatação, este programa está licenciado e tem validade 25 de julho de 2010.

Rio de Janeiro, 25 de julho de 2006.


Dr. Hugo Caire Castro Faria Neto
Coordenador da CEUA
FIOCRUZ