CARACTERIZAÇÃO DOS ANTIVENENOS DE USO VETERINÁRIO FRENTE ÀS PRINCIPAIS SERPENTES BRASILEIRAS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA

Characterization of veterinary antivenoms against the main brazilian snakes of medical importance

Maria Eduarda C. Cunha[1]; Leticia Lopes-de-Souza[2]; Júlia Machado Caetano Costa[2]; Jordanna dos Santos Pereira Migliardi[2]; Rafael S. Langer[2]; Thalita S. Santo[2]; César A. Nunes[1]; Ana Luísa S. de Miranda[1]; Carlos Chávez-Olórtegui[2]

[1] Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Escola de Veterinária – UFMG, Belo Horizonte – MG;

[2] Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas - UFMG, Belo Horizonte – MG;

E-mail: marieduardac.6b@gmail.com

RESUMO:

Acidentes ofídicos representam uma causa significativa de mortalidade em equinos no Brasil, sendo as serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* as principais responsáveis pelos casos de envenenamentos no país. Apesar do uso de antivenenos comerciais específicos para o tratamento, muitos animais ainda apresentam complicações e evoluem para óbito. Diante disso, este estudo teve como objetivo avaliar os antivenenos veterinários em relação à sua potência neutralizante e ao perfil de reconhecimento antigênico, comparando-os com os antivenenos de uso humano. Para isso, utilizou-se venenos de *Bothrops jararaca*, *Crotalus durissus terrificus* e *Lachesis muta* em ensaios de ELISA, *imunoblotting* e de neutralização da citotoxicidade. Observou-se menor reatividade e potência neutralizante dos soros veterinários em comparação aos antivenenos humanos, além de menor reconhecimento frente às proteínas dos venenos. Os dados sugerem que os antivenenos de uso veterinário atualmente disponíveis podem apresentar eficácia terapêutica limitada na neutralização dos efeitos tóxicos causados pelos venenos ofídicos em animais.

Palavras-chave: Antivenenos, equinos, ofidismo, soros antiofídicos, toxicidade.

ABSTRACT:

Snakebites represent a significant cause of mortality in equines in Brazil, with snakes from genera *Bothrops* and *Crotalus* being the main culprits behind envenomation in the country. Despite the use of commercially available specific antivenoms for treatment, many animals still experience complications and progress to death. Therefore, this study aimed to evaluate veterinary antivenoms in terms of their neutralizing potency and antigen recognition profile, comparing them with human-use antivenoms. For this, venoms from *Bothrops jararaca*, *Crotalus durissus terrificus*, and *Lachesis muta* were used in ELISA, immunoblotting, and cytotoxicity neutralization assays. Lower reactivity and neutralizing potency of veterinary sera were observed compared to human antivenoms, as well as lower recognition of the venom proteins. The data suggest that the currently available veterinary antivenoms may have limited therapeutic efficacy in neutralizing the toxic effects caused by snake venom in animals.

Keywords:antivenom efficacy,antivenoms, horses, snakebite, toxicity

INTRODUÇÃO

Acidentes ofídicos são um grave problema de saúde pública mundial, especialmente em regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, esses envenenamentos constituem uma importante causa de mortalidade em equinos, sendo as serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* as principais responsáveis pelo maior número de casos no país (COSTA & BÉRNILS, 2018).

Para tratamento dos acidentes ofídicos, recomenda-se injeção intravenosa de soro contendo anticorpos para neutralização das toxinas do veneno. Entretanto, mesmo após administração do imunobiológico, muitos animais permanecem com os sinais clínicos e podem evoluir para óbito. Diante desse cenário, o presente estudo buscou compreender o reconhecimento antigênico e potencial neutralizante desses antivenenos veterinários comerciais frente aos venenos de referência médica nacional a fim de elucidar a sua eficácia terapêutica em comparação com os soros de uso humano. Para isso, ensaios de ELISA, *imunoblotting* e de neutralização da citotoxicidade dos venenos foram realizados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram adquiridos comercialmente dois antivenenos veterinários: soro veterinário 1 (AvV1) polivalente para os venenos botrópico (Bv), laquético (Lv) e crotálico (Cv) e soro veterinário 2, que reconhece Bv e Cv. Dois antivenenos humanos foram utilizados (FUNED): AvH1 para Bv e Lv e AvH2 para Cv.

No ELISA, placas foram sensibilizadas com 0,5 µg/poço de cada veneno. As amostras de soro foram adicionadas em diluição seriada na base 2 (1:1.000 a 1:128.000) e anti-horse IgG (1:50.000) conjugado à peroxidase foi utilizado como anticorpo secundário. Para revelação, utilizou-se OPD.

No *Western Blot*, adicionou-se 20µg dos venenos sob condições redutoras a um gel de poliacrilamida e as proteínas do gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose. As amostras de soro foram incubadas (diluição 1:1.000) e anti-horse conjugado a peroxidase (1:50.000) foi utilizado. Para revelação, Diaminobenzidina (DAB)/Cloronaftol foram adicionados.

Para a neutralização da citotoxicidade dos venenos, calculou-se em células Vero a concentração efetiva de veneno capaz de reduzir em 50% a viabilidade celular (EC_{50}), a qual foi determinada utilizando uma curva concentração-resposta com diluição seriada na base 2 (0,3125µg/mL a 40µg/mL). Alamar Blue foi utilizado para análise da viabilidade celular. As células foram então novamente incubadas com cada um dos soros adicionados de uma concentração tóxica fixa dos venenos ($3EC_{50}$), ambos previamente incubados por 30 minutos a 37°C. Os soros foram diluídos seriadamente na base 1.4 (0,094µL/mL a 1µL/mL). O ensaio prosseguiu conforme realizado para a determinação da EC_{50}.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o ELISA, verificou-se que a absorbância média dos soros foi: AvH1 e AvH2 1,70, AvV1 0,89 e AvV2 0,41 nas mesmas condições. Com os resultados parciais, demonstrou-se uma menor reatividade dos antivenenos de uso veterinário em relação aos utilizados na medicina humana. Isso indica que os anticorpos presentes nos soros de uso veterinário apresentam um menor reconhecimento frente às proteínas dos venenos, quando comparados aos soros de uso humano.

O *Western Blot* corrobora com o resultado anterior, uma vez que um padrão similar foi observado. Ambos os antivenenos de destino veterinário testados reconheceram proteínas semelhantes dos venenos, embora a reatividade dos soros de uso humano ter se mostrado substancialmente maior. Os perfis de reconhecimento obtidos sustentam a hipótese de que os antivenenos humanos possuem maior capacidade de reconhecimento antigênico e, potencialmente, maior neutralização, uma vez que a identificação de bandas adicionais sugere o reconhecimento de uma diversidade mais ampla de proteínas e não apenas as de maior prevalência na composição dos venenos.

Nos ensaios de viabilidade celular, para as células tratadas com o veneno de *B. jararaca* pré-incubado com o soro de uso humano, a porcentagem média de sobrevida foi de cerca de 78%. Por outro lado, no mesmo ensaio com os soros de destino veterinário, observou-se 59% de células viáveis para AvV1 e 23% para AvV2. Já para o veneno de *L. muta*, a sobrevida média foi de 87% para o antiveneno de uso humano e de 51% (AvV1). Conforme descrito na bula do fabricante, AvV2 não apresenta potencial neutralizante frente ao veneno de *L. muta* (3%).

A eficácia dos soros veterinários requer avaliação contínua, considerando que o monitoramento pós-registro é realizado por empresas privadas sob orientação do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA). A disponibilidade limitada de dados técnico-científicos detalhados sobre produção e controle de qualidade desses antivenenos dificulta análises independentes, impactando a verificação consistente da segurança e potência desses imunobiológicos.

CONCLUSÃO

Com os resultados parciais, demonstra-se que antivenenos de uso veterinário possuem, em geral, menor reatividade frente aos antígenos dos venenos testados e indicam uma menor potência neutralizante em relação aos soros de uso humano. A partir destes dados, tem-se como perspectiva a realização de ensaios *in vivo* para confirmar essas hipóteses. Espera-se que o presente estudo possa auxiliar no desenvolvimento de soros antiofídicos de maior eficácia neutralizante para o tratamento do envenenamento por animais peçonhentos na Medicina Veterinária.

REFERÊNCIAS

COSTA HC, BÉRNILS RS. Répteis do Brasil e suas Unidades Federativas: Lista de espécies. Herpetol Bras. 2018;7(1):11-57.