

USO DE EQUINOS PARA PRODUÇÃO DE PLASMA HIPERIMUNE ANTIBOTRÓPICO

Luiz Gustavo Dias Gonzaga
João Carlos Minozzo
Anny Raissa Carolini Gomes

RESUMO

Acidentes com animais peçonhentos representam um problema de saúde pública, sendo de maior interesse em áreas metropolitanas e rurais. A maior casuística no Brasil envolve serpentes do gênero *Bothrops* cujo veneno possui atividades fisiopatológicas coagulantes, proteolíticas e inflamatórias agudas. O único tratamento considerado eficaz é o uso do soro heterólogo antibotrópico. Considerando isso, o presente artigo busca abordar sua matéria prima e produção. Para a confecção do presente artigo, foi relatado a rotina de produção de soro antibotrópico no Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI), acompanhando uma tropa de 16 animais que foram submetidos à produção do plasma. Concluiu-se que os acidentes botrópicos são de grande relevância no país, justificando a importância da produção nacional de soros hiperimunes através do uso de equinos. A forma de produção heteróloga garante a eficácia do produto.

Palavras-chave: botrópico; jararaca; cavalo; imunização; imunoglobulinas.

ABSTRACT

Accidents involving venomous animals represent a public health problem and are of greater interest in metropolitan and rural areas. The largest number of cases in Brazil involve snakes of the genus *Bothrops*, whose venom has coagulant, proteolytic and acute inflammatory pathophysiological activities. The only treatment considered effective is the use of heterologous antivenom serum. Considering this, this article seeks to address its raw material and production. For this article, we reported on the routine production of antivenom serum at the Center for Production and Research of Immunobiologicals (CPPI), following a group of 16 animals that were subjected to plasma production. It was concluded that venenous accidents are of great importance in the country, justifying the importance of the national production of hyperimmune sera using horses. The heterologous production method guarantees the product's efficacy.

Keywords: *Bothrops*; horse; immunization; immunoglobulins.

INTRODUÇÃO

O clima subtropical está presente em grande parte do território brasileiro, criando-se um habitat favorável a diversas espécies de animais peçonhentos, colaborando para que acidentes ofídicos se tornassem um problema de saúde pública. No Brasil, existem cerca de 381 espécies de serpentes, somando ao todo 80 gêneros e 10 famílias (QUEIROZ, 2005). Toda produção de soro que visa o tratamento de acidentes ofídicos têm como base os métodos de Vital Brazil, um dos pioneiros no Brasil, iniciando em 1901 no Instituto Serumtherapico do Estado de São Paulo, atual Instituto Butantan (CARDOSO, 2003). Essa produção, segundo Temporão (2005), se iniciou no século XX, e teve a participação de diversas instituições.

O soro hiperimune antibotrópico, tem como objetivo o tratamento de pacientes que se acidentaram a partir de animais do gênero *Bothrops*. Elapidae e Viperidae são as famílias capazes de produzir toxinas e inoculá-las, sendo que as espécies mais significativas são: *Bothrops alternatus*, *Bothrops atrox*, *Bothrops erythromelas*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops leucurus*, *Bothrops moojeni* e *Bothrops neuwidi*. Estas causam os acidentes ofídicos e levam a intoxicações graves em humanos e animais não-humanos (MELGAREJO, 2003). O soro heterólogo é produzido através da imunização de equinos. Os animais são inoculados com veneno de serpentes do gênero *Bothrops*, o qual é liofilizado e diluído previamente (OLIVEIRA, 2014). A substância inoculada gera uma resposta imune que produz anticorpos contra o veneno, possibilitando a coleta do plasma hiperimune do animal (MELGAREJO, 2003).

Considerando isso, o presente artigo tem como objetivo revisar os processos de produção do plasma hiperimune, relatando a experiência adquirida em um centro de pesquisa especializado na produção deste tipo de plasma em Piraquara, região metropolitana de Curitiba.

MATERIAL E MÉTODO

O presente relato é baseado em equinos pertencentes ao Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI), situado na cidade de Piraquara, no Estado do Paraná. Uma tropa de 16 animais, 12 machos castrados e 4 fêmeas foram submetidos à produção do soro antibotrópico. A média de idade e peso dos animais era de 13 anos e 500 kg respectivamente, e eram considerados sem raça definida. Eles ficavam em pastos abertos com rotação quinzenalmente. Era fornecido para alimentação dos equinos 1kg de ração própria para a espécie, 1kg de grãos de aveia, feno de alfafa e sal mineral; a água era de fonte tratada e ficava disponível à vontade.

O veneno extraído das serpentes é submetido ao processo de determinação de dose letal (DL50), assim possibilitando a liofilização e diluição para a inoculação dos animais produtores. Os cavalos de produção de plasma hiperimune, sofrem um processo de hiperimunização anterior a produção definitiva. Portanto, após o primeiro ciclo vitalício, referente ao primeiro contato do animal com o veneno inoculado, eles foram re-imunizados para as próximas produções. O processo de re-imunização durou 28 dias e foi dividido em três aplicações, sendo administrado no primeiro dia (dia 0) a solução antígeno composta por 5ml de veneno já diluído em solução salina, na concentração de 1mg/ml + 5mL de veículo Adjuvante de *Freund* incompleto (AFI). No 14º dia foi realizada a segunda re-imunização, sendo necessário 5ml de veneno diluído, a terceira aplicação foi concluída no 21º dia, sendo utilizado 5ml de veneno *Bothrops* diluído. Todos os antígenos foram inoculados por via subcutânea na região do flanco dos cavalos. Foi feita uma preparação prévia do local de inoculação com tricotomia da região e antissepsia com álcool 70%. Os animais utilizados no processo, são suscetíveis a hipersensibilização ao veneno, podendo apresentar reações inflamatórias, abscessos e necrose em região da aplicação, edema ventral, enrijecimento muscular e claudicação. Os equinos que apresentavam sinais clínicos ou doenças mais severas relacionadas ao processo de imunização eram retirados da produção de plasma hiperimune, visando seu bem-estar. Isso porque, o uso de fármacos para tratamento dos sinais clínicos é restrito, podendo interferir na qualidade do plasma.

Após o processo de re-imunização, no 28º dia, foi realizado a coleta de sangue de todos os animais imunizados, sendo que as amostras eram obtidas em tubos sem anticoagulantes, contendo gel de separação. Estas se destinavam a avaliação do título de anticorpos presentes no soro dos animais. Os tubos eram incubados em banho-maria a 37°C por no mínimo uma hora, em seguida era feita a centrifugação do sangue a 3.000 rpm, por cinco minutos. Com o auxílio de pipeta, o soro era separado do coágulo e colocado em novos frascos já identificados e posteriormente lacrados. *Para* o processo de produção do soro antibotrópico, é necessário a realização do teste *in vivo*, sendo utilizado 5 camundongos por amostra de soro. As cobaias sofrem um processo de inoculação subcutânea do veneno *Bothrops* + soro coletado do cavalo e será observado o efeito toxicológico nas cobaias, confirmando um resultado positivo quando se mantêm vivos 4/5 dos mesmos. Após os testes de qualidade, a tropa apresentou 68,75% de aprovação em níveis de antígenos (11 animais), sendo eles submetidos ao processo de sangria de produção.

Como protocolo de segurança para os animais, é coletado em média 18L de sangue, divididos em três coletas dentro de cinco dias. Os protocolos de extração da matéria bruta são extremamente rigorosos, visando a qualidade e esterilização do plasma. Todos os cavalos aprovados passam por três coletas em bolsas coletoras estéreis de 6L. Antes da sangria, os animais são submetidos a uma higienização na qual são banhados e uma tricotomia ampla da região do pescoço é feita, possibilitando a punção venosa da veia jugular. Após a higienização, foi realizado um processo de pré-asepsia do local de punção venosa, sendo utilizado álcool 70%, clorexidine 0,5% e iodopovidine 10%. Na área de acesso venoso, foi feita uma anestesia local utilizando lidocaína 2% para dessensibilizar a pele na área de inserção da agulha de coleta de sangue, diminuindo a dor e o estresse dos animais. Após a realização de todos os procedimentos citados, um médico veterinário treinado, paramentado com avental e luva estéril, realizou a punção da veia jugular dos equinos para coleta das bolsas de sangue. Todas as amostras de sangue coletadas eram identificadas, pesadas, seladas e submetidas a um processo de hemossedimentação. Por fim, o plasma era separado das hemácias com auxílio

de prensas mecânicas e encaminhado para testes de esterilização. Os animais eram avaliados após a coleta das bolsas de sangue pelo médico veterinário responsável pela instituição, que verificava a condição clínica dos animais, e submetia-os a um descanso de no mínimo 60 dias, buscando a recuperação deles. O plasma produzido era armazenado em câmaras frias e encaminhado para a Fundação Ezequiel Dias (FUNED), situada em Minas Gerais, para que o processamento do soro fosse finalizado, tornando-o disponível e utilizável para as unidades de saúde.

O GÊNERO *BOTHROPS*

Pertencentes à família Viperidae, as serpentes do gênero *Bothrops* formam um grupo com cerca de 30 espécies distribuídas pelo território nacional, entre essas as principais são: *Bothrops atrox*, *Bothrops erythromelas*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops moojeni* e *Bothrops alternatus*. (ALMEIDA, 2016). Essas serpentes são popularmente conhecidas como “jararacas”, sendo sua principal característica comportamental o fato de terem atividade noturna nos meses quentes e as fêmeas grávidas normalmente se encontram em áreas onde possam se proteger e se termorregular, utilizando o calor do solo. As jararacas normalmente se encontram em zonas rurais e nas periferias de grandes cidades, têm preferência por ambientes úmidos e locais de fácil proliferação de roedores como paióis, celeiros e depósitos de lenha (BRASIL, 2001). Em relação à zonas rurais, vivem em diversos tipos de ambientes como nas árvores, na terra entocadas, em margens de rios, cerrados e matas (OLIVEIRA, 2014). Grande parte destas espécies, apresentam seu ciclo reprodutivo no outono, finalizando a gestação ao final do verão (SILVA, 2013). São animais de hábito noturno e desferem botes quando se sentem ameaçadas e serpentes do gênero *Bothrops* possuem denteção do tipo solenóglifa e podem atingir quando adultas de 40 centímetros a dois metros (OLIVEIRA, 2014).

O veneno das espécies botrópicas possui atividades fisiopatológicas coagulantes, proteolíticas e inflamatórias agudas, e uma única toxina pode ter mais do que apenas uma destas atividades (FRANÇA, 2003). A toxina presente no veneno das jararacas gera lesões locais com destruição tecidual e necrose,

podendo induzir a incoagulabilidade sanguínea por consumo de fibrinogênio. No gênero *Bothrops* se nota uma diferença entre o veneno do filhote, que é predominantemente coagulante, e do adulto, com maior ação proteolítica e menor ação coagulante devido a diferença na concentração da peçonha, sendo assim, os acidentes ofídicos envolvendo filhotes são considerados mais perigosos (BARRAVIEIRA, 1999). No entanto, acidentes com serpentes adultas levam a inoculação de um volume maior de veneno, sendo mais danoso a vítima, apresentando propriedades mais agressivas.

ACIDENTES OFÍDICOS NO BRASIL

O clima subtropical compõe grande parte do solo brasileiro, criando-se um habitat favorável a diversas espécies peçonhentas, colaborando para que acidentes ofídicos se tornassem um problema de saúde pública. No Brasil o ofidismo era apontado como responsável por uma alta taxa de óbitos durante o período de colonização (WEN, 2003). Em 1970, o Brasil apresentava elevados índices de acidentes com animais peçonhentos e baixa produção de soro (BRASIL, 2001). Até 1985 o soro antiofídico para uso humano não fazia parte do Programa Nacional de Imunizações do Ministério da Saúde, embora o Brasil tivesse muitos casos relatados.

Os acidentes ofídicos têm aumentado nos últimos anos, em 2010 esses acidentes foram apontados como a segunda maior causa de intoxicação, com uma taxa de 22,73% segundo os casos notificados ao Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas (TEMPORÃO, 2005). O acidente botrópico se destaca devido ao grau de importância médica e sua grande frequência de ocorrências, correspondendo ao acidente ofídico de maior importância epidemiológica no país, sendo responsável pela maioria dos casos (BRASIL, 2001). Os contatos tendem a ocorrer durante as estações quentes e úmidas, período de maior atividade humana no campo, normalmente entre os meses de janeiro e abril. Os acidentes são mais frequentes em adultos e jovens do sexo masculino, devido ao fato de estarem ligados ao trabalho rural (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

SORO ANTIVENENO

Albert Calmette, após inúmeras tentativas falhas, em 1894, conseguiu imunizar coelhos contra o veneno de serpente do gênero *Naja*, após sucessivas inoculações subcutâneas. Percebeu após alguns meses que alguns dos coelhos eram capazes de sobreviver a determinadas doses de veneno, e que também o soro dos animais imunizados tinha capacidade de neutralizar a atividade tóxica do veneno in vitro. Dando continuação a esta experiência ele inoculou coelhos com o dobro da dose letal e aplicou o soro imune por via intraperitoneal ou subcutânea. Ele visualizou o aparecimento de sinais clínicos nos animais inoculados e observou que os animais tiveram melhora gradual destes sinais, voltando a normalidade (WORLD, 2010). Neste mesmo ano, Phisalix e Bertrand conseguiram visualizar a presença de substâncias antitóxicas no sangue de animais que foram vacinados com veneno de víboras. Foi feito um experimento no qual inocularam cobaias, essas cobaias foram testadas em 24, 36 e 48 horas depois da imunização. Se obteve como resultado a sobrevivência de apenas um animal o qual foi desafiado 48 horas pós-imunização, os levando a conclusão de que não era a imunização produzida diretamente pela vacina que levava a recuperação do animal, mas sim o resultado de uma reação do organismo ao inóculo (WORLD, 2010).

Vital Brazil, consciente dos inúmeros acidentes ofídicos que aconteciam no estado de São Paulo decidiu realizar experimentos com venenos de serpentes e descobriu a especificidade, deduzindo que cada tipo de veneno ofídico requer um soro específico (BRAZIL, 1895). No Brasil ainda hoje, a produção de soros antiofídicos é baseada nos métodos descritos por Vital Brazil em 1903.

PLASMA HIPERIMUNE

O sangue quando retirado do organismo tem suas proteínas reagentes umas com as outras, formando os coágulos, logo isso atribui características que diferenciam o plasma, sendo denominado como soro (OLIVEIRA, 2014). O sangue é um tecido que se diferencia dos demais tecidos devido ao fato de poder ser coletado e separado em seus componentes, assim possibilitando seu uso

para diversos fins produtivos, podendo ser utilizado como meios de cultura fúngicos e bacterianos, em hemoterapias em animais de mesma espécie e em transfusões sanguíneas visando reverter anemias hemolíticas e hemorrágicas em pacientes. O plasma comum se apresenta como um hemocomponente, sendo obtido por meios de centrifugação de amostras de sangue.

O plasma hiperimune é a principal matéria-prima utilizada na produção dos soros, obtido a partir do sangue total dos equinos imunizados, tem como objetivo principal tratamento contra toxinas de animais peçonhentos (OLIVEIRA, 2014). O total de plasma produzido de determinado lote de animais é reunido, desta forma se tornando o plasma a granel o qual será processado visando a purificação da imunoglobulina G (IgG), gerando o soro concentrado, este por sua vez passará pelo envase em ampolas (SILVA, 2008).

A inoculação do veneno possibilita com que anticorpos específicos sejam adquiridos. A reação inflamatória concentra leucócitos na região, sendo realizada a captura dos antígenos do veneno. Segundo ABBAS (2019), linfócitos B reconhecem antígenos estranhos e se proliferam em plasmócitos, secretando diferentes classes de anticorpos específicos. Tais células apresentam uma expansão policlonal, produzindo diversas imunoglobulinas específicas para combater a peçonha inoculada, IgG principalmente, a qual apresenta a capacidade de neutralizar o veneno, diminuindo seu efeito no organismo afetado.

De acordo com as Normas de Produção e Controle de Qualidade dos Soros Antiofídicos, “o soro antiofídico é uma solução de imunoglobulinas específicas purificadas, obtidas a partir de plasma de equídeos hiperimunizados, contra o veneno da espécie a que se refere” (BRASIL, 1996).

A produção do plasma hiperimune dá seu início com a extração do veneno específico de serpentes *Bothrops*, sendo submetido a teste de letalidade mediana, DL50, sendo o intuito determinar a dose necessária para a ativação da produção de anticorpos e inoculações sem risco total de letalidade ao animal. Os animais que forem considerados aptos após o exame clínico, são inoculados com o antígeno específico. Após a aplicação é realizada uma sangria de prova, onde se coleta soro sanguíneo de cada animal inoculado para realização da prova de potência, a qual avalia a titulação de anticorpos produzidos pelo cavalo,

sendo realizado o teste *in vivo* em camundongos cobaias. (OLIVEIRA,2014). Segundo a Farmacopéia Brasileira (2010), o soro antibotrópico contém em cada mililitro imunoglobulinas suficientes para neutralizar 5mg de veneno de referência de *B. jararaca*. O título da potência é expresso em miligramas de veneno neutralizados por 1 mL da amostra. Segundo França e Málaque (2003), o veneno de serpentes *Bothrops* são compostas por substâncias distintas, sendo em sua maioria proteínas, enzimas, toxinas não enzimáticas e proteínas não tóxicas. Sendo as frações não-proteicas: carboidratos, lipídios, metais, aminas biogênicas, nucleotídeos e aminoácidos livres.

Se o animal produziu anticorpos adequadamente, ele é submetido à sangria de produção (OLIVEIRA,2014). O sangue é coletado em uma bolsa plástica dupla que é armazenada em uma câmara frigorífica por 24 horas para ocorrer a decantação das hemácias. Após, há a separação dos elementos figurados do plasma, que é recolhido no segundo compartimento da bolsa de sangue, em um sistema totalmente fechado e esterilizado. O plasma fica armazenado em câmaras refrigeradas e posteriormente passam pelo processo de envasamento do soro final (CARDOSO,2003).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os acidentes botrópicos são de maior relevância no país, justificando a importância da produção nacional do soro. Isso garante o entendimento da necessidade do uso de equinos para fins produtivos. Os animais destinados a produção são de extrema importância para o processo, garantindo o tratamento gratuito pelo sistema único de saúde, visto que o uso do soro antiofídico é o único tratamento eficaz nos acidentes. O plasma hiperimune é a matéria prima para o soro antibotrópico, sendo necessário estimular o sistema imunológico dos equinos, produzindo imunoglobulinas específicas para a neutralização do veneno. A forma de produção heteróloga garante a eficácia do produto e a qualidade do tratamento.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. **Imunologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: GEN Guanabara Koogan, 2019.

ALMEIDA. Revisão sistemática: as principais complicações do acidente botrópico. **Portal de revistas eletrônicas PUC Goiás**, 2016.

AZ, E.; ARAUJO, P. Sangria de animais de imunização. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 21, p. 275-298, 1949.

BARRAVIEIRA, B. **Venenos** – Aspectos Clínicos e Terapêuticos dos Acidentes por Animais Peçonhentos. Rio de Janeiro: EPUB, 1999. p. 411.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº 17 de 16 de abril de 2010**. Dispõe sobre as Boas práticas de fabricação de medicamentos. Resolução, 2010.

BRASIL. ANVISA. **RDC nº 17 de 16 de abril de 2010**. Dispõe sobre as boas práticas de fabricação de medicamentos. Resolução, 2010.

BRASIL. **Portaria nº174, 11 de novembro de 1996**. Aprova as normas técnicas de produção e controle de qualidade dos soros antiofídicos, antitóxicos e anti-rábico. Resolução, 1996.

CARDOSO, D. F.; YAMAGUCHI, I. K.; SILVA, A. M. M. Produção de soros antitoxinas e perspectivas de modernização por técnicas de biologia molecular. p. 367 – 379. *In: Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo: Sarvier, 2003.

CARDOSO, J. L. C.; WEN, F. H. Introdução ao ofidismo. p. 3 – 5. *In: Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. São Paulo: Sarvier, 2003.

CHIPPAUX; Jean-Philippe. Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins. **Biologie aujourd'hui**, v. 204, n. 1, p. 87-91, 2010.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. **Monografia**: soro antibotrópico pentavalente. 5 ed. v.2, p.1289-1290. Brasília, ANVISA, 2019.

FRANÇA, F. O. S.; MÁLAQUE, C. M. S. Acidente botrópico. p. 72 - 86. *In*: **Animais peçonhentos no Brasil**: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier, 2003.

HIGASHI, H. G.; IIZUKA, H.; OLIVEIRA, E. P. T.; SILVA, M. A. Preparação do soro antibotulínico tipo B pela hiperimunização de cavalos, no instituto Butantan. **Memórias do instituto Butantan, São Paulo**, v. 42/43, p. 77-85, 1978/1979.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**. 2 ed. Brasília, 2001.

OLIVEIRA, E. C. F. **Controle da qualidade do plasma hiperimune equino antibotrópico produzido no Instituto de Biologia do Exército**. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013.

QUEIROZ, W. J. **O processo produtivo do soro antiofídico da crise a superação?** Goiânia, 2005. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais & Saúde, Universidade Católica de Goiás.

SILVA, K. M. P. da; SUEIRO, L. R.; GALASSI, G. G.; SANTOS, S. M. de A.-. Reprodução de *bothrops* spp. (serpentes, viperidae) em criadouro conservacionista. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v. 20, n. 4, p. 632–642, 2013.

TEMPORÃO, J. G.; CARVALHEIRO, J. R. (Org.). **Vacinas, soros e imunizações no Brasil**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2005.

THEAKSTON, R.D.G; REID. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. **Bullettin of the World Heath Organization**, v. 61, n. 6, p. 949-956, 1983.

THOMAZINI, I.A.; BARRAVIEIRA, B. Alterações he-matológicas nos acidentes por animais peçonhentos. p. 81-89. *In: Venenos animais: uma visão integrada*. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 1994.