

Perfil bioquímico sorológico de bovinos inoculados experimentalmente com veneno crotálico iodado livre e iodado incorporado em lipossomas

[Serological biochemical profile of bovines poisoned experimentally with free iodized crotalic poison and iodized incorporated in lipossomes]

L.A. Lago¹, A.P. Marques Junior¹, M.M. Melo¹, E.P. Lago², N. J. F. Oliveira¹, F. Alzamora Filho¹

¹Escola de Veterinária da UFMG

Caixa Postal 567

30123-970 – Belo Horizonte, MG

²Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa

RESUMO

Investigou-se o perfil sorológico de bovinos inoculados com veneno crotálico detoxificado pelo método de iodação e iodação com encapsulação em lipossomas. Onze fêmeas com idade média de 18 meses e peso médio de 160kg, foram inoculadas com 0,03mg/kg de peso vivo do veneno crotálico do tipo crotamina positivo. Cinco animais receberam o veneno iodado livre, cinco o iodado encapsulado em lipossomas e um animal recebeu o mesmo veneno na forma natural, para controle da letalidade da amostra de veneno utilizada. Não houve alterações significativas na concentração de proteínas totais, uréia e creatinina em ambos os tratamentos. Foi observada diferença significativa na concentração de creatinafosfoquinase a partir de duas horas após a inoculação do veneno. A iodação do veneno crotálico, com ou sem incorporação em lipossomas, suprimiu seus efeitos deletérios sobre o perfil bioquímico de bovinos.

Palavras-chave: veneno, *Crotalus*, bovino

ABSTRACT

It was studied the activity of the Crotalus venom detoxified encapsulated in lipossomes or non-encapsulated by the method of controlled iodination on the biochemical profile of bovines. Eleven 18-months-old female bovines, weighting 160kg in average were used in this study. Groups of five animals were inoculated intramuscularly with a dose of 0,03mg/kg with either the detoxified non-encapsulated venom or the detoxified encapsulated venom. One control animal received the same dose of non detoxified venom by the same route. No significant differences were observed between the study groups for the parameters of total protein, urea and creatinine. Differences were observed for creatine phosphokinase at times T₀ and T₁₂ for the group treated with the iodinated venom encapsulated in lipossomes. The detoxification process abolished the activity of the venom in the encapsulated or nonencapsulated form on the biochemical parameters and renal activity of bovine.

Keywords: venom, *Crotalus*, bovine

INTRODUÇÃO

O veneno da cascavel sul americana é uma complexa mistura química composta de proteínas

e peptídeos biologicamente ativos, amins biogênicas e outras substâncias que atuam alterando diversos processos fisiológicos (Markland, 1998). As principais ações desse

Recebido para publicação em 19 de dezembro de 2003

Recebido para publicação, após modificações, em 13 de setembro de 2004

E-mail: lago@vet.ufmg.br

veneno foram classificadas como sendo neurotóxica, miotóxica, coagulante, anticoagulante, hemolítica *in vitro* e nefrotóxica (Jorge e Ribeiro, 1992; Rahmy, 2001). Um dos constituintes mais estudados é a enzima fosfolipase A₂, responsável por exercer atividade miotóxica, inflamatória, citotóxica e neurotóxica (Takahira, 1999).

A crotovina, formada pelo complexo crotapotin-fosfolipase, juntamente com a crotamina, convulsina e giroxina são responsáveis pelos principais efeitos neurotóxicos causados pelo envenenamento crotálico. Elas agem na sinapse da placa motora provocando incoordenação motora, convulsões, salivação e paralisias (Amaral et al., 1991; Hudelson e Hudelson, 1995).

A crotamina é potencialmente menos tóxica que a crotovina, mas sua ação é específica sobre a membrana muscular esquelética, provocando estado de fibrilação com contrações curtas e relaxamento demorado (Brasil, 1990), resultando em rabdomiólise, uma síndrome clínica de múltiplas etiologias, consequência da lesão muscular esquelética (Gabow et al., 1982). Sua ocorrência faz parte do quadro clínico do envenenamento crotálico (Magalhães et al., 1986; Azevedo-Marques et al., 1990), com mioglobulinemia, hiperfosfatemia, hiperkalemia, aumentos de creatinina e da enzima creatinafosfoquinase com intensa mialgia (Salvini et al., 2001). Lago (1996) estudou o envenenamento crotálico do tipo crotamina positivo em bovinos e observou elevação sérica da uréia e da creatinafosfoquinase, que atingiram altas concentrações no soro em 12 horas após o envenenamento até a morte dos animais. A enzima creatinafosfoquinase é específica do tecido muscular e seus valores séricos elevam-se significativamente quando acontece um esforço físico. Esse aumento é diretamente proporcional ao tamanho do esforço (Bernard e Divers, 1989).

Pesquisadores preocupam-se em estudar o veneno crotálico com o objetivo de encontrar alternativa eficiente de proteção do homem e dos animais, buscando um imunógeno seguro e eficiente. Em geral, a dose letal do veneno crotálico é muito pequena. Araújo et al. (1963) determinaram a dose letal para bovinos e concluíram que 0,05mg/kg/peso vivo é o suficiente para levar o animal à morte em 24 horas.

Venenos são tidos como imunógenos fracos, o que dificulta a confecção de uma vacina. Por isso, diminuir ou mesmo suprimir sua letalidade, sem alterar suas características imunogênicas, seria um grande passo. Kocholaty et al. (1968) detoxificaram o veneno da cascavel sul-americana utilizando foto-oxidação e concluíram que, além da atenuação de seus efeitos deletérios, também preserva sua imunogenicidade. Daniel et al. (1987) detoxificaram o veneno da cascavel sul-americana mediante iodação controlada e concluíram que o método é eficiente. Freitas (1996) incorporou a crotovina em liposomas e concluiu que houve redução de, pelo menos, 42 vezes na sua toxicidade. O objetivo do presente trabalho foi verificar a supressão dos efeitos dos componentes do veneno crotálico após iodação e de iodação com incorporação em liposomas sobre o perfil bioquímico sorológico de bovinos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 11 novilhas, mestiças, com idade média de 18 meses e peso médio de 160kg. Os animais foram mantidos em baias, identificados, vermifugados com albendazole¹ e banhados com solução de amitraz², segundo recomendação do fabricante, no dia seguinte ao de sua chegada ao hospital veterinário.

Foram formados três grupos experimentais: no grupo VI (n=5), os animais receberam inoculação com veneno iodado livre; no grupo VILP (n=5), inoculação com veneno iodado incorporado em liposomas; no grupo V, um animal recebeu a inoculação com veneno na forma natural, para verificação da letalidade (controle). O veneno utilizado foi o crotálico do tipo crotamina positivo, fornecido pelo Centro de Pesquisa e Desenvolvimento da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), o qual foi diluído em salina 0,85% e fracionado em duas alíquotas. A primeira alíquota, na concentração de 5,00mg/ml, foi inoculada no animal V e a segunda, submetida a iodação segundo Heneine et al. (1986), foi subdividida em duas frações: a primeira, na concentração de 8,39mg/ml, foi inoculada nos animais do grupo VI e a segunda,

¹ Valbazen-Smithkline - Brasil

² Triatox-Mallinckrodt Vet LTDA

Perfil bioquímico sorológico de bovinos...

na concentração de 6,00mg/ml, submetida ao processo de incorporação do veneno em liposomas, segundo Freitas et al. (1998), foi inoculada nos animais do grupo VILP. A inoculação do veneno, na dose de 0,03mg/kg, foi feita por via intramuscular, na região glútea, conforme Belluomini (1972). Antes do envenenamento (tempo zero) e a cada duas horas, durante 24 horas (T₂ a T₂₄), colheu-se sangue venoso da jugular em tubos venoject³ para realização de dosagens bioquímicas. Foram feitas as dosagens de proteínas totais, creatinina e uréia para todos os tempos avaliados e de creatinafosfoquinase apenas nos tempos zero, 6, 12, 16 e 20. Em todas as dosagens foram utilizados kits comerciais⁴.

A análise de variância e os testes de KruskalWallis e de ScottKnott, para verificação das diferenças, foram usadas segundo Snedecor e Cochran (1967).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As Tab. 1 a 4 mostram o resultado do perfil sorológico da concentração de proteínas totais, uréia, creatinina e de creatinafosfoquinase. Houve diferença (P<0,05) entre os tempos estudados apenas na concentração de creatinafosfoquinase.

Tabela 1. Concentração de proteínas totais (mg/dl) em bovinos inoculados com veneno crotálico iodado livre (VI), incorporado em liposomas (VILP) e veneno crotálico natural (V)

Grupo	Tempo decorrido desde a inoculação (horas)												
	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
VI	5,7	6,8	6,6	6,1	6,5	6,1	6,5	6,9	6,3	7,4	6,6	7,7	7,6
	±0,4	±0,4	±0,9	±1,7	±1,1	±0,4	±0,4	±0,7	±1,2	±0,8	±1,0	±0,6	±0,8
VILP	6,1	6,3	6,0	5,7	5,6	5,7	6,7	6,2	6,6	6,4	7,4	6,9	7,3
	±1,3	±0,4	±0,6	±1,2	±0,7	±1,0	±1,4	±1,0	±0,9	±0,9	±0,6	±0,4	±0,9
V	5,8	6,9	9,3	6,8	7,2	5,9	8,4	6,7	8,1	7,7	7,6	-	-

Tabela 2. Concentração de uréia (mg/dl) em bovinos inoculados com veneno crotálico iodado livre (VI), incorporado em liposomas (VILP) e veneno crotálico natural (V)

Grupo	Tempo decorrido desde a inoculação (horas)												
	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
VI	41,2	43,6	51,0	44,9	36,1	36,8	26,6	33,2	31,8	41,1	27,8	26,4	21,4
	±8,1	±11,0	±11,1	±11,1	±10,8	±10,8	±9,9	±8,8	±9,3	±11,8	±8,4	±10,2	±7,1
VILP	34,2	39,6	47,2	34,4	33,3	32,1	31,4	34,3	35,8	37,4	27,3	25,6	24,5
	±4,4	±8,0	±2,0	±8,0	±5,2	±4,5	±7,1	±8,6	±7,2	±4,6	±5,2	±6,7	±7,4
V	46,8	52,9	54,5	63,2	50,2	78,3	45,6	46,7	47,3	31,8	29,9	-	-

Tabela 3. Concentração de creatinina (g/dl) em bovinos inoculados com veneno crotálico iodado livre (VI), incorporado em liposomas (VILP) e veneno crotálico natural (V)

Grupo	Tempo decorrido desde a inoculação (horas)												
	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
VI	0,9	1,1	1,1	1,1	1,0	1,1	1,2	1,2	1,1	1,1	1,3	1,0	1,1
	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,2	±0,3	±0,2	±0,1	±0,1	±0,2	±0,2	±0,1	±0,1
VILP	1,1	1,1	1,0	1,0	1,0	1,1	1,2	1,2	1,1	1,2	1,3	1,1	1,2
	±0,2	±0,2	±0,1	±0,1	±0,1	±0,2	±0,1	±0,2	±0,2	±0,1	±0,2	±0,2	±0,1
V	1,0	1,0	1,0	1,0	1,1	1,0	1,0	1,0	1,1	1,2	1,2	-	-

³Terumo Medical Corporation

⁴Labtest Diagnóstica S.A

Tabela 4. Concentração de creatinafosfoquinase (UI/l) em bovinos inoculados com veneno crotálico iodado livre (VI), incorporado em liposomas (VILP) e veneno crotálico natural (V)

Grupo	Tempo decorrido desde a inoculação (horas)				
	0	6	12	16	20
VI	61,3 ±31,5	550,5 ±776,9	575,8 ±686,5	485,2 ±411,0	509,2 ±477,1
VILP	48,8b ±12,6	385,9ab ±272,1	574,7a ±468,2	429,0ab ±315,4	382,6ab ±210,7
V	67,5	922,8	1211,6	1420,1	1557,8

Os resultados para proteínas totais e creatinina assemelham-se ao observado por Lago (1996), mas diferem dos relatados para o homem por Hudelson e Hudelson (1995). A concentração de uréia permaneceu sem alteração, possivelmente, devido ao efeito detoxificador da iodação, que suprimiu o efeito nefrotóxico do veneno garantindo, assim, a eficiência renal na excreção de catabólitos nitrogenados.

No envenenamento crotálico, segundo a maioria dos pesquisadores, espera-se que ocorra hipoproteinemia, aumento da concentração de uréia, de creatinina e de creatinafosfoquinase, em decorrência da ação dos componentes do veneno, principalmente enzima fosfolipase A₂, aminas biogênicas, crotóxina, crotamina e miotoxina 2α (Azevedo-Marques et al., 1990; Lago, 1996; Salvini et al., 2001). Segundo esses autores, o aumento de uréia e creatinina no soro ocorre por dificuldades dos rins em excretar catabólitos nitrogenados, em decorrência de disfunção renal, provocada pela ação nefrotóxica do veneno. Lago (1996) não observou hipoproteinemia e nem elevação sérica da concentração de creatinina em bovinos intoxicados com veneno de cascavel.

A creatinafosfoquinase é específica do tecido muscular e seus valores séricos elevam-se significativamente quando os animais são submetidos a esforço físico, conforme relato de Bernard e Divers (1989), ou quando apresentam quadros clínicos com miopatia, como o observado na síndrome de rabdomiólise (Gabow et al., 1982). Segundo Hudelson e Hudelson (1995), o aumento dessa enzima, nesses casos, justifica-se como sendo efeito da ação da enzima miotoxina 2α e da fosfolipase A₂, as quais agem sobre a musculatura provocando

mionecrose e, conseqüentemente, liberação de creatinafosfoquinase na circulação. Essa ação é vista em microscopia eletrônica como alterações provocadas no retículo sarcoplasmático nas mitocôndrias e por desorganização na disposição de filamentos de miosina. A miotoxina 2α assemelha-se estruturalmente e funcionalmente à crotamina e age seletivamente sobre as fibras musculares do tipo I e IIA (Salvini et al., 2001).

O aumento na concentração da creatinafosfoquinase, observado nos tempos em que foi avaliada, é inferior ao relatado por Lago (1996) e provavelmente ocorreu em decorrência do esforço muscular exercido pelos animais durante as manipulações. Aparentemente a iodação do veneno também suprimiu as ações patogênicas de seus componentes sobre a musculatura, principalmente porque o aumento da creatinafosfoquinase não foi tão elevado quanto ao observado nos casos naturais e, também, porque não foram observados sintomas clínicos de comprometimento muscular como mialgia, edema, tremores musculares e urina escura.

A iodação controlada do veneno crotálico, com ou sem incorporação em liposomas, suprimiu os efeitos deletérios sobre os rins e musculatura de bovinos e, conseqüentemente, sobre o perfil bioquímico.

CONCLUSÃO

A iodação e a iodação seguida de incorporação em liposomas do veneno crotálico suprimem os efeitos de seus constituintes sobre o perfil bioquímico sorológico da concentração de proteínas totais, uréia, creatinina e creatinafosfoquinase de bovinos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, C.F.S.; MAGALHÃES, R.A.; RESENDE, N.A. Comprometimento respiratório secundário a acidente ofídico crotálico (*Crotalus durissus*). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.33, p.251-255, 1991.
- ARAUJO, P.; ROSENFELD, G.; BELLUOMINI, H.E. Toxicidade de venenos ofídicos II - Doses

Perfil bioquímico sorológico de bovinos...

- mortais para bovinos. *Arq. Inst. Biol.*, v.30, p.43-51, 1963.
- AZEVEDO-MARQUES, M.M.; CUPO, P.; AMARAL, C.F.S. et al. Ratlesnake bites. Clinical features and complementary tests. *Mem. Inst. Butantan*, v.52, supl, p.27-30, 1990.
- BELLUOMINI, H.E. Ensaio soroterápicos no envenenamento crotálico experimental em bovinos. 1972. 190f. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- BERNARD, W.V.; DIVERS, T.J. Variation in sera sorbitol dehydrogenase, aspartate transaminase and isoenzyme 5 of lactate dehydrogenase activities in horses given carbon tetrachloride. *Am. J. Vet. Res.*, v.50, p.622-623, 1989.
- BRASIL, O.V. Pharmacology of crotamine. *Mem. Inst. Butantan*, v.52, supl., p.23-24, 1990.
- DANIEL, J.P.; HENEINE, L.G.D.; TAVARES, C.A.P. et al. Generation of protective immune sera by *Crotalus durissus terrificus* venom detoxified by controlled iodination. *Bras. J. Med. Biol. Res.*, v.20, p.713-720, 1987.
- FREITAS, T.V. Crotóxina, neurotoxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, incorporada em liposomas. 1996. 140f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- FREITAS, T.V.; DINIZ, C.R.; FREZARD, F. The use of liposomes as snake venom vehicles: Application in protective immunization. *J. Toxicol. Toxin Reviews*, v.17, p.441-466, 1998.
- GABOW, P.A.; KAEHNY, W.D.; KELLEHER, S.P. The spectrum of rhabdomyolysis. *Medicine*, n.61, p.141-152, 1982.
- HENEINE, L.G.D.; CARDOSO, V.N.; DANIEL, J.P. et al. Detoxification of the T₂ fraction from a scorpion (*Tityus serrulatus*, Lutz and Mello) venom by iodination and some immunogenic properties of the derivatives. *Toxicon*, v. 24, p. 501-505, 1986.
- HUDELSON, S.; HUDELSON, P. Pathophysiology of snake envenomization and evaluation of treatments- part II. *Comp. Contin. Educ. Pract. Vet.*, v.17, p.1035-1040, 1995.
- JORGE, M.T.; RIBEIRO, L.A. Epidemiologia e quadro clínico do acidente por cascavel Sul-Americana (*Crotalus durissus*). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.34, p.347-354, 1992.
- KOCHOLATY, W.F.; GOETZ, C.S.; ASHLEY, D.B. et al. Immunogenic response of the venoms of fer-de-lance, *Bothrops atrox asper*, la cascavella, *Crotalus durissus terrificus* following photooxidative detoxification. *Toxicon*, v.5, p.153-158, 1968.
- LAGO, L.A. Avaliação clínica e laboratorial de bovinos submetidos ao envenenamento crotálico experimental - *Crotalus durissus terrificus* - Laurenti, 1768 - crotamina positivo. 1996. 85f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)-Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- MAGALHÃES, R.A.; RIBEIRO, M.M.F.; RESENDE, N.A. et al. Rabdomiólise secundária a acidente ofídico crotálico (*Crotalus durissus terrificus*). *Rev. Med. Trop. São Paulo*, v.28, p.228-233, 1986.
- MARKLAND, F.S. Snake venoms and hemostatic system. *Toxicon*, v.36, p.1749-1800, 1998.
- RAHMY, T.R. Action of cobra venom on the renal cortical tissues: electron microscopic studies. *J. Venom. Anim. Toxins*, v.7, p.1-22, 2001. Disponível em: <<http://www.scielo.br>>. Acessado em 08/10/01.
- SALVINI, T.F.; AMARAL, A.C.; MIYABARA, E.H. et al. Systemic skeletal muscle necrosis induced by crotoxin. *Toxicon*, v.39, p.1141-1149, 2001.
- SNEDECOR, G.M.; COCHRAN, W.G. *Statistical methods*. 6.ed. Ames: Iowa State University, 1967. 580p.
- TAKAHIRA, R.K. Perfil hematológico, hemostático, bioquímico e histopatológico do envenenamento experimental de cães por *Bothrops alternatus* Dumeril, 1854 e *Bothrops moojeni* Hoge. 1996. 195f. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.