



Venenos e envenenamentos por serpentes de importância médica em Angola



Paula Regina Simões de Oliveira

U. PORTO



FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

Venenos e envenenamentos por serpentes de importância médica em Angola

Paula Regina Simões de Oliveira

Tese do 3º Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Doutoramento em Ciências Farmacêuticas - Especialidade de Toxicologia

Trabalho realizado sob a orientação de:
Professora Doutora Denise V. Tambourgi (Orientadora)
Professora Doutora Maria de Lourdes P.A.S. Bastos (Co-orientadora)

Porto

Abril, 2018

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

AGRADECIMENTOS

Antes de mais, agradeço a Deus pela orientação divina que tem dado à minha vida e por ter despertado em mim o interesse por esta área.

Ao Instituto Butantan por prontamente abrir as portas para que hoje o presente trabalho fosse uma realidade.

À Professora Denise V. Tambourgi por ter aceitado ser a minha orientadora da parte experimental do meu trabalho realizado no Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan e ter posto todos os recursos que estavam ao seu alcance para que este trabalho pudesse ser uma realidade.

À estimada Prof. Dra. Maria de Lourdes Bastos por se ter mostrado recetiva e, desde o primeiro instante em ser minha coorientadora do Doutoramento em Ciências Farmacêuticas pela Universidade do Porto, o meu muito obrigado pela orientação de excelência, pela total disponibilidade e dedicação, pelo apoio incansável e pela paciência.

À equipa do CIMETOX que colaborou durante a expedição Ndala Lutangila em especial Dra Iris Andrea Betencourt e Arnaldo Castro.

Ao Dr. Jacinto Pinto pela sua dedicação em várias fases da organização deste trabalho.

Ao herpetologista, Dr. Sávio Stefanini Santana, por ter aceitado o convite de vir a Angola coletar serpentes, no âmbito do estudo sobre venenos e envenenamentos por serpentes de Angola. Meu muito obrigado por todos os ensinamentos dados.

À Dra. Marisa Rocha, por ter aceitado igualmente o desafio de fazer parte da equipa da captação de serpentes e todos os conhecimentos ministrados para a conservação dos venenos.

Ao doutorando Felipe França pelo apoio e conhecimentos ministrados durante a fase experimental laboratorial.

À Dra. Isadora Villas Boas pelo apoio durante a fase experimental e laboratorial pelo carinho e amizade que prevalece até hoje.

Ao Prof Roberto Lardoeyt Ferrer por todo o apoio para a organização do capítulo II.

À Iva Paiva, pelo seu apoio durante todo o processo de inscrição no curso de Doutorado.

Por último, e não menos importante, à Ilda da Costa Francisco, a quem agradeço profundamente a entrega, dedicação e disponibilidade para abraçar, não só este, mas todos os desafios que norteiam a minha vida académica, científica, profissional e pessoal.

A todos que, indiretamente terão contribuído para a concretização deste trabalho.

DEDICATÓRIA

À memória dos meus pais, por acreditar que existe uma força espiritual e que é, sem dúvida alguma, a presença deles na minha vida.

Ao meu avô, por ter incutido em mim todos os valores morais e éticos que moldaram a minha personalidade e me prepararam para enfrentar os diferentes desafios com os quais me deparei ao longo da vida.

Aos meus filhos André, Dumirianh e Jessica, pelas várias horas de ausência a que estiveram sujeitos para que eu pudesse entregar-me de corpo e alma a esta pesquisa.

Aos meus tios, Hélder e Stela Sousa, que apoiaram possibilitando a minha disponibilidade para a entrega total que este trabalho exigiu de mim.

À minha mãe Júlia Varela Pinto pelo apoio incondicional sempre que foi necessário a minha presença para dedicação exclusiva a este trabalho fosse em Portugal ou no Brasil.

RESUMO

As mordeduras de serpentes constituem um problema de saúde em vários países do mundo. Estes acidentes são considerados uma doença tropical negligenciada responsável por uma alta morbidade e mortalidade no Sudeste Asiático e África subsariana. A dimensão deste problema de saúde em Angola é desconhecida.

O presente trabalho teve como objetivos: i) avaliar a atuação dos profissionais de saúde, diante dos envenenamentos por mordedura de serpentes em quatro regiões angolanas; ii) analisar bioquimicamente venenos das serpentes dessas regiões; iii) conhecer a imunogenicidade dos venenos e produzir o soro antiveneno experimental. Para cumprir tais objetivos foi feito um desenho metodológico em três etapas, tendo na primeira etapa sido realizado um estudo observacional descritivo transversal com uma amostra de 151 profissionais de saúde; na segunda etapa, a caracterização bioquímica dos venenos, que foram: i) determinação da concentração proteica dos venenos e caracterização do perfil eletroforético dos mesmos; ii) determinação do perfil de glicosilação das proteínas dos venenos; iii) avaliação da atividade proteolítica utilizando substratos peptídicos de fluorescência; iv) detecção da atividade fosfolipásica (PLA2), realizada por fluorimetria; e v) avaliação da atividade hialuronidásica por turbidimetria com uma amostra de venenos de oito serpentes. Na terceira e última etapa foi feita a avaliação do potencial imunogénico dos venenos das serpentes angolanas em modelo animal murino e detecção dos componentes antigénicos frente aos soros murinos. Estas duas últimas etapas basearam-se em estudos do tipo Experimentais Analíticos laboratoriais.

Os resultados da presente investigação permitiram concluir que: 1 - existe um baixo nível de conhecimentos dos profissionais da saúde no diagnóstico, avaliação e terapia das mordeduras de serpentes angolanas; 2 - as manifestações clínicas das mordeduras por serpentes angolanas podem ser locais, sistémicas, oftalmológicas e neurológicas; verificou-se um escasso tratamento quer pré-hospitalar quer hospitalar, sem qualquer administração de soro antiofídico; contudo, a maioria dos casos evoluiu positivamente – cura; 3 - os venenos de serpentes de importância médica em Angola, envolvidos nos acidentes ofídicos, apresentam uma notável variabilidade bioquímica no nível intraespecífico, relacionada ao sexo dos animais e regiões de onde são provenientes. Essa variabilidade foi demonstrada pelo perfil eletroforético dos venenos das diferentes espécies. Em relação à atividade fosfolipásica, verificou-se níveis similares desta atividade nos venenos de macho e fêmea de *Naja nigricollis* e diferenças estatisticamente significativas entre os venenos de machos e fêmeas de *Bitis arietans* de Mufuma, Calandula e Cuanza Sul. O veneno de *Bitis gabonica* macho de Mufuma não apresentou

atividade fosfolipásica detetável, enquanto o da fêmea da mesma região, apresentou uma atividade de cerca de 2.000 UF/min/μg. Relativamente a atividade hialuronidásica, verificou-se diferenças, estaticamente significativas, nos venenos das *N. nigricollis* de Cuanza Sul e Malanje, sendo a da última 35 vezes superior a da primeira. Os venenos de *B. arietans*, macho e fêmea, de Mufuma, também apresentaram uma diferença significativa na atividade hialuronidásica, sendo a da fêmea 28 vezes superior a do macho. Tanto os venenos das *B. arietans* como os das *B. gabonica* apresentaram atividade proteolítica significativa sobre o substrato FRET. Todos os venenos das *B. arietans* foram inibidos acima dos 90% por PMSF; no entanto, a inibição pela fenantrolina variou de 50 a 80%, enquanto que para a *B. arietans* de Cuanza Sul foi obtida uma inibição de 100% pela fenantrolina. Os venenos das serpentes *B. gabonica* não apresentaram diferenças na atividade proteolítica entre gêneros, sendo que ambos os venenos foram inibidos de forma semelhante pelo PMSF e fenantrolina; 4 - os venenos de serpentes de importância médica em Angola, envolvidos nos acidentes ofídicos, são imunogênicos. No entanto, os venenos viperideos (*B. arietans* e *B. gabonica*) são mais imunogênicos em relação ao veneno elapídico (*N. nigricollis*) e os soros murinos produzidos reconheceram um considerável número de componentes dos referidos venenos.

Palavras-chave: Angola, venenos de serpentes, perfil bioquímico, soro murino.

ABSTRACT

Snakebites are a health problem in many countries around the world. These accidents are considered a neglected tropical disease responsible for high morbidity and mortality in Southeast Asia and sub-Saharan Africa. The extent of this health problem in Angola is unknown.

The present study had the following objectives: i) to evaluate the performance of health professionals towards snake bite poisonings in four Angolan regions; ii) to biochemically analyse the venoms of the snakes collected in these regions; iii) to evaluate the immunogenicity of the venoms and produce the experimental antivenom serum.

To achieve these objectives, a three-step methodological design was carried out. First-step - a prospective cross-sectional descriptive observational field study including 151 health professionals; Second-step - Biochemical characterization of their respective poisons, including: i) determination of the protein concentration of the venoms and characterization of their electrophoretic profiles; ii) determination of the glycosylation profile of the venom proteins; iii) evaluation of the proteolytic activity using fluorescence peptide substrates; iv) detection of the phospholipase activity (PLA₂), performed by fluorimetry; and v) evaluation of the hyaluronidase activity by turbidimetry with a sample of venoms of eight snakes. In the third and last step - the evaluation of the immunogenic potential of Angolan snake venoms in a murine animal model and detection of the antigenic components against the murine sera were carried out. The last two studies were based on laboratory analytical experimental types.

The results of the present investigation allowed to conclude that: 1 - there is a low level of knowledge of health professionals in the diagnosis, evaluation and therapy of Angolan snakebites; 2 - the clinical manifestations of Angolan snakebites can be local, systemic, ophthalmological and neurological, and there was little prehospital or hospital treatment without any administration of antivenom; however, the majority of the cases evolved positively - cure; 3 - the venoms of snakes of medical importance in Angola, involved in ophidian accidents, have a remarkable intraspecies biochemical variability, related to the sex of the animals and their regions of origin. This variability was demonstrated by the electrophoretic profile of the venoms of the different species. In relation to the phospholipase activity, similar levels of this activity were observed in male and female venoms of *Naja nigricollis* and statistically significant differences between the male and female venoms of *Bitis arietans* of Mufuma, Calandula and Cuanza Sul. The male venom of *Bitis gabonica* from Mufuma showed no detectable phospholipase activity, whereas the

female venom from the same region had an activity of about 2,000 UF / min / μ g. Regarding the hyaluronidase activity, there were statistically significant differences in the venoms of the *N. nigricollis* from Cuanza Sul and Malanje, being the last 35 times higher than the first. Male and female *B. arietans* venoms from Mufuma also showed a significant difference in hyaluronidase activity, being the activity of the female venom 28 times greater than that of male. Both *B. arietans* and *B. gabonica* venoms showed significant proteolytic activity on the FRET substrate. All *B. arietans* venoms were inhibited above 90% by PMSF; however, inhibition by phenanthroline varied from 50 to 80%, while for *B. arietans* from Cuanza Sul had 100% of inhibition by phenanthroline. The venoms of *B. gabonica* snakes showed no differences in proteolytic activity between genders, and both venoms were similarly inhibited by PMSF and phenanthroline; 4 - venoms of snakes of medical importance in Angola, involved in ophidian accidents, are immunogenic. However, viperid venoms (*B. arietans* and *B. gabonica*) were more immunogenic than the elapidic venom (*N. nigricollis*) and the murine sera produced recognized a considerable number of venom components.

Keywords: Angola, venom of snakes, biochemical profile, murine serum.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	iii
DEDICATÓRIA.....	v
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
ÍNDICE.....	x
ÍNDICE DE TABELAS.....	xvii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xviii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xx
INTRODUÇÃO.....	21
CAPÍTULO 1 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	27
1.1 - Epidemiologia do Problema.....	27
1.2 - Descrição das serpentes de maior importância médica e sua distribuição em Angola.....	28
1.2.1 - Grandes víboras (género africano Bitis).....	29
Figura 1: Distribuição da serpente <i>Bitis arietans</i> em Angola.....	29
Figura 2: <i>Bitis arietans</i>	30
Figura 3: <i>Bitis arietans</i>	30
1.2.1.1 - <i>Bitis heraldica</i>	30
Figura 4: <i>Bitis heraldica</i>	30
Figura 5: Distribuição de <i>Bitis heraldica</i> em Angola.....	31
1.2.1.2 - <i>Bitis gabonica</i>	31
Figura 6: <i>Bitis gabonica</i>	32
Figura 7: <i>Bitis gabonica</i>	32
Figuras 8 e 9: <i>Bitis gabonica</i> : Presas de grande comprimento.....	32
Figura 10: Distribuição de <i>Bitis gabonica</i> em Angola.....	33
1.2.1.3 - Género Naja (citotóxicas).....	33
1.2.1.3.1 - <i>Naja nigricollis</i>	34
Figura 11: <i>Naja nigricollis</i>	34
Figura 12: <i>Naja nigricollis</i>	34
Figura 13: Distribuição da <i>Naja nigricollis</i> em Angola.....	34
1.2.1.4 - Género Naja (neurotóxicas).....	35

1.2.1.5 - Género <i>Dendroaspis</i> (Mambas)	35
Figura 14: Género <i>Dendroaspis</i> (Mambas)	35
Figura 15: Espécie <i>Dendroaspis polylepis</i>	35
Figura 16: Distribuição de <i>Dendroaspis polylepis</i> em Angola.	37
1.3 - Bioquímica e acções biológicas dos venenos das serpentes	37
1.3.1 - Família de proteínas dominantes	38
1.3.1.1 - Fosfolipases A2s	38
1.3.1.2 - Three-finger toxins.....	40
1.3.1.3 - Metaloproteinases (SVMP)	41
Figura 17: Cascata da coagulação.....	42
1.3.1.4 - Serinoproteinases (SVSPs)	42
1.3.2 - Proteínas secundárias	43
1.3.2.1 - Peptídeos Kunitz.....	43
1.3.2.2 - L-amino ácido oxidases (LAAOs)	43
1.3.2.3 - Lectinas do tipo C	44
1.3.2.4 - Desintegrinas.....	44
1.3.2.5 - Peptídeos Natriuréticos.....	44
1.3.3 - Família de Proteínas “minor”	45
1.3.3.1 - Acetilcolinesterase (AChE)	45
1.3.3.2 - Hialuronidase.....	45
1.3.3.3 - 5-nucleotidase	46
1.3.3.4 - Fosfodiesterase	46
1.3.3.5 - Fosfolipase B.....	46
1.3.3.6 - Factor de crescimento de nervos e factor de crescimento endotelial	47
1.3.3.7 - Vespryn/ohanina.....	47
1.3.3.8 - Inibidor das metaloproteinases do veneno de serpentes	47
1.3.4 - Família de proteínas raras	48
1.3.5 - Família de proteínas únicas.....	48
1.3.5.1 - β Defensinas.....	48
1.3.5.2 - Waglerinas.....	48
1.3.5.3 - Maticotoxinas.....	49
1.3.5.4 - Cistatinas.....	49
1.3.6 - Outras substâncias	49
1.3.6.1 - Sarafatoxinas.....	49
1.3.6.2 - Cardiotoxinas MT α , MT β e MT γ	50

Figura 18: Junção Neuromuscular mostrando os locais de acção das toxinas pré e pós-sinápticas	50
1.3.6.3 - Histamina e Serotonina.....	50
1.3.6.4 - Adenosina.....	51
1.3.6.5 - Arietina e gabonina.....	51
1.3.6.6 - Substâncias com acção no sistema de complemento.....	51
1.4 - Perfil Clínico dos envenenamentos por serpentes de importância médica em Angola	51
1.4.1 - Envenenamento Neurotóxico	52
1.4.2 - Envenenamento citotóxico.....	52
1.4.3 - Envenenamento hemotóxico	52
1.4.4 - Envenenamento miotóxico	52
1.5 – Apresentação Clínica dos envenenamentos por serpentes com importância médica em Angola.....	53
1.5.1 - Família Elapidae: Género <i>Naja</i>	53
1.5.2 - Família Elapidae: Género <i>Dendroaspis</i>	53
Figura 19: Mordedura por <i>Naja nigricollis</i> : no 9.º dia após mordedura com desbridamento da pele e tecido subcutâneo.	54
Figura 20: Mordedura de <i>Naja nigricollis</i> malignização escamosa.....	54
Figura 21: Mordedura por <i>Naja nigricollis</i> : no 9º dia após a mordedura.....	54
Figura 22: Dano intraocular por acção directa do veneno da <i>Naja nigricollis</i> : 5 anos após acidente mostrando intensa opacidade da córnea não tratada.....	54
Figura 23: Dano intraocular por acção directa do veneno da <i>Naja nigricollis</i> : mostrando conjuntivite intensa.....	54
Figura 24: Mordedura por <i>Dendroaspis polylepsis</i> : mostrando ptose palpebral e oftalmoplegia.....	55
1.5.3 - Família Viperidae: <i>Bitis arietans</i>	56
Figura 25: Mordedura por <i>Bitis arietans</i>	56
Figura 26: Mordedura por <i>Bitis arietans</i>	56
Figura 27 e 28: Mordedura por <i>Bitis arietans</i>	56
1.6 - Tratamento.....	57
1.6.1 - Soros antiofídicos.....	57
1.6.2 - Indicações para o uso do soro antiveneno.....	59
1.6.3 - Administração do soro antiveneno	59

CAPÍTULO 2 - CONHECIMENTOS, ATITUDES E PRÁTICAS CLÍNICAS DOS PROFISSIONAIS DA SAÚDE ANGOLANOS DIANTE DAS MORDEDURAS POR SERPENTES	61
2.1 - Introdução	61
2.2 - Objectivos	61
2.3 - Metodologia	62
2.3.1 - Caracterização da investigação e contexto espaço-temporal	62
2.3.2 – Universo de Estudo e Amostra	63
2.3.3 - Técnicas de amostragem.....	64
Figura 29: Estratégia de amostragem polietápica.....	64
2.3.4 - Critérios de inclusão, exclusão e saída.....	64
2.3.5 - Definição e operacionalização das variáveis	65
2.3.6 - Métodos, técnicas e procedimentos	65
2.3.6.1 - Técnicas de recolha de dados	65
2.3.6.2 - Técnicas de processamento e apresentação dos dados.....	66
2.3.6.3 - Processamento estatístico da informação.....	66
2.3.7 - Sub etapas da investigação.....	66
- Validação do instrumento de medição documental utilizado	67
2.3.8 - Considerações bioéticas.....	70
2.4 - Análise e discussão dos resultados.....	71
2.4.1 - Desenho e validação do questionário	71
Figura 30: Pontos de Corte que definem a posição dos padrões de avaliação dos especialistas.	72
2.4.2 - Resultados e discussão	73
Figura 31: Distribuição percentual das manifestações clínicas referidas pelos inquiridos em casos de mordeduras por serpentes	76
2.3.4 - Relato da estratégia de prevenção de mordeduras de serpentes na comunidade (expedição Ndala Lutangila)	82
Figura 32 e 33: Local da picada por <i>Bitis arietans</i>	84
Figura 34 e 35: Antiveneno disponível no Hospital Geral de Malanje.	85
2.4.3 - Análise e discussão da estratégia	87
2.5 - Conclusões do capítulo	88
CAPÍTULO 3 - CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DOS VENENOS DE SERPENTES ANGOLANAS	90
3.1 - Introdução	90

3.2 - Objectivos	91
3.3 - Metodologia	92
3.3.1 - Serpentes e venenos	92
3.3.2 - Composição proteica dos venenos	93
3.3.3 - Electroforese	93
3.3.4 - Análise do perfil de glicosilação das proteínas dos venenos	94
3.3.5 - Análise da Actividade Proteolítica	94
3.3.6 - Actividade Fosfolipásica	95
3.3.7 - Actividade Hialuronidásica.....	95
3.3.8 - Análise estatística	95
3.4 - Análise e Discussão dos resultados	96
3.4.1 - Conteúdo proteico dos venenos.....	96
3.4.2 - Perfil eletroforético de proteínas dos venenos de serpentes Angolanas	97
Figura 36: Perfil eletroforético dos venenos de <i>Naja nigricollis</i> fêmea de Cuanza Sul e Malanje.	98
Figura 37. Perfil eletroforético dos venenos de <i>Bitis gabonica</i>	99
Figura 38: Perfil eletroforético dos venenos de <i>Bitis arietans</i>	100
3.4.3 - Análise do perfil de glicosilação das proteínas dos venenos de serpentes de Angola.....	100
Figura 39: Perfil de glicosilação dos venenos de <i>Naja</i> e <i>Bitis</i>	101
3.4.4 - Actividade Fosfolipásica	101
Figura 40: Actividade Fosfolipásica A2 do veneno da serpente <i>N. nigricollis</i> (Angola) ..	102
Figura 41: Actividade Fosfolipásica A2 do veneno da serpente <i>B. arietans</i> (Angola)....	102
Figura 42: Actividade Fosfolipásica A2 do veneno da serpente <i>B. gabonica</i> (Angola)...	102
3.4.5 - Actividade Hialuronidásica de venenos de serpentes de Angola.....	103
Figura 43: Actividade hialuronidásica do veneno da serpente <i>N. nigricollis</i> (Angola)....	104
Figura 44: Actividade hialuronidásica do veneno da serpente <i>B. arietans</i> (Angola).....	104
Figura 45: Actividade hialuronidásica do veneno da serpente <i>B. gabonica</i> (Angola)	104
3.4.6 - Actividade Proteolítica	104
3.5 - Conclusões do capítulo	106
CAPÍTULO 4 - ESTUDO SOBRE A IMUNOGENECIDADE DOS VENENOS DAS SERPENTES DE ANGOLA.....	107
4.1 - Introdução	107
4.2 - Objectivos	108
4.3 - Material e Métodos.....	108

4.3.1 - Animais.....	108
4.3.2.- Imunogenicidade dos venenos de serpentes Angolanas	108
4.3.2.1 - Soro experimental produzido em camundongos	108
4.3.2.3 - Determinação dos títulos de anticorpos do soro específico	109
4.3.2.4 - <i>Western Blot</i> dos venenos de serpentes angolanas frente aos soros específicos	109
4.4 - Análise e Discussão dos resultados	110
4.4.1 - Determinação dos títulos de anticorpos anti- <i>N. nigricollis</i>	110
Figura 46: Determinação da absorvância do soro experimental anti- <i>N. nigricollis</i> por ELISA.....	111
Figura 47: Determinação dos títulos de anticorpos do soro experimental anti- <i>N. nigricollis</i> por ELISA.....	111
Figura 48. <i>Western blot</i> do soro anti- <i>N. nigricollis</i>	112
4.4.2 - Determinação dos títulos de anticorpos anti- <i>B. arietans</i>	112
Figura 49: Determinação da absorvância do soro experimental anti- <i>B. arietans</i> por ELISA.	113
Figura 50: Determinação dos títulos de anticorpos do soro experimental anti- <i>B. arietans</i> por ELISA.....	113
Figura 51: <i>Western blot</i> do soro anti- <i>B. arietans</i>	114
4.4.3 - Determinação dos títulos de anticorpos anti- <i>B. gabonica</i>	114
Figura 52: Determinação absorvância do soro experimental anti- <i>B. gabonica</i> por ELISA.	115
Figura 53: Determinação dos títulos de anticorpos do soro experimental anti- <i>B. gabonica</i> por ELISA.....	115
Figura 54: <i>Western blot</i> do soro anti- <i>B. gabonica</i>	116
4.5 - Conclusões do capítulo	117
CONCLUSÕES GERAIS	118
RECOMENDAÇÕES	119
BIBLIOGRAFIA	120
ANEXOS	132
Anexo 1: Fluxograma geral da investigação.....	133
Anexo 2: Lista S3 de Proteínas raras (Tasoulis & Isbister, 2017)	134
Anexo 3: Definição e operacionalização das variáveis	135
Anexo 4: Procedimento de aplicação do método Delphi.....	137
Anexo 5: Guia para a validação do questionário por critério de especialistas.....	138

Anexo 6: Questionário aplicado aos profissionais da saúde	139
Anexo 7 - Outros resultados da investigação	144
Anexo 8 - Províncias percorridas durante a expedição Ndala Lutangila	146
Anexo 9 Folhetos distribuídos produzidos pelo CIMETOX	147
Anexo 10 Placas de aviso nas áreas de risco	148
Anexo 11: Equipe de trabalho. Colocação de placas de aviso em Porto Amboim Província do Cuanza Sul.	149
Anexo 12: Extração de veneno de <i>Naja nigricollis</i> Cuanza Sul.....	150
Anexo 13:Trabalho com os profissionais do centro de Saúde de Caibambo	151
Anexo 14 Artigo científico sobre distribuição de <i>Bitis gabonica</i> Angola.....	152
Anexo 15 Atendimento de caso de mordedura de serpente no dia da chegada à Huíla	154
Anexo 16 Conferência aos profissionais de Saúde do Hospital Geral de Huíla.	155
Anexo 17 Prevenção primária junto aos populares da Comuna do Mpindi- Micosse, Matala.	156
Anexo 18 e 19 <i>Bitis arietans</i> e <i>gabonica</i> encontradas em Malanje	157
Anexo 20 - Participação de Angola na 69ª Conferência Mundial da OMS para a reintrodução das mordeduras de serpente na lista de doenças tropicais negligenciadas em 2016	158
Anexo 21: Snake venoms from Angola: Intra-specific variations and immunogenicity....	159

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Frequência acumulativa relativa dos aspectos avaliados no questionário	71
Tabela 2: Composição da tabela Z da distribuição normal para determinar os Pontos de Corte que definem a avaliação dos especialistas.....	72
Tabela 3: Distribuição dos profissionais da saúde segundo a experiência com mordeduras de Serpentes.....	73
Tabela 4: Distribuição dos profissionais da saúde segundo conhecimento do nome das Serpentes	74
Tabela 5: Distribuição dos profissionais da saúde segundo identificação das serpentes pelas fotos apresentadas	74
Tabela 6: Distribuição dos profissionais da saúde segundo identificação das serpentes pelas fotos apresentadas	74
Tabela 7: Distribuição segundo local da picada referida.....	75
Tabela 8: Distribuição percentual das manifestações clínicas na região da picada referidas pelos profissionais	77
Tabela 9: Distribuição percentual das manifestações clínicas oftalmopáticas referidas pelos profissionais.....	78
Tabela 10: Distribuição percentual das manifestações clínicas de neurotoxicidade referidas pelos profissionais	78
Tabela 11: Distribuição percentual das manifestações sistêmicas referidas pelos profissionais.....	79
Tabela 12: Opinião dos profissionais da saúde sobre tratamento pré-hospitalar que recebem os casos com acidentes ofídicos	79
Tabela 13: Tratamento hospitalar relatados pelos profissionais da saúde.....	80
Tabela 14: Principais complicações referidas pelos inquiridos	80
Tabela 15: Descrição da evolução referidos pelos inquiridos	81
Tabela 16: Testes laboratoriais referidos pelos profissionais da saúde	81
Tabela 17: Frequência - Tratamento com soro antiofídico.....	82
Tabela 18: Espécies de serpentes colectadas na expedição Ndala Lutangila sua distribuição, sexo, peso e quantidade de veneno extraído	92
Tabela 19- Espécies seleccionadas para a caracterização bioquímica do veneno.....	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição da serpente <i>Bitis arietans</i> em Angola.....	29
Figura 2: <i>Bitis arietans</i>	30
Figura 3: <i>Bitis arietans</i>	30
Figura 4: <i>Bitis heraldica</i>	30
Figura 5: Distribuição de <i>Bitis heraldica</i> em Angola.....	31
Figura 6: <i>Bitis gabonica</i>	32
Figura 7: <i>Bitis gabonica</i>	32
Figuras 8 e 9: <i>Bitis gabonica</i> : Presas de grande comprimento	32
Figura 10: Distribuição de <i>Bitis gabonica</i> em Angola.....	33
Figura 11: <i>Naja nigricollis</i>	34
Figura 12: <i>Naja nigricollis</i>	34
Figura 13: Distribuição da <i>Naja nigricollis</i> em Angola.....	34
Figura 14: Género <i>Dendroaspis</i> (Mambas)	35
Figura 15: Espécie <i>Dendroaspis polylepis</i>	35
Figura 16: Distribuição de <i>Dendroaspis polylepis</i> em Angola.	37
Figura 17: Cascata da coagulação	42
Figura 18: Junção Neuromuscular mostrando os locais de acção das toxinas pré e pós-sinápticas.....	50
Figura 19: Mordedura por <i>Naja nigricollis</i> : no 9.º dia após mordedura com desbridamento da pele e tecido subcutâneo.	54
Figura 20: Mordedura de <i>Naja nigricollis</i> malignização escamosa.....	54
Figura 21: Mordedura por <i>Naja nigricollis</i> : no 9º dia após a mordedura.....	54
Figura 22: Dano intraocular por ação directa do veneno da <i>Naja nigricollis</i> : 5 anos após a mordedura, mostrando intensa opacidade da córnea não tratada.....	54
Figura 23: Dano intraocular por ação directa do veneno da <i>Naja nigricollis</i> : mostrando conjuntivite intensa.....	54
Figura 24: Mordedura por <i>Dendroaspis polylepsis</i> : mostrando ptose palpebral e oftalmoplegia.....	55
Figura 25: Mordedura por <i>Bitis arietans</i>	56
Figura 26: Mordedura por <i>Bitis arietans</i>	56
Figura 27 e 28: Mordedura por <i>Bitis arietans</i>	56
Figura 29: Estratégia de amostragem polietápica.....	64

Figura 30: Pontos de Corte que definem a posição dos padrões de avaliação dos especialistas.	72
Figura 31: Distribuição percentual das manifestações clínicas referidas pelos inquiridos em casos de mordeduras por serpentes	76
Figura 32 e 33: Local da picada	84
Figura 34 e 35: Antiveneno disponível no Hospital Geral de Malanje.	85
Figura 36: Perfil eletroforético dos venenos de <i>N. nigricollis</i> fêmea de Cuanza Sul e Malanje.	98
Figura 37. Perfil eletroforético dos venenos de <i>B. gabonica</i>	99
Figura 38: Perfil eletroforético dos venenos de <i>Bitis arietans</i>	100
Figura 39: Perfil de glicosilação dos venenos de <i>Naja</i> e <i>Bitis</i>	101
Figura 40: Actividade Fosfolipásica A2 do veneno da serpente <i>N. nigricollis</i> (Angola) .	102
Figura 41: Actividade Fosfolipásica A2 do veneno da serpente <i>B. arietans</i> (Angola)....	102
Figura 42: Actividade Fosfolipásica A2 do veneno da serpente <i>B. gabonica</i> (Angola)...	102
Figura 43: Actividade hialuronidásica do veneno da serpente <i>N. nigricollis</i> (Angola)....	104
Figura 44: Actividade hialuronidásica do veneno da serpente <i>B. arietans</i> (Angola).....	104
Figura 45: Actividade hialuronidásica do veneno da serpente <i>B. gabonica</i> (Angola)	104
Figura 46: Determinação da absorvância do soro experimental anti- <i>N. nigricollis</i> por ELISA.....	111
Figura 47: Determinação dos títulos de anticorpos do soro experimental anti- <i>N. nigricollis</i> por ELISA.....	111
Figura 48. Western blot do soro anti- <i>N. nigricollis</i>	112
Figura 49: Determinação da absorvância do soro experimental anti- <i>B. arietans</i> por ELISA.	113
Figura 50: Determinação dos títulos de anticorpos do soro experimental anti- <i>B. arietans</i> por ELISA.....	113
Figura 51: Western blot do soro anti- <i>B. arietans</i>	114
Figura 52: Determinação absorvância do soro experimental anti- <i>B. gabonica</i> por ELISA.	115
Figura 53: Determinação dos títulos de anticorpos do soro experimental anti- <i>B. gabonica</i> por ELISA.....	115
Figura 54: Western blot do soro <i>anti-B. gabonica</i>	116

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AINE -	Anti-Inflamatório Não Esteroidal
CID -	Coagulação Intravascular Disseminada
CIMETOX -	Centro de Investigação e Informação de Medicamentos e Toxicologia
Crc-	Comprimento total do corpo da serpente
CRISP-	Cysteine Rich Secretory Protein
Ct -	Comprimento da cauda da serpente
DTN -	Doenças Tropicais Negligenciadas
ECG -	Electro-Cardiograma
FXII -	Factor Plasmático da Coagulação de Sangue XII (Factor de Hageman).
GSI -	Global Snakebite Initiative
HAI -	Health Action International
OMS-	Organização Mundial de Saúde
MSF -	Médecins Sans Frontières
PR -	Intervalo PR que no ECG corresponde ao tempo decorrido desde o início da onda P e o início do complexo QRS
RCP -	Ressuscitação Cardio-Pulmonar
RGD -	Arg-Gli-Asp (arginina-glicina-ácido aspártico)
ST –	Representa um período de inatividade entre a despolarização e o início da repolarização ventricular
TP -	Tempo de Protrombina
TTPA -	Tromboplastina Parcial Activada
20WBCT -	20-min Whole Blood Clotting Test (Teste de coagulação de sangue total de 20 minutos)

INTRODUÇÃO

A morbimortalidade resultante de acidentes com serpentes é relevante em muitas regiões do mundo (Méndez, Gutiérrez, Angulo, Calvete, & Lomonte, 2011) particularmente em países em desenvolvimento nos trópicos e subtropicais (Tan, Tan, Fung & Tan, 2015), sendo que a incidência e a letalidade destes envenenamentos em África são subestimadas. Tal situação representa um importante problema de Saúde Pública (Chippaux, 2011; Cook et al., 2010).

O envenenamento por mordedura de serpentes constitui uma séria condição médica e uma emergência médico-cirúrgica frequente, que afeta, primariamente, as comunidades rurais de África, América Latina, Ásia e Nova Guiné (Gutiérrez et al., 2013; Tahis, Fabio, & Wilmar, 2015). A amputação de membros constitui uma das consequências graves dos envenenamentos, sendo as complicações locais e sistêmicas mais frequentes em crianças do que em adultos (Kouassi et al., 2017). Tais complicações podem resultar em debilidades permanentes e morte (Tahis et al., 2015) que afetam cerca de 3% das vítimas (Guidolin et al., 2010).

Mundialmente, permanece indefinida a incidência exata das mordeduras de serpentes em humanos e, por conseguinte, não é conhecido o real número de envenenamentos. Os países que apresentam números confiáveis sobre a incidência, morbidade e mortalidade, são ainda escassos (Slagboom, Kool, Harrison, & Casewell, 2017). O Sudeste da Ásia e a África subsariana são de longe as regiões mais afetadas, sendo a Índia o país que maior número de mortes apresenta por mordeduras de serpentes no mundo, com uma incidência que se situa entre 35.000 a 50.000 casos por ano, de acordo com as estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) (Kasturiratne et al., 2008; Warrell, 2010) e 11 mil mortes anualmente (Gopalakrishnakone, Inagaki, Vogel, Mukherjee, & Rahmy, 2017; Slagboom et al., 2017). Outros autores consideram que estes dados de incidência são inferiores à realidade, porque foram excluídos os acidentes ocorridos na Europa e no Norte da Ásia. Apesar destas limitações, estima-se haver, anualmente em todo o mundo, 5.400.000 acidentes ofídicos, sendo que mais de 2,5 milhões apresentam evidências de envenenamento e que entre 25.000 a 125.000 desses conduzem à morte. A estes números acresce-se um total estimado de 400.000 pessoas a quem tais acidentes provocaram uma deficiência permanente. Só em África estima-se ocorrerem oitocentas amputações por ano, em consequência de envenenamentos por serpentes (Kasturiratne et al., 2008; Alirol et al., 2010; Gutiérrez et al., 2013).

A incidência de mordeduras de serpentes em humanos em África é difícil de se obter, embora seja referida a possibilidade de ocorrerem mais de 600.000 acidentes e 20.000 mortes por ano (de Cramer et al., 2012).

Em certas áreas do globo, os estudos económicos de saúde devem ter em consideração, não apenas a carga de mortalidade, mas também as consequências resultantes da amputação parcial ou total do local afetado nos casos de mordedura (Kodama et al., 2015). Existe uma associação significativa entre a mortalidade causada por mordedura de serpentes e: (i) o índice de desenvolvimento humano (ii) a percentagem da força laboral na agricultura, (iii) a despesa *per capita* em saúde e (iv) produto interno bruto levando-a ser designada como sendo uma doença da pobreza (Harrison, Hargreaves, Wagstaff, Faragher, & Laloo, 2009; Tan et al., 2015; Slagboom et al., 2017)).

A cegueira, deficiência, desfiguração, mutilação e destruição de tecidos resultantes das mordeduras por serpentes, são algumas das sequelas permanentes, que podem resultar em perdas económicas e de produtividade (Abubakar et al., 2010; Habib, 2013; Louvain de Souza et al., 2015).

Apesar deste impacto global, os envenenamentos ofídicos representam um importante, mas negligenciado problema de saúde pública, que afecta regiões rurais pobres e que têm recebido pouca atenção por parte da saúde comunitária global, da indústria farmacêutica e dos governos que não priorizam esta problemática. Como consequência, são escassos os programas de saúde que tratam estes acidentes, de um ponto de vista regional, nacional, e global (Gutierrez et al., 2013; Kodama et al., 2015).

O único tratamento eficaz para o envenenamento sistémico por mordedura de serpente é o antiveneno específico. No entanto, a combinação de diversas variáveis, como a dependência extrema sentida, pela maior parte dos países Africanos, de antivenenos, o seu alto custo e a falta de incentivo financeiro para a produção e comercialização dos soros pelos governos, resultou numa crise de abastecimento do antiveneno na década de 1990. Tal fato resultou num aumento significativo da morbidade e da mortalidade por mordeduras de serpentes. Este sofrimento poderia ser significativamente reduzido, já que existem recursos preventivos e terapêuticos disponíveis, mas que não são entregues em muitas regiões da África Subsariana (Cook et al., 2010; Gutierrez et al., 2013, 2015; Warrell et al., 2013).

Visando a resolução deste problema, as autoridades Africanas começaram a importar antivenenos produzidos no continente Asiático, especialmente da Índia, que não são específicos contra os venenos de serpentes Africanas. Tal procedimento torna ineficaz a soroterapia, levando ao incremento de uso de terapias tradicionais por parte das populações afetadas (Warrell, 2008; Guidolin et al., 2016; Gopalakrishnakone et al., 2017).

Em 2007, as imunoglobulinas (presentes nos antivenenos) foram incluídas na Lista de Medicamentos Essenciais e foi ainda reconhecido o seu papel no sistema de cuidados primários de saúde (OMS, 2010b).

Em Abril de 2009, foi dado um passo determinante no combate aos envenenamentos por animais peçonhentos, com a inclusão das mordeduras por serpentes na lista da Organização Mundial da Saúde (OMS) de Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN). Assim, como consequência de iniciativas da OMS, da *Global Snakebite Initiative* (GSI) e de outros esforços, a nível nacional e regional, tem havido uma melhoria na consciencialização deste problema global. No entanto, o impacto destes projetos tem sido bastante limitado à luz dos progressos realizados no controle de outras DTN (Abubakar et al., 2010; Gutierrez et al., 2013, 2015; Kasturiratne et al., 2008; Petras et al., 2011).

Lamentavelmente, a mordedura de serpentes apesar de ter sido incluída na lista de 2009 das DTN da OMS, não foi incorporada nas diretrizes dos esforços globais para reduzir o seu impacto, tendo mesmo sido retirada desta lista em 2011. As razões para esta omissão são diversas e, provavelmente, estão baseadas na perceção de que a mordedura de serpentes não é um agravo tão importante quanto as doenças infecciosas. Logo, as medidas para a sua diminuição e alívio não se enquadram nas estratégias traçadas (Gutierrez et al., 2013). Importante progresso teve a iniciativa apoiada pelo GSI, HAI e MSF e patrocinada pelo governo da Costa Rica e co-patrocínado pelos governos do Afeganistão, Angola, Bangladesh, Burkina Faso, Camarões, Chade, Gabão, Guiné, Quênia, Nepal, Nigéria, Paquistão, Papua Nova Guiné, Filipinas, Senegal e Uganda ao realizarem o evento paralelo que abordava as picadas de serpentes, na Assembléia Mundial da Saúde em Genebra em Maio de 2016. Esse evento, assistido por 140 pessoas de vários países, provou ser uma oportunidade poderosa para aumentar a conscientização sobre a saúde pública, a situação das vítimas e um plano estratégico para reverter isso. O evento atraiu a atenção da mídia e de muitas organizações para

encorajar a OMS a reintroduzir a mesma na lista Doenças Tropicais Negligenciadas ou Medicamentos Essenciais (Harrison & Gutiérrez, 2016). Com estes avanços, em 2017, as mordeduras de serpentes voltaram a ser reconhecidas como sendo uma doença tropical negligenciada (Slagboom et al., 2017).

A educação comunitária para reduzir o risco de mordeduras, em áreas de alta incidência de acidentes, com distribuição de folhetos e manuais informativos, é uma abordagem mais racional do que a erradicação das serpentes venenosas. Esta deve basear-se no conhecimento das circunstâncias em que ocorrem a maioria dos acidentes, do habitat predilecto das espécies perigosas e dos seus períodos de pico de atividade, isto é, a hora do dia, estação e condições atmosféricas que as condicionam (Warrell, 2010; Gutiérrez et al., 2015). Outra abordagem importante é a transmissão de conhecimento aos profissionais de saúde, médicos e enfermeiros, ministrando-se seminários e conferências, constituindo ações que contribuam para a melhoria do manuseio clínico das mordeduras de serpentes (Gutiérrez et al., 2015).

A prevalência de casos de mordeduras por serpentes em Angola é desconhecida, embora possamos inferir que seja alta, se tivermos em conta os dados de países vizinhos limítrofes, como a República do Congo, onde se regista entre 120 a 450 mordeduras por 100.000 habitantes por ano (Cook et al., 2010). Esta abordagem para a estimativa de envenenamentos humanos, por mordeduras de serpentes em países sem registos, é considerada por especialistas como Kasturiratne et al. (2008) no seu estudo intitulado "*The global burden of snakebite: a literature analysis and modeling based on regional estimates of envenoming and deaths*" (Kasturiratne et al., 2008).

Angola encontra-se na região nº 18, na África Subsaariana Central, onde a estimativa de envenenamentos varia entre 18176 a 47820 casos por ano por 100.000 habitantes, dos quais resultam entre 256 a 3083 mortes/ ano por 100.000 habitantes (Kasturiratne et al., 2008; Kodama et al., 2015). No caso de Angola, pode ainda recorrer-se a dados de países não limítrofes, como a Nigéria, onde, a nordeste, em Benue Valley, são afetadas anualmente 497 pessoas em cada 100.000 habitantes, com uma taxa de letalidade de 12,2% causada pelo mesmo tipo de serpente existente em Angola, a *Naja nigricollis* (Kasturiratne et al., 2008). Igualmente, mas já na região sudoeste da Nigéria, a *Bitis gabonica* é a principal causadora de acidentes, levando a anormalidades cardiovasculares tais como hipotensão e choque (Kodama et al., 2015). Existem regiões deste país africano em que as vítimas de mordeduras por serpentes ocupam 10% dos

leitos hospitalares. Outras fontes bibliográficas referem que em toda a África subsaariana ocorrem 314.000 mordeduras causando 7300 mortes e 6000 amputações anualmente (Habib et al., 2013; Warrell, 2010).

Angola não está isenta desta realidade, anualmente existe um incremento de casos de mordeduras por serpentes (Oliveira & Castro, 2015; Oliveira et al., 2014). Além disto, não estão desenvolvidas ações de prevenção de saúde ao nível das comunidades. Tal fato é agravado pela não existência de soros antiofídicos para combater as mordeduras de serpentes autóctones do país, que possibilite diminuir a incidência, prevalência, assim como a morbimortalidade desta problemática de saúde. Tendo em conta este problema prático coloca-se o seguinte problema científico.

Problema científico: Como contribuir para análise dos venenos das serpentes, produção de soros e tratamento dos envenenamentos. Para isso, foram selecionadas 4 regiões de Angola e foram formuladas as seguintes perguntas científicas:

1. Que nível de conhecimentos, atitudes e práticas clínicas, contra as mordeduras de serpentes, têm os profissionais da saúde?
2. Que características bioquímicas apresentam os venenos das serpentes angolanas das Províncias selecionadas?
3. São imunogénicos os venenos destas serpentes em modelo animal murino?

Por forma a dar resposta às questões previamente levantadas, o presente trabalho teve como objetivo, i) avaliar a atuação dos profissionais de saúde, diante de envenenamentos por mordedura de serpentes, em quatro regiões angolanas; ii) capturar serpentes nas regiões selecionadas e analisar os seus venenos; iii) conhecer a imunogenicidade dos venenos e produzir o soro antiveneno experimental murino.

Para cumprir tal objetivo foi feito um desenho metodológico em três etapas:

Na primeira etapa, realizou-se um estudo de campo observacional descritivo transversal incluindo 151 profissionais de saúde.

Na segunda etapa foi feita a captura de 8 serpentes e a caracterização bioquímica dos respetivos venenos, tendo em conta a procedência e o sexo das mesmas.

Na terceira etapa foi feita uma avaliação do potencial imunogénico dos venenos e produzidos soros experimentais em camundongos.

O presente trabalho está estruturado e organizado em capítulos: Capítulo I - Fundamentação Teórica; Capítulo II - Nível de conhecimento, atitudes e práticas clínicas

dos profissionais de saúde diante das mordeduras de serpentes, em quatro regiões de Angola; Capítulo III - Caracterização bioquímica dos venenos de serpentes das regiões selecionadas; Capítulo IV - Estudos de imunogenicidade dos venenos e produção de soro antiveneno experimental. (Anexo 1) (Fluxograma geral da investigação).

Deve-se realçar que esta é a primeira investigação desta natureza a ser realizada em Angola, e que teve como propósito contribuir para o avanço do conhecimento sobre serpentes Angolanas e seus venenos. A longo prazo, espera-se oferecer uma solução terapêutica para os envenenamentos por mordeduras de serpentes que ainda são um importante problema de saúde no país.

OBJECTIVOS

GERAL

Avaliar a atuação dos profissionais de saúde diante de envenenamentos por serpentes em quatro regiões angolanas, analisar os venenos de serpentes capturadas nessas regiões e produzir experimentalmente antivenenos.

ESPECÍFICOS

- Descrever os conhecimentos, as atitudes e práticas clínicas, diante das mordeduras por serpentes nas Províncias selecionadas;
- Caracterizar bioquimicamente os venenos de serpentes Angolanas de Malanje (incluindo os municípios de Mufuma e Calandula) e Cuanza Sul.
- Avaliar a imunogenicidade dos venenos em modelo animal (murino) e produzir antivenenos específicos.

CAPÍTULO 1 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 - Epidemiologia do Problema

Estima-se que ocorrem um milhão de mordeduras por ano, primariamente na África Subsaariana, das quais resultariam entre 100.000 a 500.000 envenenamentos e entre 10.000 a 30.000 mortes (Chippaux, 2011; Cook et al., 2010; Kodama et al., 2015).

Em algumas áreas rurais, como o Vale do Benue, no norte da Nigéria, a mordedura de serpentes é uma das principais causas de morbidade e mortalidade entre os agricultores, pastores, caçadores e crianças (WHO, 2010). Mais de 65 % da população da Cote d'Ivoire é rural e dedica-se a agricultura e estão particularmente expostas às mordeduras de serpentes (Kouassi et al., 2017). Países há como a Índia em que os envenenamentos não afetam somente as populações rurais agrícolas, mas também aquelas que vivem nas áreas urbanas que devido à rápida urbanização invadem o habitat das serpentes (Tan et al., 2015).

Tal situação tem um impacto económico negativo, uma vez que reduz a capacidade de trabalho das vítimas, devido às sequelas físicas permanentes resultantes das mordeduras de serpentes (Cook et al., 2010; Louvain de Souza et al., 2015). De facto, em alguns casos, os sobreviventes apresentam áreas de destruição dos tecidos profundos, sendo mesmo necessário recorrer-se à amputação (Warrell, 2010; Kouassi et al., 2017).

As crianças representam entre 20% a 40% dos casos dos envenenamentos reportados na maioria dos estudos publicados. Nos adultos, os agricultores e outros trabalhadores agrícolas são as vítimas mais comuns (Alirol et al., 2017). A análise deste facto sublinha que o aspeto ocupacional das vítimas de mordeduras de serpentes deve ser equacionado. A criação de um Programa de controlo teria, portanto, que incluir os trabalhadores mais expostos a esse tipo de acidentes como são os agricultores, os trabalhadores das plantações, os pastores e os caçadores. Tais profissionais, produtores de alimentos de primeira linha, são particularmente valiosos para a comunidade (Warrell, 2010; WHO, 2010a; Gutierrez et al., 2013; Gutiérrez et al., 2015), sendo considerável o impacto socioeconómico causado pelas possíveis deficiências causadas pelas mordeduras (Abubakar, 2010).

Um estudo publicado em 2009 por Harrison et al., evidenciou uma correlação inequívoca direta entre os envenenamentos por serpentes e a pobreza dos países, bem como uma

correlação inversa entre o número de mortes por mordeduras de serpentes e o investimento na saúde pelos governos (Harrison et al., 2009; Slagboom et al., 2017). Claramente, a pobreza predispõe as populações a serem vítimas de acidentes por mordeduras de serpentes e esta situação não é só um problema de saúde, mas também é um dos principais obstáculos a um desempenho económico próspero (Habib, 2013).

Das quase 3000 espécies de serpentes conhecidas, apenas uma pequena percentagem é venenosa e, portanto, potencialmente perigosa para o homem. Os acidentes graves são causados, principalmente, por serpentes da família Viperidae, que apresenta veneno rico em metaloproteinases (SVMP), podendo causar hemorragias e distúrbios da coagulação (*Echis* spp e *Bitis* spp), seguido da família Elapidae com ação neurotóxica, ao nível das junções neuromusculares, levando à falência respiratória (*Naja* sp e *Dendroaspis* sp) (Guidolin et al., 2016).

1.2 - Descrição das serpentes de maior importância médica e sua distribuição em Angola

Do ponto de vista médico, as serpentes venenosas de Angola podem ser divididas em duas categorias:

CATEGORIA 1

De grande importância médica: são consideradas altamente venenosas e podem causar alta morbidade, incapacidade ou mortalidade. Incluem-se, nesta categoria, as serpentes da família Elapidae: *Dendroaspis jamesoni*, *Dendroaspis polylepis*, *Naja anchietae*, *Naja melanoleuca*, *Naja nigricollis*; e da família Viperidae: *Bitis arietans*, *Bitis gabonica* (WHO 2010b).

CATEGORIA 2

De importância médica secundária: são consideradas altamente venenosas, capazes de causar morbidade, deficiência ou morte, cujos dados epidemiológicos ou clínicos exatos estejam em falta e/ou que são menos frequentemente envolvidas em acidentes (devido aos ciclos de atividade, comportamento, preferências de habitat ou ocorrência em áreas remotas). Nesta categoria incluem-se as famílias Atractaspididae: *Atractaspis bibronii*, *Atractaspis irregularis*; Colubridae: *Dispholidus typus*, *Thelotornis capensis*, *Thelotornis kirtlandii*; Elapidae *Naja christyi*, *Naja mossambica*, *Naja nigricincta*. *Pseudohaje goldii*; e Viperidae: *Atheris squamigera*, *Bitis nasicornis* (WHO, 2010b).

1.2.1 - Grandes víboras (género africano Bitis)

Espécies: *Bitis arietans*, *Bitis heraldica* (Bocage, 1895)

- *Bitis arietans*



Figura 1: Distribuição da serpente *Bitis arietans* em Angola

Fonte: (WHO, 2010a)

Pertencem à família Viperidae. Apresentam corpos relativamente espessos com cabeças achatadas e narinas voltadas para cima.

É uma serpente com corpo pesado e com um comprimento que pode atingir 1,4 m, apesar de no Quênia já terem sido encontradas de 1,8 m. Pode apresentar várias cores que vão desde o preto, castanho, avermelhado ou mesmo laranja (Marais, 1992). Existem com maior frequência em Cabinda e nas regiões a sul do rio Cuanza. Serpente de hábitos noturnos, é considerada a serpente venenosa que mais acidentes causa em todo o continente africano, provavelmente devido à sua coloração críptica, e ampla distribuição territorial (Manaças, 1981; Guidolin et al., 2016.). Tal serpente apresenta o veneno mais tóxico da família Viperidae, como avaliado pela dose média letal (LD₅₀) (Paixão-Cavalcante et al., 2015) cujo valor em camundongos varia de 0.4-2 mg/kg intravenoso (iv) e 4,4-7,7 mg/kg subcutâneo (sc) (Calvete et al., 2007).

Existem registros de que tal serpente pode ser encontrada em Alto Chicapa (Lunda), Ambriz, nos arredores do Lago Calundo, Moxico, Bela Vista, Capelongo, Chitau, Cubal (Benguela), Cuma, Dundo, Kalandula, Entre Rios, Equimina, Hanha, Huambo, Kubango,

Namibe, Mucoso (próximo do Dondo), Rio Sangevê, M'Banza Kongo (Manaças, 1981). No estudo de Oliveira et al. (2015) foi também registrada a existência desta em Mufuma, Selela (Calandula), Cuanza Sul.



Figura 2: *Bitis arietans*

Foto: Paula Oliveira, CIMETOX, Malanje Angola, 2015



Figura 3: *Bitis arietans*

Foto: Paula Oliveira, CIMETOX, Malanje, Angola, 2015

1.2.1.1 - *Bitis heraldica*

A espécie do género Bitis, que se distribui por todo o território Angolano, é a *B. heraldica*, também denominada por *Bitis angolana* (Bocage, 1895; WHO, 2010a).



Figura 4: *Bitis heraldica*

Foto: Paulo Pouseiro, Talamajamba, Benguela



Figura 5: Distribuição de *Bitis heraldica* em Angola

Fonte: (WHO, 2010a)

1.2.1.2 - *Bitis gabonica*

A víbora do Gabão (*Bitis gabonica*) é uma espécie da família Viperidae. É uma serpente venenosa, encontrada em florestas e savanas da África sub-saariana. É o membro do género *Bitis* que apresenta o corpo mais robusto podendo pesar de 7 a 10 kg, considerado o maior produtor de veneno de todas as serpentes, sendo a sua toxicidade menor em relação às outras do género *Bitis*, com DL₅₀ de 0,8-5 mg/ kg intravenoso (iv) 5-6 mg/kg subcutâneo (sc) (Calvete et al., 2007). Existem duas subespécies reconhecidas atualmente nomeadamente *Bitis gabonica* e *Bitis rinoceros*. Os adultos têm um tamanho médio de 1,22 a 1,53 m.

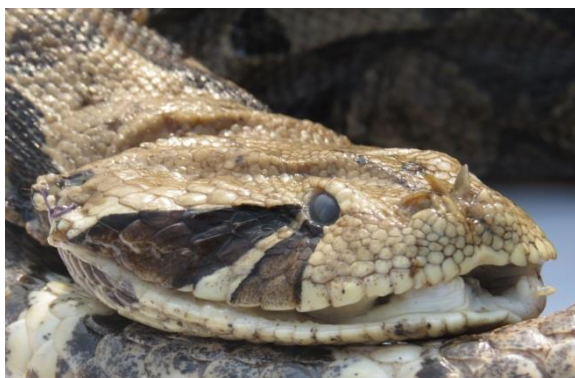


Figura 6: *Bitis gabonica*

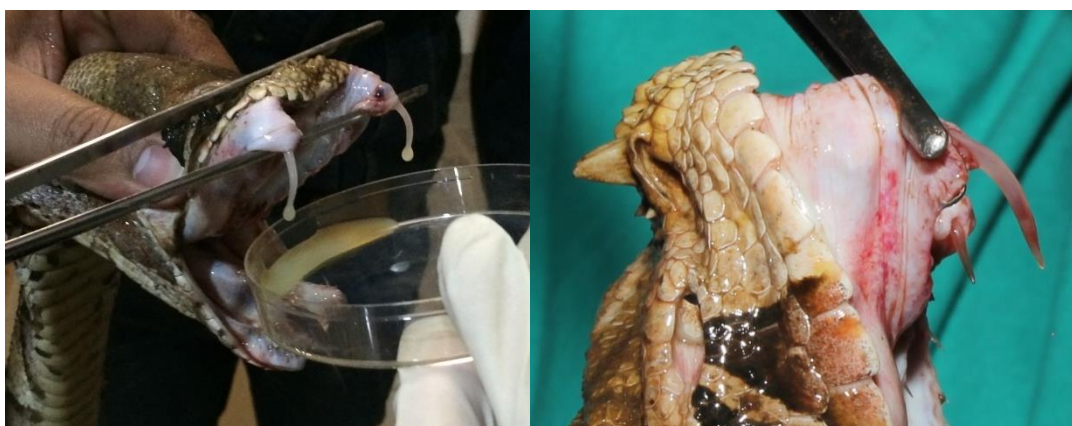
Foto: Paula Oliveira, CIMETOX, Malanje, Angola, 2014



Figura 7: *Bitis gabonica*

Foto: Paula Oliveira, CIMETOX, Malanje, Angola, 2015

Os olhos são grandes e móveis, cercados de 15 a 21 escamas. Apresenta presas com um comprimento geralmente superior a 5 centímetros, sendo essas as maiores presas encontradas em serpentes (Walach et al., 2014).



Figuras 8 e 9: *Bitis gabonica*: Presas de grande comprimento

Foto: Paula Oliveira, CIMETOX, Malanje, Angola, 2015

Esta espécie possui entre 28 a 46 escamas dorsais, dispostas em quilha, exceto para as linhas ultraperiféricas em cada lado. O padrão de cores é composto por uma série de manchas claras sub-retangulares, intercaladas com manchas escuras e marcas em forma de ampulheta, de bordas amarelas. Os flancos têm uma série de manchas em forma de diamante, beges ou castanhas, com leves barras verticais centrais. O abdómen é pálido com manchas irregulares castanhas ou pretas. A cabeça é branca ou creme, com uma fina linha escura central, manchas pretas nos cantos traseiros e um triângulo preto atrás de cada olho. A íris é de cor creme, amarelo-claro, laranja e prata (Marais, 1992; Walach et al., 2014). É notável pela sua natureza dócil o que pode explicar as poucas mordeduras relatadas na literatura (Calvete et al., 2007).

É uma serpente muito lenta que pode permanecer dias no mesmo lugar. Quando comparada com a *Bitis arietans* é, surpreendentemente, tranquila. Se perturbada, emite uma série de apitos fortes enquanto levanta a parte posterior do seu corpo para o tornar horizontal e, ainda assim, o ataque é pouco comum (WHO, 2010a). Apesar da elevada toxicidade do seu veneno relativa aos efeitos sistémicos, os efeitos locais da sua picada são menos severos (Kodama et al., 2015).



Figura 10: Distribuição de *Bitis gabonica* em Angola.

Fonte: (WHO, 2010a)

Existem registros de que pode ser encontrada nos arredores do Lago Calundo (Moxico), em Cabinda, Dundo, Hanha, N´Dalatando e M'Banza Kongo (Manaças, 1981). No estudo de Oliveira et al, (2015), foi registrada a sua presença em Calandula, Mufuma e Benguela.

1.2.1.3 - Género *Naja* (citolóxicas)

São serpentes da família Elapidae que existem em Cabinda, Cuanza Sul no interior de Benguela, Caála, Calanga, Huíla, Huambo e Malanje (Bocage, 1895; WHO, 2010).

Este género tem 6 espécies, nomeadamente: *Naja katienses*, *Naja nubiae*, *Naja mossambica*, *Naja ahei*, *Naja nigricinta* e *Naja nigricollis*. Atualmente, esta nomenclatura foi alterada para *AfroNaja nigricollis*, *AfroNaja nigricinta* (Walach et al., 2014).

Adiante será detalhada apenas a *Naja nigricollis* por ter sido uma das espécies coletadas em Malanje e Cuanza Sul e seu veneno analisado na presente pesquisa.

1.2.1.3.1 - *Naja nigricollis*

Apresenta um comprimento médio entre 1 a 1,5 m (podendo atingir um máximo de 2,20 m). Existe, sobretudo, na África Ocidental. É cinza escura, preta ou castanha, com bandas vermelho-rosadas até à região cervical (Walach et al., 2014).

Esta espécie está amplamente distribuída em Angola (Bocage, 1895; WHO, 2010a).



Figura 11: *Naja nigricollis*

Foto: Jacinto Pinto & Paula Oliveira em Porto Amboim, Cuanza Sul, 2014.



Figura 12: *Naja nigricollis*

Foto: Paula Oliveira & Sávio Santana, 2015



Figura 13: Distribuição da *Naja nigricollis* em Angola.

Fonte (WHO 2010a).

1.2.1.4 - Género *Naja* (neurotóxicas)

Espécies: *Naja anulífera*, *Naja haje*, *Naja nivea*, *Naja senegalenses*, *Naja nivea*. São encontradas em Cabinda, Caconda, Caála, Galanga, Benguela e Catumbela (Bocage, 1895).

1.2.1.5 - Género *Dendroaspis* (Mambas)

As Mambas pertencem à família Elapidae e podem provocar envenenamentos fatais o que as torna as mais perigosas das serpentes do mundo (Jespersen et al, 2015).

Espécies: *Dendroaspis jamesonii*, *Dendroaspis jamesoni*, *Dendroaspis angusticeps* e *Dendroaspis polylepis*.

Em Angola, encontram-se em Cuanza Norte, Malanje, Lunda Sul, Bié, Huambo, Moxico, Zaire, Cuando Cubango, Benguela, Huíla, Namibe (WHO, 2010a).

Em alguns dialetos nacionais são chamadas Ndala, Lutangila que significa serpente que quando morde não deixa a vítima sair do campo viva segundo a expedição realizada na presente pesquisa para a captação de serpentes.



Figura 14: Espécie *Dendroaspis polylepis*

Foto: Paula Oliveira & Savio Santana 2015.



Figura 15: *Dendroaspis polylepis*

Foto: Paula Oliveira, Bio Snake Farm Watamu Quênia 2014

São serpentes venenosas, muito longas e perigosas que estão sempre alerta, agressivas e caracterizam-se pelos seus movimentos rápidos e ágeis. São defensoras do seu território e atacam quando este é invadido, quando a pessoa se encontra a menos de 40 cm de distância. Podem ser arborícolas ou terrestres (Marais, 1992; Walach et al., 2014),

diurnas e capazes de atingir 16 a 20 km/h, tornando-as a mais velozes das serpentes Africanas (Petras, Heiss, Harrison, Süssmuth, & Calvete, 2016)

Esta espécie é uma das mais frequentes em Angola. Tem um comprimento médio que pode ir de 2,20 a 2,70 metros mas, excepcionalmente, poderá atingir 4,5 m, tornando-a a segunda serpente venenosa mais comprida do mundo (Petras et al., 2016). É a mais perigosa das mambas, apresenta uma cor castanha acinzentada ou castanho misturado com uma tonalidade verde azeitona e tem um revestimento preto bucal, daí a denominação popular de mamba negra. Numa posição defensiva, ela eleva o corpo e sibila (Hodgson & Davidson, 1996; WHO, 2010a).

Estas serpentes utilizam a visão, quimio-receção e olfato para localizar as presas. Possuem ainda fileiras de dentes menores que podem produzir múltiplas punções na pele, que quando ocorre poderão injetar mais de 400 mg do potente veneno neurotóxico (LD₅₀ subcutânea em camundongos é de 0,28 mg/kg) (Petras et al., 2016).

Tais serpentes acasalam no início da Primavera ou no Verão e de Setembro a Fevereiro. O pico de mortes por mordedura de mambas acontece durante este período, quando a interação com o homem é intensificada. Por outro lado, as mortes caem drasticamente durante os meses mais frios, quando ela se retrai nos seus refúgios. São ovíparas e, em cada postura, colocam entre 12 e 16 ovos (Marais, 1992; Walach et al., 2014).

O veneno das mambas apresenta efeitos neurotóxicos proeminentes que são atribuídos a um número de polipéptidos específicos, além da atividade da hialuronidase que facilita a propagação do veneno nos tecidos da vítima. A glândula de veneno das mambas pode armazenar entre 4 a 8 ml. Está descrito que 1 ml (10 a 15 mg) do veneno de *Dendroaspis polylepis* é suficiente para matar uma pessoa adulta (Crisp, 1985; Hodgson & Davidson, 1996; Laustsen et al, 2015), levando a um colapso cardiovascular, paragem respiratória e morte em apenas 30 a 45 minutos (Ainsworth et al., 2018; Petras et al., 2016).



Figura 16: Distribuição de *Dendroaspis polylepis* em Angola.

Fonte: WHO, 2010a

Em 50% dos casos de mordeduras o veneno não é injetado, designando-se uma mordedura seca. Mesmo depois de várias mordeduras ou depois de comer as suas presas, as serpentes não esgotam o seu veneno. Dentro da mesma espécie, serpentes de grande porte também tendem a injetar mais veneno do que as menores, mas o veneno destas últimas, em algumas espécies, pode conter determinadas classes de toxinas potentes em maior proporção. Mordeduras de serpentes de pequeno porte não devem, portanto, ser negligenciadas e devem receber a mesma atenção que as das serpentes maiores (WHO, 2010a).

1.3 - Bioquímica e ações biológicas dos venenos das serpentes

A principal função do veneno das serpentes é ajudar a imobilizar e, eventualmente, digerir a sua presa (Warrell, 2010; Calvete, 2017; Gopalakrishnakone et al., 2017). A quantidade de veneno injetada durante uma mordedura depende de vários fatores como: espécie e tamanho da serpente, eficiência mecânica da mordedura, sendo que nem todas as mordeduras por serpentes peçonhentas liberam veneno (WHO, 2010a).

A seguir expõem-se algumas das características das principais substâncias tóxicas presentes nos venenos das serpentes. Conforme ficará explícito, várias das substâncias

sejam elas enzimas, nucleósidos, ou outros, podem exercer os seus efeitos em diversos alvos simultaneamente, causando diferentes efeitos biológicos.

Num estudo realizado com os venenos de 132 espécies de serpentes (Tasoulis & Isbister, 2017) foram identificadas 59 proteínas nos mesmos que, com base na sua composição e importância, foram classificadas em:

- **Proteínas dominantes:** Quatro famílias de proteínas dominantes, nomeadamente, as fosfolipases A2 (PLA2) (as mais comuns), metaloproteases (SVMP), serino proteases (SVSP) e as toxinas *three finger* (3FTx).
- **Proteínas secundárias:** Seis famílias de proteínas secundárias, nomeadamente, proteínas secretoras ricas em cisteína, L-aminoácido oxidases, péptidos kunitz, lectinas do tipo C, desintegrinas e péptidos natriuréticos.
- **Proteínas “minor”:** Nove famílias de proteínas “minor”, nomeadamente, acetilcolinesterase, hialuronidase, 5'-nucleotidase, fosfodiesterase, fosfolipase B, factor de crescimento do nervo, factor de crescimento vascular endotelial, “vespryn/ohanina” e inibidor de metaloprotease de veneno de serpente.
- **Proteínas raras:** mencionadas 36 famílias.
- **Proteínas únicas:** quatro famílias: defensina, waglerina, maticotoxina e cistatina.

Os venenos elapídicos contêm, principalmente, toxinas de três dedos, 3FTx, e fosfolipases A2, enquanto os venenos viperídeos contêm metaloproteases, fosfolipases A2 e serinoproteases (Tasoulis & Isbister, 2017).

1.3.1 - Família de proteínas dominantes

1.3.1.1 - Fosfolipases A2

As fosfolipases A2 (PLA2s) representam uma superfamília de enzimas lipolíticas que catalisam especificamente a hidrólise da ligação éster na posição sn-2 de glicerofosfolípidos, resultando na geração de ácido graxo (ácido araquidónico e lisofosfolípido). A superfamília PLA2 divide-se em 15 grupos que estão subdivididos em vários subgrupos, que exibem diferenças em termos de especificidades estruturais e

funcionais. No entanto, os quatro tipos principais de PLA2s classificam-se em secretórias (sPLA_{2s}) citosólicas (cPLA_{2s}), Ca²⁺ independentes (iPLA2s) e fosfolipases associadas a lipoproteínas (LpPLA2s) (Kang et al., 2011).

As fosfolipases A2 atuam com alta afinidade em terminais nervosos pré-sinápticos, (Gutierrez & Lomonte, 2013), causando *per se*, ou pós hidrólise dos fosfolípidos, uma alteração estrutural dos locais de liberação dos neurotransmissores, resultando numa diminuição da fusão das vesículas sinápticas e impedindo a libertação dos neurotransmissores. A hidrólise dos fosfolípidos pode originar a formação de poros transientes na membrana, permitindo a entrada de cálcio extracelular, cujo aumento citosólico causa a exocitose das vesículas presentes na sinapse, danificando as terminações nervosas e interferindo na liberação de acetilcolina como pode observar-se na Figura 18 (Warrell, 2010). Entre as enzimas existentes no veneno das serpentes, as fosfolipases A2 são as mais interessantes, devido à sua capacidade de induzir vários efeitos biológicos nas vítimas de mordeduras de serpentes. Estes vão desde efeitos neurotóxico, necrótico, hipotensivo, hemorrágico, cardiotoxico, miotóxico e anticoagulante devido a sua ação em várias etapas do sistema da coagulação como o Factor Xa, Factor Va, protrombina, trombina (Gopalakrishnakone et al., 2017), e bloqueando de forma reversível os recetores nicotínicos da acetilcolina (Vulfius et al, 2011).

As fosfolipases A2 têm uma atividade neurotóxica pré-sináptica que causa efeitos sedativos do tipo dos opiáceos (Warrell, 2010). É importante realçar que as fosfolipases podem exercer muitos outros efeitos para além de serem hemolíticas e miolíticas (Gutierrez & Lomonte, 2013).

A análise dos venenos de *Naja nigricollis* e *Naja mossambica* revelou um alto teor de fosfolipase A2 que pode explicar a extensa necrose tecidual, característica dos envenenamentos por estas espécies (Petras et al., 2011), interferindo sinergicamente com a integridade da membrana celular, sendo em parte responsáveis pela toxicidade ocular, e causando inflamação conjuntival e palpebral (WHO, 2010a), bem como lesões oftálmicas graves (Rivel et al, 2016). Um dos fatores que leva à potenciação do efeito anticoagulante da PLA2s do veneno de *Naja nigricollis* é denominado (CM-IV) que interfere na formação de um complexo protrombinase, por via não enzimática que é independente do seu efeito catalisador normal (Thakur & Mukherjee, 2017). As PLA2s são consideradas a família de proteínas mais comuns quer em venenos elapídicos como viperídicos (Tasoulis & Isbister, 2017).

1.3.1.2 – “Three-finger toxins”

As “three-finger toxins”, 3FTx, são toxinas não enzimáticas com 60 a 70 aminoácidos que foram encontradas em venenos de serpentes elapídicas, viperídeos e crotalídeos apresentando uma massa molecular entre 6 e 7 kDa. Apresentam uma estrutura característica a que se denominou *three finger toxins* (3FTx) e são ricas em pontes dissulfureto e são essencialmente cardiotoxinas e neurotóxicas (Thakur & Mukherjee, 2017).

As 3FTx são também conhecidas como cardiotoxinas devido ao facto de apresentarem uma capacidade em induzir paragem cardíaca sistólica em roedores, enquanto o potente efeito citolítico, sobre uma ampla variedade de células *in vitro*, deu origem a sua designação como citotoxinas ou citolisinas (Hodges et al., 1987; Rees et al., 1987; Harvey, 1990). Estas toxinas são encontradas em venenos elapídicos e numa espécie de viperídeos, a *Atropoides mummifer* (Tasoulis & Isbister, 2017).

As alfa neurotoxinas pertencem à família 3FTx e têm um papel importante na neurotoxicidade, levando a uma paralisia flácida da vítima que leva à falência respiratória, bem como fasciculações que podem perdurar por 5 a 7 h (Petras et al, 2016; Gopalakrishnakone et al, 2017). A sua passagem pela barreira hematoencefálica (BHE) é facilitada devido a interação com recetores nicotínicos existentes em células endoteliais cerebrais, tendo sido demonstrado um efeito analgésico mediado pelo sistema nervoso central (Gopalakrishnakone et al., 2017). As alfa neurotoxinas são encontradas, principalmente, em venenos de serpentes da família *Elapidae* nomeadamente no veneno da serpente *Dendroaspis polylepis*. Além dos componentes neurotóxicos do veneno que bloqueiam a transmissão de impulsos nervosos, uma série de péptidos isolados no veneno de *Dendroaspis* potenciam a neurotransmissão nos nervos centrais e periféricos (Petras et al., 2016).

O veneno de *Dendroaspis polylepis* apresenta um polipeptídeo de 57 aminoácidos denominado mambalgina (2MFA) pertencente à família das “three finger toxins” (3FTx), que constitui 1,4 % das proteínas do veneno e que inibe os canais de ácido associado à dor (Laustsen et al, 2015) (acid-sensing ion channels), ASIC1a, ASIC2a e ASIC1b, tornando-a um potente analgésico, tão forte como a morfina (atribuído à mambalgina) e que causa menos tolerância que a mesma e sem afetar o sistema respiratório (Ainsworth et al., 2018; Gopalakrishnakone et al., 2017). Essa propriedade está a ser estudada para o desenvolvimento de fármacos potentes contra a dor (Laustsen et al, 2015). Interessante

é saber que as 3 FTxs estudadas no veneno desta espécie têm diversas funções biológicas tais como: bloqueio dos recetores nicotínicos colinérgicos atribuído à alfa neurotoxina de cadeia longa ou curta, bloqueio dos recetores muscarínicos (atribuído às cardiotoxinas) bloqueio da acetilcolinesterase induzindo fasciculações (atribuído à fasciculina), bloqueio dos canais de cálcio tipo L, interferindo com a contração dos músculos da boca e do coração (atribuído à calciseptina) (Ainsworth et al., 2018).

1.3.1.3 - Metaloproteinases (SVMP)

Estima-se que as SVMP compreendam pelo menos 30% da proteína total da maioria dos venenos de viperídeos, tendo 72% sido a maior percentagem encontrada (Tasoulis & Isbister, 2017).

As SVMP são as principais responsáveis pela atividade hemorrágica e a indução de sangramento local, sistêmico e outros efeitos na hemostasia mediada por ações procoagulante e/ou efeitos anticoagulantes, alterações na agregação de plaquetas bem como atividades pró-inflamatórias. Uma injeção intramuscular de metaloproteinase resulta na destruição das células, seguida de mionecrose, que ocorre secundariamente à isquémia causada pelo sangramento e leva a uma resposta regenerativa incompleta do músculo (Gutierrez & Rucavado, 2000). As metaloproteinases presentes no veneno das *Bitis* degradam o colagénio e o fibrinogénio (Jenings et al, 1999; Currier et al, 2010; Paixão Cavalcante et al, 2015).

As proteínas hemorrágicas presentes no veneno das víboras têm sido alvo de inúmeros estudos e mostraram exibir outras atividades como fibrinogénicas ou fibrinolíticas, ativadoras da protrombina, ativadoras do factor X da cascata de coagulação, inibidoras da agregação plaquetária, pró-inflamatórias, e inibidoras da inativação das serinoproteases (Markland & Swenson, 2013). Mas a ação hemorrágica é, sem dúvida, a característica mais proeminente das metaloproteinases (Gutierrez & Rucavado, 2000). Estudos referem que as metaloproteinases estão também envolvidas no desenvolvimento do edema, hipotensão, inflamação e necrose por interferirem, entre outros, com fatores de ativação do sistema de complemento (Pidde-Queiroz et al., 2013). A proteína indutora de apoptose vascular (VAP) pertence a uma família de proteínas hemorrágicas do veneno de serpentes, que induz apoptose em células endoteliais vasculares (Gopalakrishnakone et al., 2017).

1.3.1.4 - Serinoproteínases (SVSPs)

Dentre as proteínas dominantes as serino proteínases são quantitativamente as menos importantes (Tasoulis & Isbister, 2017). As SVSPs são frequentemente referenciadas como sendo as “thrombin-like enzymes” (TLEs), devido à sua ação análoga à da trombina (Slagboom et al., 2017). Caracterizam-se por catalisarem a clivagem de ligações covalentes peptídicas em proteínas e desempenham papel fundamental em processos biológicos que vão desde a digestão até ao controle e regulação da coagulação sanguínea, sistema imune e inflamação (Neurath & Neurath, 2016).

As SVSPs são agrupadas em seis grandes grupos e subdivididas em famílias com base em sequências e semelhanças funcionais (Rawlings et al, 2004). As SVSPs pertencem à família S1 e interferem na regulação e controle das principais reações biológicas na cascata da coagulação, sistema fibrinolítico e ativação de plaquetas. Com base nos papéis biológicos, elas foram classificadas como ativadoras do sistema fibrinolítico, procoagulante, anticoagulantes e enzimas agregadoras de plaquetas (Marsh & Williams, 2005). A maior parte da fibrina é destruída pelo sistema fibrinolítico. Este processo esgota os próprios níveis dos fatores de coagulação, tornando eventualmente o sangue não coagulável, e conduzindo a hemorragias. Este fenómeno é designado por coagulopatia de consumo (WHO, 2010a; Guidolin et al, 2016).

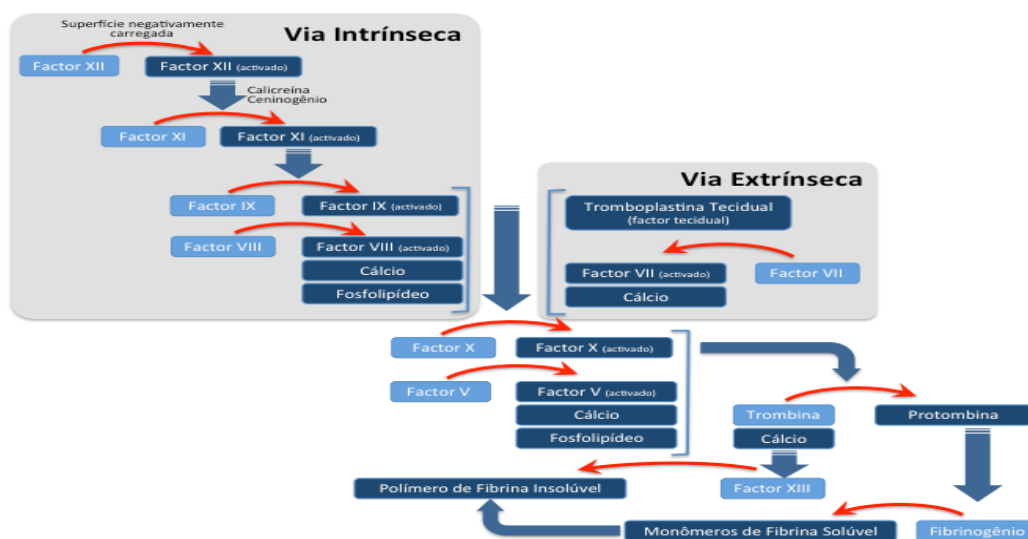


Figura 17: Cascata da coagulação
Adaptado de Gutierrez & Lomonte (2013)

1.3.2 - Proteínas secundárias

1.3.2.1 - Peptídeos Kunitz

Alguns polipéptidos de veneno do tipo Kunitz apresentam atividade de serino protéases como tripsina e quimotripsina; no entanto, as toxinas deste tipo estrutural, encontrado em venenos de serpentes, manifestam também outras propriedades biológicas. Por exemplo, as dendrotoxinas são bloqueadoras de canais K⁺ dependentes de voltagem (Gopalakrishnakone et al., 2017), permitindo o acúmulo de acetilcolina na fenda pré-sináptica, causando um efeito excitatório e elevada neurotoxicidade; além de que, ao inibirem a repolarização, causam prolongada libertação de neurotransmissores dos neurônios centrais e periféricos (Harvey & Anderson, 1985; Laustsen et al., 2015; Petras et al., 2016). As dendrotoxinas (DTX) existem exclusivamente no veneno das mambas e pertencem à família Kunitz (Gopalakrishnakone et al., 2017). Seguidamente a estas, consideradas altamente tóxicas e letais, são as alfa dendrotoxinas que induzem o bloqueio pós-sináptico da junção neuromuscular. A combinação destas duas toxinas torna o veneno altamente eficaz para a paralisia da vítima desta serpente (Laustsen et al., 2015).

As DTX têm uma atividade convulsiva em ratos, podendo contribuir para a paralisia do músculo cardíaco e respiratório, que ocorre em vítimas por mordedura de mamba, tanto por mecanismos centrais, ou por exaustão da junção neuromuscular, como resultado de superestimulação. As ações cumulativas deste e o início precoce da sudorese profusa, que resulta da superestimulação simpática, é um sintoma universal relatado em quase todas as vítimas de mambas (Hodgson & Davidson, 1996).

1.3.2.2 - L-aminoácido oxidases (LAAOs)

As LAAOs são flavoenzimas abundantes em venenos de serpentes, particularmente nos venenos de víboras. O veneno de *Calloselasma rhodostema* (*Malayan pit viper*) contém até 30% de LAAOs no seu veneno. Esta enzima ajuda a reação de oxidação de L-aminoácidos originando um cetoácido e amônia. Este grupo de enzimas é capaz de causar vários efeitos biológicos *in vivo*, incluindo coagulopatia, inibição da agregação plaquetária e citotoxicidade (Gopalakrishnakone et al., 2017).

1.3.2.3 - Lectinas do tipo C

As lectinas do tipo C são encontradas em tipos diferentes de tecidos e são principalmente envolvidas na adesão e sinalização relacionada à inflamação e imunidade. As lectinas de tipo C podem não se ligar aos carboidratos. No entanto, todas elas contêm uma dobra denominada dobra de lectina do tipo C, com uma alta variação na sequência de aminoácidos. As lectinas de tipo C existem em dois tipos diferentes de venenos de serpentes - (1) proteínas de lectina de tipo C (CLP) e (2) lectinas de serpentes de ligação ao açúcar (SSL). As SSL geralmente são proteínas homodiméricas com cerca de 28 kDa, que são capazes de aglutinar glóbulos vermelhos através da ligação das cadeias laterais de carboidratos na sua superfície. Elas afetam o sistema hemostático em vítimas de envenenamento, através de ações em vários componentes do plasma ou células sanguíneas, particularmente as plaquetas. Devido à sua estrutura conservada e geralmente homóloga, as CLPs são ferramentas úteis na caracterização bioquímica de várias proteínas e ajudaram o estudo das vias de transdução de sinal plaquetários (Gopalakrishnakone et al., 2017).

1.3.2.4 - Desintegrinas

As desintegrinas são polipeptídeos com 7-8 kDa encontradas no veneno de serpentes da família Viperidae. Elas contêm uma sequência de aminoácidos (Arg-Gly-Asp) denominada RGD que confere seletividade para a interação com certos receptores celulares, como as integrinas. Estes peptídeos são potentes inibidores de agregação plaquetária e de adesão celular. Trabalhos recentes têm mostrado resultados animadores na inibição do desenvolvimento de metástases e na prevenção da trombose, sugerindo a utilização dessas moléculas como uma alternativa terapêutica (Gopalakrishnakone et al., 2017).

1.3.2.5 - Peptídeos Natriuréticos

A Dendroaspina (DNP) é um análogo do peptídeo natriurético atrial (ANP) com uma atividade ANP-like, que pode facilitar a disseminação do veneno através de uma ação vasodilatadora (de Weille et al., 1991; Hodgson & Davidson, 1996). Os peptídeos natriuréticos, Dendroaspina (DNP) e DNP 2, induzem o relaxamento vascular e a natriurese e estão a ser estudados exhaustivamente para sua utilização terapêutica na insuficiência cardíaca e hipertensão arterial (Degueldre et al., 2017).

1.3.3 - Família de Proteínas “minor”

1.3.3.1 - Acetilcolinesterase (AChE)

A acetilcolina (ACh) é a primeira substância química conhecida por estabelecer uma comunicação entre duas células de mamíferos, e atua na propagação de um estímulo elétrico na junção sináptica. A acetilcolinesterase, pertence à família das colinesterases, e desempenha um papel vital na degradação da ACh no sistema nervoso, garantindo a hidrólise de ACh em colina e ácido acético, terminando assim o impulso químico que de forma precisa e integrada leva à geração do impulso nervoso na sinapse (Kang et al., 2011).

A fasciculina é o único péptido inibidor da acetilcolinesterase (AChE) conhecido em veneno de serpentes. Experiências feitas em ratos com fasciculina mostraram que se liga à acetilcolinesterase com alta afinidade, conduzindo a um aumento das concentrações da acetilcolina na fenda sináptica o que leva a fasciculações graves (Hodgson & Davidson, 1996; Petras et al, 2016; Gopalakrishnakone et al, 2017) e causando paralisia devido ao acúmulo da acetilcolina (Warrell, 2010).

1.3.3.2 - Hialuronidase

A hialuronidase é amplamente distribuída em venenos de serpentes e de outros animais. A hialuronidase é conhecida como fator de dispersão, pois ajuda a difundir o veneno, degradando a matriz extracelular e os tecidos conjuntivos ao redor dos vasos sanguíneos. A hialuronidase digere o hialuronano, um glicosaminoglicano de alto peso molecular (GAG), encontrado em grandes quantidades na matriz extracelular de tecidos moles. O hialuronano está envolvido em muitos processos fisiológicos, como cicatrização de feridas e migração celular. Sendo um GAG negativamente carregado, o hialuronano pode conter na sua composição uma série de catiões e água. O hialuronano atua como uma cola para dar estabilidade à matriz extracelular. As hialuronidases dos venenos de serpentes digerem o hialuronano na matriz extracelular e provocam a disseminação de catiões e água. A hialuronidase não está mencionada entre os componentes tóxicos dos venenos de serpentes e a maioria dos seus efeitos tóxicos são indiretos. No entanto, é sugerido que os produtos de degradação decorrentes da ação da hialuronidase do veneno, uma vez que entrem nos sistemas circulatórios, possam contribuir para a toxicidade (Gopalakrishnakone et al., 2017).

1.3.3.3 – “5'-nucleotidase”

A “5'-nucleotidase” é uma fosfomonoesterase específica, que hidrolisa o fosfato monoéster na posição 5' do DNA e RNA. Diferentes mononucleotídeos podem ser hidrolisados, mas o 5'-AMP é o substrato mais suscetível. A enzima não hidrolisa o 3'-AMP, p-nitrofenilfosfato e ribose-5'-fosfato, que são substratos de fosfomonoesterases não-específicas (Ferreira, 2006).

1.3.3.4 - Fosfodiesterase

Também chamada de exonuclease, é uma das enzimas mais estudadas, amplamente distribuída entre os venenos das cinco famílias de serpentes venenosas. Fosfodiesterases (EC 3.1.4.1) (PDEs) hidrolisam as ligações fosfodiéster sequencialmente do terminal 3' de polinucleótidos produzindo 5-mononucleótidos (Ferreira, 2006).

É importante salientar que a hidrólise de nucleótidos pode ser realizada por enzimas como fosfodiesterase, mas também 5'-nucleotidase, ADPase, ATPase e fosfatase alcalina, e a existência de tais enzimas em venenos de serpentes foi também relatada (Ferreira, 2006). Por exemplo, recentemente foi demonstrado que o veneno da víbora de Russell (RVV) contém diferentes enzimas que desempenham papéis importantes em vários processos biológicos, incluindo a modulação das atividades das células neurais. Algumas nucleotidasas, denominadas apirases, mostraram que degradam tanto o ATP como o ADP numa ordem de preferência decrescente, o que poderá contribuir futuramente para a prevenção da trombose intravascular e regulação das respostas imunes. Apesar das dificuldades para análise, nomeadamente a sua baixa abundância em veneno, estabilidade transitória e sensibilidade aos agentes de desnaturação, foi possível recentemente realizar a purificação e caracterização da apirase (Ruviapyrase) de veneno de serpente *Daboia russelii* (Kalita et al., 2018).

1.3.3.5 - Fosfolipase B

A importância desta enzima nos venenos de serpentes parece ser relativa, pois referências à sua presença e atividade são muito escassas (Doery & Pearson, 1964).

1.3.3.6 - Factor de crescimento de nervos e factor de crescimento endotelial

O factor de crescimento de nervos (NFG) e o factor de crescimento endotelial (FCE) são os únicos fatores de crescimento encontrados nos venenos de serpentes. Somente o NGF mostrou ter impacto sobre o sistema nervoso e é um membro da família neurotrofina que pertence à superfamília dos fatores de crescimento. Os NGFs foram encontrados nos venenos das famílias Viperidae e Elapidae e apresentam massas moleculares de 12,5 a 22 kDa, com poucas exceções (34 kDa para NGF do veneno de *Bungarus caeruleus* e 35 kDa para NGF do veneno *Agkistrodon bilineatus*). O NFG pode reduzir a degeneração das fibras nervosas e aumentar a regeneração do nervo periférico e a recuperação funcional da lesão dos nervos ciáticos em mamíferos (gatos) *in vivo* (Gopalakrishnakone et al., 2017).

O fator de crescimento endotelial vascular é uma proteína reguladora angiogênica e linfangiogênica, bem conhecida, tendo já sido isolada do veneno de algumas espécies como a *Bitis arietans* (Yamazaki et al., 2009).

1.3.3.7 – “Vespryn/Ohanina”

A Ohanina foi primeiramente isolada da peçonha de *Ophiophagus hannah* mostrando ser responsável por causar hipolocomoção e hiperalgesia em camundongos. Essas ações tóxicas são provavelmente mediadas pelo seu efeito no sistema nervoso central (Pung et al., 2006). Diferente de outras proteínas presentes nas peçonhas que são ricas em resíduos de cisteína e pontes dissulfeto, a ohanina apresenta apenas um resíduo de cisteína na sua estrutura e é o primeiro membro da nova família de proteínas contendo o domínio B30-2 like, com um segmento N terminal que foi denominada de “vespryn” (Bastos, 2012; Pung et al., 2006). Alguns relatos na literatura apresentam exemplos de ohanina em veneno de *Naja kouthia* (Fry et al., 2005).

1.3.3.8 - Inibidor das metaloproteinases do veneno de serpentes

O inibidor da metaloproteinases do veneno de serpente representa um membro adicional da família da cistatina que é encontrado no soro de serpentes venenosas, protegendo as proteínas do veneno da inativação proteolítica por proteases da vítima (Gopalakrishnakone et al., 2017).

1.3.4 - Família de proteínas raras

São 36 famílias que estão descritas na tabela S3 (Anexo 2) (Tasoulis & Isbister, 2017).

1.3.5 - Família de proteínas únicas

São as β Defensinas, Waglerinas, Maticotoxina e Cistatinas assim designadas por estarem presentes apenas num género, mas como fração dominante do veneno. As defensinas encontram-se no género *Crotalus*; as Waglerinas no género *Tropidolaemus*; a Maticotoxina no género *Calliophis* e as Cistatinas no género *Bitis*. Nesta última a sua colocação nesta classificação é algo arbitrária, já que constitui somente 2 a 10 % do veneno de *Bitis*.

1.3.5.1 - β Defensinas

As β defensinas são péptidos de aproximadamente 4,5 kDa encontrados em espécies de serpentes *Crotalinae* da América do Sul incluindo *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*. A crotamina é um exemplo de β Defensina, presente no veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*, que age como uma miotoxina com capacidade de interferir com canais iónicos. Foram atribuídas várias propriedades para a crotamina como: citotoxicidade seletiva *in vitro* e *in vivo* anticancerígena (Hayashi et al., 2008; Kerkis et al., 2014), atividade microbicida contra bactérias e fungos (Yamane et al., 2013), interação seletiva com o canal K⁺ de células eucarióticas (Peigneur et al., 2012), translocação em bicamadas lipídicas e penetração em células eucarióticas e interação com ácidos nucléicos (Chen, Hayashi, Oliveira, & Karpel, 2012; Nascimento et al., 2007).

Curiosamente, recentemente foi demonstrado que o desenvolvimento de *Plasmodium falciparum* é inibido pela crotamina de uma maneira dependente da dose [valor IC₅₀ de 1,87 μ M] (El Chamy Maluf et al., 2016). Essas propriedades equipam a crotamina com uma versatilidade única a ser explorada para o desenvolvimento de novas ferramentas diagnósticas e terapêuticas (Gopalakrishnakone, H, Mukherjee, Rahmy, & Vogel, 2015)

1.3.5.2 - Waglerinas

As waglerinas são neurotoxinas bloqueadoras seletivas do recetor nicotínico da acetilcolina, do tipo muscular (nAChR). Elas bloqueiam os recetores, que contêm a subunidade ϵ , com afinidade 2-3 vezes superior àquelas que contêm subunidade γ fetal (Gopalakrishnakone et al., 2017).

1.3.5.3 - Maticotoxinas

As maticotoxinas foram identificadas no veneno da serpente *Maticora bivirgata* (*Calliophis bivirgata* do sudeste asiático), são consideradas fosfolipases A2 (quatro homólogas de citotoxina) e causam um potente síndrome neurotóxico (Gopalakrishnakone et al., 2017).

1.3.5.4 - Cistatinas

As cistatinas, que são inibidores de cisteino-proteases, são agrupadas em três famílias: Família 1 contém polipeptídeos de cadeia simples, de aproximadamente 100 aminoácidos; as cistatinas da família 2 são polipeptídeos de cadeia simples, de 120 aminoácidos, com duas ligações dissulfureto intra-moleculares; e cininogénios da família 3, são proteínas glicosiladas que consistem em três subunidades do tipo cistatina. Análises recentes indicam que as cistatinas das famílias 1 e 2 são ancestrais intracelulares e secretados, respetivamente, para toda uma gama de proteínas de domínio multi-cistatina. As cistatinas de veneno de serpentes foram isoladas em 1987, mais propriamente do veneno de *Bitis arietans* (Evans & Barrett, 1987; Richards et al., 2011).

1.3.6 - Outras substâncias

Outras substâncias existentes nos venenos das serpentes poderão não estar na classificação anterior, mas serão aqui descritas devido à sua importância.

1.3.6.1 - Sarafotoxinas

As sarafotoxinas são uma classe de peptídeos cardiotoxicos com cerca de 21 a 25 aminoácidos que induzem, principalmente, a vasoconstrição coronária (Abd-Elsalam, 2011; Terrat et al., 2013). As sarafotoxinas mostram características estruturais e funcionais da endotelina (Abd-Elsalam, 2011), bloqueando os recetores A e B da endotelina, mediando a ação vasoconstritora e efeito ao nível da tensão arterial (Yokoyama et al., 2014). A única espécie de serpente, até ao momento descrita, que apresenta no seu veneno as sarafotoxinas é a *Atractaspis engaddensis* (Terrat et al., 2013; Gopalakrishnakone et al., 2017). Estas toxinas aumentam, transitoriamente, a pressão arterial devido a sua ação ao nível da inervação simpática e a sua dose letal média é de 15 µg/kg em mamíferos (Gopalakrishnakone et al., 2017).

1.3.6.2 - Cardiotoxinas MT α , MT β e MT γ

As cardiotoxinas são toxinas adrenérgicas denominadas MT α , MT β e MT γ que reconhecem os recetores M1 e M4 são encontradas no veneno de *Dendroaspis polylepis* (Petras et al, 2016). Somente as toxinas muscarínicas α (MT α) e β (MT β) isoladas do veneno de mambas apresentam uma alta afinidade por recetores muscarínicos M3 (Gopalakrishnakone et al, 2017).

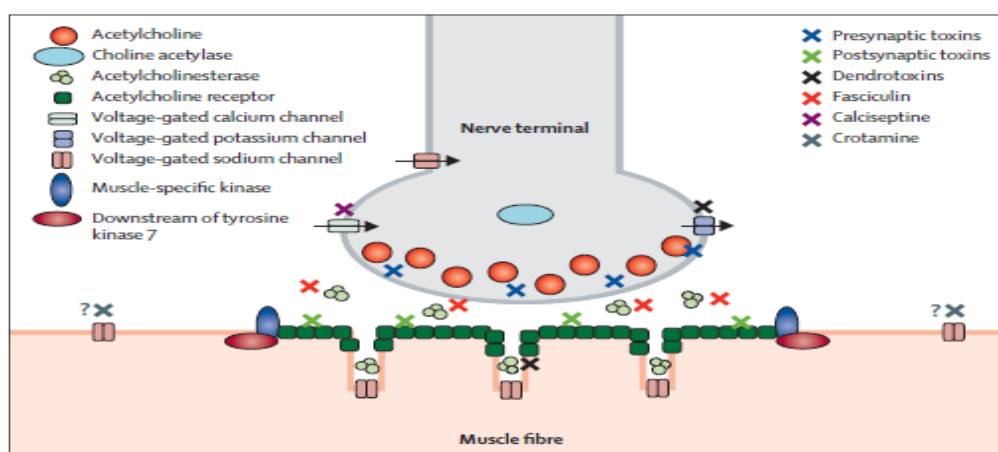


Figura 18: Junção Neuromuscular mostrando os locais de ação das toxinas pré e pós-sinápticas

Fonte: Adaptado de Warrell (2010).

As toxinas muscarínicas presentes no veneno da *Dendroaspis polylepis* ligam-se aos recetores muscarínicos da acetilcolina bloqueando-os e, desta forma, desregulando processos fisiológicos vitais como, a função cardíaca e o controle do sistema nervoso central (Laustsen et al, 2015; Petras et al, 2016; Ainsworth et al., 2018).

1.3.6.3 - Histamina e Serotonina

As aminas biogénicas, tais como a histamina e a serotonina (5-hidroxitriptamina), são encontradas particularmente em venenos de víboras. Elas podem contribuir para a dor local e permeabilidade vascular, causando alterações no local da mordedura (WHO, 2010a). Estes componentes dos venenos das víboras são responsáveis por vários efeitos incluindo inflamação, edema e vasodilatação (Sebia-Amrane & Laraba-Djebari, 2013).

1.3.6.4 - Adenosina

A adenosina induz a desgranulação dos mastócitos e hipotensão e está presente em venenos de *Bitis arietans*, *Bitis gabonica* e *Bitis nasicornis* (Granham et al, 2005).

1.3.6.5 - Arietina e gabonina

A arietina e gabonina são sequências de péptidos que interferem na agregação plaquetária encontradas no veneno de *Bitis gabonica* (Huang et al, 1991, 1992).

1.3.6.6 - Substâncias com ação no sistema de complemento

Muitos venenos de serpentes contêm componentes que interferem no sistema complemento. Muitos desses componentes são protéases e podem induzir a geração de anafilatoxinas, como C3a e C5a, por ação direta nos componentes do sistema complemento. Tais fragmentos podem causar vasodilatação e inflamação direta e indiretamente (via mastócitos). Alguns componentes dos venenos, principalmente metaloproteases, podem também causar ativação do sistema complemento por inativação de C1-INH, um regulador das vias clássica e das lectinas do complemento. Assim, um efeito muito mais potente pode ser obtido, não só pela desregulação do complemento, mas também pela geração de bradicinina, uma vez que a enzima responsável por sua geração, a kalicreína, é também inibida por C1-INH. A deficiência de C1-INH, é um fenômeno conhecido, e responsável pelo edema angioneurótico hereditário, que é amplamente considerado como causado pelo excesso de produção de bradicinina. Os componentes em venenos de cobras, que podem inativar C1-INH, provavelmente, contribuem para a formação do edema observado em muitos envenenamentos (Tambourgi & van den Berg, 2014).

1.4 – Perfil clínico dos envenenamentos por serpentes de importância médica em Angola

O perfil clínico dos envenenamentos por serpentes de importância médica em Angola pode ser classificado em três grandes grupos, nomeadamente neurotóxico, citotóxico e hemotóxico, embora por vezes também estejam presentes, em alguns casos, alterações miotóxicas, podendo ocorrer envenenamentos mistos (WHO, 2010; Slagboom et al., 2017).

1.4.1 - Envenenamento neurotóxico

Este é caracterizado por um moderado ou ausente edema local, descendente e progressiva paralisia, começando com a ptose palpebral e paralisia dos movimentos oculares, causando visão dupla. O paciente pode vomitar, apresentar salivação profusa e, eventualmente, pode haver dificuldades com deglutição e respiração até à paralisia flácida generalizada (Slagboom et al., 2017; WHO, 2010a). Depois de uma paralisia flácida, a progressão da sintomatologia pode ser rápida ou retardada, com paralisia progressiva dos músculos respiratórios que acaba por conduzir ao colapso cardiopulmonar e à morte (Hodgson & Davidson, 1996).

1.4.2 - Envenenamento citotóxico

Este caracteriza-se por dor e progressiva inflamação dos tecidos, extravasamento de fluídos com sangue, flitenas e hematomas. As vítimas queixam-se de dor intensa no local da mordedura e ao longo do membro afetado, ocorrendo a morte irreversível do tecido (necrose/gangrena) (WHO, 2010a); efeitos sistêmicos poderão ocorrer tais como hipotensão e choque hipovolémico (Slagboom et al., 2017).

1.4.3 - Envenenamento hemotóxico

A hemotoxicidade é uma das mais comuns manifestações clínicas em vítimas de mordeduras de serpentes, particularmente, quando causado por serpentes da família Viperidae (Slagboom et al., 2017). É caracterizada por gengivorragia, sangramento gastrointestinal e geniturinário que pode ser generalizado (WHO, 2010a).

Os efeitos cardiovasculares vão desde a hipotensão grave, com consequente choque hipovolémico, e os sistêmicos poderão levar até a coagulação intravascular disseminada (CID), como resultado da coagulopatia de consumo (Slagboom et al., 2017).

1.4.4 - Envenenamento miotóxico

Este é caracterizado por insignificante edema local, dor muscular generalizada e sensibilidade aumentada, associada a característica de envenenamento neurotóxico e paralisia progressiva descendente, culminando com a paragem da respiração (WHO, 2010a).

1.5 – Apresentação clínica dos envenenamentos por serpentes com importância médica em Angola

1.5.1 - Família Elapidae: Género *Naja*

As mordeduras por serpentes cuspideiras (*Naja nigricollis*, *Naja katiensis*, *Naja pallida*, *Naja mossambica*, *Naja nigricincta*, *Naja nubiae*, *Naja ashei*) produzem uma síndrome clínica diferente da causada por outras serpentes da família Elapidae, ou seja, necrose local sem neurotoxicidade (WHO, 2010a). A maioria das mordeduras ocorre à noite, dentro de casa, enquanto as vítimas estão a dormir. Há dor imediata acompanhada de vômitos, por um período de seis horas a seguir ao acidente, bem como inflamação local, bolhas locais, em 60% dos casos, e necrose do tecido local, em 70% dos casos de envenenamentos. A necrose geralmente envolve apenas a pele e o tecido conjuntivo subcutâneo (Figuras 19, 20 e 21) (Mendez et al., 2011; Warrell, 2010; Louvain de Souza et al., 2015; Rivel et al., 2016).

Quando o veneno destas serpentes atinge o olho diretamente causa vários tipos de lesões oftálmicas (Rivel, 2016), ocorrendo intensa dor local, blefarospasmo, edema palpebral e epífora. A observação com a lâmpada de fenda, ou um exame com fluoresceína, revela erosões da córnea em mais de metade dos pacientes que são atingidos pelo veneno da espécie *Naja nigricollis*. A infeção secundária da córnea causa lesões que podem resultar em opacidade permanente, causando cegueira ou até destruição do olho (Figuras 22 e 23). Quando o veneno é absorvido pela câmara do olho causa uveíte anterior. Uma complicação rara é a paralisia do VII nervo craniano, facial (Goldman, 2010; WHO, 2010a).

1.5.2 - Família Elapidae: Género *Dendroaspis*

Estas são, no seu conjunto, as serpentes mais temidas de África e do mundo (WHO, 2010a; Laustsen et al., 2016). Também conhecidas por mambas, são responsáveis pelo maior número de mortes na África Austral, quando comparadas a outras serpentes (Crisp, 1985; Hodgson & Davidson, 1996). O veneno da mamba contém neurotoxinas incomuns chamadas dendrotoxinas. As dendrotoxinas são proteínas pequenas, com 57 a 60 aminoácidos, que bloqueiam a despolarização neuromuscular pela inibição das serinoproteases. Estas toxinas são responsáveis por um síndrome clínico distinto que causa parestesias, sinais de estimulação do sistema nervoso autónomo e fasciculações (WHO, 2010a; Laustsen et al, 2015; Petras et al, 2016). As quatro espécies (*D. polylepis*, *D. angusticeps*, *D. jamesoni* e *D. viridis*) são capazes de causar, rapidamente, uma

progressiva paralisia descendente, que aparece 15 minutos após a mordedura, e que progride para a paralisia respiratória fatal (WHO, 2010a; Laustsen et al., 2015).



Figura 19: Mordedura por *Naja nigricollis*: no 9.º dia após mordedura com desbridamento da pele e tecido subcutâneo

Fonte: (WHO, 2010a).



Figura 20: Mordedura por *Naja nigricollis*: malignização escamosa

Fonte: (WHO, 2010a).



Figura 21: Mordedura por *Naja nigricollis*: no 9º dia após a mordedura

Fonte: (WHO, (2010a)



Figura 22: Dano intraocular por ação direta do veneno da *N. nigricollis*: 5 anos após o acidente, mostrando intensa opacidade da córnea não tratada

Fonte: (WHO, 2010a)



Figura 23: Dano intraocular por ação direta do veneno da *N. nigricollis*: mostrando conjuntivite intensa.

Fonte: (WHO, 2010a)

A velocidade da evolução do envenenamento e as suas características distintivas são bem ilustradas por um caso clínico atendido em Harare, Zimbabwe (WHO, 2010a). A vítima, um minuto após ter sido mordida por uma mamba negra de 3 metros de comprimento, começou a sentir formiguelo na língua e nos lábios que rapidamente se generalizou, seguindo-se por dores abdominais e tonturas. Após 20 minutos, apresentava sudorese profusa, náuseas e fraqueza generalizada, midríase e logo em seguida ptose palpebral detetável. Quarenta minutos após a mordedura, apresentava arrepios de frio e fasciculações generalizadas. Após 4 horas e meia, após a mordedura, foi intubado e ventilado mecanicamente durante 40 horas, tendo posteriormente recuperado após a administração de antiveneno (Hodgson & Davidson, 1996; WHO, 2010a).

Outras características descritas na literatura incluem dor local intensa, um estranho sabor na boca, diarreia, hipersalivação, contrações musculares involuntárias, vômitos, dor abdominal, dispneia e episódios recorrentes de paralisia flácida. O edema local é variável e, por vezes, ausente após as vítimas serem mordidas por mambas (WHO, 2010a; Laustsen, 2015). No entanto, os pacientes mordidos por mambas verdes (*Dendroaspis angusticeps*) podem desenvolver edema de todo o membro afetado e também mostram leves distúrbios hemostáticos (WHO, 2010a).



Figura 24: Mordedura por *Dendroaspis polylepsis*: mostrando ptose palpebral e oftalmoplegia

Fonte: (WHO, 2010a)

1.5.3 - Família Viperidae: *Bitis arietans*

Esta espécie é, quase certamente, a responsável pela maior parte dos envenenamentos graves que ocorrem em África. Após mordedura pela *Bitis arietans*, ocorre frequentemente edema acentuado que se estende geralmente por todo o membro e se espalha para o tronco. Há um extravasamento de plasma acentuado que pode causar choque hipovolémico, uma apresentação comum característica desta situação. No local da mordedura, ocorre necrose que pode ser extensa (Figuras 27 e 28) exigindo, em alguns casos, a amputação de parte ou mesmo da totalidade do membro atingido.



Figura 25: Mordedura por *Bitis arietans*.
Foto: Paula Oliveira, Malanje, Angola, 2015.



Figura 26: Mordedura por *Bitis arietans*.
Foto: Paula Oliveira, Malanje, Angola, 2015.



Figura 27 e 28: Mordedura por *Bitis arietans* Necrose do membro inferior esquerdo
Fonte: (WHO 2010a)



Fonte: (Kouassi et al 2017)

As principais artérias podem tornar-se trombosadas no membro mordido e raramente em outros pontos. Pode desenvolver-se uma síndrome compartimental. Os sintomas sistémicos podem ser precoces e dramáticos com anomalias cardiovasculares, incluindo hipotensão e choque, arritmias e alterações electrocardiográficas (Kodama et al., 2015).

A síndrome compartimental é rara e caracteriza casos graves, sendo de difícil manuseio clínico pela necessidade de medição da pressão intra tecidual, quando é possível, constituindo uma causa frequente de amputação em várias regiões de África (Kouassi et al., 2017). Decorre da compressão do feixe vaso-nervoso, com conseqüente extenso edema que se desenvolve no membro atingido, causando a isquemia das extremidades. As manifestações mais importantes são a dor intensa, parestesia, diminuição da temperatura do segmento distal, cianose e déficit motor (WHO, 2010a). O sangramento sistémico espontâneo é comum e mediado por ação de metaloproteinasas, zinco dependentes (SVMs), enquanto as alterações hemostáticas incluem trombocitopenia e evidência de atividades semelhantes à trombina (Warrell et al., 1975; WHO, 2010a; Gutierrez, 2015).

1.6 - Tratamento

A única terapia específica disponível para o tratamento das mordeduras de serpentes são os antivenenos (Slagboom et al., 2017).

1.6.1 - Soros antiofídicos

Os trabalhos pioneiros simultâneos de Calmette e de Phisalix e Bertrand, em 1894 (In: Leon et al., 2013), demonstraram que o soro de animais imunizados com venenos de serpentes era eficaz na neutralização dos efeitos tóxicos dos venenos em humanos. Isso definiu o palco da terapia moderna de envenenamentos por mordedura de serpentes, através da administração parentérica de derivados de soros de animais previamente imunizados. A evolução deste trabalho pioneiro ocorreu depois em diversas regiões do globo, com maior incidência nos países da América do Sul, mas também nos Estados Unidos da América e Austrália (Gutierrez et al., 2011, 2015).

De facto, a administração de soros antiveneno tornou-se a terapia de eleição a adotar em caso de envenenamentos por mordeduras de serpentes. Os antivenenos são produzidos em animais, normalmente o cavalo, mas também em ovelhas ou jumentos, após administração aos animais do veneno da serpente e subsequente recolha de sangue, separação do plasma ou soro e seu fracionamento para obtenção das imunoglobulinas, ou dos fragmentos de imunoglobulinas F(ab'2) ou Fab (WHO, 2010a,WHO, 2010b; Slagboom et al., 2017).

Os primeiros antivenenos provocavam uma incidência elevada de reações adversas subsequentes à sua administração, especialmente quando administrados por via

endovenosa. Essas reações poderiam consistir em prurido e urticária e até anafilaxia potencialmente fatal. Embora não inteiramente esclarecida, as reações adversas aos antivenenos podem ocorrer devido a: a) práticas relacionadas com a sua produção, como contaminação com endotoxinas ou vírus, b) fatores de natureza físico-química, como a pureza do antiveneno e a presença de agregados proteicos, c) fatores dependentes das características imunoquímicas das imunoglobulinas heterólogas dos antivenenos, como atividade anticomplementar e imunogenicidade (Gutierrez et al., 2011, 2013, 2015; Squaiella-Baptistão, Marcelino, Ribeiro da Cunha, Gutiérrez, Tambourgi, 2014).

Os soros podem ser produzidos contra o veneno de uma simples espécie de serpente, soros mono específicos, ou contra venenos de várias serpentes, soros poli específicos (Gutierrez et al., 2013).

A eficácia e a segurança dos antivenenos têm que ser avaliadas em animais e em humanos, através da realização de ensaios pré-clínicos e clínicos, antes que a sua comercialização seja autorizada (WHO 2010a,b).

As técnicas ómicas têm dado uma enorme contribuição na preparação de antivenenos eficazes. De facto, uma das principais condicionantes da sua eficácia consiste na preparação do antiveneno por imunização dos animais com misturas de venenos que tenham na sua constituição uma gama alargada de toxinas de diferentes espécies de serpentes. A caracterização, por análise proteómica, da constituição proteica dos venenos de serpente de diferentes espécies e zonas geográficas permite a melhor seleção destes, para inclusão na mistura de venenos a ser utilizada na imunização dos animais. Esta metodologia é denominada por venómica (Petras et al., 2016; Lausten et al., 2015).

Também a análise antivenómica pode dar uma grande contribuição para a elucidação da falta de eficácia dos antivenenos. Resumidamente, o veneno a neutralizar e o antiveneno respetivo são incubados *in vitro*, os complexos formados são precipitados e as proteínas não reconhecidas pelo antiveneno analisadas por espectrometria de massas. Estes dados são de enorme importância para o entendimento da falha de eficácia dos soros no combate a algumas patologias resultantes de envenenamento, e ajudam a esclarecer a constituição proteica de venenos complexos (Gutierrez et al., 2013; Lausten et al., 2015).

Como já referido, um dos aspetos mais importantes na qualidade dos antivenenos diz respeito aos efeitos adversos que possam originar nas vítimas tratadas, sobretudo reações do tipo alérgico. Uma elevada percentagem de imunoglobulinas presentes nos antivenenos não tem efeito terapêutico e podem estar na origem dessas reações. Uma estratégia para ultrapassar este problema consiste na produção de anticorpos monoclonais contra as toxinas de serpente e a preparação de misturas dos mesmos, de modo a permitir uma cobertura terapêutica alargada contra os constituintes tóxicos dos venenos, evitando a presença de imunoglobulinas alergénicas desprovidas de efeitos terapêuticos (Frauches et al., 2013). Um exemplo recente desta estratégia é o desenvolvimento por parte destes investigadores de um soro constituído por anticorpos monoclonais contra toxinas importantes presentes no veneno da *Bitis*, nomeadamente anticorpos contra as proteínas *thrombin-like*, contra as fosfolipases A2, e contra as Zn-metaloproteinases. Deste modo, efeitos tóxicos importantes causados por venenos de serpente, como os efeitos sobre a coagulação do sangue, os efeitos neurotóxicos e musculares, podem ser neutralizados com o mesmo antiveneno, garantindo um maior sucesso na terapia.

1.6.2 - Indicações para o uso do soro antiveneno

A administração de soro antiveneno está indicada em todos os casos com sinais clínicos de envenenamento sistémico ou efeitos locais severos:

a) Envenenamentos sistémicos

- Neurotoxicidade
- Sangramento sistémico espontâneo
- Sangue incoagulável (20MWBCT)
- Alterações cardiovasculares: hipotensão, choque, arritmia, anomalias do eletrocardiograma.

b) Envenenamentos por espécies que causam necrose local

- Edema extenso (a envolver mais de metade do membro picado)
- Edema rápido e progressivo
- Mordeduras nos dedos das mãos e dos pés

1.6.3 - Administração do soro antiveneno

O antiveneno é mais eficaz quando administrado por via intravenosa. O antiveneno liofilizado deverá ser dissolvido rapidamente (em menos de 10 minutos) em água estéril. Se a dissolução for difícil, sugere defeito de fabrico, não devendo então ser aplicado (WHO, 2010a).

A injeção intravenosa pode ser feita a uma velocidade de cerca de 5 ml por minuto ou diluída em soro isotónico e infundida em 30-60 minutos. A incidência e a gravidade das reações ao antiveneno são as mesmas para as duas formas de aplicação. A vantagem da infusão intravenosa é a facilidade de controlo. Além disso, garante a permanência de um profissional de saúde ao lado do paciente durante os primeiros 10-15 minutos, após o início do tratamento, quando as reações iniciais têm maior probabilidade de ocorrer (WHO, 2010a).

Quando a administração intravenosa é impossível, o antiveneno pode ser administrado, como último recurso, por via intramuscular profunda, em vários locais da face anterior e lateral das coxas. Este processo deve ser seguido por uma massagem para promover a absorção e a aplicação de pensos de pressão para limitar a formação de hematoma (WHO, 2010a).

Nesta secção abordámos os fundamentos teóricos atualizados relacionados com as serpentes, venenos e envenenamentos. A seguir, no Capítulo 2, abordar-se-ão os principais resultados acerca do nível de conhecimentos e as atitudes e práticas clínicas contra as mordeduras por serpentes nas Províncias angolanas seleccionadas, assim como as ações preventivas e de promoção de saúde feitas pela equipe de investigação nos bairros seleccionados durante a atividade de campo.

CAPÍTULO 2 - CONHECIMENTOS, ATITUDES E PRÁTICAS CLÍNICAS DOS PROFISSIONAIS DA SAÚDE ANGOLANOS DIANTE DAS MORDEDURAS POR SERPENTES

2.1 - Introdução

Segundo a OMS, a maioria das DTN podem ser prevenidas e mesmo eliminadas se as comunidades afetadas têm acesso às informações disponíveis. Esta informação consiste em intervenções em toda a população com ferramentas de baixo custo, suficientemente poderosas para melhorar o quadro de morbidade segundo a OMS. O desafio que se coloca é expandir a cobertura e o acesso a essas informações numa base preventiva proactiva.

O pessoal de saúde, sobretudo das áreas endêmicas de serpentes, deve estar preparado nas ações de saúde hospitalar com o objetivo de salvar a vida da pessoa afetada por acidentes ofídicos; porém, a essência destas estratégias está na promoção dos primeiros auxílios, ao nível da comunidade, quando ocorrem estes eventos. É importante que os profissionais de saúde tenham conhecimento sobre as principais espécies de serpente existentes em Angola, que tipo de envenenamento causam e qual a melhor atitude clínica para o manuseio do mesmo. Este conhecimento foi considerado insuficiente, conforme constatado no estudo sobre Caracterização dos Conhecimentos em Toxicologia na Educação Médica em Angola (Oliveira, 2014).

2.2 - Objetivos

Geral

Caracterizar conhecimentos, atitudes e práticas clínicas dos profissionais de saúde angolanos diante das mordeduras por serpentes nas Províncias selecionadas.

Específicos

1. Validar o instrumento de medição documental aplicado durante a investigação;
2. Descrever conhecimentos que os inquiridos têm das serpentes, venenos e envenenamentos, assim como o perfil clínico-terapêutico que eles relatam;
3. Aplicar uma estratégia de promoção e prevenção de saúde contra as mordeduras e envenenamentos por serpentes em bairros selecionados.

2.3 - Metodologia

2.3.1 - Caracterização da investigação e contexto espaço-temporal

Foi realizado um estudo observacional descritivo transversal com 151 profissionais da saúde dos hospitais provinciais das regiões selecionadas. Este estudo pertence ao segundo nível de investigação, o nível descritivo, e forma parte de um projeto de Investigação básica e de intervenção. O paradigma investigativo aplicado foi o quantitativo ou paradigma positivista.

A investigação teve dois momentos ou etapas: A primeira consistiu na aplicação de um questionário aos profissionais da saúde dos hospitais provinciais de Cuanza Sul, Benguela, Malanje e Huíla. Na segunda etapa foi feita uma intervenção comunitária às povoações de algumas regiões previamente selecionadas pelos sobas das respeitantes Províncias, com a finalidade de realizar ações de promoção e prevenção de saúde. Neste sentido, durante o trabalho de campo pelas diversas Províncias realizou-se o levantamento epidemiológico sobre os acidentes de serpentes com importância clínica existentes na fauna Angolana, conforme planificação de forma a caracterizar o conhecimento, as atitudes e práticas clínicas perante mordeduras por serpente nas Províncias selecionadas.

Cuanza-Sul é uma Província de Angola com uma área de 55.660 km² e a sua população aproximada é de 600.000 habitantes; tem como limites a Norte e Nordeste, os rios Longa e Kwanza e as Províncias do Bengo, Cuanza Norte e Malanje, a Sul Província de Benguela, a sudeste a Província do Bié e Huambo, e a oeste Oceano Atlântico. A sua capital é o município sede do Sumbe que dista 330 km de Luanda e 208 km de Benguela. A Província é constituída pelos municípios de Amboim, Cassongu e, Cela, Conda, Ebo, Libolo, Mussende, Porto Amboim, Quilenda, Quibala, Seles e Sumbe.

Benguela é uma Província de Angola com uma área de 39.826,83 km² e 2,6 milhões de habitantes; tem como limites a Norte a Província do Cuanza-Sul, a Leste a Província do Huambo, a Sudeste as Províncias do Namibe e da Huíla e a Oeste o Oceano Atlântico. A Província é constituída pelos seguintes municípios: Baía Farta, Balombo, Benguela, Bocoio, Caimbambo, Catumbela, Chongoroi, Cubal, Ganda e Lobito.

A Província da Huíla tem 79.023 km², está situada no Sudoeste de Angola, e tem uma população estimada em cerca de 2,3 milhões de habitantes. Huíla está limitada a Norte com as de Benguela e Huambo, a Leste com a do Bié e Kuando Kubango; o extremo sul

da Província é limitado pela Província do Cunene e a oeste pelas Províncias de Namibe e Benguela. Huíla tem 13 municípios: Lubango, Caconda, Caluquembe, Chiange, Chibia, Chicomba, Chipindo, Humpata, Jamba (Mineira), Kuvango, Matala, Quilengues, Quipungo.

A Província de Malanje tem uma superfície de 98 302 Km² e uma população de 998.000 habitantes, e tem os seguintes limites: a Norte a Província do Cuanza Norte, a Nordeste a República Democrática do Congo, a Este a Província da Lunda Norte, a Sudeste Lunda Sul, a Sul a Província do Bié e a Província do Cuanza Sul a Sudoeste e tem os seguintes municípios: Cacuso, Calandula, Caculama, Kangandala, Kambundi-Katambo, Quela, Cahombo, Kiwaba-Nzaji, Massango, Marimba, Luquembo, Quirima, Kunda-Dia-Base.

2.3.2 – Universo de Estudo e Amostra

O Universo incluiu:

1. Todos os profissionais da saúde dos hospitais provinciais de Cuanza Sul, Benguela, Malanje e Huíla.
2. Todas as comunas e bairros das Províncias de Cuanza Sul, Benguela, Malanje e Huíla no período de 2014 a 2015.

Amostra:

1. A amostra contou com 151 profissionais da saúde que foram inquiridos, no dia em que foi apresentada a conferência, e que participaram da reunião matinal de cada hospital provincial.
2. Oito comunas e bairros das Províncias, anteriormente referenciadas, selecionadas pelos sobas.

Obs.: A amostra de profissionais teve o fim de determinar o nível de conhecimentos dos mesmos em relação à identificação e manuseio clínico dos envenenamentos por serpentes.

A amostra dos bairros foi constituída com o objetivo de interagir com as populações dos mesmos, com a finalidade de estabelecer estratégias de prevenção de mordeduras de serpentes e identificar o cenário natural para a captura das mesmas.

2.3.3 - Técnicas de amostragem

Foi aplicada uma técnica de amostragem poli-etápica. Na primeira etapa foram seleccionadas quatro das 18 Províncias do país, perante uma técnica probabilística por conglomerados (considerou-se cada Província como um conglomerado). Logo foram seleccionados dois municípios por Províncias (oito municípios no total), perante uma técnica não probabilística por critério, já que foi utilizado como critério de seleção principal os municípios com maior índice de mordeduras por serpentes. Numa terceira etapa foram seleccionados 151 profissionais da saúde que estiveram no momento da apresentação da conferência para aplicar os questionários na reunião matinal (Técnica de amostragem não probabilística accidental ou deliberada). Além disso, foram escolhidos oito bairros (um por cada município), segundo critérios dos sobas nas regiões abordadas (amostragem não probabilística por critério). A seguir mostra-se as estratégias de amostragem aplicadas.



Figura 29: Estratégia de amostragem poli-etápica

2.3.4 - Critérios de inclusão e exclusão dos profissionais de saúde

Critérios de inclusão:

- Profissionais de saúde dos hospitais provinciais que estavam presentes na reunião matinal
- Que ofereceram o seu consentimento informado.

Critério de exclusão:

- Profissionais que não estiveram na reunião matinal (momento em que foi aplicado o questionário).

2.3.5 - Definição e operacionalização das variáveis

As variáveis estudadas são apresentadas na tabela de definição e operacionalização na seção de anexos (Anexo 3).

2.3.6 - Métodos, técnicas e procedimentos

2.3.6.1 - Técnicas de recolha de dados

Documentação Científica: Foi feita uma revisão detalhada da literatura sobre o tema em estudo em diferentes bases de dados bibliográficos, nacionais e internacionais, acreditadas tais como: *Pubmed, MedlinePlus, Google académico, Lilacs e HINARI*, durante os últimos 5 anos. Foram priorizados os estudos sistemáticos e de meta análise, assim como teses ou monografias em extensão PDF, de modo a obter informações e conhecimentos sobre o objecto de estudo.

As palavras-chave para as pesquisas foram:

- ✓ Serpentes
- ✓ Venenos de serpentes
- ✓ Envenenamentos por mordeduras de serpentes
- ✓ Mordeduras de serpentes em Angola

Observação Científica: Foi aplicada a observação científica participante, não estruturada, ao interatuar com as populações dos bairros indicados pelos sobas e realizar as ações de promoção e prevenção das mordeduras por serpentes nos mesmos.

Inquérito: Teve-se em conta como instrumento um questionário de medição documental, submetido a um processo de validação de conteúdo perante o método Delphi, com perguntas fechadas e abertas.

Formulou-se um total de cinco núcleos temáticos apresentados, como se segue:

- Dados gerais
- Experiências com serpentes e acidentes ofídicos
- Manifestações clínicas

- Cuidados e tratamentos
- Disponibilidade de soros antiofídicos

Foram feitas um total de 21 perguntas, 8 fechadas e 13 semi-fechadas com a possibilidade de dar mais informação (Anexo 4).

Entrevista: Foi feita uma entrevista em profundidade, não estruturada, com os sobas e pessoas que habitam os bairros selecionados, com o objetivo de conhecer os seus principais problemas de saúde e como enfrentam os acidentes ofídicos na comunidade, os seus primeiros passos, entre outros aspetos.

2.3.6.2 - Técnicas de processamento e apresentação dos dados

Os dados foram submetidos a uma base de dados desenhada no pacote estatístico SPSS (versão 22.0), tendo em conta as variáveis definidas e operacionalizadas nos capítulos anteriores.

Desenharam-se tabelas e gráficos com os resultados em frequências absolutas e relativas dos dados quali-quantitativos das variáveis de estudo.

2.3.6.3 - Processamento estatístico da informação

Foi utilizada estatística descritiva, de acordo aos objetivos da presente investigação, para variáveis categóricas tanto nominais quanto ordinais, obtendo-se tabelas de distribuição de frequências.

2.3.7 – Sub-etapas da investigação

A investigação teve dois momentos: um foi a aplicação de um questionário aos profissionais da saúde dos hospitais provinciais, com a finalidade de identificar o nível de conhecimentos que eles têm sobre serpentes, venenos e envenenamentos e, um segundo momento, relacionado com uma atividade de campo denominada Expedição Ndala Lutangila (termo utilizado pelas populações locais quando se referem à Mamba Negra). Esta atividade teve como objetivos pôr em prática uma estratégia para a prevenção de mordeduras de serpentes e captura de serpentes para recolha de veneno.

Na citada atividade foram percorridos 1350 km entre as Províncias de Cuanza Sul, Benguela, Huíla e Malanje e visitadas várias comunas de pelo menos 2 municípios de cada uma tendo-se entrevistado populares de áreas de risco, a maior parte camponeses e pastores.

- Validação do instrumento de medição documental utilizado

Para a colheita de dados sobre conhecimentos e atitudes sobre os acidentes ofídicos utilizou-se um questionário, para seu desenho e elaboração foi consultada a bibliografia especializada mais atualizada. Seguiu-se o procedimento de Reichenheim, que consta de várias etapas (Reichenheim, 2002), que foram executadas de forma adequada para o caso concreto desta investigação, segundo os objetivos propostos:

1. Explicitação dos conceitos a estudar e as respectivas dimensões;
2. Proposição de itens que representem as dimensões a estudar;
3. Seleção dos itens que compõem as primeiras edições do instrumento (protótipo);
4. Discussão do sistema de escores/opções de respostas;
5. Redação das perguntas;
6. Pré teste;
7. Seleção do instrumento final;
8. Estudos de corroboração.

Validação do Conteúdo (Anexo 5)

Foi aplicado o Método Delphi. Primeiro foram selecionados os especialistas, perante o Coeficiente de Competência (K), tendo em conta os dois parâmetros: Coeficiente de Conhecimento (Kc) e o Coeficiente de Argumentação (Ka).

Foram determinados o Coeficiente de competência do especialista (K) a partir da semi-soma do coeficiente de argumentação (Ka) e do coeficiente de conhecimento (Kc). Aqueles com K maior ou igual a 8 foram os especialistas selecionados para avaliar o questionário no Anexo 6.

No caso dos especialistas da área das ciências da saúde, que são dos profissionais com maior saturação de agenda foi possível, por meio do uso das tecnologias da comunicação, contar com eles para que formassem parte do painel e contribuíssem com juízos e opiniões a favor da investigação nesta área.

O procedimento para aplicação do Método de Delphi realizou-se tal como está descrito na literatura especializada (Varela-Ruiz e al 2012, Ortega, 2008, Hurtado de Mendoza, 2011) e mostra-se graficamente no Anexo 4.

Tal como expressa o fluxograma do Anexo 1, durante a etapa I realizou-se o desenho do guia de avaliação para os especialistas. Identificaram-se, inicialmente, os fatores relevantes que podem determinar a efetividade do questionário a validar e definiram-se os eixos da discussão para, posteriormente, definir as perguntas a formular aos especialistas. Na sua construção tomaram-se em conta as recomendações dos especialistas neste método (Varela-Ruiz, 2012, Ortega, 2008, Landeta, 2002). Finalmente, a guia de avaliação ficou com quatro perguntas específicas e o critério geral sobre o questionário (Anexo 5). Definiu-se uma escala tipo Likert, de 1 a 5, onde o 1 é equivalente a totalmente em desacordo e o 5 simetricamente oposto ou totalmente de acordo (Likert, 1932), com pontos intermédios (2, 3 e 4).

Durante a segunda etapa, foram selecionados os especialistas. Para incrementar a qualidade da avaliação, selecionaram-se especialistas de reconhecida experiência profissional certificada por sua alta qualificação, conhecimento do tema e resultados satisfatórios no trabalho assistencial, docente ou de investigação no âmbito da toxicologia e tendo em conta que o painel de especialistas necessita de uma composição heterogénea, para garantir a diversidade e relevância nas opiniões (Ortega, 2008).

A seleção realizou-se por meio da análise da síntese curricular que constitui o elemento mais utilizado na prática, porque permite maior objetividade na avaliação do resultado e resulta cómodo para a seleção dos participantes (Camacho, 2004).

O número de especialistas foi determinado tendo em conta o que a maioria dos autores reporta, ou seja, que deve contar com 7 a 30 membros (Varela-Ruiz e al. 2012, Ortega, 2008, Landeta, 2002). Uma vez recebidas as respostas de todos, selecionou-se um grupo heterogéneo e significativo, composto por 15 especialistas assumindo um erro de 5%.

Durante a terceira etapa de execução do método Delphi, obteve-se a informação necessária para a validação. Nesta etapa, teve lugar o intercâmbio de informação com o grupo de especialistas. Na primeira ronda, enviou-se aos especialistas selecionados a proposta do questionário para determinar conhecimentos e atitudes da população sobre os acidentes ofídicos e o guia de avaliação a preencher; depois de aproximadamente uma semana receberam-se as respostas dos mesmos.

Analisou-se a informação presente nos guias, mediante o uso da ferramenta informática de análise de dados SPSS. Na segunda ronda de avaliação, enviou-se aos especialistas

o questionário já corrigido com suas opiniões emitidas no capítulo “observações”, acompanhado de um resumo das opiniões de todos os especialistas, tal como se recomenda, para facilitar a intercomunicação entre todos os membros do painel; conjuntamente enviou-se o guia de avaliação para que emitissem seus novos critérios acerca do questionário. Na terceira ronda, procedeu-se de maneira idêntica à segunda ronda. O número total de rondas dependeu do grau de contradições observadas nos critérios dos especialistas.

Durante a quarta etapa realizou-se o processamento e interpretação dos dados. Nesta etapa fez-se o processamento estatístico dos resultados do método Delphi. Para expressão dos resultados se estabeleceram cinco níveis de avaliação (Hurtado de Mendoza, 2011) onde:

- ✓ 5: Muito adequado;
- ✓ 4: Bastante adequado;
- ✓ 3: Adequado;
- ✓ 2: Pouco adequado;
- ✓ 1: Inadequado.

Uma vez registrados os critérios dos especialistas, em cada nível de avaliação para os diferentes aspetos na tabela, seguiu-se a sequência reportada na bibliografia (Hurtado de Mendoza, 2011).

A sequência foi a seguinte:

- Obtenção da tabela de frequência observada;
- Obtenção da tabela de frequência acumulativa;
- Obtenção da tabela de frequência acumulativa relativa;
- Determinação, a partir da tabela Z da distribuição normal, o valor da imagem que corresponde a cada frequência acumulativa relativa obtida;
- Obtenção dos pontos através do cálculo de N-P, onde:

N = Somatório da Soma por Aspetos / (Nº Níveis de avaliação x Nº aspetos);

P = Média por Aspetos;

Divide-se a recta por categorias a partir dos Pontos de Corte e se colocam os pontos **N-P** para determinar a categoria de cada aspeto.

Pontos de Corte = Somatório dos Níveis de avaliação/ Nº de Aspetos Avaliados

Com os resultados obtiveram-se as conclusões de Delphi e outorgaram-se os respetivos níveis de avaliação a cada aspeto analisado e a avaliação definitiva do questionário.

Validez de confiabilidade

Para validar a confiabilidade do questionário para a determinação dos conhecimentos e atitudes da população sobre os acidentes ofídicos, utilizou-se o método de teste e reavaliação (Método Teste-Retest) que é uma medida da confiabilidade do questionário. Este procedimento consiste na aplicação do questionário, duas ou mais vezes, ao mesmo grupo de pessoas depois de determinado período de tempo. Se a correlação entre os resultados das diferentes aplicações é altamente positiva, o instrumento é confiável (Sampieri, Collado & Lucio, 2006).

Nesta investigação o questionário foi previamente testado em 15 médicos, tendo sido aplicado uma primeira vez no mês de Janeiro de 2015 e, pela segunda vez, no mês de Fevereiro de 2015 (com um mês de diferença entre uma aplicação e a outra).

Para confirmar a confiabilidade do instrumento, determinou-se a correlação entre ambas as aplicações para o qual se calculou o coeficiente de correlação de Spearman (teste não paramétrico e escala de medição ordinal). É considerada baixa, se for inferior a 0,50; regular se estiver entre 0,50 e 0,74; aceitável se entre 0,75 e 0,89 e elevada quando é maior ou igual a 0,90 (Sampieri et al., 2006).

2.3.8 - Considerações bioéticas

A presente investigação foi apresentada e aprovada pelo Conselho Científico da Faculdade de Medicina da Universidade de Lueji A NKonde com o número do processo 22 VDAC/ULAN/2013 de 31 de Outubro de 2013.

Foi garantido total anonimato e privacidade dos profissionais inquiridos e teve-se em conta os princípios e normativos vigentes nos regulamentos sobre ética da investigação científica tanto nacionais quanto internacionais (O Código de Nuremberg, A Declaração de Helzinki, A Declaração de Budapest).

Obteve-se o consentimento informado da totalidade dos elementos incluídos na amostra, respeitando o princípio da autonomia e garantindo o carácter confidencial da sua participação.

2.4 - Análise e discussão dos resultados

2.4.1 - Desenho e validação do questionário

Quanto a confiabilidade do questionário, o valor do coeficiente de correlação de Spearman foi de 0,78, isto significa que a confiabilidade é aceitável e a correlação entre as duas aplicações foi média alta.

Quanto à validade do questionário, o painel de especialistas que avaliou o método estava formado por 15 membros, selecionados entre 31 profissionais médicos e toxicólogos de reconhecida experiência, 13 com Coeficiente de Competência alta e dois com Coeficiente de Competência média. Estes resultados estão certificados pela sua qualificação, conhecimento do tema e resultados no trabalho assistencial, docente ou de investigação relacionado com a Toxicologia.

No painel de especialistas existiu um predomínio de Doutores em Ciências da Saúde (66,6%), os restantes (33,4%) eram Mestres em Ciências; cem por cento (100%) eram professores de categoria superior (53,3% Professores Titulares e 46,7% Professores Auxiliares).

Depois de três rondas de circulação do guia de avaliação do questionário, obteve-se o critério definitivo do painel; na Tabela 1 observou-se a frequência acumulativa relativa, que serviu de base para o cálculo dos pontos (N-P) que definiu as categorias de cada um dos aspetos avaliados.

Tabela 1: Frequência acumulativa relativa dos aspetos avaliados no questionário

Aspeto a avaliar	5	4	3	2	1
Estruturação do questionário	0,88	1,00	1,00	1,00	1,00
Facilidade de compreensão do conteúdo	0,85	1,00	1,00	1,00	1,00
Sequência lógica das perguntas	0,96	1,00	1,00	1,00	1,00
Cumprimento do objetivo do questionário	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Avaliação geral do questionário	0,91	1,00	1,00	1,00	1,00

Posteriormente, determinaram-se os Pontos de Corte (Tabela 2) que definiram os padrões de avaliação (ver Figura 29)

Tabela 2: Composição da tabela Z da distribuição normal para determinar os Pontos de Corte que definem a avaliação dos especialistas

Aspetos do questionário avaliados	Σ	P	N-P
Estruturação do questionário	10,78	2,69	0,12
Facilidade de compreensão do conteúdo	10,62	2,65	0,16
Sequência lógica das perguntas	10,78	2,69	0,12
Cumprimento do objetivo do questionário	11,35	2,83	-0,02
Avaliação geral do questionário	12,80	3,20	-0,39

N=2,81 Pontos de Corte: 1,66; 3,2

Calcularam-se os quatro pontos de corte que definem os cinco níveis de avaliação descritos na metodologia (Tabela 2) o que significa que os aspetos do questionário avaliados ou a avaliação geral do questionário foi:

- ✓ Muito adequado: quando o ponto N-P é menor que 1,66;
- ✓ Bastante adequado: quando o ponto N-P está entre 1,66 e 3,2;
- ✓ Adequado: quando o ponto N-P está entre 1,66 e 3;
- ✓ Pouco adequado: quando o ponto N-P está entre 3 e 3,2;
- ✓ Inadequado: quando o ponto N-P está acima de 3,2.

Finalmente, foi dividida a recta por categorias a partir dos Pontos de Corte e se colocaram os pontos N-P para determinar a categoria de cada aspeto que permitiram que se outorgassem os respetivos níveis de avaliação, a cada aspeto analisado, e a avaliação definitiva do questionário que se estava a propor para a determinação do nível de conhecimento dos profissionais de saúde sobre serpentes, venenos e envenenamentos assim como o perfil clínico terapêutico que eles relatam.

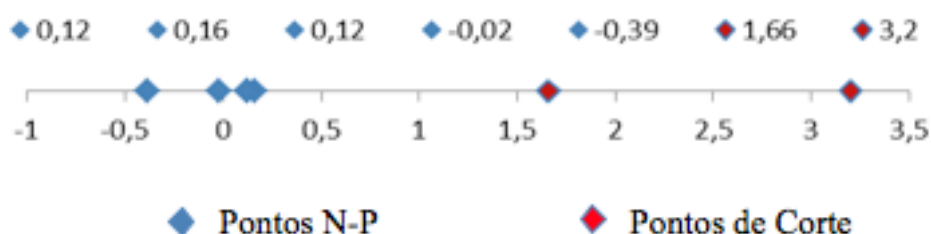


Figura 30: Pontos de Corte que definem a posição dos padrões de avaliação dos especialistas.

Na Figura 30 observa-se que todos os pontos N-P estão na categoria 5, ou seja, abaixo de 1,66 que foi o valor calculado como ponto de corte para definir o limite da avaliação de muito adequado. Portanto o painel de especialistas considerou todos os aspetos do

questionário avaliados como *muito adequado*, a avaliação geral do questionário também foi considerada *muito adequada*, tendo em conta que o valor do ponto N-P relacionado com a avaliação geral, feita pelos especialistas ao questionário, foi de 0,39 e também ficou abaixo do ponto de corte 1,66.

2.4.2 - Resultados e discussão

A idade média de todos os profissionais inquiridos foi de 38,7 anos com um desvio padrão de 14,46, o qual confirma o predomínio de pessoal jovem nos hospitais provinciais abordados, embora exista uma diferença considerável das idades deles em relação à média. Além de isso, existe uma maior percentagem do sexo masculino (57,8%).

Em relação à experiência com mordeduras de serpentes, 28% dos profissionais referem tê-la tido, em algum momento da sua prática profissional ou pessoal. Para além disso, 68% dos inquiridos tiveram conhecimento de outras pessoas com mordeduras por serpentes que ocorreram em pacientes (Tabela 3).

Tabela 3: Distribuição dos profissionais da saúde segundo a experiência com mordeduras de Serpentes

Experiências com mordeduras	Frequência	Percentagem
Própria	43	28
Outros	103	68
Viu	6	4,0
Total	151	100,0

Fonte: Questionário aplicado aos profissionais de saúde dos hospitais das Províncias seleccionadas

Tabela 4: Distribuição dos profissionais da saúde segundo conhecimento do nome das Serpentes

Conhece o nome da Serpente	Frequência	Percentagem
Não	125	82,8
Sim	26	17,2
Total	151	100,0

Fonte: Questionário aplicado aos profissionais de saúde dos hospitais das Províncias seleccionadas

Ao indagar sobre o conhecimento do nome das serpentes, 82,8% não conhecem e 17,2% conhecem, embora uma percentagem maior (25,8%) pudessem identificá-las perante fotografias (Tabelas 4 e 5).

Tabela 5: Distribuição dos profissionais da saúde segundo identificação das serpentes pelas fotos apresentadas

Identificada	Frequência	Percentagem
Sim	39	25,8
Não	112	74,2
Total	151	100,0

Fonte: Questionário aplicado aos profissionais de saúde dos hospitais das Províncias seleccionadas

Nos casos em que as identificaram (39), os gêneros mais frequentemente envolvidos foram as *Dendroaspis*, as *Bitis* e as *Najas* (Tabela 6). Embora para uma amostra de estudo cinco vezes superior à do nosso, Chafiq et al (2016) verificaram em Marrocos, que de um total de 873 casos apenas em 54 (6,2%) as serpentes foram identificadas, sendo este resultado inferior ao da presente pesquisa.

Tabela 6: Distribuição dos profissionais da saúde segundo identificação das serpentes pelas fotos apresentadas

Nome da Serpente	Frequência	Percentagem
<i>Bitis arietans</i>	9	23,0
<i>Bitis gabonica</i>	2	5,1
<i>Dendroaspis polylepis</i> (Mamba negra)	11	28,2
Mamba verde	8	20,5
<i>Naja nigricollis</i>	8	20,5
Várias	1	2,5
Total	39	100,0

Fonte: Questionário aplicado aos profissionais de saúde dos hospitais das Províncias seleccionadas

A *Dendroaspis polylepis*, mais conhecida por mamba negra, foi a que com maior frequência foi identificada (28,2 %), seguida da *Bitis arietans* (23%). No estudo de Chafiq et al., 2016, realizado em Marrocos, 33,4% das serpentes identificadas eram da família Colubridae. Esta família é constituída de serpentes que, geralmente, são consideradas não peçonhentas e 16,6% eram *Bitis arietans* (Chafiq et al., 2016). Chama a atenção o facto de que a coloração de alguns colubrídeos, e até sua fisionomia, ser muito parecida à da mamba negra *Dendroaspis polylepis* (só se diferencia dos colubrídeos pela coloração negra do interior da boca); provavelmente, no nosso estudo, a identificação referindo-se à mamba era de colubrídeos.

Respeitante ao local da mordedura, mais frequentemente referida pelos profissionais da saúde, os pés e pernas foram as regiões vulneráveis às picadas (Tabela 7). Num estudo idêntico ao nosso realizado em Kédougou, região este do Senegal, 85% dos casos não especificaram o local da mordedura (Lam, Camara, Kane, Diouf, & Chippaux, 2016).

Tabela 7: Distribuição segundo local da picada referida

Local	Número	Frequência (%)
Membros (múltiplas picadas)	3	1,9
Membro superior	4	2,6
Cabeça	5	3,3
Coxa	1	0,6
Mão	11	7,2
Olhos	2	1,3
Pé	52	34,4
Perna	56	37,0
Tronco	2	1,3
Não refere o local	15	9,9
Total	151	100,0

Fonte: Questionário aplicado aos profissionais de saúde dos hospitais das Províncias seleccionadas

Nas Tabelas 8,9,10,11 e Figura 31 observam-se, em ordem de frequência, as manifestações clínicas referidas pelos profissionais da saúde, tendo sido as manifestações locais referentes ao local da picada as mais frequentes, seguidas em ordem pelas manifestações de neurotoxicidade, manifestações sistémicas e oftalmopáticas.

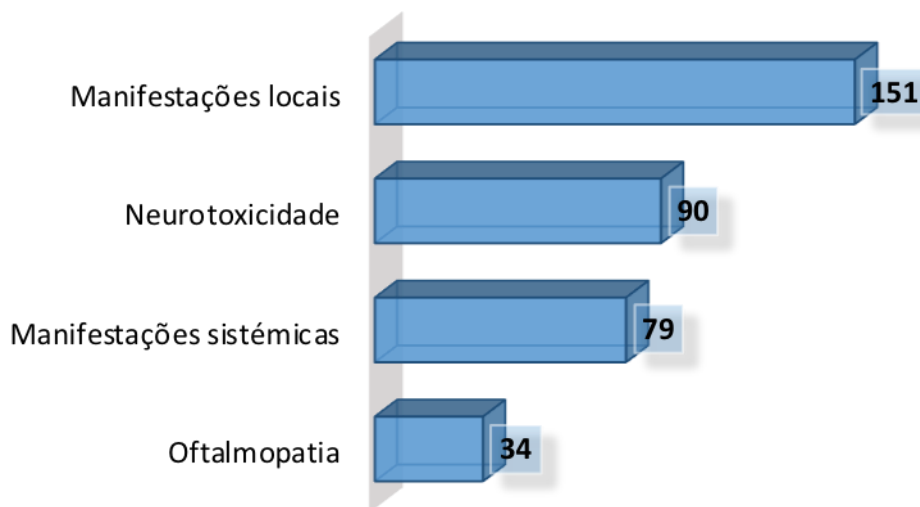


Figura 31: Distribuição percentual das manifestações clínicas referidas pelos inquiridos em casos de mordeduras por serpentes

Fonte: Tabelas 8, 9, 10 e 11.

As manifestações na região da mordedura, mais frequentemente relatadas, foram a dor (74,8%), o edema (48,3%) e a equimose (15,9%) (Tabela 8). Relativamente às manifestações oftálmicas, 22,5% dos inquiridos relataram-na, tendo sido a dor ocular a mais referida (11,3%) (Tabela 9). Em relação aos sinais de neurotoxicidade, 59,6% dos inquiridos referiram sintomas, sendo as câibras e a sensação de formigueiro (17,9%) com a visão turva ou diplopia (14,6%), as principais manifestações nos casos de neurotoxicidade (Tabela 10).

Em relação às manifestações sistêmicas poderá ser observado na (Tabela 11) que 79 dos inquiridos (52,3%) apresentaram-nas. No estudo de Chafiq et al., (2016), realizado em Marrocos, 57,5% dos sintomas mais frequentes decorrentes de mordedura de viperídeos foram dor, edema, equimose e necrose.

Tabela 8: Distribuição percentual das manifestações clínicas na região da picada referidas pelos profissionais

Manifestações locais	Número	Frequência (%)*
Dor	113	74,8
Equimose	24	15,9
Edema	73	48,3
Necrose	16	10,6
Bolhas	14	9,3
Hemorragia local	35	23,1
Total	151	100,0

Fonte: Questionário aplicado aos profissionais de saúde dos hospitais das Províncias selecionadas

Tabela 9: Distribuição percentual das manifestações clínicas oftalmopáticas referidas pelos profissionais

Manifestações oculares	Número	Frequência (%) Percentagem*
Dor ocular	17	11,3
Infeção conjuntival	6	4,0
Edema conjuntival	6	4,0
Erosão da córnea	3	2,0
Dificuldades em abrir os olhos e ver	1	0,7
Visão turva	1	0,7
Total	34	22,5

Fonte: Questionário aplicado aos profissionais de saúde dos hospitais das Províncias seleccionadas

*percentagem sobre 151

Tabela 10: Distribuição percentual das manifestações clínicas de neurotoxicidade referidas pelos profissionais

Manifestações de neurotoxicidade	Número	Frequência (%) *
Dificuldade de mastigação e deglutição	12	7,9
Visão turva ou diplopia	22	14,6
Fasciculações	8	5,3
Cãibras e sensação de formigueiro	27	17,9
Parestesias	7	4,6
Convulsões	4	2,6
Calafrios	2	1,3
Agitação psicomotora	1	0,7
Confusão mental	1	0,7
Rigidez	2	1,3
Tonturas	2	1,3
Dificuldade em respirar	1	0,7
Sialorréia	1	0,7
Total	90	59,6

Fonte: Questionário aplicado aos profissionais de saúde dos hospitais das Províncias seleccionadas

*percentagem sobre 151

Em relação às manifestações sistémicas, 79 dos inquiridos (52,3%) referiram tais sintomas e sinais. Deles, as mialgias e as consequências hemodinâmicas foram as mais frequentes a ser verificadas com 15,2% e 13,9%, respetivamente. (Tabela 11).

Tabela 11: Distribuição percentual das manifestações sistêmicas referidas pelos profissionais

Manifestações sistêmicas	Número	Frequência (%)*
Hemorragias (epistaxe, gengivorragia ou outros sangramentos)	10	6,6
Consequências hemodinâmicas (hipotensão e choque)	21	13,9
Mialgias	23	15,2
Vômitos, diarreias	12	7,9
Renais (Oligúria, anúria, urina escura)	9	6,0
Febre	1	0,7
Arritmias	3	2,0
Total	79	52,3

Fonte: Questionário aplicado aos profissionais de saúde dos hospitais das Províncias selecionadas
*percentagem sobre 151

Em muitos casos (54,9%), realizaram-se tratamentos tradicionais pré-hospitalares, fundamentalmente cortes no local da mordedura, aplicação de folhas da mata e outros (anexo 7). No estudo de Lam et al. (2016), realizado no Senegal, foram tratados pré-hospitalarmente 121 casos pelos líderes tradicionais, no entanto, a evolução favorável foi de 17,2% e para a morte de 2,4% (Lam et al., 2016).

Tabela 12: Opinião dos profissionais da saúde sobre tratamento pré-hospitalar que recebem os casos com acidentes ofídicos

Tratamento Pré-hospitalar	Frequência	Percentagem
Não	39	25,8
Sim	83	54,9
Desconhece	29	19,2
Total	151	100,0

Fonte: Questionário aplicado aos profissionais de saúde dos hospitais das Províncias selecionadas
*percentagem sobre 151

Somente alguns casos procuraram os serviços médicos; o tratamento hospitalar efetuou-se em 74 casos (49%), dos quais mais de metade (49: 66,21%) foram assistidos nos bancos de urgência. Realizaram-se apenas 22 testes de laboratório e assistidos 7 casos (9,45%) na terapia intensiva; nos casos mais graves ocorria o desfecho fatal por

complicações e falta de um antídoto adequado (90% dos relatos referem a não existência do mesmo). Estes resultados são similares aos do estudo de Lam et al., (2016) em que se verificou que de um total de 122 casos, mais da metade recebeu tratamento pré hospitalar, sendo que 1 em cada dez pacientes receberam tratamento hospitalar.

Tabela 13: Tratamento hospitalar relatado pelos profissionais da saúde

Tratamento hospitalar	Frequência	Porcentagem
Banco de Urgência	49	32,4
Internamento normal	18	11,9
Terapia intensiva	7	4,6
Não	77	50,9
Total	151	100,0

Fonte: Questionário aplicado aos profissionais de saúde dos hospitais das Províncias selecionadas

*percentagem sobre 151

Relativamente ao apresentado na Tabela 14, 38 (25,2%) dos inquiridos referiram complicações tendo sido infeção (11,2%) e insuficiência respiratória (7,9%) as que maior percentagem apresentaram.

Tabela 14: Principais complicações referidas pelos inquiridos

	Frequência	Porcentagem*
Choque	1	0,6
Dificuldade em caminhar	2	1,3
Dores nos olhos e secreções	1	0,6
Gangrena	1	0,6
Infeção	18	11,2
Necrose muscular	2	1,3
Necrose cutânea	2	1,3
Síndrome compartimental	1	0,6
Insuficiência renal	2	1,3
Insuficiência respiratória	12	7,9
Total	38	25,2

Fonte: Questionário aplicado aos profissionais de saúde dos hospitais das Províncias selecionadas

*percentagem sobre 151

A maior percentagem dos inquiridos referiu a cura dos pacientes (65,5%), embora 10% terminaram em óbitos (Tabela 15). No estudo de Lam et al. (2016) não são mostrados dados sobre a evolução em 71 % dos casos, tendo sido referido melhoria em 26% dos

mesmos, sequelas em 2% dos casos e 1 % terminando em óbito. Estes resultados são discordantes aos do presente trabalho em que os valores são superiores.

Tabela 15: Descrição da evolução do envenenamento por serpentes referida pelos inquiridos

Evolução	Frequência	Porcentagem
Amputação	4	2,6
Cura	99	65,5
Deformação cicatricial	11	7,2
Óbito	15	9,9
Desconhecida	22	14,5
Total	151	100,0

Fonte: Questionário aplicado aos profissionais de saúde dos hospitais das Províncias selecionadas
*percentagem sobre 151

Tabela 16: Testes laboratoriais referidos pelos profissionais da saúde

Estudos laboratoriais	Alterado	Normal	Não realizado
Tempo de coagulação – TC	2 1,3%	9 5,9%	140 92,7%
Creatinoquinase - CPK	4 2,6%	3 1,9%	144 95,3%
Desidrogenase láctica – DHL	2 1,3%	2 1,3%	147 97,3%

Fonte: Questionário aplicado aos profissionais de saúde dos hospitais das Províncias selecionadas
*percentagem sobre 151

Os exames laboratoriais como tempo de coagulação, creatinoquinase e desidrogenase láctica foram realizados em mais de 90 % dos pacientes, apresentando alterações em 1,3%, 2,6 % e 1,3% dos casos, respetivamente.

Tabela 17: Frequência - Tratamento com soro antiofídico

Tratamento	Frequência	Porcentagem
Não	122	80,7
Sim	12	7,9
Desconhece	17	11,2
Total	151	100,0

Fonte: Questionário aplicado aos profissionais de saúde dos hospitais das Províncias selecionadas
*percentagem sobre 151

Em relação ao tratamento com soro antiofídico, dos 151 inquiridos, apenas 12, o que correspondeu a 7,9%, utilizou o soro. No estudo de Chafiq et al. (2016), 41 pacientes receberam soro antiofídico, sendo que 38 casos evoluíram bem e três faleceram mesmo com a administração deste. Já no estudo de Lam et al. (2016), beneficiaram da administração deste 19% dos casos. Nos resultados conclusivos da 6ª Conferência internacional de Abidjan, sobre envenenamentos por serpentes e escorpiões em 2015, verificou-se que na maior parte dos países Africanos participantes, os antivenenos disponíveis eram inadequados (Chippaux et al., 2016) e, em 1998, Chippaux assumia que menos de 25% das necessidades de antiveneno eram cobertas e na maioria dos pacientes as doses eram insuficientes (Chippaux, 1998).

2.3.4 - Relato da estratégia de prevenção de mordeduras de serpentes na comunidade (expedição Ndala Lutangila)

Com a expedição Ndala Lutangila a equipa percorreu as Províncias de Cuanza Sul, Benguela, Huíla e Malanje, conforme mapa em Anexo 8.

A primeira foi a Província do Cuanza Sul partindo de Luanda, especificamente ao município de Porto Amboim, para a primeira fase do estudo. Foram pesquisadas várias comunas de Porto Amboim, tendo sido realizado nestas comunidades a busca ativa de serpentes venenosas vivas. Foram realizadas entrevistas para coletar relato de experiências, com acidentes com serpentes venenosas, e foram entregues cartazes e folhetos para a promoção e prevenção dos mesmos (Anexo 9). Também foi colocada uma placa de aviso sobre área de perigo de mordeduras na comunidade de Conda (Anexos 10 e 11).

Com a ajuda da população foram capturadas duas serpentes vivas, uma *Naja nigricollis*, da qual se extraiu 1200 µl de veneno e que morreu em seguida, e um colubrídeo, que foram levados para serem guardados na coleção do CIMETOX (Anexo 12).

Na Província de Benguela, ministrou-se a primeira conferência para a formação do pessoal médico no Hospital Provincial de Benguela. Foram entregues cartazes e folhetos informativos.

No município de Caimbambo, visitou-se o Hospital Municipal, onde houve troca de impressões com os funcionários e profissionais que tiveram alguma experiência com pacientes com mordeduras de serpentes (Anexo 13). Colocou-se a segunda placa de aviso e foram visitadas várias comunas e bairros, onde se realizaram as mesmas atividades que nas anteriores, sempre com a aprovação das autoridades governamentais e tradicionais, em cada uma das comunas e bairros visitados. Numa delas, foi desenterrada uma serpente *Bitis gabonica* que tinha sido capturada e morta por camponeses no dia anterior, enquanto trabalhavam na lavra. Por não estar descrita na literatura mundial a existência de *B. gabonica* ao sul de Angola, tal fato foi registrado no artigo publicado no periódico *The Herpetological Bulletin* (Oliveira et al., 2016) (Anexo 14).

Na Província da Huíla, assistiu-se a uma emergência por mordedura de serpente ocorrida no bairro da Lage, localizado na cidade do Lubango (Anexo 15). A equipa foi mobilizada e forneceu-se assistência médica à paciente. Foram aconselhados os parentes da paciente e funcionários da clínica quanto às medidas preventivas, em tais casos, e distribuídos cartazes e folhetos. Realizou-se busca ativa de serpentes e trabalho educativo para a promoção e prevenção no bairro da Lage, onde reside a paciente que foi assistida.

Apresentou-se uma conferência que teve lugar no Hospital Provincial da Huíla; todas estas ações foram divulgadas pelos órgãos de comunicação de forma massiva (Anexo 16).

No município da Matala, realizou-se igualmente uma conferência e a atividade de promoção, que tiveram lugar no Hospital Municipal da Matala. Foram visitados alguns bairros nas comunas de Npindi e Micosse, onde se realizou a captura ativa de serpentes e a promoção da educação da população até anoitecer em áreas de difícil acesso. Houve enorme apoio e aceitação das pessoas, especialmente na comuna de Npindi, onde a

autoridade tradicional, o Soba, reuniu todas as pessoas e inquiriu-se 18, sendo as próprias vítimas de mordedura de serpentes (Anexo17).

Motivados a deslocar-se ao município de Calandula, já na Província de Malanje, foi realizada pesquisa ativa e trabalho comunitário em locais de difícil acesso de Calandula, na comuna de Mufuma Selalo, no bairro de Chinganeca, o que resultou na captura de dois espécimes vivos do gênero *Bitis* (*B. arietans* e *B. gabonica*). (Anexo 18 e 19).

Em Malanje apresentou-se a conferência e entrega de materiais educativos e Inquiritos para os profissionais da saúde, tendo terminado a atividade com a extração do veneno das *Bitis* encontradas no dia anterior, no Serpentário do CIMETOX.

Durante a digressão em Malanje ocorreu um caso clínico dramático em que a vítima era um menino de 10 anos que foi picado por uma serpente do gênero *Bitis*. As circunstâncias do acidente, os sintomas clínicos, os detalhes do tratamento e da evolução do caso, permitiram-nos analisar o estado dos acidentes ofídicos como uma doença negligenciada, uma "doença da pobreza" em Angola.

O paciente, sem antecedentes patológicos, era de Cangandala, um Município que dista a 30 km da cidade de Malanje, foi picado na mão direita por uma *Bitis arietans*, tendo sido levado para o CIMETOX. Após 20 horas do incidente que ocorreu quando ele estava no campo a tentar capturar ratos em buracos. Durante o exame físico geral apresentava astenia com membranas mucosas pálidas, e com os seguintes sinais vitais: afebril, normotenso; frequência cardíaca (120 batimentos / min) e respiração foram consideradas normais. Ele estava consciente e orientado. O exame físico local revelou intensa dor ao toque e inchaço no braço direito, mais evidente na sua mão e antebraço. Ao lado do polegar, a mão apresentava área sem pele e com necrose superficial; uma lesão com sangramento que não parava, mesmo após a compressão digital local.



Figura 32 e 33: Local da picada por *Bitis arietans*.

Foto: Paula Oliveira

O paciente foi transferido para o Hospital Geral de Malanje com uma recomendação, por escrito, das medidas de primeiros socorros a tomar nestes casos nomeadamente: a lavagem da área afetada com água e sabão; desinfecção com peróxido de hidrogénio; realização de testes de laboratório, tais como, hemograma, testes de coagulação, função renal; administração da vacina contra o tétano; antibioticoterapia e avaliação para a administração do antiveneno.

Após 48 horas, a criança foi encontrada numa sala de ortopedia com a mão envolta em compressas. Solicitou-se a remoção das mesmas porque aumentariam o risco de necrose. O sangramento não parou, e houve uma maior área de necrose perto do polegar com edema em todo o membro superior direito e no rosto.

Os testes laboratoriais mostraram 5,7 g / dl de hemoglobina, neutrofilia, o tempo de sangramento foi 5'30 " (Sistema de Duke), e o tempo de coagulação foi 11'00 " (Lee-Whie). Os testes de função renal não foram realizados, mas o volume de urina do paciente era escasso. A 20 WBCT (20-min Whole Blood Clotting Test) (Teste de coagulação de sangue total em 20 minutos) foi realizada e o sangue não coagulava. O tratamento consistiu em hidratação, antibióticos e analgesia. Devido aos resultados que levaram ao diagnóstico de coagulopatia e sinais de deterioração da função renal foi sugerido o internamento na unidade de terapia intensiva e a administração do antiveneno. O antiveneno existente no hospital era produzido na Índia e comercializado para a África Central e não incluía o veneno da *Bitis arietans*.

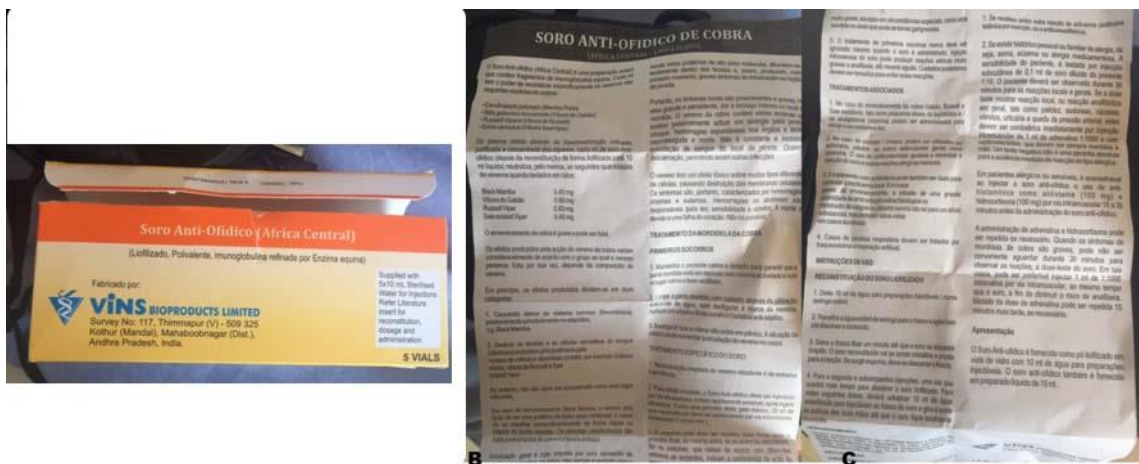


Figura 34 e 35: Antiveneno disponível no Hospital Geral de Malanje.
Foto: Paula Oliveira

O CIMETOX forneceu 4 frascos de soro polivalente Saimir que tem na sua composição o veneno de *Bitis arietans* e coordenou o acompanhamento adequado e a soroterapia precoce. No entanto, quando o tratamento estava pronto para ser iniciado, a criança não pôde ser encontrada no hospital, porque seus pais haviam levado a fim de seguir um tratamento tradicional.

As *Bitis arietans*, juntamente com as *Dendroaspis polylepis* e *Najas*, são as espécies de serpentes africanas mais frequentemente envolvidas em situações de acidentes ofídicos em humanos e nos animais domésticos. As consequências mais comuns deste tipo de acidente são dor e inchaço do membro afetado, com as marcas das presas do animal. A neutrofilia é comum se houver envenenamento. A ocorrência de anemia e insuficiência renal também são consequências comuns. A morte não é um evento raro em acidentes envolvendo esta espécie.

Em suma, foram percorridos 1350 km entre as Províncias de Cuanza Sul, Benguela, Huíla e Malanje (Anexo 10) e visitadas várias comunas de, pelo menos, 2 municípios de cada uma, inquiridas mais de 260 pessoas entre profissionais de saúde e população de áreas de risco, a maior parte camponeses e pastores. Apresentaram-se 5 conferências magistras sobre a importância da problemática nas principais unidades de saúde e o seu manuseio, nas referidas Províncias, com a participação de um total de 350 profissionais de saúde como médicos e enfermeiros. Colocaram-se placas de aviso de perigo de mordeduras de serpentes nas áreas de maior risco, foram distribuídos folhetos e pósteres sobre como prevenir o aparecimento de serpentes, que prevenção adotar contra os acidentes ofídicos e as medidas adequadas para atenção dos primeiros socorros desencorajando as práticas tradicionais de tratamento, amplamente utilizadas pelas populações.

De forma geral, o resultado das entrevistas mostraram que as comunidades dessas regiões conheciam as diferentes espécies, haviam tido experiência com mordeduras de serpentes. Tais comunidades realizavam tratamento tradicional, que consistia nas inúmeras práticas que vão desde aplicação de folhas, pedra negra, o próprio animal na lesão, que não são as adequadas, segundo as normativas de procedimentos de saúde, referenciados na literatura científica, e nem tinham pessoal treinado para intervir no caso de tal ocorrência. (Anexo 7)

2.4.3 - Análise e discussão da estratégia

Os resultados conclusivos da 6ª Conferência Internacional de Abidjan sobre envenenamento por serpentes e escorpiões, realizada em 2015, mostraram que na maior parte dos países Africanos participantes, os antivenenos disponíveis eram inadequados (Chippaux et al., 2016), o que está de acordo com as observações do presente estudo. Nesse mesmo encontro, realizou-se um workshop onde foram treinados mais de 200 profissionais de saúde por herpetologistas, epidemiologistas, toxicologistas sobre o conhecimento das manifestações clínicas e o manuseio terapêutico de mordeduras de serpentes (Lam et al., 2016). Uma das conclusões a que se chegou na 6ª Conferência de Abidjan foi de que mais da metade das vítimas de mordeduras por serpentes, inicialmente procuram os terapeutas tradicionais (Chippaux et al., 2016).

Segundo as deliberações e conclusões da Conferência sobre os mecanismos para reverter a negligência na saúde pública com as mordeduras de serpentes realizada em Hinxton, onde foram delineadas ações prioritárias para a redução da mortalidade e morbidade e o peso sócio económico das mesmas, estão: a) Conhecer a real incidência global das mordeduras de serpentes, dados de mortalidade e morbidade e projetar campanhas de saúde pública; b) Promoção de i) campanhas de educação preventiva; (ii) sistemas de transporte para melhorar o acesso aos hospitais e (iii) estabelecimento de instalações regionais para testagem de antiveneno para garantir a eficácia e segurança dos mesmos; c) Exploração para identificação de modelos de investimento para a produção de antivenenos para cobertura de determinadas regiões; d) Estabelecimento de i) programas para treinamento de primeiros socorros, manuseio hospitalar das vítimas por mordeduras de serpentes, ii) rede clínica para gerar orientações de tratamento e sistema de ensaios clínicos para melhorar o manuseio clínico das mesmas; e) desenvolvimento de i) novos tratamentos sistêmicos e para destruição tecidual local e ii) *kits* de diagnóstico simples e acessíveis para melhorar a precisão e rapidez do tratamento; f) elaboração e implementação de intervenções para ajudar as pessoas e comunidades afetadas por sequelas físicas e psiquiátricas das vítimas de mordeduras de serpentes (Harrison & Gutiérrez, 2016). Durante o período que decorreu a estratégia por todas as Províncias em que se trabalhou realizaram-se ações coincidentes com as diretrizes emanadas na Conferência supracitada.

Durante a 6ª Conferência Internacional sobre envenenamentos de serpentes e escorpiões em África, ocorrida em Abidjan de 1 a 5 de Junho de 2015 verificou-se que

em países como Côte d'Ivoire e Burkinafaso, as mordeduras por serpentes são de notificação obrigatória (Lam et al., 2016; Gampini et al., 2016).

Esforços têm sido feitos por Angola participando em encontros internacionais para a chamada de atenção sobre esta problemática no país, nomeadamente no encontro decorrido em Hinxtton em 2015 sobre os “Mechanisms to Reverse the Public Health neglect of snakebite victims” (Harrison & Gutiérrez, 2016) e, em Genebra, na 69th World Health Assembly, em Maio de 2016, juntamente com mais 20 países membros da OMS, para que as mordeduras fossem introduzidas na lista de doenças tropicais negligenciadas, tendo sido apresentada no Side Event, a situação em Angola com a comunicação intitulada “Efforts to address snakebite in Angola” (Anexo 20)

Felizmente, tal facto ocorreu em 2017 com a reintrodução das mesmas na lista de doenças tropicais negligenciadas da OMS (World Health Organization, 2017).

Em todos os cenários visitados houve participação ativa da comunidade, nas diferentes palestras ministradas com participação governamental e dos diferentes sectores das Províncias visitadas. A propósito do acima exposto, o próximo capítulo tratará sobre a caracterização bioquímica dos venenos das serpentes capturadas.

2.5 - Conclusões do capítulo

1. O instrumento de medição documental, proposto para medir o nível de conhecimento, teve validade de conteúdo o que garante a confiabilidade do mesmo.
2. Existe pouca experiência de profissionais da saúde sobre a ocorrência de mordeduras de serpentes, e pouco conhecimento em relação à nomenclatura das mesmas e sua identificação perante fotos (imagens).
3. As manifestações locais no local da picada (dor) são as mais frequentes, seguidas pelas manifestações de neurotoxicidade (parestesias), manifestações sistémicas (mialgias) e oftalmopatia (dor ocular).

4. Em relação ao perfil terapêutico, existe maior frequência de acidentados com mordeduras de serpentes com tratamento pré-hospitalar, em relação a tratamento institucional, e estes não recebem soro antiofídico, como ação emergente, embora a maior percentagem tenha evoluído para a cura.

5. A estratégia de intervenção comunitária caracterizou-se pela multidisciplinariedade e intersectorialidade com apoio governamental, ao chegar aos diferentes bairros com material de apoio para a promoção e prevenção de acidentes ofídicos.

CAPÍTULO 3 - CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DOS VENENOS DE SERPENTES ANGOLANAS

3.1 - Introdução

O envenenamento por serpentes tem sido um problema subestimado e negligenciado em saúde pública, que afeta muitos países no mundo (Chippaux, 2011; Gutiérrez et al., 2013). É responsável por um grande número de vítimas que podem evoluir para morte, principalmente nas áreas rurais, onde estas comunidades são as que mais sofrem por viverem longe dos serviços de saúde que geralmente estão, inadequadamente, equipados para atender estas emergências médicas (Ainsworth et al., 2018). Além disso, tem um grande impacto socioeconómico nas populações mais pobres que habitam as zonas rurais e tropicais da África, Ásia, Oceânia e América Latina, causando morbidade, mortalidade e sofrimento social (Gutiérrez et al., 2016).

Nas nações desenvolvidas, os acidentes com animais peçonhentos ocorrem, habitualmente, no decorrer de atividades recreativas, ao passo que, nos países em vias de desenvolvimento, esta é uma doença laboral, com maior probabilidade de afetar jovens trabalhadores agrícolas, sobretudo homens. Estima-se que existam no mundo cerca de 3000 espécies de serpentes (Gold et al., 2002; Pough, Heiser, & McFarland, 2008; Vidal & Hedges, 2005), sendo que 15% destas são capazes de provocar acidentes graves envolvendo humanos (Gold et al., 2002).

As serpentes peçonhentas pertencem à super família Colubroidea, que é dividida em quatro famílias: Viperidae, Elapidae, Colubridae e Atractaspididae (Pough et al., 2008). Na família Viperidae encontram-se serpentes dos gêneros Bitis (Hamako et al., 1996), Bothrops (Fenwick, Gutberlet, Evans, & Parkinson, 2009), Crotalus (Barros et al., 2011), Lachesis (Felicori et al., 2003) entre outras. Na Elapidae encontram-se principalmente serpentes dos gêneros Dendroaspis (Vandenbergh et al., 2001), Micrurus, Naja (Slowinski et al., 1997); na Colubridae, os gêneros Philodryas, Thamnodynastes e Phalotris (Zaher et al., 2009), dentre outras, e na Atractaspididae, serpentes do gênero Atractaspis (Fox & Serrano, 2008).

As serpentes usam o seu veneno, principalmente, para caçar e não hesitam em empregá-lo de forma defensiva. Venenos são misturas complexas e estáveis de

componentes orgânicos, peptídicos e não peptídicos, como hexoses e lipídios, juntamente com componentes inorgânicos, com atividade enzimática, produzidos por um par de glândulas exócrinas especializadas (Lomonte & Calvete, 2017).

A pesquisa básica, pré-clínica, epidemiológica, desenvolvimento tecnológico e intervenção das políticas de saúde são de grande importância para a melhoria no tratamento dos acidentes envolvendo picadas de serpentes (Gutiérrez et al., 2006). O antiveneno, proveniente de fabricantes que utilizam imunogénicos de espécies não originárias dos países importadores, coloca a questão de quão apropriada é a eficácia do antiveneno para as espécies heterólogas ou não nativas, considerando os vários relatórios sobre as variações geográficas do veneno (Tan et al., 2015).

Tendo em conta que o antiveneno é o único tratamento definitivo para envenenamento de serpentes, essencialmente, a eficácia da neutralização do veneno depende das características moleculares e dos determinantes antigénicos das toxinas do veneno (Tan et al., 2015). Portanto, são relevantes os estudos que caracterizem os componentes dos venenos e o modo de ação dos mesmos, fornecendo desta forma subsídios para o estabelecimento de novas estratégias terapêuticas para os envenenamentos por serpentes e outros animais peçonhentos.

3.2 - Objetivos

Geral

- Caracterizar bioquimicamente os venenos de serpentes Angolanas de Malanje (Calandula e Mufuma) e Cuanza Sul.

Objetivos Específicos

- Descrever o perfil eletroforético e de glicolização das proteínas dos venenos das serpentes estudadas.
- Determinar a atividade proteolítica, fosfolipásica e hialuronidásica nos venenos.
- Detetar a presença ou ausência de atividade proteolítica assim como a magnitude da inibição da mesma nos venenos.

3.3 - Metodologia

3.3.1 - Serpentes e venenos

A população de estudo esteve constituída por venenos de 24 serpentes coletadas na expedição Ndala Lutangila das Províncias de Cuanza Sul e Malanje (incluindo os municípios de Mufuma e Calandula) (Tabela 18). Tais serpentes foram enviadas para o biotério do serpentário do Centro de Investigação e Informação de Medicamentos e Toxicologia de Malanje (CIMETOX) e acondicionadas em caixas plásticas transparentes forradas com papelão e água *ad libitum*.

Diariamente, as caixas eram vistoriadas e, sempre que necessário, eram limpas. Mensalmente as serpentes passaram pelo processo de extração do veneno. Para tal, as serpentes eram colocadas numa câmara de gás carbónico, a fim de ficarem mais letárgicas e poder-se realizar a extração com maior segurança, de forma manual, por compressão das glândulas. As coletas de veneno eram individuais. Após sete dias, as serpentes eram alimentadas com camundongos. Em caso de óbito, as serpentes eram encaminhadas para a coleção de herpetologia do próprio CIMETOX.

Para a caracterização bioquímica selecionou-se uma amostra com os venenos de 8 serpentes tendo em conta a espécie, procedência e o sexo (Tabela 19).

Tabela 18: Espécies de serpentes coletadas na expedição Ndala Lutangila sua distribuição, sexo, peso e quantidade de veneno extraído

Nº	Espécie	Procedência	Data	Crc (cm)	Ct (cm)	Sexo	Massa (g)	Volume veneno extraído (µL)
1	<i>Naja nigricolis</i>	C. Sul	18/03/15	140	27	Fêmea	1190	900,0
8	<i>Bitis arietans</i>	Mufuma	28/03/15	69	7	Macho	720	50,0
9	<i>Bitis gabonica</i>	Mufuma	29/03/15	118	8	Fêmea	2150	900,0
10	<i>Bitis arietans</i>	Mufuma	30/03/15	50	5	Fêmea	120	150,0
11	<i>Bitis gabonica</i>	Mufuma	30/03/15	108	12	Macho	2090	500,0
12**	<i>Bitis arietans</i>	Calandula	30/03/15	85	15	Macho	1110	100,0
13	<i>Bitis gabonica</i>	Mufuma	03/04/15	150	16	Fêmea	2070	400,0
14**	<i>Bitis arietans</i>	Mufuma	03/04/15	69	7	Fêmea	580	100,0
15	<i>Naja nigricolis</i>	Mufuma	03/04/15	141	30	Fêmea	1050	400,0
16	<i>Bitis arietans</i>	Mufuma	28/04/15	80	10	Fêmea	10009	500,0
17	<i>Bitis arietans</i>	Mufuma	28/04/15	93	10	Fêmea	650	200,0
9	<i>Bitis gabonica</i>	Mufuma	28/04/15	118	7	Fêmea	2150	800,0
18**	<i>Bitis arietans</i>	C. Sul	28/04/15	59	5	Fêmea	250	20,0

19	<i>Bitis gabonica</i>	Mufuma	04/05/15	118	8	Macho	2100	50,0
20	<i>Bitis arietans</i>	C. Sul	06/06/15	80	10	Fêmea	900	600,0
21**	<i>Bitis arietans</i>	C. Sul	06/06/15	55	6	Fêmea	200	100,0
22	<i>Bitis arietans</i>	C. Sul	06/06/15	93	7	Fêmea	1600	900,0
23**	<i>Bitis arietans</i>	C. Sul	06/06/15	65	5	Fêmea	250	100,0
24	<i>Bitis arietans</i>	C. Sul	06/06/15	104	13	Fêmea	1750	500,0

*Serpentes em que foi possível a extração de veneno mais que uma vez.

Crc (comprimento do corpo) Ct (comprimento da cauda)

Tabela 19- Espécies selecionadas para a caracterização bioquímica do veneno

Nº	ESPÉCIE	PROCEDÊNCIA	SEXO	IDADE	CRC (cm)	CT(cm)
1	<i>Naja nigricollis</i>	Cuanza Sul	Fêmea	Adulto	141	30
2	<i>Naja nigricollis</i>	Mufuma Malanje	Fêmea	Adulto	140	27
3	<i>Bitis arietans</i>	Mufuma Malanje	Macho	Adulto	69	7
4	<i>Bitis arietans</i>	Mufuma Malanje	Fêmea	Jovem	50	5
5	<i>Bitis arietans</i>	Calandula	Macho	Adulto	85	15
6	<i>Bitis arietans</i>	Cuanza Sul	Fêmea	Adulto	59	5
7	<i>Bitis gabonica</i>	Mufuma Malanje	Macho	Adulto	108	12
8	<i>Bitis gabonica</i>	Mufuma Malanje	Fêmea	Adulto	118	8

3.3.2 - Composição proteica dos venenos

A determinação da concentração proteica dos venenos foi realizada pelo método BCA (Bicinchoninic Acid) (Protein Assay Kit, Pierce Biotechnology Inc., EUA). Os procedimentos foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante.

3.3.3 - Eletroforese

O perfil eletroforético das amostras dos venenos (30 µg) foi avaliado em gel de SDS-PAGE, em gradiente de concentração de 8 a 16% (Amersham ECL Gel 8-16%, 10 wells, GE Healthcare Life Sciences), segundo o método descrito por Laemmli (1970), em condições redutoras e não redutoras. A corrida eletroforética foi realizada a 120 V no sistema Amersham ECL Gel Running (GE Healthcare Life Sciences) em tampão de eletroforese (Tris-Glicina-SDS). A coloração do gel foi feita pelo método de impregnação por prata (Morrissey, 1980).

3.3.4 - Análise do perfil de glicosilação das proteínas dos venenos

O perfil de glicosilação das proteínas dos venenos (30 µg) foi avaliado por *Western Blot* lectina seguindo-se a metodologia descrita por Tanaka et al. (2010), com algumas modificações. Para tanto, as proteínas do veneno foram separadas em géis de SDS-PAGE a 12% e eletrotransferidas para membranas de Nitrocelulose (Thermo Scientific®), como descrito por Towbin et al. (1979). As membranas foram bloqueadas com 5% BSA em PBS (Sigma, EUA) por 2 horas a 37°C e, posteriormente, incubadas com as lectinas ConA (Concanavalina A-Sigma, EUA) ou WGA (Wheat Germ- Lectin from *Triticum vulgare*, Sigma, EUA), conjugadas com peroxidase (1:1000 e 1:2000, respectivamente), em solução PBS-BSA 0,01%, durante 1 hora, à temperatura ambiente. Ao término desta incubação, as membranas foram lavadas 3 vezes em PBS-Tween 20 0,05%. A revelação das bandas, contendo resíduos de açúcar, foi realizada pela adição de 20 mg/ml de DAB (3,3'- diaminobenzidina- Sigma, EUA). As bandas glicosiladas tiveram suas massas moleculares estimadas pelo programa Gel Logic 100 Imaging System Kodak.

3.3.5 - Análise da Atividade Proteolítica

A atividade proteolítica dos venenos das serpentes de Angola foi avaliada em ensaios utilizando substratos peptídicos de fluorescência apagada (FRET - Fluorescence Resonance Energy Transfer), seguindo os procedimentos descritos por (Araujo et al., 2000) e as leituras realizadas em espectrofluorímetro (Victor 3™, Perkin – Elmer, Massachusetts, EUA). Para tal, o peptídeo Abz-FRSSRQ-EDDnp foi dissolvido em 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e, posteriormente, diluído em água Milli-Q de modo a permitir a utilização de volumes sem que a concentração do solvente orgânico ultrapassasse 5% do volume final de incubação (100 µL). Para o ensaio, amostras dos venenos (1 µg) de todos os venenos, exceto da *B. arietans* macho de Mufuma|Malanje, para o qual foi utilizado (0,25 µg), foram incubadas com amostras dos peptídeos (5,0 µM) em solução salina tamponada (PBS, pH 7,4), utilizando placas de 96 poços, e analisadas em espectrofluorímetro nos comprimentos de onda de excitação e emissão de ($\lambda_{EM}=420$ nm e $\lambda_{EX}=320$ nm), respetivamente. A temperatura da reação foi mantida a 37 °C em compartimento Termo estabilizado, sob agitação. O aumento da fluorescência foi monitorado, continuamente por 30 minutos, e a atividade proteolítica específica dos venenos expressa como µM de substrato clivado por minuto por micrograma de veneno (U/µg), sendo calculada pela fórmula: Velocidade de hidrólise (µM/min) / [prot] (µg).

A inibição relativa foi determinada em paralelo utilizando, nos ensaios, 5 mM de PMSF ou 5 mM de 1,10-fenantrolina (FEN), com período de incubação de 30 minutos. A

percentagem de inibição foi calculada comparando-se as atividades proteolíticas obtidas na presença ou ausência dos inibidores.

3.3.6 - Atividade Fosfolipásica

A detecção de atividade PLA₂, nos diferentes venenos de serpentes angolanas, foi realizada por meio de ensaio fluorimétrico, utilizando-se o EnzChek Phospholipase A₂ Assay Kit (Invitrogen, MA, EUA). Os experimentos foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante. Amostras dos diferentes venenos, diluídas em 50 µL de tampão de reação, foram incubadas com 50 µL de solução contendo 10 mM de dioleoilfosfatidilcolina e 10 mM de dioleoilfosfatidilglicerol. O aumento nos valores de fluorescência foi avaliado no leitor FLUOStar Omega (BMG Labtech, Ortenberg, Alemanha) nos comprimentos de onda de excitação e emissão $\lambda_{EM}=515$ nm, $\lambda_{EX}=485$ nm respectivamente, a 37°C e durante 10 minutos. Os resultados foram expressos como atividade específica (UF/min/µg de veneno).

3.3.7 - Atividade Hialuronidásica

A atividade hialuronidásica foi avaliada pelo método turbidimétrico descrito por Purkittayamee et al. (1988), com algumas alterações. Amostras dos venenos das serpentes de Angola (20 µg) foram incubadas, por 15 minutos a 37°C, com 400 µL de tampão acetato (200 mM acetato de sódio e 0,15 M de cloreto de sódio, pH 6,0) e 100 µL de ácido hialurônico (1mg/mL), para um volume final de 500 µL. Após a incubação, adicionou-se 1 mL de tampão para interromper a reação (brometo de cetiltrimetilamônio a 2,5% em NaOH 2%). O controlo negativo, correspondente a 100% de turbidez, foram 500 µL de tampão acetato e 1 mL de brometo de cetiltrimetilamônio e o de 100% de turbidez, 400 µL de tampão acetato, 100 µL de ácido hialurônico e 1 mL de tampão brometo de cetiltrimetilamônio. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro Multiskan EX (Labsystems, Finlândia) a λ 405 nm. A atividade específica (AE) foi expressa em unidades de redução de turbidez (URT) por mg de veneno e calculada pela seguinte fórmula: $AE = \% \text{ de redução de turbidez} / \text{hidrólise de } 50\% \text{ do substrato} / \text{concentração de veneno}$.

3.3.8 - Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão e analisados estatisticamente com o auxílio do programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, CA, EUA). As comparações de mais de dois grupos em relação a uma variável foram analisadas por One Way ANOVA, para as comparações entre mais de dois grupos em relação a duas ou

mais variáveis foi utilizado o teste Two Way ANOVA, seguido pelo teste post-hoc de Tukey HSD ou pelo teste de Bonferroni. Quando comparados apenas dois grupos foi utilizado o teste *t* de Student.

3.4 - Análise e Discussão dos resultados

Neste capítulo serão analisados e discutidos os resultados obtidos neste estudo em relação ao conteúdo proteico, perfil eletroforético e de glicosilação das proteínas, atividade proteolítica, fosfolipásica e hialuronidásica dos venenos das serpentes Angolanas estudadas.

3.4.1 - Conteúdo proteico dos venenos

A Tabela 20 mostra a percentagem de proteínas presentes nos venenos analisados neste estudo.

Tabela 20- Conteúdo proteico dos venenos

Espécie	Proteína [%]
<i>N. nigricollis</i> fêmea: Cuanza Sul	96
<i>N. nigricollis</i> fêmea: Mufuma Malanje	99
<i>B. arietans</i> macho: Mufuma Malanje	72
<i>B. arietans</i> fêmea: Mufuma Malanje	72
<i>B. arietans</i> macho: Calandula Malanje	99
<i>B. arietans</i> fêmea: Cuanza Sul	84
<i>B. gabonica</i> macho: Mufuma Malanje	76
<i>B. gabonica</i> fêmea: Mufuma Malanje	99

Como pode ser observado, houve pouca variação no conteúdo proteico dos venenos da espécie *N. nigricollis*, a saber: Cuanza Sul (96%), Malanje (99%). Os valores percentuais dos conteúdos proteicos dos venenos das *B. arietans* das diferentes regiões não foram semelhantes, contudo entre macho e fêmea de Mufuma os valores foram idênticos, com 72% para ambas. Na análise do conteúdo proteico do veneno de *Bitis gabonica*, houve uma variação mais expressiva dos conteúdos proteicos dos venenos entre macho e fêmea (♂,76%;♀,99%). Como o número de animais estudados foi baixo, não é possível avaliar o verdadeiro significado das diferenças encontradas.

Variações intraspécies de venenos das diferentes serpentes em estudo, relacionadas ao sexo e/ou distribuição geográfica, são aspetos amplamente descritos na literatura e que

podem contribuir para as variações da toxicidade dos venenos de uma mesma espécie de serpente (Chippaux et al, 1991; Daltry, Wüster, & Thorpe, 1996).

No estudo Chippaux et al. (1991) é discutido que a variabilidade intraespécie dos venenos deve-se a vários fatores incluindo, condições geográficas, idade, habitat e condições climáticas, enquanto no estudo de Daltry et al. (1996) foi ainda mencionado o factor dieta dos animais, como sendo uma das causas da variabilidade.

3.4.2 - Perfil eletroforético de proteínas dos venenos de serpentes Angolanas

Todos os venenos de serpentes coletadas em Malanje (Mufuma e Calandula) e Cuanza Sul apresentaram diferentes perfis electroforéticos, com bandas com massa molecular variando de 20 a 250 kDa. Algumas dessas bandas parecem conter ligações dissulfeto inter- ou intracadeias, como observado pela presença de novas bandas, com menor peso molecular, após redução das amostras.

Em relação ao veneno da *Naja nigricollis*, foram observadas diferenças significativas do perfil electroforético (principalmente nas bandas com peso entre 37 a 82 kDa), das serpentes de Cuanza Sul e Malanje e a inexistência de bandas abaixo de 12 KDa na *Naja* de Cuanza Sul (Figura 36).

Apesar destes resultados terem sido obtidos com veneno de poucos animais, não permitindo extrapolar para a população de serpentes do gênero *Najas* dessa região, a diferença pode indicar um perfil de toxicidade diferente nas serpentes desta região, uma vez que são essas proteínas de baixo peso molecular, possivelmente 3FTX, as responsáveis pelos efeitos cardiotoxícos e citotóxicos destes venenos (Méndez et al, 2011).

Os nossos resultados são distintos aos encontrados por Mendez et al. (2011) que comparou o perfil eletroforético de cinco espécies do gênero de *Najas* da África (*N. nigricollis*, *N. katienses*, *N. pallida*, *N. nubiae* e *N. mossambica*) e observaram semelhanças na composição proteica, tendo as bandas encontradas, que constituíam 90% do peso das proteínas totais, massa molecular entre 9 a 15 kDa, correspondente às 3FTxs.

Os venenos das *B. gabonica* macho e fêmea de Mufuma apresentaram composição de bandas similar, variando entre 26 a 115 kDa (Figura 37). Estes resultados são diferentes dos encontrados nos estudos bioquímicos realizados anteriormente por Paixão Calvacante et al. (2015) que analisaram vários parâmetros bioquímicos das espécies *B. arietans*, *B. gabonica rhinoceros* e *B. nasicornis* de África. Neste, o perfil eletroforético encontrado incluía proteínas com peso molecular de 10 a 200 KDa e variabilidade da disposição das proteínas nos géis de SDS-PAGE entre as espécies.

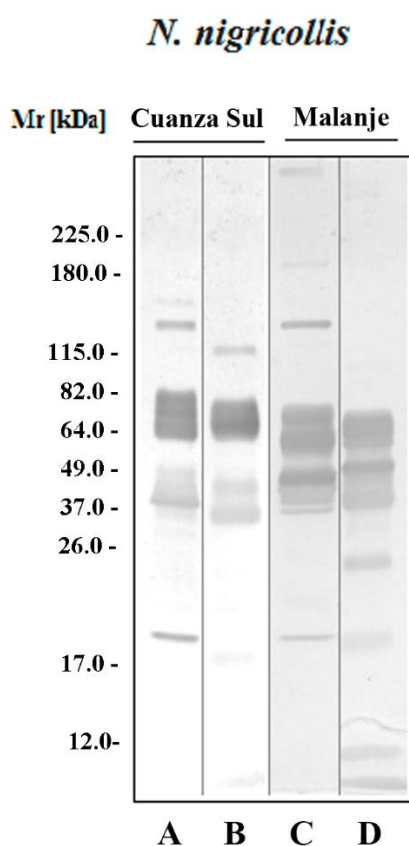


Figura 36: Perfil eletroforético dos venenos de *N. nigricollis* fêmea de Cuanza Sul e Malanje. Amostras de veneno (30 µg de proteína) foram separadas por SDS-PAGE (gel de gradiente 8-16%) em condições não redutoras (A, C) e redutoras (B, D) e coradas por impregnação por prata.

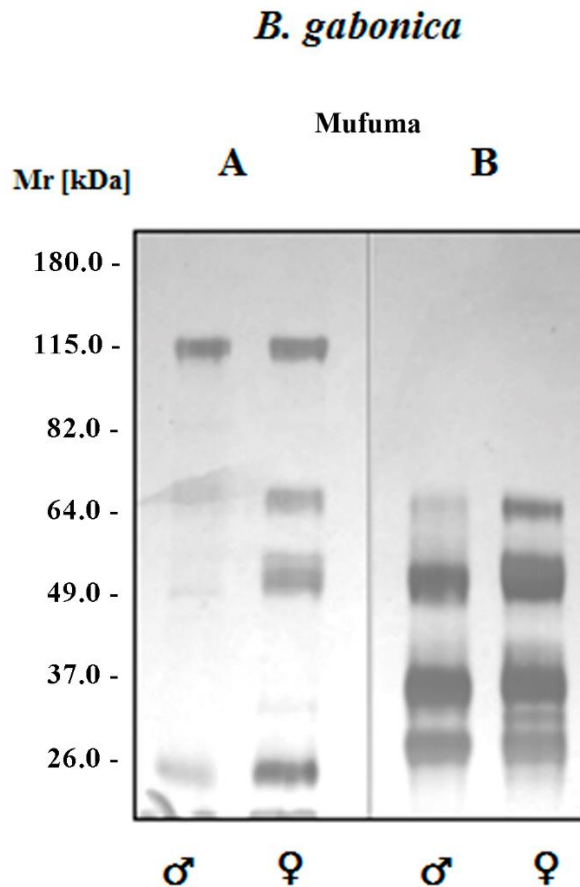


Figura 37. Perfil eletroforético dos venenos de *B. gabonica*.

Amostras de veneno (30 µg de proteína) foram separadas por SDS-PAGE (gel de gradiente 8-16%) em condições não redutoras (A) e redutoras (B) coradas por impregnação por prata. Venenos de *Bitis gabonica* macho (♂) e fêmea (♀) de Mufuma.

Os perfis eletroforéticos das proteínas dos venenos de machos e fêmeas de *B. arietans* mostraram diferenças relacionadas com o sexo e com a localidade geográfica aonde as serpentes foram coletadas (Figura 38). Em relação aos venenos das espécies *B. arietans*, foi possível observar diferenças nos perfis eletroforéticos de machos e fêmeas de Mufuma|Malanje, Calandula|Malanje e Cuanza Sul, com bandas variando entre 26 a 130 kDa (Figura 38).

Currier et al. (2010), no seu estudo sobre a variação intraespécie de veneno de *B. arietans*, analisaram o perfil eletroforético de venenos de serpentes provenientes da Arábia Saudita, Ghana, Nigéria, Zimbabue, Malawi e Tanzânia e verificaram variabilidade considerável entre os venenos de todos os animais. A principal diferença foi verificada no veneno da *B. arietans* da Arábia Saudita que não apresentava uma proteína de 22 kDa, presente em todos os venenos das serpentes africanas, bem como uma banda de

aproximadamente 33 kDa, presente no veneno da Nigéria que não estava no veneno de *B. arietans* de Gana.

A falta de consistência dos resultados dos vários estudos publicados até hoje demonstra a necessidade de se realizarem estudos sistematizados por forma a clarificar a existência ou não de diferenças significativas no perfil proteico intraespécies, relacionadas com os vários fatores (sexo, localização geográfica, habitat e clima).

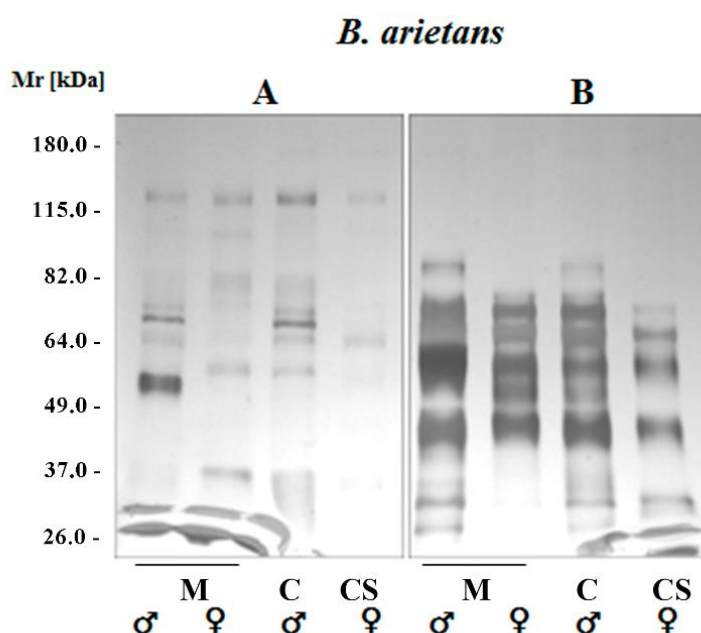


Figura 38: Perfil eletroforético dos venenos de *Bitis arietans*.

Amostras de veneno (30 µg de proteína) foram separadas por SDS-PAGE (gel de gradiente 8-16%) em condições não redutoras (A) e redutoras (B) coradas por impregnação por prata. Venenos de *Bitis arietans* macho (♂) e fêmea (♀) de Mufuma|Malanje (M), Calandula|Malanje (C), Cuanza Sul (CS).

3.4.3 - Análise do perfil de glicosilação das proteínas dos venenos de serpentes de Angola

A análise do perfil de glicosilação das proteínas dos venenos foi realizada com o objetivo de detetar proteínas contendo resíduos de carboidratos. Para tanto, foram utilizadas as lectinas Con A (Concanavalina A-Sigma, EUA) e WGA (Wheat Germ- Lectin from *Triticutun vulgaris*- Sigma, EUA), que reconhecem resíduos N-acetilglicosamina e de Manose, respectivamente. Na Figura 39 mostra-se que as lectinas WGA e Con A revelaram várias bandas com diferentes massas, em todos os venenos estudados, e que mais uma vez houve diferenças inter e intra-espécies relacionadas à distribuição geográfica e sexo dos animais. Em diferentes espécies de *Bitis* africanas (*B. arietans*, *B.*

gabonica rhinoceros e *B. nasicornis*), Paixão et al. (2015) também observaram, pelos mesmos métodos, a presença de resíduos de açúcar nas proteínas de todos os venenos analisados. No estudo de Zelanis et al. (2010), apesar de ter sido realizado com uma espécie diferente da nossa, o veneno de *Bothrops jararaca* apresentou diferenças no padrão de glicosilação entre venenos de serpentes jovens e adultos.

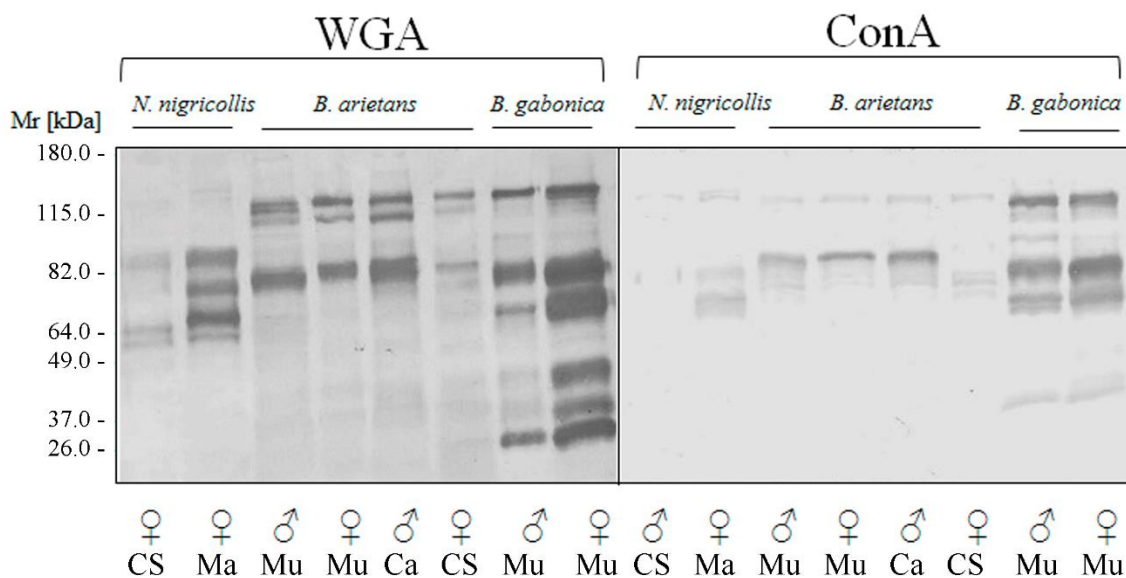


Figura 39: Perfil de glicosilação dos venenos de *Naja* e *Bitis*.

Amostras dos venenos (30 µg) de *N. nigricollis*, *B. arietans* e *B. gabonica* foram submetidas a eletroforese em SDS-PAGE 12% e, posteriormente, eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose. A seguir, o perfil de glicosilação do veneno foi determinado usando-se as lectinas WGA (1:2000) ou ConA (1:1000) e a reação revelada com DAB. Cuanza Sul (CS); Mufuma|Malanje (Ma); Mufuma|Malanje (Mu); Calandula|Malanje (Ca), macho (♂); fêmea (♀).

3.4.4 - Atividade Fosfolipásica

A atividade fosfolipásica dos venenos de serpentes Angolanas foi avaliada por meio de ensaio fluorimétrico. Os resultados foram expressos como atividade específica (UF/min/µg de veneno). Como controle positivo da reação foi usado o veneno de *Crotalus durissus terrificus*.

As Figuras 40, 41 e 42 mostram a atividade fosfolipásica dos venenos, onde se verifica que os venenos das serpentes *N. nigricollis* de Cuanza Sul e de Malanje apresentam valores similares de atividade fosfolipásica (~25.000 000 UF/min/µg). Este resultado é concordante ao encontrado na pesquisa de Petras et al. (2011) ao estudarem veneno de diferentes espécies do género *Naja* (*N. katiensis*, *N. mossambica*, *N. nigricollis*, *N. nubiae* e *N. pallida* de vários países africanos (Nigéria, Togo, Camarões, Tanzânia, Burkina Faso e Quênia).

De salientar a diferença estatisticamente significativa da atividade fosfolipásica dos venenos de machos e fêmeas de *B. arietans* de Mufuma|Malanje (Figura 41). Dentre as *B. arietans*, as que apresentaram maior atividade fosfolipásica foram o macho de Calandula|Malanje e a fêmea de Cuanza Sul com atividades em torno dos 3500 UF/min/ μ g (Figura 41). O veneno de *Bitis gabonica* macho não apresentou atividade fosfolipásica comparativamente à fêmea da mesma região, que apresentou cerca de 2.000 UF/min/ μ g (Figura 42).

Em muitos venenos animais, a fosfolipase A2 (PLA2) é importante para a imobilização e digestão da presa, bem como responsável por uma variedade de ações tóxicas e farmacológicas (Gutierrez e Lomonte, 2013). Calvete e colegas (2007), em estudo proteômico sobre os venenos de várias espécies de *Bitis* africanas (*B. g. rinoceros*, *B. nasicornis*, *B. caudalis*), identificaram também a presença de PLA2. Os nossos resultados não são concordantes aos apresentados por Paixão-Cavalcante et al. (2015), que ao analisar a atividade fosfolipásica dos venenos de *B. arietans*, *B. g. rhinoceros* e *B. nasicornis*, mostraram que a atividade fosfolipásica desses venenos era similar entre si e em torno de 80 a 100 UF/min/ μ g. Importante é salientar que no nosso estudo todas as *Bitis* apresentaram uma atividade bem mais elevada, com exceção da *B. gabonica* macho de Mufuma que não apresentou atividade fosfolipásica.

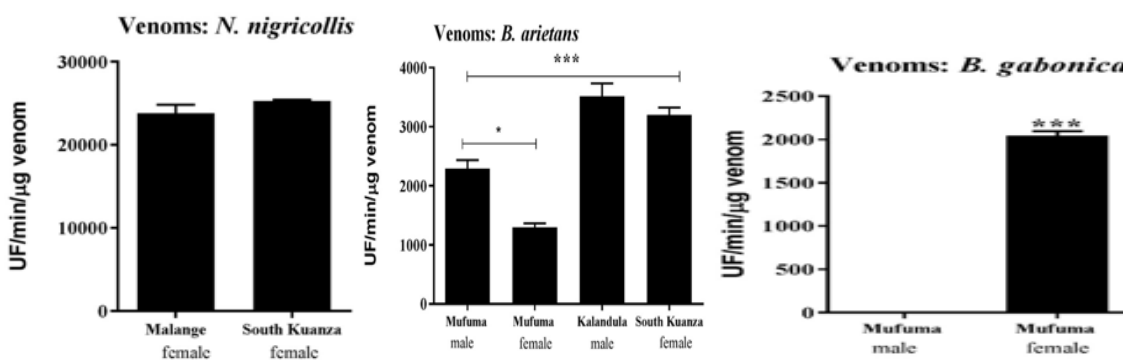


Figura 40: Atividade Fosfolipásica A2 do veneno da serpente *N. nigricollis*.

Figura 41: Atividade Fosfolipásica A2 do veneno da serpente *B. arietans*.

Figura 42: Atividade Fosfolipásica A2 do veneno da serpente *B. gabonica*.

Amostras dos venenos (0,5 μ g) de *N. nigricollis*, *B. arietans* e *B. gabonica* foram incubadas a 37°C, durante 10 minutos, com uma mistura contendo 10 mM de dioleoilfosfatidilcolina e 10 mM de dioleoilfosfatidilglicerol. O aumento nos valores de fluorescência foi avaliado no leitor FLUOStar Omega, nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 460 e 515 nm, a 37°C, durante 10 minutos. Os resultados foram expressos como unidades de fluorescência por minuto por micrograma de veneno UF/min/ μ g de veneno. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste t (para venenos de *N. nigricollis* e *B. gabonica*) ou ANOVA One Way (para venenos de *B. arietans*), seguido de comparações múltiplas de Bonferroni (*P <0,05).

3.4.5 - Atividade Hialuronidásica de venenos de serpentes de Angola

As hialuronidases estão envolvidas num grande número de funções biológicas, incluindo a difusão de toxinas de veneno do local da mordedura para os tecidos e circulação (Kemparaju & Girish, 2006).

A atividade hialuronidásica foi determinada em ensaio turbidimétrico e os resultados estão representados nas Figuras 43, 44 e 45. Pode-se observar uma diferença estatisticamente significativa, na atividade hialuronidásica detetada nos venenos das *Naja* de Malanje e Cuanza Sul, sendo a da última superior à da primeira.

Em relação aos venenos de *Bitis arietans*, macho e fêmea, de Mufuma, também apresentaram uma diferença significativa na atividade hialuronidásica, sendo a da fêmea 28 vezes superior à do macho (Figura 44). Variação intraespécies na atividade hialuronidásica, associada ao sexo, foi também observada nos venenos de macho e fêmea de *B. gabonica* (Figura 45).

Os resultados da atividade hialuronidásica dos venenos do nosso estudo são concordantes em relação aos encontrados no estudo de Paixão et al., (2015), que mostraram uma atividade similar em torno de 20 UTR/mg/μg, embora no nosso estudo tenhamos encontrado uma atividade significativamente inferior para machos com valores inferiores a 5 UTR/mg/μg. Deve realçar-se que no estudo de Paixão et al., (2015) foram usados pools de venenos de *B. arietans*, *B. g. rhinoceros* ou de *B. nasicornis* de ambos sexos e com diferentes idades.

Outros estudos, apesar de terem sido realizados com outras espécies, apresentam variabilidade intraespecífica dos venenos, associadas a vários fatores, nas atividades hialuronidásica, hemorrágica, coagulante, fosfolipásica e miotóxica (Chippaux et al., 1991; Furtado, Travaglia-Cardoso, & Rocha, 2006).

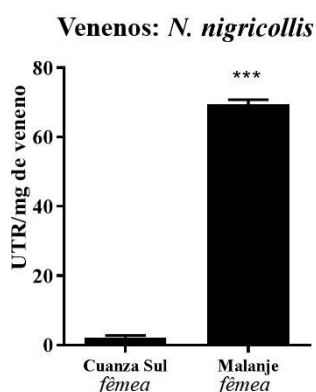


Figura 43: Atividade hialuronidásica do veneno da serpente *N. nigricollis*.

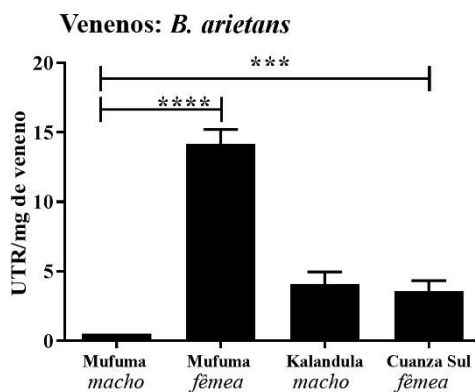


Figura 44: Atividade hialuronidásica do veneno da serpente *B. arietans*.

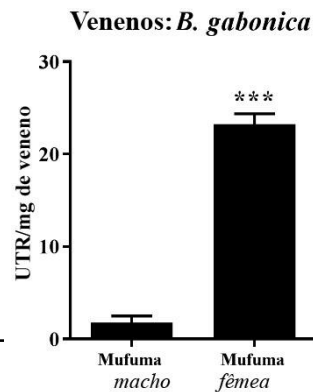


Figura 45: Atividade hialuronidásica do veneno da serpente *B. gabonica*.

Amostras dos venenos de *N. nigricollis*, *B. arietans*, *B. gabonica* (20 µg) foram pré-incubadas com ácido hialurônico a 37 °C por 30 min. A turvação da mistura foi medida num espectrofotômetro a λ 405 nm. Os resultados foram expressos em unidades de redução de turvação (UTR) por µg de veneno. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste t (para venenos de *N. nigricollis* e *B. gabonica*) ou ANOVA One Way (para venenos de *B. arietans*) seguido de comparações múltiplas de Bonferroni ($p \leq 0,05$).

3.4.6 - Atividade Proteolítica

A atividade proteolítica dos venenos de serpentes angolanas foi avaliada utilizando o substrato peptídico de fluorescência apagada FRET, que permite uma quantificação rápida e sensível desta atividade, usando pouco veneno e substrato. Na presença de 5 µM de substrato e em condições de cinética linear (excesso de substrato), as atividades específicas dos venenos sobre o substrato peptídico Abz-FRSSRQ-EDDnp (Abz-FRSSRQ) estão mostradas na Tabela 21.

Tanto os venenos das *B. arietans*, como o das *B. gabonica* apresentaram atividade proteolítica significativa sobre o substrato FRET. Todos os venenos das *B. arietans* foram inibidos acima dos 90% por PMSF. No entanto, a inibição pela fenantrolina variou de 50 a 80%, enquanto para as *B. arietans* de Cuanza Sul foi obtida uma inibição de 100% pela fenantrolina.

Os venenos das serpentes *B. gabonica* não apresentaram diferenças significativas na atividade proteolítica entre gênero feminino e masculino, tendo o veneno de macho sido inibido por PMSF em 31% e por fenantrolina em 62%, enquanto o veneno da fêmea foi inibido em 38% pelo PMSF e em 55% pela fenantrolina.

Algumas proteases podem ter este duplo efeito sobre certos substratos, sendo inibidos tanto pelo PMSF quanto pela fenantrolina, conforme apresentado por Paixão Cavalcante et al. (2015), em pools de venenos de *B. arietans*, *B. g. rhinoceros* e *B. nasicornis*. Os nossos resultados da atividade proteolítica apresentaram-se com diferenças na atividade hidrolítica, sobre o substrato FRET e associadas à distribuição geográfica não existindo concordância em relação aos venenos de serpentes, capturadas na Guiné, S. Tomé, Angola e Moçambique e mantidas em cativeiro no estudo de Paixão Cavalcante et al., (2015). Neste estudo anterior, a atividade hidrolítica do veneno de *B. arietans* foi totalmente inibida por EDTA e fenantrolina, mas não pela PMSF, indicando uma variação nesta atividade relacionada à origem das serpentes.

Tabela 21: Atividade proteolítica dos venenos de serpentes angolanas sobre o substrato FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)

Atividade do veneno (UF/min/ μ g)	Padrão	PMSF	Fenantrolina
<u>Origem: Mufuma</u>			
<i>B. arietans</i> macho	13430,3 \pm 1674,1	1219,7 \pm 221,5* <i>Inibição: 90%</i>	5432,3 \pm 945,6* <i>Inibição: 60%</i>
<i>B. arietans</i> fêmea	835,7 \pm 62,4	24,85 \pm 16,3* <i>Inibição: 97%</i>	428,59 \pm 19,2* <i>Inibição: 51%</i>
<u>Origem: Calandula</u>			
<i>B. arietans</i> macho	800,72 \pm 1,8	33,33 \pm 0* <i>Inibição: 95%</i>	160,6 \pm 74,1* <i>Inibição: 80%</i>
<u>Origem: Cuanza Sul</u>			
<i>B. arietans</i> fêmea	546,9 \pm 84,3	32,65 \pm 8,3* <i>Inibição: 94%</i>	0* <i>Inibição: 100%</i>
<u>Origem: Mufuma</u>			
<i>B. gabonica</i> macho	2293,62 \pm 84,7	1575,88 \pm 309,7 <i>Inibição: 31%</i>	862,79 \pm 63,0* <i>Inibição: 62%</i>
<i>B. gabonica</i> fêmea	1952,9 \pm 285,7	1209,40 \pm 55,9 <i>Inibição: 38%</i>	871,31 \pm 10,6* <i>Inibição: 55%</i>

Amostras de veneno (1.0 μ g) foram incubadas ou não com inibidores, por 30 min a temperatura ambiente, com o substrato FRET Abz-FRSSRQ (5 μ M). Todos os ensaios enzimáticos foram feitos em triplicado e os resultados expressos como a atividade específica (UF/mim/ μ g). A análise estatística foi realizada utilizando-se one way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni (*P < 0,05).

3.5 - Conclusões do capítulo

Os venenos das serpentes angolanas apresentam diferenças significativas na sua composição de proteínas, características de glicosilação, propriedades tóxicas e enzimáticas. Tais diferenças estão associadas as variações interespecies, bem como intraespecies, relacionadas à distribuição geográfica das serpentes, bem como ao sexo.

Uma vez feitos alguns ensaios que permitiram a caracterização bioquímica dos venenos, surge a questão sobre se os mesmos são imunogênicos, facto que poderá ser relevante para a futura produção do soro antiofídico Angolano.

No capítulo seguinte abordar-se-ão os estudos sobre a imunogenicidade dos venenos em modelo murino.

CAPÍTULO 4 - ESTUDO SOBRE A IMUNOGENECIDADE DOS VENENOS DAS SERPENTES DE ANGOLA

4.1 - Introdução

O envenenamento por serpentes é uma doença tropical negligenciada que afeta principalmente populações rurais empobrecidas de África, Ásia e América Latina (Gutiérrez et al., 2006). Estima-se que as mordeduras de serpente causem a morte na África a 32.000 pessoas anualmente e muitas delas ficam com debilidades permanentes e sequelas (Kasturiratne et al., 2008). As espécies implicadas nessas fatalidades são sobretudo: *Bitis arietans*, *Naja nigricollis* e *Echis ocellatus* (Currier, Harrison, Rowley, Laing, & Wagstaff, 2010).

A soroterapia é o único tratamento capaz de neutralizar a ação dos venenos, consistindo na administração de soro antiveneno, rico em anticorpos específicos. Os antivenenos podem evitar ou reverter a maioria dos efeitos dos envenenamentos ofídicos e desempenham um papel crucial na redução da mortalidade e da morbidade. Por esta razão, a produção, distribuição e o acesso garantido aos antivenenos constituem condições fundamentais para que seja alcançada uma das Metas de Desenvolvimento do Milênio, estabelecidas pela Organização das Nações Unidas: a erradicação das doenças tropicais negligenciadas, dentre as quais estão os envenenamentos por serpentes. Assim, há necessidade urgente de garantir a disponibilidade de antivenenos eficazes, particularmente para países em desenvolvimento, e de melhorar o controlo regulamentar sobre a fabricação, importação e venda de antivenenos (Tambourgi et al., 2010).

Em 1998, Chippaux assumia que menos de 25% das necessidades de antiveneno eram cobertas e na maioria dos pacientes as doses eram insuficientes (Chippaux, 1998).

A toxínologia e imunologia dos venenos de serpente têm progredido muito nos últimos anos e, conseqüentemente, contribuído para a produção de antivenenos mais eficazes. O recurso às técnicas ómicas para caracterização extensa e fidedigna dos constituintes dos venenos, bem como da engenharia genética para produção de toxinas de serpentes, permitirá num futuro próximo a obtenção de soros mais específicos e isentos de substâncias alergénicas (Gutierrez et al., 2011 a,b).

Portanto, são relevantes os estudos que caracterizem os componentes dos venenos e o modo de ação dos mesmos, bem como a produção de soros experimentais para o estabelecimento de novas estratégias terapêuticas para os envenenamentos por serpentes e outros animais peçonhentos.

4.2 - Objetivos

Geral

Demonstrar a imunogenicidade dos venenos de serpentes de Angola em modelo animal murino e produzir antivenenos específicos.

Objetivos Específicos

1. Avaliar a imunogenicidade dos venenos de serpentes de Angola em modelo murino
2. Determinar os títulos de anticorpos dos soros experimentais murinos
3. Detetar os componentes antigênicos dos venenos frente aos soros murinos

4.3 - Material e Métodos

4.3.1 - Animais

Camundongos Swiss de dois meses de idade (18 g – 22 g) foram obtidos do Biotério de Criação de Animais do Instituto Butantan. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan, sob o parecer (CEUAIB Nº 1364/15).

4.3.2.- Imunogenicidade dos venenos de serpentes Angolanas

4.3.2.1 - Soro experimental produzido em camundongos

Para o estudo comparativo da imunogenicidade dos venenos, grupos de animais (6 por grupo) foram inoculados pela via subcutânea com 5 µg de pools dos diferentes venenos de machos e fêmeas de *B. arietans* de Malanje (municípios de Mufuma e Calandula) e Cuanza Sul; de macho e fêmea de *B. gabonica* de Mufuma; de macho e fêmea de *N. nigricollis* de Malanje e Cuanza Sul, diluídos 1:25, em hidróxido de alumínio, para um volume final de 200 µL. Os grupos receberam três imunizações com intervalo de 20 dias

cada, sendo realizadas sangrias em tempos variados após as imunizações. Os soros foram separados e mantidos a -20°C até a realização das análises.

4.3.2.3 - Determinação dos títulos de anticorpos dos antivenenos

Placas de ELISA (Costar[®], Corning Inc., EUA) foram sensibilizadas com 100 µL dos venenos em tampão PBS (10 µg/mL) e incubadas por 18 h a 4° C. Após este período, as placas foram lavadas com PBS e bloqueadas com PBS/BSA 5%, durante 2 h e a 37° C. Em seguida, as placas foram novamente lavadas e, posteriormente, incubadas com diluições crescentes dos soros monoespecíficos ou normal de camundongos por 1 h à temperatura ambiente. As placas foram lavadas em PBS com Tween/20 0,05% (PBS-T) e incubadas com anticorpos secundários, marcados com peroxidase (Sigma, EUA), diluídos 1:5000 (anti camundongo) em PBS/BSA 1%, por 1 h e a 37° C. A seguir, as placas foram, novamente, lavadas e as reações reveladas pela adição de OPD (Ortofenildiamina – Sigma, EUA) e H₂O₂ (peróxido de hidrogênio), de acordo com as recomendações do fabricante. As densidades óticas foram determinadas por leitura espectrofotométrica Multiskan EX (Labsystems, Finlândia) a 492 nm. O título de anticorpos foi estabelecido como a diluição mais alta de antiveneno que produziu uma absorvância duas vezes superior à determinada no soro pré-imune.

4.3.2.4 - *Western Blot* dos venenos de serpentes angolanas frente aos soros específicos

Amostras dos venenos de serpentes angolanas foram separadas em géis de SDS-PAGE, assim como descrito no item 3.3.3, e eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose (Amersham Pharmacia Biosciences, Suécia), como descrito por Towbin et al. (1979). As membranas foram bloqueadas com PBS-BSA 5%, por 2 h e a 37° C e, posteriormente, incubadas com os soros experimental ou normal de camundongos, diluídos em solução PBS/BSA 1%, durante 1 h e à temperatura ambiente. As membranas foram lavadas em PBS-Tween 0,05% e incubadas com anticorpos secundários específicos, marcados com fosfatase alcalina (Promega, EUA), diluídos 1:5000 em solução PBS/BSA 1%, por 1 h e a temperatura ambiente. As membranas foram lavadas e a reação foi revelada pela adição do substrato NBT e BCIP (*nitro-blue tetrazolium chloride/5-bromo-3chloro-3-indolyphosphate p-toluidine salt*), de acordo com as recomendações do fabricante (Molecular Probes, EUA).

4.4 - Análise e Discussão dos resultados

4.4.1 - Determinação dos títulos de anticorpos anti-*N. nigricollis*

As Figuras 46 e 47 demonstram que os venenos de *N. nigricollis* são pouco imunogénicos induzindo baixos títulos de anticorpos. Foi possível observar que após a primeira imunização, os venenos de *N. nigricollis* não induziram produção de anticorpos IgG detetáveis nos nossos ensaios; entretanto, observa-se que a partir do segundo reforço, tem-se produção de anticorpos IgG, obtendo-se títulos de 1: 800.

Na Figura 48 poder-se-á observar a reatividade do soro experimental anti-*N. nigricollis*; como analisado por *Western blot*, que reconheceu os componentes antigénicos da *N. nigricollis* de Malanje mais do que a de Cuanza Sul sugerindo que o veneno da *Naja* de Malanje era mais imunogénico.

Os nossos resultados são concordantes em relação aos encontrados por Guidolin et al. (2010) que verificou, em cavalos, que o desenvolvimento de títulos de anticorpos ocorreu significativamente após a segunda imunização com os venenos das serpentes africanas, *N. melanoleuca* e *N. mossambica*. Petras et al. (2011) analisaram venenos de *Naja nigricollis*, *Naja katiensis*, *Naja nubiae*, *Naja mossambica* e *Naja pallida*, da Nigéria, Togo, Camarões e Tanzânia, e produziram o antiveneno para as mesmas em cavalos. Seguidamente, avaliaram a capacidade de neutralização dos venenos pelo soro poliespecífico EchiTab-Plus- ICP e verificaram que no veneno da *N. nigricollis* foram parcialmente reconhecidas as proteínas 3 FTX e PLA2 e, totalmente, as proteínas CRISP (Cysteine Rich Secretary Protein) e SVMPs em todas as outras espécies do género *Naja*.

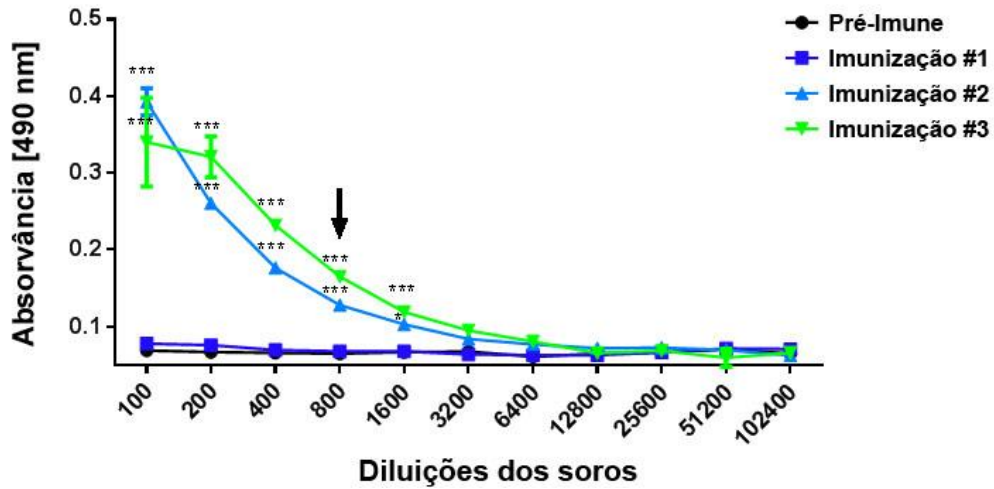


Figura 46: Determinação da absorvância do soro experimental anti-*N. nigricollis* por ELISA.

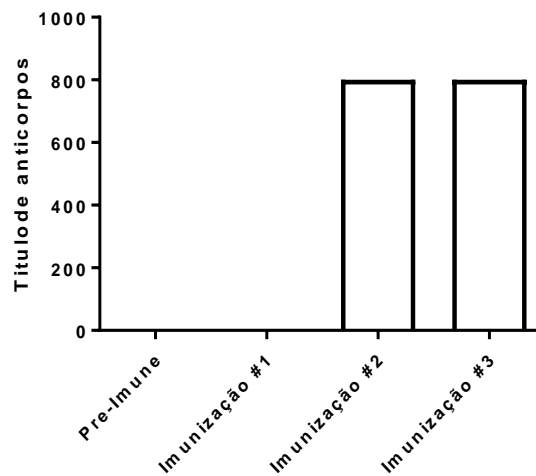


Figura 47: Determinação dos títulos de anticorpos do soro experimental anti-*N. nigricollis* por ELISA.

Placas de ELISA foram sensibilizadas com pool de venenos de *N. nigricollis* 1.0 µg e, posteriormente, incubadas com diluições crescentes do soro experimental, seguida pelo conjugado IgG-HRPO. Os resultados foram submetidos à leitura espectrofotométrica a 490 nm. Os títulos de anticorpos foram determinados a partir da diluição na qual se obteve a densidade ótica (D.O) 2 vezes maior que a D.O do soro pré-imune.

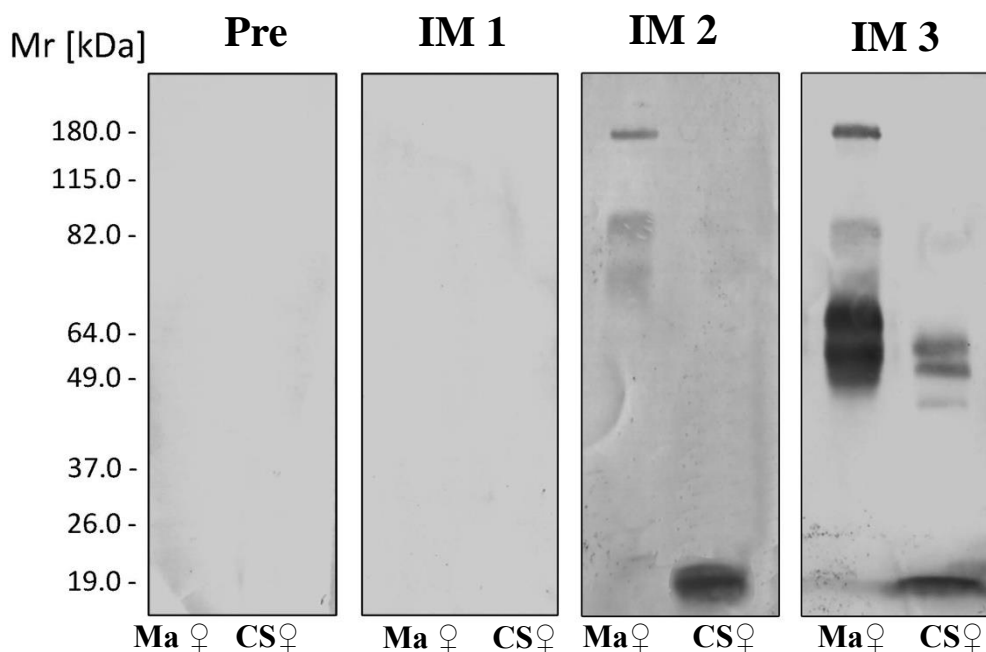


Figura 48. Western blot do antiveneno de *Naja nigricollis*.

Amostras de veneno de *N. nigricollis* (15 µg) foram separadas por eletroforese e electrotransferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com o antiveneno murino diluído a 1:800 (*N. nigricollis*). Após a incubação, as membranas foram lavadas 3 vezes em PBS-Tween 0,05% e incubadas com anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina (diluído 1:7500) durante uma hora. Por fim, as membranas foram lavadas 3 vezes com PBS-Tween 0,05% e submetidas a revelação com NBT/BCIP (Promega), e as reações interrompidas pela adição de água. Cuanza Sul (CS); Malanje (Ma); fêmea (♀).

4.4.2 - Determinação dos títulos de anticorpos anti-*B. arietans*

As Figuras 49 e 50 mostram o potencial imunogénico dos venenos de *B. arietans*. Demonstrou-se por ELISA que a partir da segunda imunização com o pool de venenos, tem-se a produção de anticorpos IgG específicos 1:1600.

Os nossos resultados são concordantes aos encontrados por Paixão et al. (2015) que verificaram que os títulos de anticorpos no antiveneno de *Bitis arietans* foram altos e que houve um reconhecimento eficaz da maior parte das proteínas do veneno no Western blot. Digno é salientar que se verificou no estudo de Paixão e colaboradores que o antiveneno de *B. arietans* reconhecia eficazmente as bandas de menor peso molecular dos venenos de *B. g. rhinoceros* e *B. nasicornis*. Currier et al. (2010) analisaram a variação intraespécies dos venenos de *B. arietans* de diferentes origens geográficas da África subsariana e da Arábia testando soro "Pan African polyspecific" desenvolvido na Costa Rica EchiTAB-Plus-IPC e verificaram que todos os venenos estudados foram amplamente reconhecidos.

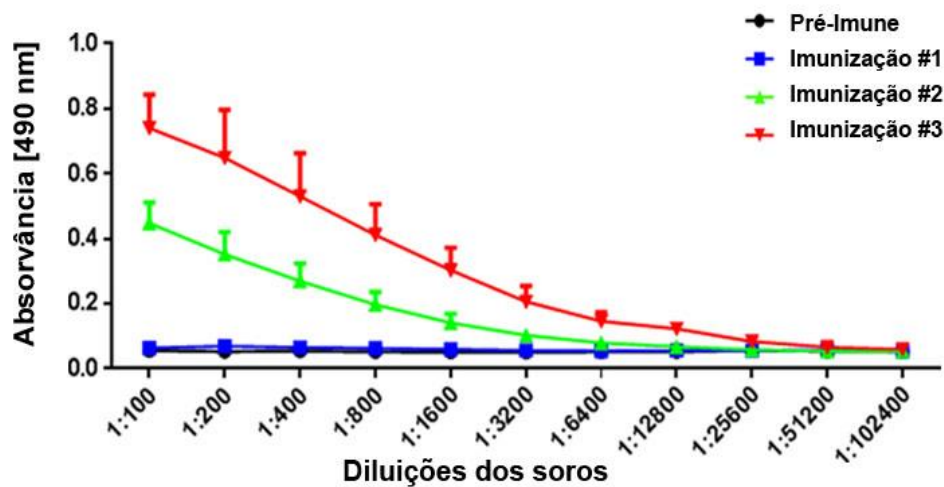


Figura 49: Determinação da absorvância do soro experimental anti-*B. arietans* por ELISA.

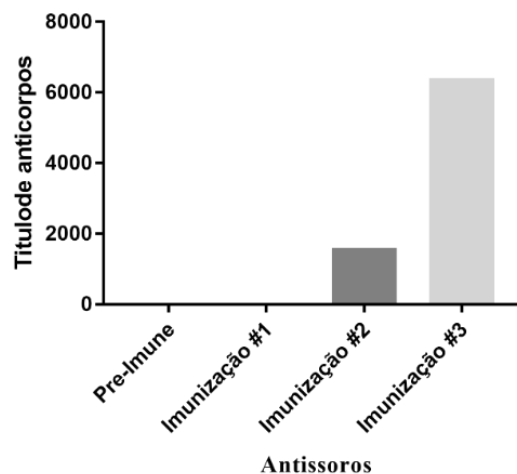


Figura 50: Determinação dos títulos de anticorpos do soro experimental anti-*B. arietans* por ELISA.

Placas de ELISA foram sensibilizadas durante a noite com veneno de *B. arietans* e, posteriormente, incubadas com soro experimental. Na sequência, as placas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase e submetidas à revelação com H₂O₂ e OPD. As reações foram interrompidas por H₂SO₄ e submetidas a leitura espectrofotométrica a 490 nm. Os títulos de anticorpos foram estabelecidos a partir da diluição na qual se obteve a D.O 3 vezes maior que a D.O do soro pré-imune.

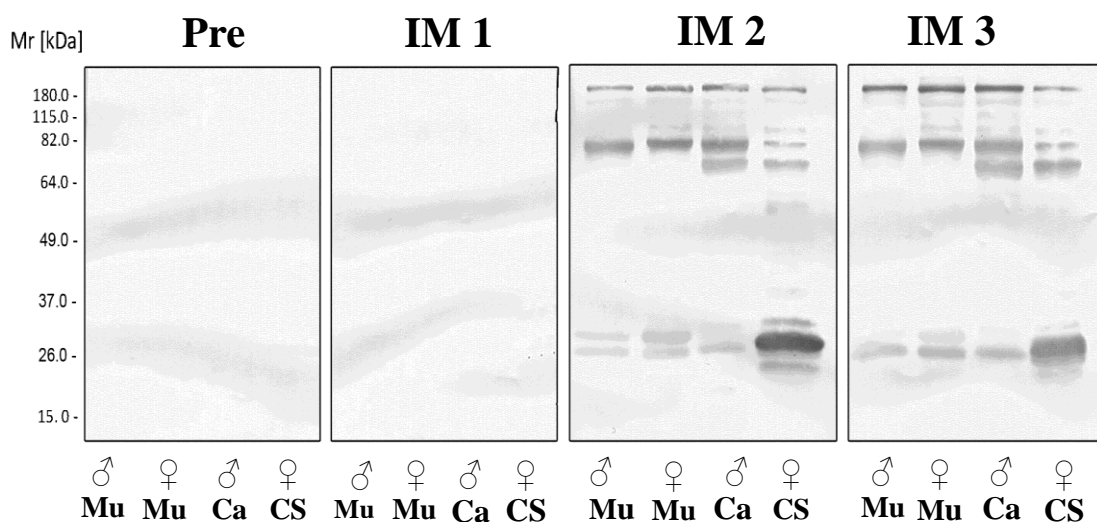


Figura 51: Western blot do soro anti-*B. arietans*.

Amostras dos venenos (15 µg) de *B. arietans* foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE 12% em condições não redutoras e eletrotransferidas durante a noite para membranas de nitrocelulose e incubadas com o *pool* de soros experimentais na diluição de 1:6400 durante uma hora a temperatura ambiente. Seguindo a incubação as membranas foram lavadas 3 vezes em PBS-Tween 0,05% e incubadas com anticorpo secundário conjugado com fosfatase durante uma hora. Por fim, as membranas foram lavadas 3 vezes com PBS-Tween 0,05% e submetidas a revelação com NBT/BCIP e as reações interrompidas pela adição de água. Cuanza Sul (CS); Mufuma|Malanje (Mu); Calandula|Malanje (Ca), macho (♂); fêmea (♀).

4.4.3 - Determinação dos títulos de anticorpos anti-*B. gabonica*

As Figuras 52 e 53 mostram que os venenos de *B. gabonica* são imunogênicos, induzindo títulos de anticorpos de 1:6400 na segunda imunização. A Figura 54 mostra a reatividade do soro experimental anti-*B. gabonica*, sendo que tanto as proteínas de alto quanto de baixo peso molecular, foram reconhecidas de forma similar em venenos do macho e da fêmea. Além disso, o forte reconhecimento dos venenos nos permite afirmar que o veneno de *B. gabonica* é imunogênico.

Os nossos resultados são concordantes aos encontrados por Paixão Cavalcante et al., (2015) que verificaram que os títulos de anticorpos, no antiveneno de cavalo anti-*B. gabonica*, foram altos, bem como ter havido um reconhecimento da maior parte das proteínas do veneno no *western blot* pelo antiveneno.

No nosso estudo verificamos que na segunda imunização houve uma produção maior de anticorpos nos animais imunizados com veneno de *B. gabonica* comparativamente à *B. arietans*. Ghuidolin et al (2010), por outro lado, verificaram que os títulos de anticorpos

contra *B. arientans* foram superiores em relação aos desenvolvidos contra o veneno de *B. gabonica*, em modelo de cavalos.

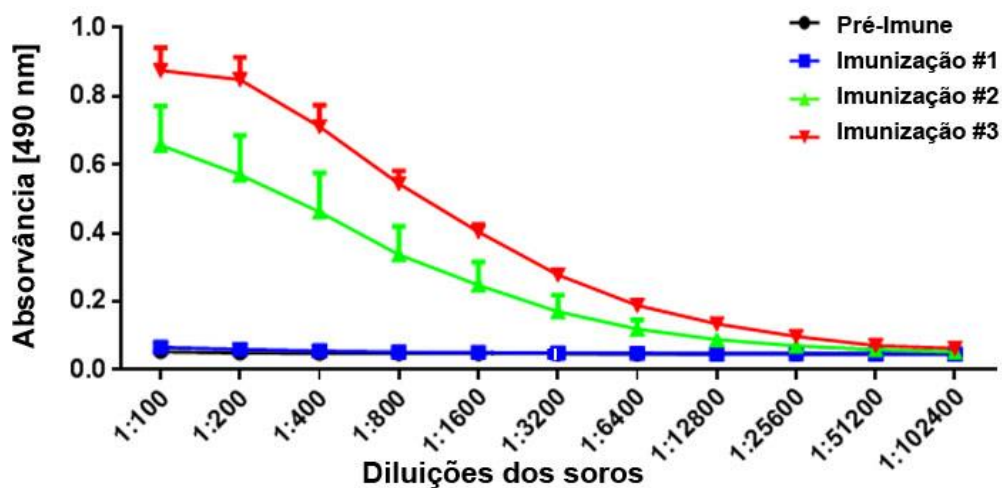


Figura 52: Determinação da absorvância do soro experimental anti-*B. gabonica* por ELISA.

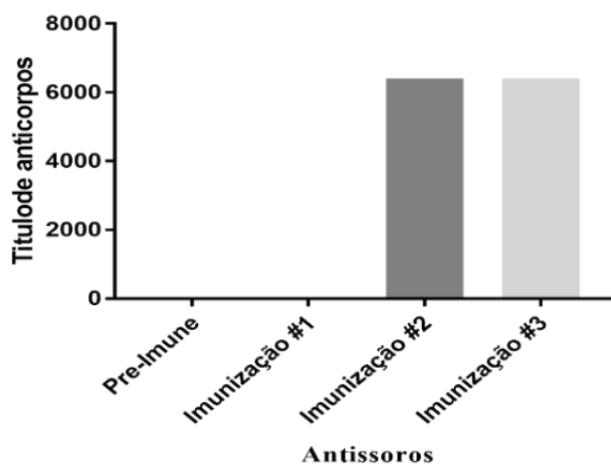


Figura 53: Determinação dos títulos de anticorpos do soro experimental anti-*B. gabonica* por ELISA.

Placas de ELISA foram sensibilizadas durante a noite com pool de venenos de *B. gabonica* e, posteriormente, incubadas com soro experimental. Na sequência, as placas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase e submetidas a revelação com H₂O₂ e OPD. Os resultados submetidos à leitura espectrofotométrica a 490 nm. Os títulos de anticorpos foram determinados a partir da diluição na qual se obteve a densidade óptica (D.O) 3 vezes maior que a D.O do soro pré-imune.

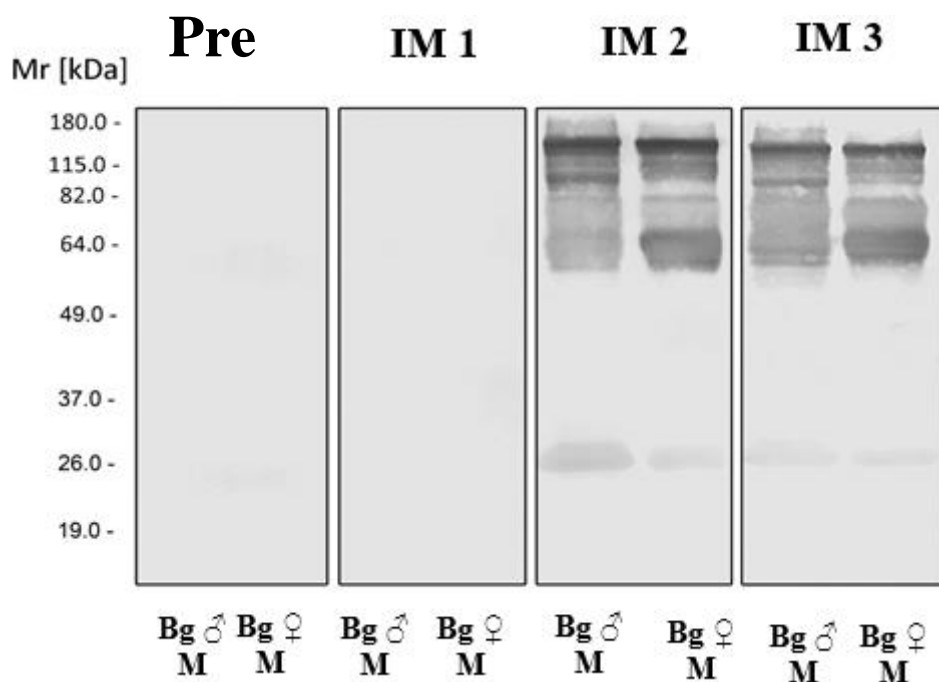


Figura 54: Western blot do soro anti-*B. gabonica*.

Amostras dos venenos (15 μ g) de *B. gabonica* foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE 12% em condições não redutoras e eletrotransferidas overnight para membranas de nitrocelulose e incubadas com o *pool* de soros experimentais nas diluições de 1:6400 títulos de anticorpos, durante uma hora a temperatura ambiente. Após a incubação, as membranas foram lavadas 3 vezes em PBS-Tween 0,05% e incubadas com anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina (diluído 1:7500) durante uma hora. Por fim, as membranas foram lavadas 3 vezes com PBS-Tween 0,05% e submetidas a revelação com NBT/BCIP (Promega), e as reações interrompidas pela adição de água. *Bitis gabonica* (Bg) Mufuma macho (♂); fêmea (♀).

4.5 - Conclusões do capítulo

1. Foram obtidos, pela primeira vez, soros experimentais murinos, a partir de venenos de serpentes das espécies *N. nigricollis*, *B. arietans*, e *B. gabonica* captadas na fauna angolana.
2. Os títulos de anticorpos obtidos em camundongos foram variáveis para cada um dos venenos testados.
3. Os resultados acima apresentados demonstram que os venenos de serpentes de importância médica em Angola, envolvidos nos acidentes ofídicos são imunogénicos. No entanto, os venenos viperídeos (*Bitis arietans* e *gabonica*) são mais imunogénicos em relação ao veneno elapídico (*Naja nigricollis*) e os soros murinos produzidos reconhecem um considerável número de proteínas de alto e baixo peso molecular dos referidos venenos. Foi também demonstrado que apesar das diferenças entre os venenos de animais dos dois sexos de uma mesma espécie e de regiões diferentes de Angola o grau de reconhecimento foi significativo.
4. Com estes resultados torna-se evidente que a futura produção de soros para uso humano deve ter em conta a variabilidade intraespecífica relacionada ao sexo e a distribuição geográfica das serpentes, de forma a obter um soro eficaz e capaz de neutralizar todos os efeitos tóxicos dos venenos das espécies que mais acidentes ofídicos causam em Angola.

CONCLUSÕES GERAIS

1. Existe um baixo nível de conhecimento dos profissionais da saúde em relação à identificação das espécies de serpentes angolanas que causam envenenamentos e o manuseio clínico dos mesmos, facto que constitui um elemento desfavorável para a projeção de estratégias de promoção, prevenção e de tratamento relacionadas com esta problemática.
2. O perfil clínico dos envenenamentos por mordeduras de serpentes angolanas apresenta-se com manifestações locais, sistémicas oftalmológicas e neurológicas.
3. O tratamento hospitalar das mordeduras de serpentes é escasso em detrimento de práticas de tratamento tradicional.
4. Os venenos de serpentes de importância médica em Angola, envolvidos nos acidentes ofídicos, apresentam uma notável variabilidade bioquímica intraespécies, relacionada ao sexo dos animais e regiões de onde são provenientes.
5. Os resultados aqui apresentados demonstram que os venenos de serpentes de importância médica em Angola, envolvidos nos acidentes ofídicos são imunogénicos. No entanto, os venenos viperídeos (*B. arietans* e *B. gabonica*) são mais imunogénicos em relação ao veneno elapídico (*N. nigricollis*) e os soros murinos produzidos reconhecem um considerável número de proteínas de alto e baixo peso molecular dos referidos venenos.
6. Com estes resultados torna-se evidente que a futura produção de soros para Angola deve ter em conta essa variabilidade e distribuição geográfica das espécies, de forma a obter um soro eficaz e capaz de neutralizar todos os efeitos tóxicos dos venenos das espécies que mais acidentes ofídicos causam neste país.

RECOMENDAÇÕES

1. Tornar as mordeduras de serpentes uma doença de notificação obrigatória em Angola.
2. Generalização a aplicação do questionário validado a outras regiões de Angola.
3. Expandir a estratégia de prevenção “Ndala Lutangila” a outras regiões do país.
4. Aprofundar o conhecimento sobre a biodiversidade das serpentes venenosas de Angola.
5. Criar um plano de formação sobre o manuseio clínico dos envenenamentos por serpentes de importância médica em Angola.
6. Caracterizar bioquímica- e imunogénicamente os venenos de outras espécies não estudadas.
7. Aprofundar os estudos dos venenos utilizando-se outras técnicas laboratoriais.
8. Obter soro antiofídico equino contra venenos de serpentes Angolanas.

BIBLIOGRAFIA

- Ainsworth, S., Petras, D., Engmark, M., Süssmuth, R. D., Whiteley, G., Albuлесcu, L. O., ... Calvete, J. J. (2018). The medical threat of mamba envenoming in sub-Saharan Africa revealed by genus-wide analysis of venom composition, toxicity and antivenomics profiling of available antivenoms. *Journal of Proteomics*, 172(August 2017), 173–189. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.08.016>
- Alirol, E., Sharma, S. K., Ghimire, A., Poncet, A., Combescure, C., Thapa, C., ... Chappuis, F. (2017). Dose of antivenom for the treatment of snakebite with neurotoxic envenoming: Evidence from a randomised controlled trial in Nepal. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005612>
- Araujo, M. C., Melo, R. L., Cesari, M. H., Juliano, M. A., Juliano, L., & Carmona, A. K. (2000). Peptidase Specificity Characterization of C- and N-Terminal Catalytic Sites of Angiotensin I-Converting Enzyme †. *Biochemistry*, 39(29), 8519–8525. <https://doi.org/10.1021/bi9928905>
- Barros, L., Soares, A., Costa, F., Rodrigues, V., Fuly, A., Giglio, J., ... Ferreira Junior, R. (2011). Biochemical and biological evaluation of gyroxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 17(1), 23–33. <https://doi.org/10.1590/S1678-91992011000100004>
- Bastos, C. M. V. (2012, February 9). *Análise da expressão gênica diferencial das glândulas de veneno de Bothrops jararaca (Serpentes: Viperidae)*. Universidade de São Paulo, São Paulo. <https://doi.org/10.11606/T.41.2012.tde-13072012-161408>
- Beolens, B., Watkins, M., & Grayson, M. (2011). *The Eponym Dictionary of Reptiles*. Book collections on Project MUSE. Baltimore: Johns Hopkins University Press.
- Bocage, B. du. (1895). *Herpétologie d'Angola et du Congo : ouvrage publié sous les auspices du Ministère de la marine et des colonies*. Lisboa: Imprensa Nacional. Retrieved from <https://www.biodiversitylibrary.org/item/25817>
- Boche, J., Chippaux, J. P., & Courtois, B. (1981). [Biochemical variations of West African snake venoms]. *Bulletin de La Societe de Pathologie Exotique et de Ses Filiales*, 74(3), 356–66. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7285271>
- Calvete, J. J. (2017). Venomics : integrative venom proteomics and beyond *. *Biochemical Journal*, 474(5), 611–634. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160577>

- Calvete, J. J., Marcinkiewicz, C., & Sanz, L. (2007). Snake Venomics of *Bitis gabonica gabonica*. Protein Family Composition, Subunit Organization of Venom Toxins, and Characterization of Dimeric Disintegrins Bitisgabonin-1 and Bitisgabonin-2 research articles. *Journal of Proteome Research*, 6(1), 326–336. <https://doi.org/10.1021/pr060494k>
- Chafiq, F., El Hattimy, F., Rhalem, N., Chippaux, J.-P., Soulaymani, A., Mokhtari, A., & Soulaymani-Bencheikh, R. (2016). Snakebites notified to the poison control center of Morocco between 2009 and 2013. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 22(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s40409-016-0065-8>
- Chen, P. C., Hayashi, M. A. F., Oliveira, E. B., & Karpel, R. L. (2012). DNA-Interactive Properties of Crostamine, a Cell-Penetrating Polypeptide and a Potential Drug Carrier. *PLoS ONE*, 7(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048913>
- Chippaux, J.-P., Akaffou, M. H., Allali, B. K., Dosso, M., Massougbedji, A., & Barraviera, B. (2016). The 6 th international conference on envenomation by Snakebites and Scorpion Stings in Africa: a crucial step for the management of envenomation. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 10–12. <https://doi.org/10.1186/s40409-016-0062-y>
- Chippaux, J. P. (1998). The development and use of immunotherapy in Africa. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 36(11), 1503–1506. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(98\)00140-8](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(98)00140-8)
- Chippaux, J. P. (2011). Estimate of the burden of snakebites in sub-Saharan Africa: A meta-analytic approach. *Toxicon*, 57(4), 586–599. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2010.12.022>
- Chippaux, J. P., Williams, V., & White, J. (1991). Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon*, 29(11), 1279–1303.
- Currier, R. B., Harrison, R. A., Rowley, P. D., Laing, G. D., & Wagstaff, S. C. (2010). Intra-specific variation in venom of the African Puff Adder (*Bitis arietans*): Differential expression and activity of snake venom metalloproteinases (SVMPs). *Toxicon*, 55(4), 864–873. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2009.12.009>
- Daltry, J. C., Wüster, W., & Thorpe, R. S. (1996). Diet and snake venom evolution. *Nature*, 379(6565), 537. <https://doi.org/10.1038/379537a0>
- Degueldre, M., Echterbille, J., Id, N. S., Damblon, C., Gouin, C., Mourier, G., ... Quinton, L. (2017). In-Depth Glyco-Peptidomics Approach Reveals Unexpected Diversity of Glycosylated Peptides and Atypical Post-Translational Modifications in *Dendroaspis angusticeps* Snake Venom.

International Journal of Molecular Sciences, 18,
<https://doi.org/10.3390/ijms18112453>

- Del Brutto, O. H., & Del Brutto, V. J. (2012). Neurological complications of venomous snake bites: A review. *Acta Neurologica Scandinavica*, 125(6), 363–372. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2011.01593.x>
- Doery, H., & Pearson, J. (1964). Phospholipase B in snake venoms and bee venom. *Biochemical Journal*, 92(3), 599–602.
<https://doi.org/10.1042/bj0920599>
- El Chamy Maluf, S., Dal Mas, C., Oliveira, E. B., Melo, P. M., Carmona, A. K., Gazarini, M. L., & Hayashi, M. A. F. (2016). Inhibition of malaria parasite *Plasmodium falciparum* development by crotamine, a cell penetrating peptide from the snake venom. *Peptides*, 78, 11–16.
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2016.01.013>
- Eursakun, S., Simsiriwong, P., & Ratanabanangkoon, K. (2012). Studies on the fractionation of equine antivenom IgG by combinations of ammonium sulfate and caprylic acid. *Toxicon*, 60(6), 1022–1029.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2012.07.005>
- Evans, H. J., & Barrett, A. J. (1987). A cystatin-like cysteine proteinase inhibitor from venom of the African puff adder (*Bitis arietans*). *The Biochemical Journal*, 246(3), 795–7. Retrieved from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1148349/>
- Fasoli, E., Sanz, L., Wagstaff, S., Harrison, R. A., Righetti, P. G., & Calvete, J. J. (2010). Exploring the venom proteome of the African puff adder, *Bitis arietans*, using a combinatorial peptide ligand library approach at different pHs. *Journal of Proteomics*, 73(5), 932–942. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.12.006>
- Fauci, A., Braunwald, E., Lisselbacher, K., Wilson, J., Martin, J., Kasper, D., ... Longo, D. (1999). *Harrison Medicina Interna: compêndio* (14th ed.). Lisboa: McGraw-Hill Portugal.
- Felicori, L. F., Souza, C. T., Velarde, D. T., Magalhaes, A., Almeida, A. P., Figueiredo, S., ... Sanchez, E. F. (2003). Kallikrein-like proteinase from bushmaster snake venom. *Protein Expression and Purification*, 30(1), 32–42.
[https://doi.org/10.1016/S1046-5928\(03\)00053-6](https://doi.org/10.1016/S1046-5928(03)00053-6)
- Fenwick, A. M., Gutberlet, R. L., Evans, J. A., & Parkinson, C. L. (2009). Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 156(3), 617–640. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.2008.00495.x>

- Ferreira, A. T. da S. (2006). *Caracterização das nucleotidases presentes no veneno da serpente bothrops jararaca - ênfase para as atividades ATPase E ADPase*. Universidade Estadual do Norte Fluminense. Retrieved from http://www.uenf.br/Uenf/Downloads/PGBB_6667_1241612243.pdf
- Fox, J. W., & Serrano, S. M. T. (2008). Exploring snake venom proteomes: Multifaceted analyses for complex toxin mixtures. *Proteomics*, 8(4), 909–920. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700777>
- Fry, B. G., Vidal, N., Norman, J. A., Vonk, F. J., Scheib, H., Ramjan, S. F. R., ... Hodgson, W. C. (2005). Early evolution of the venom system in lizards and snakes. *Nature*, 439(7076), 1–5. <https://doi.org/10.1038/nature04328>
- Fry, B. G., Winkel, K. D., Wickramaratna, J. C., Hodgson, W. C., & Wüster, W. (2003). Effectiveness of Snake Antivenom: Species and Regional Venom Variation and Its Clinical Impact. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, 22(1), 23–34. <https://doi.org/10.1081/TXR-120019018>
- Fung, H. T., Lam, K. K., Wong, O. F., & Lam, T. S. K. (2010). Local Antivenom Treatment for Ophthalmic Injuries Caused by a *Naja atra*. *Journal of Medical Toxicology*, 6(2), 147–149. <https://doi.org/10.1007/s13181-010-0068-8>
- Furtado, M. F. D., Travaglia-Cardoso, S. R., & Rocha, M. M. T. (2006). Sexual dimorphism in venom of *Bothrops jararaca*(Serpentes: Viperidae). *Toxicon*, 48(4), 401–410. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.toxicoN.2006.06.005>
- Gampini, S., Nassouri, S., Chippaux, J., & Semde, R. (2016). Retrospective study on the incidence of envenomation and accessibility to antivenom in Burkina Faso. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 22(10), 1–5. <https://doi.org/10.1186/s40409-016-0066-7>
- Garfin, S. R., Castilonia, R. R., Mubarak, S. J., Hargens, A. R., Russell, F. E., & Akeson, W. H. (1984). Rattlesnake bites and surgical decompression: results using a laboratory model. *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology*, 22(2), 177–182.
- Gold, B. S., Dart, R. C., Barish, R. A., Barry, S., D, G. M., Snakes, V., ... States, U. (2002). Bites of Venomous Snakes. *New England Journal of Medicine*, 347(5), 347–356. <https://doi.org/10.1056/NEJMra013477>
- Gopalakrishnakone, P., H, I., Mukherjee, A. K., Rahmy, T. R., & Vogel, C. W. (2015). *Snake Venoms – Toxinology*. Dordrecht: Springer Netherlands.
- Gopalakrishnakone, P., Inagaki, H., Vogel, C., Mukherjee, A. K., & Rahmy, T. R. (2017). *Snake Venoms*. Singapore: Springer. Retrieved from <http://www.springer.com/series/13330>

- Graham, R. L. J., McClean, S., O’Kane, E. J., Theakston, D., & Shaw, C. (2005). Adenosine in the venoms from viperinae snakes of the genus *Bitis*: Identification and quantitation using LC/MS and CE/MS. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 333(1), 88–94. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.05.077>
- Guidolin, R. G., Marcelino, R. M., Gondo, H. H., Morais, J. F., Ferreira, R. A., Silva, C. L., ... Silva, W. D. (2010). Polyvalent horse F(Ab`)₂ snake antivenom : Development of process to produce polyvalent horse F(Ab`)₂ antibodies anti-african snake venom. *African Journal of Biotechnology*, 9(16), 2446–2455.
- Gutiérrez, J. M., Escalante, T., Rucavado, A., Herrera, C., & Fox, J. W. (2016). A Comprehensive View of the Structural and Functional Alterations of Extracellular Matrix by Snake Venom Metalloproteinases (SVMPs): Novel Perspectives on the Pathophysiology of Envenoming. *Toxins*, 2(12), 304. <https://doi.org/10.3390/toxins8100304>
- Gutierrez, J. M., & Rucavado, A. (2000). Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie*, 82(9–10), 841–850.
- Gutiérrez, J. M., Theakston, R. D. G., & Warrell, D. A. (2006). Confronting the Neglected Problem of Snake Bite Envenoming : The Need for a Global Partnership. *PLoS Medicine*, 3(6), e150–e150. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030150>
- Gutiérrez, J. M., Warrell, D. A., Williams, D. J., Jensen, S., Brown, N., Calvete, J. J., & Harrison, R. A. (2013). The Need for Full Integration of Snakebite Envenoming within a Global Strategy to Combat the Neglected Tropical Diseases: The Way Forward. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(6), e2162. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002162>
- Hamako, J., Matsui, T., Suzuki, M., Ito, M., Makita, K., Fujimura, Y., ... Titani, K. (1996). Purification and Characterization of Bitiscetin, a Novel von Willebrand Factor Modulator Protein from *Bitis arietans* Snake Venom. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 226(1), 273–279.
- Harrison, R. A., & Gutiérrez, J. M. (2016). Priority Actions and Progress to Substantially and Sustainably Reduce the Mortality , Morbidity and Socioeconomic Burden of Tropical Snakebite. *Toxins*, 8(September 2015), 351. <https://doi.org/10.3390/toxins8120351>
- Harrison, R. A., Hargreaves, A., Wagstaff, S. C., Faragher, B., & Laloo, D. G. (2009). Snake Envenoming: A Disease of Poverty. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(12), e569. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000569>

- Hayashi, M. A. F., Nascimento, F. D., Kerkis, A., Oliveira, V., Oliveira, E. B., Pereira, A., ... Tersariol, I. L. S. (2008). Cytotoxic effects of crostamine are mediated through lysosomal membrane permeabilization. *Toxicology*, *52*(3), 508–517. <https://doi.org/10.1016/j.toxicology.2008.06.029>
- Hudson, B. J. (1988). Positive response to edrophonium in death adder (*Acanthopis antarcticus*) envenomation. *Australian and New Zealand Journal of Medicine*, *18*(6), 792–794.
- Jennings, B. R., Spearman, C. W., Kirsch, R. E., & Shephard, E. G. (1999). A novel high molecular weight fibrinogenase from the venom of *Bitis arietans*. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1427*(1), 82–91.
- Jerusalinsky, D., Cerveñansky, C., Peña, C., Raskovsky, S., & Dajas, F. (1992). Two polypeptides from *Dendroaspis angusticeps* venom selectively inhibit the binding of central muscarinic cholinergic receptor ligands. *Neurochemistry International*, *20*(2), 237–246. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0197-0186\(92\)90173-O](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0197-0186(92)90173-O)
- Kalita, B., Patra, A., Jahan, S., & Mukherjee, A. K. (2018). First report of the characterization of a snake venom apyrase (Ruviapyrase) from Indian Russell's viper (*Daboia russelii*) venom. *International Journal of Biological Macromolecules*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.038>
- Kang, T. S., Georgieva, D., Genov, N., Murakami, M. T., Sinha, M., Kumar, R. P., ... Kini, R. M. (2011). Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. *FEBS Journal*, *278*(23), 4544–4576. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08115.x>
- Kasturiratne, A., Wickremasinghe, A. R., Silva, N. De, Gunawardena, N. K., de Silva, N., Gunawardena, N. K., ... de Silva, H. J. (2008). The Global Burden of Snakebite: A Literature Analysis and Modelling Based on Regional Estimates of Envenoming and Deaths. *PLoS Medicine*, *5*(11), e218–e218. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050218>
- Kemparaju, K., & Girish, K. S. (2006). Snake venom hyaluronidase : a therapeutic target. *Cell Biochemistry and Function*, *52*(October 2005), 7–12. <https://doi.org/10.1002/cbf.1261>
- Kerkis, I., Hayashi, M. A. F., Prieto Da Silva, A. R. B., Pereira, A., De Sá Júnior, P. L., Zaharenko, A. J., ... Yamane, T. (2014). State of the art in the studies on crostamine, a cell penetrating peptide from South American rattlesnake. *BioMed Research International*, *2014*. <https://doi.org/10.1155/2014/675985>
- Knowles, J. C. (2012). Book Review. *Journal of Biomaterials Applications*, *26*(6), 761–762. <https://doi.org/10.1177/0885328212437192>

- Kodama, R. T., Cajado-Carvalho, D., Kuniyoshi, A. K., Kitano, E. S., Tashima, A. K., Barna, B. F., ... Portaro, F. V. (2015). New proline-rich oligopeptides from the venom of African adders: Insights into the hypotensive effect of the venoms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1850(6), 1180–1187. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.02.005>
- Kouassi, K. J. E., M'bra, K. I., Sery, B. J. L. N., Yao, L. B., Krah, K. L., Lohourou, G. F., ... Kodo, M. (2017). Amputation de membre secondaire à une morsure de vipère. *Archives de Pédiatrie*, 24(4), 350–352. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.arcped.2016.12.013>
- Lam, A., Camara, B., Kane, O., Diouf, A., & Chippaux, J.-P. (2016). Epidemiology of snakebites in Kédougou region (eastern Senegal): comparison of various methods for assessment of incidence and mortality. *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 22(9), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s40409-016-0064-9>
- Landeta, J. (2002). *El método Delphi: una técnica de previsión del futuro*. Barcelona: Ariel.
- Lomonte, B., & Calvete, J. J. (2017). Strategies in “snake venomics” aiming at an integrative view of compositional, functional, and immunological characteristics of venoms. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 23(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s40409-017-0117-8>
- Luiselli, L., Angelici, F. M., & Akani, G. C. (2000). Arboreal habits and viper biology in the African rainforest: The ecology of *Atheris Squamiger*. *Israel Journal of Zoology*, 46(4), 273–286. <https://doi.org/10.1560/RUW9-CERW-BDBF-P01J>
- Maita, N., Nishio, K., Nishimoto, E., Matsui, T., Shikamoto, Y., Morita, T., ... Mizuno, H. (2003). Crystal Structure of von Willebrand Factor A1 Domain Complexed with Snake Venom, Bitiscetin. *Journal of Biological Chemistry*, 278(39), 37777–37781. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305566200>
- Makowski, G. S., & Ramsby, M. L. (1998). Identification and partial characterization of three calcium- and zinc-independent gelatinases constitutively present in human circulation. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 46(5), 1043–1053.
- Mallow, D., Ludwig, D., & Nilson, G. (2003). *True vipers: natural history and toxinology of old world vipers*. Malabar: Krieger Publishing Company.
- Maria Gutierrez, J., Leon, G., Lomonte, B., Angulo, Y., Gutiérrez, J. M., León, G., ... Angulo, Y. (2011). Antivenoms for snakebite envenomings. *Inflammation & Allergy Drug Targets*, 10(5), 369–380. <https://doi.org/10.2174/187152811797200669>

- Marsh, N., & Williams, V. (2005). Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. *Toxicon*, *45*(8), 1171–1181.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.016>
- Méndez, I., Gutiérrez, J., Angulo, Y., Calvete, J. J., & Lomonte, B. (2011). Comparative study of the cytolytic activity of snake venoms from African spitting cobras (*Naja* spp., Elapidae) and its neutralization by a polyspecific antivenom. *Toxicon*, *58*(6–7), 558–564.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.08.018>
- Montecucco, C., Rossetto, O., Caccin, P., Rigoni, M., Carli, L., Morbiato, L., ... Paoli, M. (2009). Different mechanisms of inhibition of nerve terminals by botulinum and snake presynaptic neurotoxins. *Toxicon*, *54*(5), 561–564.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.12.012>
- Nascimento, F. D., Hayashi, M. A. F., Kerkis, A., Oliveira, V., Oliveira, E. B., Rádis-Baptista, G., ... Kerkis, I. (2007). Crostamine mediates gene delivery into cells through the binding to heparan sulfate proteoglycans. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(29), 21349–21360.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M604876200>
- Neurath, H., & Neurath, H. (2016). Evolution of Proteolytic Enzymes. *American Association for the Advancement of Science Stable*, *224*(4647), 350–357.
- Nikai, T., Momose, M., Okumura, Y., Ohara, A., Komori, Y., & Sugihara, H. (1993). Kallidin-Releasing Enzyme from *Bitis arietans* (Puff Adder) Venom. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *307*(2), 304–310.
<https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1593>
- Ohkura, M., Miyashita, Y., Nikai, T., Suzuki, J., Komori, Y., Sugihara, H., & Ohizumi, Y. (1996). Properties of Ca⁺⁺ release induced by puff adder lectin, a novel lectin from the snake *Bitis arietans*, in sarcoplasmic reticulum. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *277*(2), 1043–1048.
- Oliveira, P., & Castro, A. (2015). Epidemiology of Snakebites in Angola. In *18th World Congress of the International Society on Toxicology*. Oxford. Retrieved from <http://lpmhealthcare.com/wp-content/uploads/2015/09/IST-2015-Agenda-for-WeB.pdf>
- Oliveira, P. R. (2014). *Caracterização dos conhecimentos em Toxicologia na educação médica em Angola*. (Tese de Mestrado). Universidade Agostinho Neto, Faculdade de Medicina, Luanda), Malanje. Retrieved from c
- Oliveira, P. R. S., Neto, A. P., Arcia, I. R., Castro, A. G., Poutou, E., Escandon, A., ... Francisco, A. (2014). Caracterização epidemiológica dos acidentes ofídicos em Angola 2013-2014. In *Congresso Internacional de Toxicologia* (p. 41). Malange, Angola. Retrieved from <http://www.ulan-cimetox->

malanje.net/pt/conteudo/congresso/resumo/Livro_de_resumos.html

- Oliveira, P. S. D. E., Rocha, M. T., Castro, A. G., Betancourt, I. R., Wen, F. A. N. H. U. I., Neto, A. P., ... Paulo, S. (2016). New records of Gaboon viper (*Bitis gabonica*) in Angola. *The Herpetological Bulletin*, 136, 42–43.
- Ortega Mohedano, F. (2008). El método Delphi, prospectiva en Ciencias Sociales a través del análisis de un caso práctico. *Revista EAN*, (64), 31.
<https://doi.org/10.21158/01208160.n64.2008.452>
- Paixão-Cavalcante, D., Kuniyoshi, A. K., Portaro, F. C. V, da Silva, W. D., & Tambourgi, D. V. (2015). African Adders: Partial Characterization of Snake Venoms from Three *Bitis* Species of Medical Importance and Their Neutralization by Experimental Equine Antivenoms. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(2), e0003419. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003419>
- Peigneur, S., Orts, D. J. B., Prieto da Silva, A. R., Oguiura, N., Boni-Mitake, M., de Oliveira, E. B., ... Tytgat, J. (2012). Crostamine Pharmacology Revisited: Novel Insights Based on the Inhibition of KV Channels. *Molecular Pharmacology*, 82(1), 90–96. <https://doi.org/10.1124/mol.112.078188>
- Petras, D., Heiss, P., Harrison, R. A., Süssmuth, R. D., & Calvete, J. J. (2016). Top-down venomomics of the East African green mamba, *Dendroaspis angusticeps*, and the black mamba, *Dendroaspis polylepis*, highlight the complexity of their toxin arsenals. *Journal of Proteomics*, 146, 148–164.
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.06.018>
- Petras, D., Sanz, L., Segura, A., Herrera, M., Villalta, M., Solano, D., ... Calvete, J. J. (2011). Snake Venomomics of African Spitting Cobras: Toxin Composition and Assessment of Congeneric Cross-Reactivity of the Pan-African EchiTAB-Plus-ICP Antivenom by Antivenomics and Neutralization Approaches. *Journal of Proteome Research*, 10(3), 1266–1280. <https://doi.org/10.1021/pr101040f>
- Pidde-Queiroz, G., Magnoli, F. C., Portaro, F. C. V, Serrano, S. M. T., Lopes, A. S., Paes Leme, A. F., ... Tambourgi, D. V. (2013). P-I snake venom metalloproteinase is able to activate the complement system by direct cleavage of central components of the cascade. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(10), e2519. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002519>
- Pough, F. H., Heiser, J. B., & McFarland, W. N. (2008). *A Vida dos Vertebrados* (4º). São Paulo: Atheneu Editora.
- Price, J. A. (2007). A colorimetric assay for measuring phospholipase A2 degradation of phosphatidylcholine at physiological pH. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70(3), 441–444.
<https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2006.10.008>

- Pukrittayakamee, S., Warrell, D. A., Desakorn, V., McMichael, A. J., White, N. J., & Bunnag, D. (1988). The hyaluronidase activities of some Southeast Asian snake venoms. *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology*, 26(7), 629–637. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3176052>
- Pung, Y. F., Kumar, S. V., Rajagopalan, N., Fry, B. G., Kumar, P. P., & Kini, R. M. (2006). Ohanin, a novel protein from king cobra venom: Its cDNA and genomic organization. *Gene*, 371(2), 246–256. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.12.002>
- Rawlings, N. D., Tolle, D. P., & Barrett, A. J. (2004). Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochemical Journal*, 378(3), 705–716. <https://doi.org/10.1042/bj20031825>
- Rees, B., Samama, J. P., Thierry, J. C., Gilibert, M., Fischer, J., Schweitz, H., ... Moras, D. (1987). Crystal structure of a snake venom cardiotoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(10), 3132–3136. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3472200>
- Reichenheim, M. E., & Moraes, C. L. (2002). Buscando a qualidade das informações em pesquisas epidemiológicas. In M. C. S. Minayo & S. F. Deslandes (Eds.), *Caminhos do Pensamento: Epistemologia e Método* (pp. 227–254). Rio de Janeiro: Editora Fiocruz.
- Richards, R., St Pierre, L., Trabi, M., Johnson, L. A., De Jersey, J., Masci, P. P., & Lavin, M. F. (2011). Cloning and characterisation of novel cystatins from elapid snake venom glands. *Biochimie*, 93(4), 659–668. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.12.008>
- Sampieri, R. H., Collado, C. F., & Lucio, P. B. (2006). *Metodología de la investigación*. México: McGraw Hill.
- Slagboom, J., Kool, J., Harrison, R. A., & Casewell, N. R. (2017). Haemotoxic snake venoms : their functional activity , impact on snakebite victims and pharmaceutical promise. *British Journal of Haematology*, 177(February), 947–959. <https://doi.org/10.1111/bjh.14591>
- Slowinski, J. B., Knight, A., & Rooney, A. P. (1997). Inferring Species Trees from Gene Trees : A Phylogenetic Analysis of the Elapidae (Serpentes) Based on the Amino Acid Sequences of Venom Proteins. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 8(3), 349–362.
- Spawls, S., & Branch, B. (1995). *The Dangerous Snakes of Africa: Natural History: Species Directory: Venoms and Snakebite*. Sanibel Island,: Ralph Curtis – Books.

- Squaiella-Baptistão, C. C., Gutiérrez, J. M., Tambourgi, D. V., Marcelino, J. R., & Ribeiro da Cunha, L. E. (2014). Anticomplementary Activity of Horse IgG and F(ab')₂ Antivenoms. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *90*(3), 574–584. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0591>
- Tahis, L. de S., Fabio, C. M., & Wilmar, D. da S. (2015). Characterization of a hemorrhage-inducing component present in Bitis arietans venom. *African Journal of Biotechnology*, *14*(12), 999–1008. <https://doi.org/10.5897/AJB2014.14319>
- Tambourgi, D. V. (2010). Anais da 62^a Reunião Anual da SBPC - Natal, RN - Julho/2010.
- Tambourgi, D. V., & van den Berg, C. W. (2014). Animal venoms/toxins and the complement system. *Molecular Immunology*, *61*(2), 153–162. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2014.06.020>
- Tan, K. Y., Tan, C. H., Fung, S. Y., & Tan, N. H. (2015). Venomics, lethality and neutralization of Naja kaouthia (monocled cobra) venoms from three different geographical regions of Southeast Asia Kae. *Journal of Proteomics*, *120*, 105–125. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.02.012>
- Tanaka, G. D., Furtado, M. de F. D. F. D., Portaro, F. C. V., Sant'Anna, O. A., & Tambourgi, D. V. (2010). Diversity of Micrurus snake species related to their venom toxic effects and the prospective of antivenom neutralization. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *4*(3), e622. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000622>
- Tasoulis, T., & Isbister, G. K. (2017). A Review and Database of Snake Venom Proteomes. *Toxins*, *9*(9), 290. <https://doi.org/10.3390/toxins9090290>
- Thakur, R., & Mukherjee, A. K. (2017). Pathophysiological significance and therapeutic applications of snake venom protease inhibitors. *Toxicon*, *131*, 37–47. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.03.011>
- Theakston, R. D., Phillips, R. E., Looareesuwan, S., Echeverria, P., Makin, T., & Warrell, D. A. (1990). Bacteriological studies of the venom and mouth cavities of wild Malayan pit vipers (*Calloselasma rhodostoma*) in southern Thailand. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *84*(6), 875–879.
- Tytgat, J., Vandenberghe, I., Ulens, C., & Van Beeumen, J. (2001). New polypeptide components purified from mamba venom. *FEBS Letters*, *491*(3), 217–221. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02201-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02201-3)
- Vélez, S. M., Salazar, M., Acosta de Patiño, H., Gómez, L., Rodríguez, A., Correa, D., ... Gutiérrez, J. M. (2017). Geographical variability of the venoms of four

- populations of *Bothrops asper* from Panama: Toxicological analysis and neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon*, 132, 55–61.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.04.002>
- Vidal, N., & Hedges, S. B. (2005). The phylogeny of squamate reptiles (lizards, snakes, and amphisbaenians) inferred from nine nuclear protein-coding genes. *Comptes Rendus Biologies*, 328(10–11), 1000–1008.
<https://doi.org/10.1016/j.crv.2005.10.001>
- Warrell, D. A. (2010). Snake bite. *The Lancet*, 375(9708), 77–88.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61754-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61754-2)
- World Health Organization. (2017). Neglected tropical diseases. Retrieved from http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/
- World Health Organization, Organisation, W. H., Organization, W. H., World Health Organization, & Organization, W. H. (2010). These Guidelines were adopted by the WHO Expert Committee on Biological Standardization at its 59th meeting which took place in Geneva from 13 to 17 October 2008 and will be published in the WHO Technical Report Series ., 1–134.
- Yamane, E. S., Bizerra, F. C., Oliveira, E. B., Moreira, J. T., Rajabi, M., Nunes, G. L. C., ... Hayashi, M. A. F. (2013). Unraveling the antifungal activity of a South American rattlesnake toxin crotamine. *Biochimie*, 95(2), 231–240.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.09.019>
- Yamazaki, Y., Matsunaga, Y., Tokunaga, Y., Obayashi, S., Saito, M., & Morita, T. (2009). Snake Venom Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF-Fs) Exclusively Vary Their Structures and Functions among Species * □. *Journal of Biological Chemistry*, 284(15), 9885–9891.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M809071200>
- Zaher, H., Graziotin, F. G., Cadle, J. E., Murphy, R. W., Moura-Leite, J. C. De, & Bonatto, S. L. (2009). Molecular phylogeny of advanced snakes (Serpentes , Caenophidia) with an emphasis on South American Xenodontines : a revised classification and descriptions of new taxa. *Papéis Avulsos de Zoologia (São Paulo)*, 49(11), 115–153. <https://doi.org/10.1590/S0031-10492009001100001>

ANEXOS

Anexo 1: Fluxograma geral da investigação



Anexo 2: Lista S3 de Proteínas raras (Tasoulis & Isbister, 2017)

Table S3. The remaining 36 protein families in viper and elapid venoms have been classed as rare protein families. Most have only been recorded in one or two species of snakes, and always made up less than 10% of the whole venom.

Quantitatively Minor Component Protein Families	Number of Snake Species Possessing the Toxin	Maximum Total Amount (% of WV)	Species
glutaminy cyclase	8	2	<i>Cryptelytrops purpureomaculatus</i>
aminopeptidase	6	0.8	<i>Bothriechis aurifer</i>
endonuclease	6	0.6	<i>Naja mossambica</i>
cobra venom factor	5	1.1	<i>Naja naja/N. kaouthia</i>
transferrin	3	1.8	<i>Hydrophis platurus</i>
waprin	3	1.7	<i>Naja nigricollis</i>
endopeptidase	3	1.2	<i>Bungarus fasciatus</i>
glutathione peroxidase	3	0.2	<i>Micrurus clarki</i>
kazal-type inhibitor	2	9	<i>Bothriechis supraciliaris</i>
galactose-binding protein	2	5.5	<i>Bothrops jararaca</i>
trypsinogen	2	1.2	<i>Bungarus fasciatus</i>
albumin	2	1.1	<i>Hydrophis platurus</i>
prokineticin	2	0.4	<i>Dendroaspis polylepis</i>
selectin	1	<0.3	<i>Naja melanoleuca</i>
peroxiredoxin	1	<0.1	<i>Crotalus atrox</i>
protein c activator	1	8.87	<i>Agkistrodon contortrix</i>
cholinesterase	1	6	<i>Naja naja</i>
polyglycine peptides	1	4.1	<i>Bothriechis supraciliaris</i>
Glycine-histidine rich peptide	1	7.5	<i>Viridovipera stejnegeri</i>
flavine monoamine oxidase	1	2.5	<i>Naja melanoleuca</i>
lysosomal acid lipase A	1	2.4	<i>Micrurus altirostris</i>
fibrinogenases	1	2.28	<i>Agkistrodon contortrix</i>
haemoglobins	1	2.1	<i>Hydrophis platurus</i>
neurotrophin	1	1.6	<i>Calloselasma rhodostoma</i>
aspartic protease	1	1.12	<i>Vipera berus</i>
type-B carboxylesterase	1	1.1	<i>Naja melanoleuca</i>

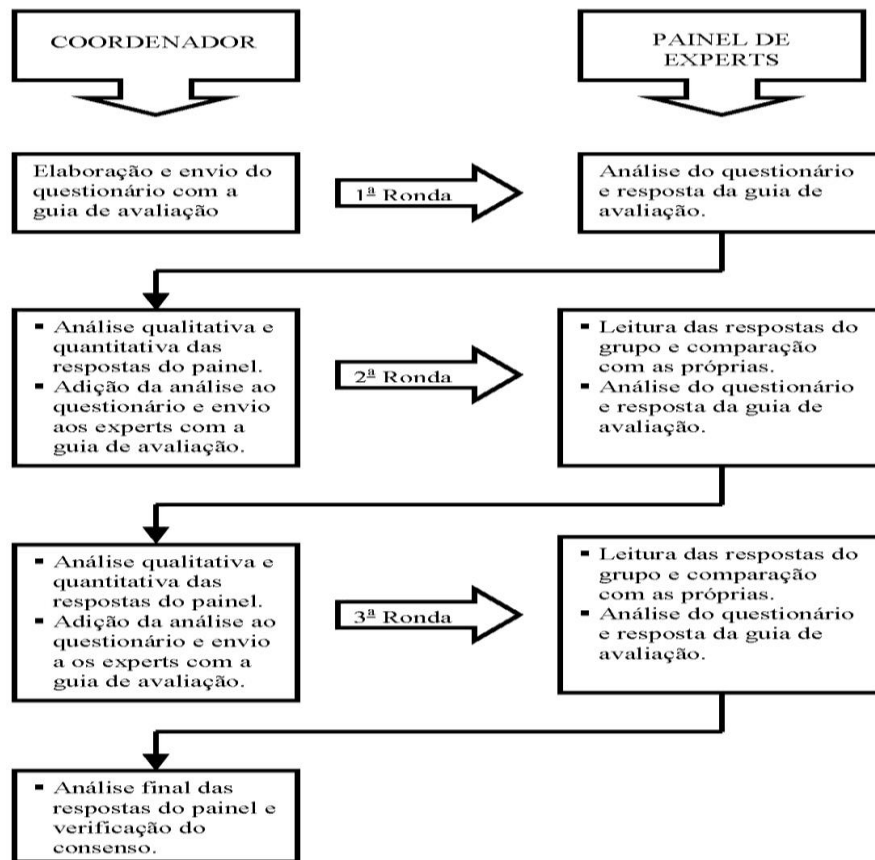
Anexo 3: Definição e operacionalização das variáveis

Variáveis	Indicadores	Valor final	Tipo
Lugar de procedência	Unidimensional Subjetiva	Sítio onde mora	Qualitativa nominal Politómica
Idade	Unidimensional Objetiva	Segundo anos cumpridos	Quantitativa continua
Sexo	Unidimensional Subjetiva	Segundo sexo biológico	Qualitativa nominal Dicotómica
Estado civil	Unidimensional Subjetiva	Solteiro Casado União consensual	Qualitativa nominal Politómica
Experiência com mordeduras de serpentes	Unidimensional Subjetiva	Sim Não Próprio De outro Desconhecido Conhecido Familiar	Qualitativa nominal Politómica
Conhecimento do nome da serpente	Unidimensional Subjetiva	Sim Não Ignorado	Qualitativa nominal Politómica
Descrição da serpente	Bidimensional Cor Comprimento e largura	Segundo as características que descrevam os inquiridos	Qualitativa nominal Politómica
Identificação	Unidimensional Subjetiva	<i>Dendroaspis polylepis</i> <i>Dendroaspis jamesoni</i> <i>Bitis gabonica</i> <i>Naja nigricollis</i> <i>Bitis arietans</i>	Qualitativa nominal Politómica
Local da picada	Unidimensional Subjetiva	Cabeça Braço Antebraço Mão Coxa Perna Pé Tronco	Qualitativa nominal Politómica
Manifestações Locais	Unidimensional Subjetiva	Dor Equimose Edema (de carácter progressivo) Necrose Bolhas Hemorragia no ponto da picada	Qualitativa nominal Politómica
Manifestações Locais (Oftalmopatia)	Unidimensional subjetiva	Dor ocular Injeção conjuntival Edema conjuntival Erosão da córnea Outras	Qualitativa nominal Politómica
Manifestações de neurotoxicidade	Unidimensional Subjetiva	Dificuldade para a mastigação e deglutição Sensação de formigueiro Outras	Qualitativa nominal Politómica

Definição e operacionalização das variáveis (Continuação)

Variáveis	Indicadores	Valor final	Tipo
Manifestações sistêmicas	Unidimensional Subjetiva	Hemorragias (epistaxe, gengivorragia ou outros sangramentos) Consequências hemodinâmicas. (hipotensão e choque) Mialgias Vagais (vômitos, diarreias) Renais (oligúria, anúria, urina escura) Outras	Qualitativa nominal Politômica
Tratamento Pré-hospitalar	Unidimensional Subjetiva	Sim Não Ignorado	Qualitativa nominal Politômica
Tratamento hospitalar	Unidimensional subjetiva	Banco de urgência Terapia intensiva Internamento normal	Qualitativa nominal Politômica
Complicações	Unidimensional Subjetiva	Infeção Síndrome compartimental Amputação Insuficiência Renal Insuficiência Respiratória Outras	Qualitativa nominal Politômica
Tempo de coagulação	Unidimensional Subjetiva	Normal Alterado Não realizado	Qualitativa nominal Politômica
Creatinoquinase	Unidimensional Subjetiva	Normal Alterado Não realizado	Qualitativa nominal Politômica
Desidrogenasse láctica	Unidimensional subjetiva	Normal Alterado Não realizado	Qualitativa nominal Politômica
Evolução	Unidimensional Subjetiva	Cura Amputação Óbito Deformação cicatricial	Qualitativa nominal Politômica
Tratamento com soro antiofídico	Unidimensional Subjetiva	Sim. Não Ignorado	Qualitativa nominal Politômica
País de procedência e o nome do laboratório ou fabricante do soro	Unidimensional Subjetiva	Segundo resposta do inquerido	Qualitativa nominal Politômica

Anexo 4: Procedimento de aplicação do método Delphi



Anexo 5: Guia para a validação do questionário por critério de especialista

(MÉTODO DELPHI)

Apresentamos-lhe um questionário que servirá para determinar o nível de conhecimento dos médicos em Angola sobre a toxicologia dos envenenamentos. Será preciso que você faça uma avaliação exaustiva.

Sua seleção para esta avaliação não foi por azar; deve-se ao prestígio que alcançou durante a prática profissional. Não esqueça de avaliar todos os aspetos, usando a escala de 1 a 5, onde 1 é a qualificação mais baixa (totalmente em desacordo) e 5 a mais alta (totalmente de acordo).

I. Dados do avaliador.

Grau científico:

Categoria docente:

Categoria de investigação:

Anos de experiência:

II. Guia de avaliação.

Uma vez lido, revisto e analisado o questionário, marque com um “X” a qualificação que você outorga a cada aspeto.

Aspeto a avaliar	5	4	3	2	1
Estruturação do questionário					
Facilidade de compreensão do conteúdo					
Sequência lógica das perguntas					
Cumprimento do objetivo do questionário					
Avaliação geral do questionário					

Anexo 6: Questionário aplicado aos profissionais da saúde



UNIVERSIDADE LUEJI A'NKONDE FACULDADE DE MEDICINA DE MALANJE CENTRO DE INVESTIGAÇÃO E INFORMAÇÃO DE MEDICAMENTOS E TOXICOLOGIA CIMETOX – MALANJE

QUESTIONÁRIO

Estimado colega, o Centro de Investigação e Informação de Medicamentos e Toxicologia (CIMETOX) da Faculdade de Medicina de Malanje da Universidade Lueji A' Nkonde, está a realizar uma investigação sobre as mordeduras de serpentes e o conhecimento que a população tem sobre as mesmas, pela importância do tema e implicação na morbimortalidade por esta causa no país, gostaríamos de poder contar com o vosso critério em relação ao tema assim, como também do inquérito que anexamos em termos de:

- Pertinência do tema.
- Utilidade.
- Necessidade
- Factibilidade do estudo.
- Novidade
- Dados recolhidos no inquérito são os suficientes ou gostaria de acrescentar algum mais que considere necessário

Os resultados deste estudo, permitir-nos-ão obter dados e informações para o desenho de Estratégias Educativas e Interventivas em matéria de prevenção, redução, e tratamento específico das mordeduras de serpentes no nosso país.

A informação que fornecerá é anónima e somente vai ser utilizada para fins de pesquisa, investigação e formação.

Muito obrigada!

Pesquisador _____ Assinatura _____

Data _____

ACIDENTES POR SERPENTES

DADOS GERAIS

1 - LUGAR DE PROCEDÊNCIA:

BAIRRO _____ MUNICÍPIO _____
PROVÍNCIA _____

2 - IDADE _____

3 - SEXO: F _____ M _____

4 - ESTADO CIVIL:

SOLTEIRO (A) _____ CASADO (A) _____ UNIÃO CONSENSUAL _____

5 - OCUPAÇÃO:

TRABALHADOR _____ ESTUDANTE _____ DESEMPREGADO _____

6 - JÁ ALGUMA VEZ TEVE EXPERIÊNCIA PRÓPRIA OU DE OUTRÉM COM MORDEDURAS DE SERPENTES.

- Sim
- Não
- Próprio
- De outro
- Desconhecido
- Conhecido
- Familiar

7 - CONHECE O NOME DA SERPENTE?

- Sim
- Não
- Ignorado

Se conhece, especificar:

8 - DESCRIÇÃO DA SERPENTE

Cor ou cores da serpente, especificar.....

Comprimento e largura da serpente, especificar.....

9 - PODERÁ IDENTIFICÁ-LA NUMA DAS FOTOS ABAIXO?

1- Mamba verde



2- Mamba negra



3- *Bitis gabonica*



4- *Naja nigricollis* (cuspideira)



5- *Bitis arietans* (bufadora)



10 - LOCAL DA PICADA

Cabeça

Braço

Antebraço

Mão

Coxa

Perna

Pé

Tronco

11 - MANIFESTAÇÕES LOCAIS (na região da picada):

Dor

Equimose

Edema (de carácter progressivo)

Necrose.

Bolhas.

Hemorragia no ponto da picada.

12 - MANIFESTAÇÕES LOCAIS (OFTALMOPATIA) POR COBRAS CUSPIDERAS

Dor ocular.

Injeção conjuntival.

Edema conjuntival.

Erosão da córnea.

Outras, especificar.....

13 - MANIFESTAÇÕES DE NEUROTOXICIDADE:

- Dificuldade para a mastigação e deglutição.
- Visão turva ou diplopia.
- Fasciculações.
- Dificuldade para a mastigação e deglutição.
- Parestesias. (Cãibras). Sensação de formigueiro.
- Outras (especificar)

14 - MANIFESTAÇÕES SISTÉMICAS:

- Hemorragias (epistaxe, gengivorragia ou outros sangramentos).
- Consequências hemodinâmicas. (hipotensão e choque).
- Mialgias.
- Vagais (vômitos, diarreias)
- Renais (oligúria, anúria, urina escura)
- Outras (especificar)

15 - TRATAMENTO PRÉ-HOSPITALAR:

- Sim
- Não
- Ignorado

Se tratamento pré-hospitalar sim, especificar:

16 - TRATAMENTO HOSPITALAR:

- Banco de urgência.
- Terapia intensiva.
- Internamento normal.

17 - COMPLICAÇÕES:

- Infecção.
- Síndrome compartimental.
- Amputação.
- Insuficiência Renal.
- Insuficiência Respiratória.
- Outras (especificar)

18 - TESTES DE LABORATÓRIO

Tempo de coagulação. (TC)

1. Normal.
2. Alterado
3. Não realizado

Creatinoquinase (CPK).

1. Normal.
2. Alterado.
3. Não realizado.

Desidrogenase láctica (DHL).

1. Normal.
2. Alterado.
3. Não realizado

19- EVOLUÇÃO DO CASO:

Cura.

Amputação

Óbito.

Deformação cicatricial.

20 - TRATAMENTO COM SORO ANTIOFÍDICO:

Sim.

Não.

Ignorado.

21 - CONHECE O PAÍS DE PROCEDÊNCIA E O NOME DO LABORATÓRIO OU FABRICANTE DO SORO?

Se conhece, especificar:

Anexo 7: Outros resultados da investigação

Tratamento Pré-Hospitalar VS Complicações

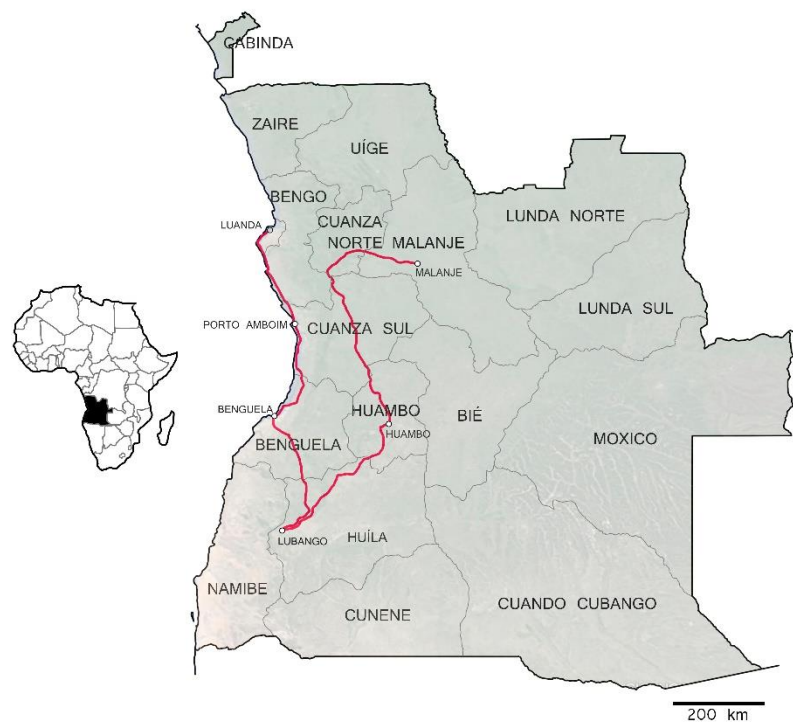
Tratamento Pré-Hospitalar	Complicações										
	Choque	Dificuldade em	Dores nos olhos e	Gangrena	infecção	Necrose muscular	Necrose cutânea	Síndromecomparti	Insuficiência renal	Insuficiência respiratória	Total
água de bateria											0
Água de bateria e cortes		1									1
água de milho (fule)			1								1
alternativa tradicional									1		1
Antibiótico					1						1
Areia											0
cabeça de cobra											0
cortado com faca											0
Cortes											0
cortes no local da picada											0
Corticosteroides					1						1
Curas tradicionais					1	1	1				3
Folhas da mata											0
Incisão local											0
lavagem com água											0
lavagem com água e garrote											0
lavagem com água e sabão											0
Lavagem e compressa									1		1
lavagem e hidrocortisona									1		1
Medicamento tradicional											0
Medicamento tradicional (folhas)											0
Medicamento tradicional (raízes)											0
Medicamentos											0
medicina tradicional											0
no bairro											0
picadas profundas a volta da picada											0
planta de cagolulo pequeno											0
pomada analgésica											0

Tratamento Pré-Hospitalar	Complicações										
	Choque	Dificuldade em	Dores nos olhos e	Gangrena	infecção	Necrose muscular	Necrose cutânea	Síndromecomparti	Insuficiência renal	Insuficiência respiratória	Total
posto de saúde											0
Raízes											0

Tratamento Pré-Hospitalar VS Complicações (continuação)

Tratamento Pré-Hospitalar	Complicações										
	Choque	Dificuldade em	Dores nos olhos e	Gangrena	infecção	Necrose muscular	Necrose cutânea	Síndromecomparti	Insuficiência renal	Insuficiência respiratória	Total
Torniquete					1						1
torniquete e plantas											0
torniquete e raízes											0
torniquete, cortaduras, lavados		1									1
Tradicional					1					1	2
tradicional (raízes)											0
tradicional (umbundo)											0
tratamento caseiro											0
Vacinação											0
Ventosas											0
ventosas e chifre de animal											0
ventosas e chifre de cabrito											0
<i>Tratamento Desconhecido</i>	1			1	3	1	1	1	2	8	28
Total	1	2	1	1	8	2	2	1	2	12	42

Anexo 8: Províncias percorridas durante a expedição Ndala Lutangila



Anexo 9: Folhetos distribuídos, que foram produzidos pelo CIMETOX

ATITUDES QUE EVITAM O APARECIMENTO DE ANIMAIS PEÇONHENTOS

1. Não acumular lixo doméstico. O lixo deve manter-se fechado. (Figura 1)
2. Manter os quintais, jardins e terrenos baldios, sempre limpos.
3. Não acumular objectos antigos perto de casa.
4. Fazer a limpeza de locais com vasta folhagem, usando botas, luvas e calças compridas.
5. Andar sempre calçado.
6. Ao trabalhar com construção ou lavra, usar luvas de raspa de couro e botas altas para protecção. Usar luva de raspa de couro para proteger as mãos antes de mexer em tocas, lenha, pedras, hortaliças e folhas secas.
7. Não usar insecticidas contra o animal.
8. Jamais introduzir a mão em frestas ou buracos no chão.
9. Olhar por onde caminha atenciosamente e em locais onde se deseja apanhar pequenos objectos ou animais.
10. Aplicar telas nas janelas, nas soleiras de portas é necessário colocar saquinhos de areia ou frisos de borracha.
11. Combater a infestação de roedores. (Figura 2)
12. Não manusear animais peçonhentos vivos ou mortos.
13. Evitar queimar terrenos baldios, pois desalojam os animais.
14. Roupas, calçados e toalhas devem sempre ser examinados antes de usados.
15. Importantíssimo preservar os predadores naturais das serpentes. Como por exemplo o **Secretário**, o **Serpentário**. (Figura 3)
16. Não tentar diferenciar cobras venenosas das não venenosas. Somente um especialista pode verificar a diferença entre as duas.



(Figura 1)



(Figura 2)



(Figura 3)



A *Bitis Gabonica* é o maior membro do género *Bitis*, família *Viperidae*, mas também é uma víbora muito pesada e tem grandes dentes (até 5 cm). Tem uma grande produção de veneno. Os adultos têm em média 1,20-1,50 m de comprimento, com um máximo de 2 metros. As picadas por *Bitis Gabonica* são relativamente raras, devido à sua natureza dócil e ao facto de que a sua ocorrência é limitada principalmente às áreas de floresta tropical. O veneno causa edema e hemorragia.



A *Dendroaspis Polylepsis* é membro da família *Elaeidae*. **A Mamba Preta** tem a pele dorsal que varia de castanho, verde-oliva, e cinza. O nome veio, da coloração preta, no interior da sua boca. A cabeça é estreita e alongada e seu corpo pode chegar a medir 4 metros. **A Mamba Preta** pode ser encontrada nas savanas, florestas e pedreiras. O veneno causa neurotoxicidade.



A *Bitis Arietans* é membro do género *Bitis*, família *Viperidae*. Tem corpo robusto, curto e grosso. A cabeça é grande, triangular e bem diferenciada do corpo. A cauda é curta, bem diferenciada do corpo. Os olhos são pequenos e as pupilas verticais. Algumas são de cor amarelo-brilhante, com uma faixa preta na região ocular e uma série de manchas escuras ponteadas e dirigidas para trás das costas. Em outros casos, é de cor escura com manchas amarelas. É uma espécie nocturna e terrestre.



A *Naja Nigricollis* é membro da família *Elaeidae*. Os adultos têm em média 1,2-2,2 m de comprimento, com um máximo de 2,8 m. Algumas são pretas ou cinza-pálido, com a região ventral amarela ou vermelha com uma banda preta no pescoço. Com frequência apresentam uma barra laranja no pescoço. Tem a capacidade de expelir jactos de veneno que podem atingir de forma pulverizada os olhos e a boca da vítima e causar: dor ocular, injeção e edema conjuntival. Sua mordedura causa inflamação dos tecidos.



Anexo 10: Placas de aviso nas áreas de risco







CIMETOX
CENTRO DE INVESTIGAÇÃO E INFORMAÇÃO
DE MEDICAMENTOS E TOXICOLOGIA

AVISO

ÁREA DE PERIGO DE MORDEDURAS DE SERPENTES

CAMINHE SEMPRE CALÇADO • EVITE CAMINHAR POR CIMA DE VEGETAÇÃO
EM CASO DE ACIDENTE VÁ IMEDIATAMENTE PARA O HOSPITAL OU LIGUE PARA O CIMETOX

CONTACTOS DO CIMETOX 24 HORAS
Telemóvel 943 002 006 – 912 225 301 – 912 225 304 Telefone 251235 531 – 251235 532 – 251235 533 – 251235 534
Email fmm.cimetox-malanje@hotmail.com Site www.ulan-cimetox.net

Anexo 11: Equipe de trabalho. Colocação de placas de aviso em Porto Amboim - Província do Cuanza Sul.



Anexo 12: Extração de veneno de *Naja nigricollis* Cuanza Sul



Anexo 13: Trabalho com os profissionais do centro de Saúde de Caibambo



Reconhecimento de espécies que, geralmente, provocam acidentes ofídicos e diagnóstico dos envenenamentos.

Anexo 14: Artigo científico sobre distribuição de *Bitis gabonica* em Angola

NATURAL HISTORY NOTE

The Herpetological Bulletin 136, 2016: 42-43

New records of Gaboon viper (*Bitis gabonica*) in Angola

PAULA S. DE OLIVEIRA^{1,2,3,*}, MARISA T. ROCHA⁴, ARNALDO G. CASTRO³,
IRIS R. BETANCOURT¹, FAN HUI WEN⁴, ANDRÉ P. NETO², MARIA L. BASTOS³,
DENISE V. TAMBOURGI⁴ & SAVIO S. SANT'ANNA⁴.

¹Medical Faculty, Lueji A'Nkonde University, Malanje, Angola.

²Research and Information for Drug and Toxicology Center, Malanje, Angola.

³UCIBIO / REQUIMTE, Toxicology Laboratory, Faculty of Pharmacy, University of Porto, Portugal.

⁴Instituto Butantan, São Paulo, Brazil.

*Corresponding author Email: pau.laregina80@gmail.com

The Gaboon viper (*Bitis gabonica*) is a sedentary snake distributed across the tropical and subtropical forests, woodlands and savannas of sub-Saharan Africa (e.g. Angelici et al., 2000; Warner, 2009). The geographical distribution ranges from Nigeria to southern Sudan, through Uganda, western Kenya, southeastern Tanzania, Zambia, Democratic Republic of Congo, the extreme north of Angola (Zaire and Cabinda provinces), northern Zululand, and South Africa (Spawls et al, 1995). Between April 2015 and May 2015 a search was made for *B. gabonica* through four provinces of Angola (South Kwanza, Benguela, Huila and Malange). This included requesting local people to deliver newly-captured individuals (dead or alive). Subsequently eight specimens of *B. gabonica* were found and added to the CIMETOX collection (Table 1, Fig. 1 & 2). All snakes encountered were sent to the Medical Faculty of Malange, Lueji N'konde University. Live snakes were housed in a serpentarium; dead animals were fixed in formalin and placed in the Snake Collection of the Centre for Research and Information on Drug and Toxicology (CIMETOX) in the same department.

These collections expanded our knowledge of the distribution of this species in Angola, to include south into Benguela Province and Malange (Fig.1). The *B. gabonica* from Benguela was collected in a woodland thicket environment, while those in Malange were in a forest of tall bushes and savanna mosaic. According to Marsh and

Whaler (1984) *B. gabonica* occupies mostly woodland thicket habitats and this type of vegetation can be found between Malange and Benguela (República de Angola, 2006). More inventories in Angola are needed to confirm these assumptions.



Figure 1. Geographical distribution of *B. gabonica*. The cross hatched area corresponds to the previously known distribution. The white spots indicate locations of new specimens.

Table 1. Dates of collection, location, geographical coordinates, size and sex of *B. gabonica* collected in Angola. F = Female; M = Male; SVL = Snout-vent length; nd = not deposited

Date of collection	Municipality (Province)	Sex	SVL (cm)	Geographic coordinates		Catalogue number
				Latitude	Longitude	CMTOX
April 2014	Cacuso (Malange)	F	115	-9.4994°S	16.1613 °E	0010
25/3/15	Caimbambo (Benguela)	F	125	-13.1677 °S	13.7663 °E	0013
29/3/15	Kalandula (Malange)	F	118	-9.1956 °S	15.9026 °E	0015
30/3/2015	Kalandula (Malange)	M	108	-9.1956 °S	15.9027 °E	0016
01/04/2015	Kalandula (Malange)	M	109	-9.1956 °S	15.9027 °E	0018
02/04/2015	Kalandula (Malange)	F	150	-9.2097 °S	15.8906 °E	0019
02/04/2015	Kalandula (Malange)	F	121	-9.1907 °S	15.9159 °E	0020
04/05/2015	Kalandula (Malange)	M	119	-9.3872 °S	15.9441 °E	0021
30/05/2015	Dundo (Luanda Norte)	M	195	-7.3667 °S	20.8167 °E	nd



Figure 2. Sample of *B. gabonica* collected in Kalandula, Angola (29/03/2015)

REFERENCES

- Angelici, F., Effah, C., Inyang, M.A., & Luiselli, L. (2000). A preliminary radiotracking study of movements, activity patterns and habitat use of free-ranging Gaboon vipers, *Bitis gabonica*. *Revue d'Ecologie: La Terre et la Vie* 55: 45-55.
- Marsh, N.A. & Whaler, B.C. (1984): The Gaboon viper (*Bitis gabonica*): Its biology, venom components and toxinology. *Toxicon* 22: 669-694.
- Spawls, S., Branch, B. & Branch, W.R. (1995). *The Dangerous Snakes of Africa: Natural History, Species Directory, Venoms and Snakebite*. Ralph Curtis Pub. Dubai, 192p
- Warner, J.K. (2009). Conservation Biology of the Gaboon adder (*Bitis gabonica*) in South Africa. Master Thesis. University of the Witwatersrand, South Africa.120p.

Accepted: 15 May 2016

Anexo 15: Atendimento de caso de mordedura de serpente no dia da chegada à Huíla



Anexo 16: Conferência aos profissionais de Saúde do Hospital Geral de Huíla



Anexo 17: Prevenção primária junto aos populares da Comuna do Mpindi- Micosse, Matala



Anexo 18 e 19: *B. arietans* e *B. gabonica* encontradas em Malanje



Anexo 20: Participação de Angola na 69ª Conferência Mundial da OMS para a reintrodução das mordeduras de serpente na lista de doenças tropicais negligenciadas em 2016



Anexo 21: Snake venoms from Angola: Intra-specific variations and immunogenicity

Accepted Manuscript

Snake venoms from Angola: Intra-specific variations and immunogenicity

Paula Regina Simões de Oliveira, Felipe Silva de França, Isadora Maria Villas Boas, Marisa Maria Teixeira da Rocha, Sávio Stefanini Sant'Anna, Maria de Lourdes Bastos, Denise V. Tambourgi



PII: S0041-0101(18)30154-5
DOI: [10.1016/j.toxicon.2018.04.013](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.04.013)
Reference: TOXCON 5862

To appear in: *Toxicon*

Received Date: 24 February 2018

Revised Date: 6 April 2018

Accepted Date: 14 April 2018

Please cite this article as: Oliveira, Paula.Regina.Simões.de., França, F.S.d., Villas Boas, I.M., Rocha, M.M.T.d., Sant'Anna, Sá.Stefanini., Lourdes Bastos, M.d., Tambourgi, D.V., Snake venoms from Angola: Intra-specific variations and immunogenicity, *Toxicon* (2018), doi: 10.1016/j.toxicon.2018.04.013.

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

1 **Snake venoms from Angola: intra-specific variations and immunogenicity**

2

3 Paula Regina Simões de Oliveira¹, Felipe Silva de França², Isadora Maria Villas Boas²,
4 Marisa Maria Teixeira da Rocha³, Sávio Stefanini Sant'Anna³, Maria de Lourdes
5 Bastos⁴, Denise V Tambourgi^{2*}

6

7 ¹Faculty of Medicine, Lueji A'Nkonde University, Malanje, Angola

8 ²Immunochemistry Laboratory, Butantan Institute, São Paulo, Brazil

9 ³Herpetology Laboratory, Butantan Institute, São Paulo, Brazil

10 ⁴UCIBIO REQUIMTE, Toxicology Laboratory, Faculty of Pharmacy, University of
11 Porto, Porto, Portugal

12

13

14 *Corresponding author

15 E-mail: denise.tambourgi@butantan.gov.br (DVT)

16

17 Keywords

18 *Naja nigricollis*; *Bitis arietans*; *Bitis gabonica*; Angolan snake venoms; intra-specific
19 variations; gender; geographic distribution; immunogenicity

20

Highlights

Naja nigricollis, *Bitis arietans* and *Bitis gabonica* snakes, collected in various provinces of Angola, present large intraspecific variations.

These variations were associated to the gender and to the geographic origin of the snakes.

For the preparation of efficient therapeutic antivenom, intra-species variability should be taken into account.

Abstract

Snakebite is a public health problem in many countries of world. These accidents are considered a Neglected Tropical Disease and are responsible for a high morbidity and mortality index in South and Southeast Asia and Sub-Saharan Africa. In this study, we have biochemically characterized male and female venoms from *Naja nigricollis*, *Bitis arietans* and *Bitis gabonica* snakes, collected in various provinces of Angola. These snake venoms possess a combination of enzymes that may act in the generation and development of some of the clinical manifestations of the envenomations. Here, it was also shown that Angolan snake venoms present distinctive immunogenic properties and large intraspecific variations, associated to the gender and geographic origin of the snakes. With these results, it is possible to suggest that for the preparation of a therapeutic antivenom, intra-species variability should be taken into account, in order to obtain an efficient serum to neutralize the toxic effects of the Angolan snake venoms.

1. Introduction

Envenomation by snakebite is a public health problem, which affects many countries of the world (Chippaux, 2011; Gutierrez et al., 2013). It is estimated that, in the sub-Saharan Africa, 314,000 accidents, 7,300 deaths and 8,000 amputations occur annually (Chippaux, 2011). In West Africa, the number of the accidents varies from 10,000 to 100,000 snakebites, with 1,000 to 10,000 deaths (Kasturiratne et al., 2008). Due to the relevance of the accidents and their consequences, snakebites were added to the Neglected Tropical Diseases list, by the World Health Organization (2017).

The epidemiological situation of snakebites in Angola is so far unknown. Patients, particularly in rural areas, do not seek or do not have access to health services, making it difficult to obtain official record of the cases (World Health Organization, 2007; 2010). Data from neighbouring countries of Angola, such as the Republic of Congo, show 120-450 bites *per* 100,000 inhabitants *per* year (Pugh et al., 1980, Chippaux. 2011). Following the approach to estimate the snakebites in unrecorded countries, Angola is in the region 18 of Central Sub-Saharan Africa, where poisoning estimative is 18.176 to 47.820 cases *per* year, out of which from 256 to 3.083 people die (Chippaux, 2013; Kasturiratne et al., 2008).

Young adults involved in agricultural activities are the most commonly affected individuals. The complex pathophysiological effects of the snake venoms act locally or systemically, and result in dysfunction and sequelae when not properly treated (Snow et al., 1994).

The administration of specific antivenom is the only effective treatment for poisonings by snakebites. However, unsuccessful efforts of public health policies and of the production industry have led Africa to a supply crisis, since the early 1990s, causing increased morbidity and mortality by these accidents (Gutierrez et al., 2013). There is no production of antivenoms in most African countries, being the access to antivenom therapy only possible by purchasing the sera from private laboratories (Warrell, 2008).

Among the dangerous snakes found in Angola, there are *N. nigricollis*, *B. arietans*, and *B. gabonica* (Litschka-Koen, 2011).

N. nigricollis (Black-necked Spitting cobra), Elapidae family, is encountered in North and Sub-Saharan Africa countries (Spawls and Branch, 1995; Clinical Toxinology Resources, 2017a). Envenoming by *N. nigricollis* causes distinct symptoms mainly featured by local damage, which involve pain, swelling, blistering and extent tissue necrosis. In some cases, tissue necrosis is responsible for loss of function of the affected limb, since the lesion can evolve to chronic ulceration, osteomyelitis, arthrodesis, hypertrophic scars, keloid formation and malignant transformation (Rivel et al., 2016; World Health Organization, 2010). The local damage can be accompanied by systemic reactions, such as inflammation, hemostatic disturbances, heart and hepatic injury and neurotoxicity (Tambourgi et al., 1994; Clinical Toxinology Resources, 2017a; Ghani et al., 2009; 2010; MacKay et al., 1969; Warrell et al., 1976; World Health Organization, 2010). Proteomic analyzes of the *N. nigricollis* venom revealed the presence of several components, such as Three Finger Toxins (3FTX), metallo- (SVMP) and serinoproteinases (SVSP), phospholipases A₂ (PLA₂), Cysteine Rich Secretory Proteins (CRISP) and hyaluronidases (Petras et al., 2010).

B. arietans (Puff Adder) is found on Middle East, North Africa and Sub-Saharan Africa (Spawls and Branch, 1995; Clinical Toxinology Resources, 2017b), while *B. gabonica* (Gabon Adder) is found only in Sub-Saharan Africa (Spawls and Branch, 1995; Clinical Toxinology Resources, 2017c). These snakes belong to the Viperidae family and cause several accidents, with similar clinical manifestations, including local and systemic reactions, such as swelling, pain, blistering and necrosis, headache, hemorrhage, coagulation disturbances, severe hypotension, nausea, vomiting, diarrhea, dizziness and convulsions (Clinical Toxinology Resources, 2017b, 2017c; World Health Organization, 2010). *Bitis* venoms present SVMP, SVSP, PLA₂, hyaluronidases, C-type lectins (CTL), Bradykinin-potentiating peptides (BPPs), among other components (Calvete et al., 2007; Kodama et al., 2015; Paixão-Cavalcante et al., 2015).

The treatment indicated to envenoming by these snakes is the serum therapy. Since Angolan snake venoms are poorly investigated and, considering that there is no specific antivenom against them, the aim of this study was to evaluate biochemical and immunogenic properties of these venoms and the possible variability related to gender and geographic location of the snakes.

2. Material and methods

2.1. Chemicals and reagents

Tween 20, N-Cetyl-N,N,N-trimethylammonium bromide (CTAB), ortho-phenylenediamine (OPD), hyaluronic acid, diaminobenzidine (DAB), phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), 1,10-phenanthroline (Phe), bovine serum albumin (BSA), goat anti-mouse (GAM) IgG horseradish peroxidase (IgG-HRPO), concanavalin A (Con A) and Wheat Germ Agglutinin (WGA) labelled with peroxidase, were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). Bicinchoninic Acid Protein (BCA), GAM IgG labelled with alkaline phosphatase (IgG-AP), 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP) and nitroblue tetrazolium (NBT) were obtained from Promega Corp. (Madison, WI, USA). Fluorescent resonance energy transfer (FRET) substrates Abz-FRSSRQ-EDDnp (Abz-FRSSRQ) were acquired from GenOne Biotechnologies (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). 8-16% SDS-PAGE (Amersham ECL Gel 8-16%, 10 wells) were gotten from GE Healthcare Life Sciences (Uppsala, Sweden). Aluminum Hydroxide was from Prati Donaduzzi (São Paulo, Brazil). EnzChek Phospholipase A2 Assay Kit was purchased from Invitrogen (California, USA).

2.2. Venoms

N. nigricollis, *B. arietans* and *B. gabonica* snakes were collected during an expedition named Ndala Lutangila (term used by local populations when referring to the Black Mamba) on March and April of 2014. On this expedition, 1350 km of Angola were covered, including the Provinces of Cuanza Sul, Benguela, Huíla and Malanje. This expedition aimed to collect snakes and to diffuse actions to populations and health professionals for the prevention of snakebite accidents (Figure 1). The collected animals (Table 1) were individually kept in appropriate cages. Then, they were transported and maintained in the Serpentarium of CIMETOX, at the Medical School of Malanje, Angola. Following manual extraction of the venoms from the different species in the CIMETOX Laboratory, the samples were frozen, lyophilized and stored at 4 °C. *Crotalus durissus terrificus* and *Tityus serrulatus* venoms were obtained from Butantan Institute. Protein concentration of the venoms was estimated by the BCA kit, according to manufacturer's recommendations. The final concentration of the venoms was adjusted to 5 mg/mL with sterile saline solution. Samples were aliquoted and stored at -80 °C.

2.3. Electrophoresis and Western blot

Samples (30 µg) of female venoms of *N. nigricollis* from Malanje and Cuanza Sul, of male and female venoms of *B. arietans* from 2 municipalities of Malanje (Mufuma and Calandula) and Cuanza Sul, of male and female venoms of *Bitis gabonica* from Mufuma, were separated on 8-16% gradient SDS-PAGE (Laemmli, 1970) under reducing and non-reducing conditions. The gels were silver stained (Morrissey, 1980) or transferred onto nitrocellulose membranes as described by Towbin et al. (1979). The membranes were blocked with 5% BSA in PBS. Sugar residues were detected with peroxidase labeled Con A or WGA, diluted in PBS-BSA 0.01% at 1:1000 and 1:2000, respectively. Reactive proteins were detected using a solution containing 0.1% hydrogen peroxide, 0.5 mg/mL DAB in PBS. To determine the specificity and cross-reactivity of experimental murine antivenoms, the nitrocellulose membranes were incubated for 1 h at room temperature (RT) with the antisera diluted 1:800 (for anti-*N. nigricollis* venoms) or 1:6400 (for anti-*Bitis spp* venoms) in PBS - 0.1% BSA. Then, the membranes were incubated with GAM/IgG-AP diluted 1:7500 in PBS, 0.1% BSA, 0.05% Tween for 1 h at RT. Immunoreactive proteins were detected using NBT/BCIP, according to the manufacturer's instructions.

2.4. Hyaluronidase activity

The hyaluronidase activity of the venoms was evaluated following the procedures of Pukrittayakamee et al. (1988). Briefly, venom samples (20 µg) were incubated during 15 min, at 37°C with hyaluronic acid. After this incubation, the reactions were stopped by adding CTAB solution (2.5% CTAB and 2% NaOH). Turbidity measurements were determined in ELISA plate reader (Multiskan EX, Labsystems, Finland) at λ 405 nm. *T. serrulatus* scorpion venom was used as positive control. Hyaluronidase activity was expressed as TRU (turbidity reducing units)/mg.

2.5. PLA₂ activity

PLA₂ activity was determined using EnzChek™ Phospholipase A2 Assay Kit, according to the manufacturer's recommendations. Venom samples (0.5 µg) were incubated with a phospholipid mix containing 10 mM Dioleoylphosphatidylcholine and 10 mM Dioleoylphosphatidylglycerol, in 96-well microtiter plates. The increase on the

fluorescence was measured using a spectrometer FLUOstar Omega (BMG Labtech, Ortenberg, Germany) at the wavelength λ_{EM} 460 and λ_{EX} 515 nm, at 37°C, for 10 minutes. *C. d. terrificus* venom was used as positive control. Specific activity was expressed as Units of Fluorescence (UF) *per minute per microgram* of venom.

2.6. Proteolytic activity of the venoms

The fluorescence resonance energy transfer (FRET) substrate, Abz-FRSSRQ, was used to study the Angolan snake venom's proteolytic activity in the presence or absence of inhibitors, following the procedures described by Araújo et al. (2000). The assays were conducted in 100 μ L of phosphate buffer (50 mM phosphate, 20 mM NaCl, pH 7.4), containing the venom sample (1.0 μ g), the FRET substrate in a final concentration of 5 μ M, on Corning® 96-well plates. The reactions were also performed in the presence of venom pre-treated with PMSF (5 mM) or Phe (5 mM), for 30 min at room temperature, before substrate addition. The reactions were monitored at 37 °C (λ_{EM} =420 nm and λ_{EX} =320 nm) in a fluorescence spectrophotometer (FLUOstar Omega, BMG Labtech, Offenburg, Germany). As positive control, *C. d. terrificus* venom was used. Specific activity was expressed as units of free fluorescence (UF) of cleaved substrate/min/ μ g of venom.

2.7. Animals and venoms immunization procedures

Male Swiss mice, aged 2 months and weighting between 18 and 22 g, were obtained from the Central Animal Breeding from Butantan Institute. Groups of Swiss mice (n=6) were immunized by subcutaneous route with *B. arietans*, *B. gabonica* or *N. nigricollis* venom pools (5 μ g/animal), diluted 1:25 in aluminum hydroxide, as adjuvant. During the process, exploratory bleeds were carried out to evaluate the kinetics of the antibody production against the venoms components. The blood obtained from the mice was centrifuged at 665 \times g during 10 minutes. The sera obtained were stored at -20 °C until analyzes. The experiments were in accordance with ethical principles in animal research, adopted by the Brazilian Society of Animal Care Legislation n° 11.794/08. The experimental protocol was approved by Institutional Animal Care and use Committee (CEUAIB N° 1364/15).

2.8. Antibody titers and cross-reactivity

ELISA plates were coated with 1 µg/well of venoms pools from *N. nigricollis*, *B. arietans* or *B. gabonica* in PBS (overnight at 4 °C). Plates were blocked with PBS-5% BSA and incubated with increasing dilutions of the murine antivenoms for 1 h at 37 °C. After incubation, the plates were washed with PBS/0.05% Tween 20 and incubated with the specific conjugated IgG-HRP during 1 h at room temperature. Then, plates were washed and the reactions developed with OPD substrate, according to the manufacturers conditions. The absorbances were recorded in a spectrophotometer (Labsystems, Finland) at λ 492 nm. The antibody titers were established as the highest antivenom dilution, which produced an absorbance two times greater than that determined for the preimmune sera.

2.9. Statistical analysis

Statistical analysis were performed by *t test*, one way ANOVA and Bonferroni's multiple comparisons test, using Prism 6 (GraphPad Software, Inc., USA). Statistical differences were considered significant when $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Biochemical analyses of *N. nigricollis*, *B. gabonica* and *B. arietans* venoms

All venoms from snakes collected in Mufuma, Calandula (both are from the municipalities of Malanje) and Cuanza Sul presented different electrophoretic profiles containing bands with molecular weight varying from ~20 to 250 kDa (Figures 2-4). Some of these bands are probably in complex or in present disulfide bonds inter- or intra-chains, as observed by the presence of extra bands of lower molecular weight after reduction. Differences in the electrophoretic profile, mainly in bands with molecular weight, ranging from 37 to 180 kDa, could be observed in the *N. nigricollis* female venoms. Besides that, *N. nigricollis* venom from Malanje showed a protein band with high molecular weight, which was not found in the venoms from snakes of Cuanza Sul (Figure 2). Electrophoretic differences were observed in the profiles of *B. arietans* venoms, associated with the gender and/or geographic distribution (Figure 3). Differences in the electrophoretic profile associated with the gender were also observed in the *B. gabonica* venoms from animals collected in Mufuma (Figure 4).

The lectin western blot analysis showed that several proteins from the Angolan snake venoms contain N-acetyl-D-glucosamine and/or sialic acid, and α -D-mannosyl and/or α -D-glucosyl groups, as determined by using WGA and ConA, respectively (Figure 5). The specificity of the lectin binding was confirmed by the absence of bands on the membranes incubated with lectins in the presence of the specific sugars (data not shown). Moreover, as seen in Figure 5, variations in the glycosylation profile of the venoms components presented in the three species could also be associated with the gender and/or geographic distribution of the snakes from Cuanza Sul, Malanje, Mufuma and Calandula.

3.2. Enzymatic activities of Angolan snake venoms

Figure 6 shows that all Angolan snake venoms presented detectable levels of hyaluronidase activity. However, this activity was statistically higher in female venoms of *B. arietans* and *B. gabonica* from Mufuma, as compared to the male venoms of animals collected in the same province. Moreover, significant statistically differences in the hyaluronidase activity were also observed in female venoms from *N. nigricollis* collected in Cuanza Sul and Malanje, as well as from *B. arietans* collected in Mufuma, Calandula and Cuanza Sul.

The majority of the *Angolan snake* venoms, tested in this study, presented PLA₂ activity, with the exception of *B. gabonica* male venom from Mufuma, whose activity was not detectable (Figure 7). Nevertheless, female venom of *B. gabonica* snake collected in the same province, *i.e.* Mufuma, exhibited a high phospholipase A₂ activity (~2000 UF/min/ μ g). Intraspecific variations in the PLA₂ activity, also associated to the gender, were observed in the venoms of *B. arietans* from Mufuma, being the male's venom activity higher than the female's. The activity of *N. nigricollis* female venoms, from Cuanza Sul and Mufuma, were similar (~25000 UF/min/ μ g). Similar levels of activity were also observed in *B. arietans* male and female venom from Calandula and Cuanza Sul (~3500 UF/min/ μ g), although these venoms presented significantly higher activity than the snake venoms from Mufuma (Figure 7).

Finally, proteolytic activity of Angolan snake venoms upon FRET peptide substrate was investigated. In linear kinetics conditions (excess of substrate), the venoms from *B. arietans* and *B. gabonica* presented significant proteolytic activity on the peptide Abz-FRSSRQ. Variations depended on the gender as well as on the origin of the snake (Table

2). However, none of the venoms from *N. nigricollis* were able to hydrolyse the substrate (data not shown). Upon pre-incubation with specific inhibitors, these activities could be partially or completely abolished (Table 2). The proteolytic activity of *B. arietans* venom from Mufuma was inhibited up to 90% by PMSF and between 50 to 60% by phenanthroline, while *B. arietans* from Cuanza Sul was 100% inhibited by phenanthroline and 94% by PMSF. The venom of *B. gabonica* did not show significant proteolytic differences between genders. The male venom had its activity inhibited by around 31% by PMSF and 62% by phenanthroline, whereas the female venom had a proteolytic activity inhibition around 38% by PMSF and 55% by phenanthroline.

3.3. Immunogenicity

The immunogenic properties of the Angolan snake venoms were evaluated by ELISA, using sera obtained from mice inoculated with pools of venom from the different species. Figure 8 shows that all venoms were able to induce IgG antibody production, and their kinetic was dependent on the number of inoculations. Control serum samples, collected from animals before starting the immunization process, or collected 15 days after the first venom injection, have no detectable levels of IgG antibodies. The antibody titers obtained from mice immunized with *Bitis* spp venoms were higher than the ones obtained from mice inoculated with *N. nigricollis* venom.

By western blot (Figure 9), it was possible to observe that the anti-*N. nigricollis* mice serum was able to recognize better, after the second round of immunization, the homologous female venom from Malanje. For *B. arietans*, it can be seen that the specific antiserum was also able to better recognize components present in the homologous female venom from Cuanza Sul. No differences were observed for the recognition of male and female venoms of *B. gabonica* from Mufuma by the specific murine antiserum.

4. Discussion

In the present study, we showed that the venoms from *N. nigricollis*, *B. arietans* and *B. gabonica* snakes presented variations in their protein composition and biological properties. These animals were collected during an expedition that covered about 1,350

km, including several provinces of Angola. These variations could be associated with the species of the snakes, and/or their geographic origin and/or gender.

Venoms of females from *N. nigricollis* collected in two different provinces of Angola, *i.e.*, Cuanza Sul and Malanje, exhibit not only differences in the electrophoretic profile of proteins, as well as in their glycosylation, and levels of hyaluronidase activity. Glycosylation is a post-translational modification that enhances snake venom complexity, as demonstrated with *B. jararaca* venom (Zelanis et al, 2010; 2012). Hyaluronic acid is a polysaccharide of high molecular mass, which is an essential component of extracellular matrices in soft interstitial tissues. Hyaluronidase-mediated degradation of hyaluronic acid increases interstitial tissue permeability and lowers the viscosity of extracellular fluids (Girish and Kemparaju, 2006), enhancing diffusion of toxins and promoting their direct contact with cellular membranes. In many animal venoms, PLA₂ is important for immobilization and digestion of the prey, as well as responsible for a variety of toxic and pharmacological actions, some of which are associated with the pathophysiology of snakebite envenoming (Gutiérrez and Lomonte, 2013). Similar and strong PLA₂ activity was detected in *N. nigricollis* females' venoms from the two provinces.

The presence of hyaluronidases and PLA₂ in *N. nigricollis* venom from Tanzania, Togo, Cameroon and Nigeria have already been reported in a proteomic study performed by Petras and collaborators (2011). Thus, the high content of hyaluronidase and PLA₂ may contribute for the clinical manifestations of the envenomation, which includes swelling, blistering and extent tissue necrosis (World Health Organization, 2010). On the other hand, using the FRET substrate, Abz-FRSSRQ, it was not possible to detect proteolytic activity in the *N. nigricollis* venoms, although SVMPS and SVSP have been described in a proteomic analysis (Petras et al, 2011).

Differences in the female *N. nigricollis* venoms were also observed when their immunogenic properties were investigated. Mice were used as model for the immunization, and it was possible to detect IgG production, although with low titers at the end of the third immunization. This experimental antivenom was able to recognize better components of *N. nigricollis* from Malanje than from Cuanza Sul, suggesting that female venom components of the snake from Malanje are higher immunogenic.

In relation to *Bitis* spp venoms, it was possible to observe that the electrophoretic profiles vary between the *B. arietans* and *B. gabonica* species analyzed in this study. These results are in agreement with data from previous biochemical (Boche et al., 1981), proteomic (Calvete et al., 2007) and genomic (Currier et al., 2010) studies. All *Bitis* venoms, as here analyzed, presented hyaluronidase and PLA₂ activity, which was also previously described in proteomic (Calvete et al, 2007) and functional studies (Paixão-Cavalcante et al, 2015). Nonetheless, it was possible to observe a large difference in the hyaluronidase activity associated to the gender in the venoms of *B. arietans* and *B. gabonica* from Mufuma, as well as related to the geographic origin in the venoms of *B. arietans*. Levels of phospholipase activity were also different in venoms from *B. arietans* and this could be associated to both gender and geographic distribution. A surprising finding was the absence of PLA₂ activity in the male venom of *B. gabonica* and a strong activity in the female venom. This data deserves further study, with the analysis of a larger panel of venoms obtained from *B. gabonica* male specimens from Mufuma.

Bitis spp venoms displayed hydrolytic activity on the peptide Abz-FRSSRQ. Interestingly, the proteases of the *Bitis* venoms here analysed were inhibited by PMSF and 1.10 phenanthroline. Again, differences in the hydrolytic activity, upon the FRET substrate, were observed and associated with the geographic distribution and/or gender of the *Bitis* spp snakes. Moreover, these results were different from our previous study analysing venoms from *B. arietans*, obtained from males and females snakes, with different ages, captured in Guinea, S. Tome, Angola and Mozambique, and maintained in captivity (Paixão Cavalcante et al, 2015). In this previous study, the hydrolytic activity of *B. arietans* venom was totally inhibited by EDTA and Phenanthroline, but not by PMSF, indicating a large variation in this activity related to the origin of the snakes. All *B. arietans* and *B. gabonica* venoms were highly immunogenic for mice, but differences in the proteins recognition by the experimental antivenom were also observed and associated with gender and geographic distribution of the snakes.

In conclusion, in this report we have biochemically characterized the venom from three species of snakes involved in accidents with humans in Angola. These venoms possess a combination of enzymes that may act in the generation and development of some of the clinical manifestations of the envenomation. Furthermore, we reported here that these venoms showed distinctive immunogenic potential, and that the venoms' differences

may be associated to the gender and geographic origin of the snakes. These results, emphasizes that for the preparation of an efficient therapeutic antivenom, the intra-species variability should be taken into account, in order to obtain an efficient serum to neutralize the toxic effects of the Angolan snake venoms.

References

Araújo, M.C., Melo, R.L., Cesari, M.H., Juliano, M.A., Juliano, L., Carmona, A.K. (2000) Peptidase specificity characterization of C- and N-terminal catalytic sites of angiotensin I-converting enzyme. *Biochem* 39:8519-8525.

Boche, J., Chippaux, J.P., Courtois, B. (1981) Biochemical variations of West African snake venoms. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 74: 356-366.

Calvete, J.J., Escolano, J., Sanz, L. (2007) Snake venomomics of *Bitis* species reveals large intragenus venom toxin composition variation: application to taxonomy of congeneric taxa. *J Proteome Res* 7:2732-2745.

Chippaux, J.P. (2011) Estimate of the burden of snakebites in sub-Saharan Africa: a meta-analytic approach. *Toxicon* 57:586-599.

Clinical Toxinology Resources. 2017a [accessed Dec 11, 2017]. Available from: <http://www.toxinology.com/fusebox.cfm?fuseaction=main.snakes.display&id=SN0185>

Clinical Toxinology Resources. 2017b [accessed Dec 11, 2017]. Available from: <http://www.toxinology.com/fusebox.cfm?fuseaction=main.snakes.display&id=SN0200>

Clinical Toxinology Resources. 2017c [accessed Dec 11, 2017]. Available from: <http://www.toxinology.com/fusebox.cfm?fuseaction=main.snakes.display&id=SN0204>

Currier, R.B., Harrison, R.A., Rowley, P.D., Laing, G.D., Wagstaff, S.C. (2010) Intra-specific variation in venom of the African Puff Adder (*Bitis arietans*): Differential expression and activity of snake venom metalloproteinases (SVMPs). *Toxicon* 55: 864-873.

Girish, K.S., Kemparaju, K. (2006) Snake venom hyaluronidase: a therapeutic target. *Cell Biochem Funct* 24:7-12.

Ghani, L. M. A., El-Asmer, M. F., Abbas, O. A., Rahmy, T. R. (2009) Histological and immunohistochemical studies on the hepatotoxic effects of the venom of *Naja nigricollis* snake on albino mice. *Egy J Nat Toxins* 6: 100-119.

Ghani, L. M. A., El-Asmer, M. F., Abbas, O. A., Rahmy, T. R. (2010) Cardiotoxic effects of the venom of the Black-Neck spitting cobra, *Naja nigricollis* snake. *Egy J Nat Toxins* 7: 1-28.

Gutierrez JM, Lomonte B. (2013) Phospholipases A2: unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. *Toxicon* 62:27-39.

Gutierrez, J.M., Warrell, D.A., Williams, D.J., Jensen, S., Brown, N., Calvette, J.J., Harrison, R. A. (2013) The need for full integration of snakebite envenoming within a global strategy to combat the neglected tropical diseases: the way forward. *PLoS neglected tropical diseases*. 7: 1-7.

Kasturiratne, A., Wickremasinghe, A.R., De Silva, N., Gunawardena, N.K., Pathmeswaran, A., Premaratna, R., Savioli, L., Lallo, D. G., De Silva, H. J. (2008) The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS Med* 5: 1-11.

Kodama, R. T., Cajado-Carvalho, D., Kuniyoshi, A. K., Barna, B. F., Takakura, A. C., Serrano, S. M., Dias-Da-Silva, W., Tambourgi, D. V., Portarao, F. V. (2015) New proline-rich oligopeptides from the of African adders: Insights into the hypotensive effects of the venoms. *Biochim Biophys Acta* 1850: 1180-1187.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 15: 680-685.

Litschka-Koen, T., Williams, D.J. (2011) Snake antivenoms in southern Africa. *CME* 29:75-82.

MacKay, N., Ferguson, J. C., McNicol, G. P. (1969) Effects of three cobra venoms on blood coagulation, platelet aggregation, and fibrinolysis. *J Clin Path* 22: 304-311.

- Morrissey, J.H. (1980) Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal Bioch* 117: 307–310.
- Paixao-Cavalcante, D., Kuniyoshi, A.K., Portaro, F.C., Da Silva, W.D., Tambourgi, D.V. (2015) African adders: partial characterization of snake venoms from three *Bitis* species of medical importance and their neutralization by experimental equine antivenoms. *PLoS Neg Trop Dis* 9: 1-18.
- Petras, D., Sanz, L., Segura, A., Herrera, M., Villalta, M., Solano, D., Vargas, M., León, G., Warrell, D. A., Theakston, R. D., Harrison R. A., Durfa N., Gutiérrez, J. M., Calvete, J. J (2011) Snake venomomics of African spitting cobras: toxin composition and assessment of congeneric cross-reactivity of the pan-African EchiTAb-Plus-ICP antivenom by antivenomics and neutralization approaches. *J Proteome Res* 10:1266-1280.
- Pugh RN, Theakston RD, Reid HA. (1980) Malumfashi Endemic Diseases Research Project, XIII. Epidemiology of human encounters with the spitting cobra, *Naja nigricollis*, in the Malumfashi area of northern Nigeria. *Ann of Trop Med Parasitol* 74:523-530.
- Pukrittayakamee, S., Warrell, D.A., Desakorn, V., McMichael, A.J., White, N.J., Bunnag, D. (1988) The hyaluronidase activities of some Southeast Asian snake venoms. *Toxicon*, 26:629-637.
- Rivel, M., Solano, D., Herrera, M., Villalta, M., Segura, A., Arias, A.S., León, G., Gutiérrez, J. M. (2016) Pathogenesis of dermonecrosis induced by venom of the spitting cobra, *Naja nigricollis*: An experimental study in mice. *Toxicon* 119: 171-179.
- Snow, R.W., Bronzan, R., Roques, T., Nyamawi, C., Murphy, S., Marsh, K. (1994) The prevalence and morbidity of snakebite and treatment-seeking behavior among a rural Kenyan population. *Ann Trop Med and Parasitol* 88:665-671.
- Spawls, S. and Branch, B., 1995. The dangerous snakes of Africa: natural history, species directory, venoms, and snakebite. London, Ralph Curtis Pub, 192p.
- Tambourgi, D.V., Santos, M.C., Furtado, M.F.D., Freitas, M.C.W., Silva, W.D., Kipnis, T.L. (1994) Pro-inflammatory activities in elapid snake venoms. *Br J Pharmacol* 112: 723-727.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 76:4350-4354.

Warrell, D. A. (2008) Unscrupulous marketing of snake bite antivenoms in Africa and Papua New Guinea: choosing the right product--'what's in a name?'. Trans R Soc Tropical Med Hyg. 102:397-399.

Warrel, D. A., Greenwood, B. M., Davidson, N. M., Ormerod, L. D., Prentice, C. R. (1976) Necrosis, haemorrhage and complement depletion following bites by the spitting cobra (*Naja nigricollis*). QJ Med 177:1-22.

World Health Organization. Guidelines for the prevention and clinical management of snakebite in Africa. Brazzaville: WHO 2010.

World Health Organization. Neglected tropical diseases. http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/ (accessed Dec 11th, 2017).

Zelanis, A., Tashima, A.K., Rocha, M.M., Furtado, M.F., Camargo, A.C., Serrano, S.M. (2010) Analysis of the ontogenetic variation in the venom proteome/peptidome of *Bothrops jararaca* reveals different strategies to deal with prey. J Proteome Res 9: 2278-2291.

Zelanis, A., Serrano, S.M., Reinhold, V.N., (2012) N-glycome profiling of *Bothrops jararaca* newborn and adults venoms. J Proteome Res 75: 774-782.

Legend for figures

Figure 1. Ndala Lutangila Expedition. Map indicating the 1,350 km covered by the expedition, including the Provinces of Cuanza Sul, Benguela, Huíla, Mufuma and Calandula, which are municipalities in the province of Malanje. In this area, the snakes *Bitis arietans*, *Bitis gabonica* and *Naja nigricollis* were collected.

Figure 2. Electroforetic profile of *Naja nigricollis* venoms. Venom samples (30 µg) of *N. nigricollis* female snakes, from the Angola provinces of Cuanza Sul and Malanje, were separated by SDS-Page (8-16%) gel, under non-reducing [A, C] and reducing [B, D] conditions, and silver stained.

Figure 3. Electroforetic profile of *Bitis arietans* venoms. Venoms samples (30 µg) of *B. arietans* male and female snakes, from the Angola provinces of Mufuma, Calandula and Cuanza Sul, were separated by SDS-Page (8-16%) gel, under non-reducing [A] and reducing [B] conditions, and silver stained.

Figure 4. Electroforetic profile of *Bitis gabonica* venoms. Venom samples (30 µg) of *B. gabonica* male and female snakes, from the Angola province of Mufuma, were separated by SDS-Page (8-16%) gel, under non-reducing [A] and reducing [B] conditions, and silver stained.

Figure 5. Presence of oligosaccharide residues in the Angolan snake venoms proteins. Venom samples (10 µg) of *N. nigricollis*, *B. gabonica* and *B. arietans* male or female snakes, from Cuanza Sul, Malanje, Mufuma and Calandula, were separated by SDS-PAGE (8–16% gel), under non-reducing and electrotransferred into nitrocellulose membranes to analyze the presence of oligosaccharide residues. Blots were probed with WGA-HRPO (WGA) or Con A-HRPO (Con A) and the reactions developed with DAB.

Figure 6. Hyaluronidase activity of the Angolan snake venoms. Venom samples (20 µg) of *N. nigricollis*, *B. arietans* and *B. gabonica* male and/or female snakes, from Cuanza Sul, Malanje, Mufuma or Calandula, were pre-incubated with hyaluronic acid at 37 °C for 30 min. The turbidity of the mixture was measured in a spectrophotometer at λ 405 nm. The results are representative of three individual experiments and expressed in units of turbidity reduction (UTR) *per* µg of venom. Statistical analyses were performed using *t*

t test (for *N. nigricollis* and *B. gabonica* venoms) or One Way ANOVA (for *B. arietans* venoms) followed by Bonferroni multiple comparisons ($p \leq 0.05$).

Figure 7. Phospholipase A₂ activity of the Angolan snake venoms. Venom samples (0.5 µg) of *N. nigricollis*, *B. arietans* and *B. gabonica* male or female snakes, from Cuanza Sul, Malanje, Mufuma or Calandula, were incubated with a phospholipid mixture containing Dioleoylphosphatidylcholine and Dioleoylphosphatidylglycerol. The increase on the fluorescence was evaluated using a spectrophotometer at the wavelength λ_{EM} 460 and λ_{EX} 515 nm. The specific activity was expressed as Units of Fluorescence (UF) *per minute per* microgram of venom. Results are representative of three experiments performed in triplicate. Statistical analyses were performed using the *t* test (for *N. nigricollis* and *B. gabonica* venoms) or One Way ANOVA (for *B. arietans* venoms) followed by Bonferroni multiple comparisons (* $P < 0.05$).

Figure 8. Titers of the antivenoms raised against a pool of venoms from Angolan snakes. ELISA plates were coated with 1.0 µg of the venoms/well and incubated with different dilutions of the experimental antivenoms produced in mice, followed by the specific IgG-HRPO-conjugated. The results were expressed as the mean of absorbance value \pm SD.

Figure 9. Reactivity of the Angolan snake venoms to the experimental mice antivenoms. Venoms samples (15 µg) were separated by electrophoresis and electrotransferred to nitrocellulose membranes and incubated with the mice antivenoms diluted 1:800 (*N. nigricollis*) or 1:6400 (*Bitis spp*), followed by GAM/IgG-AP (1:7,500). Cross-reacting bands were visualized with NBT-BCIP.

Table 1: List of snakes from some Angolan provinces from which venom was collected and used in the present study.

Snake	From	Gender	Age	SVL (cm)	TL (cm)
<i>N. nigricollis</i>	Malanje	female	adult	141	30
<i>N. nigricollis</i>	Cuanza Sul	female	adult	140	27
<i>B. arietans</i>	Mufuma	male	adult	69	7
<i>B. arietans</i>	Mufuma	female	adult	50	5
<i>B. arietans</i>	Calandula	male	adult	85	15
<i>B. arietans</i>	Cuanza Sul	female	adult	59	5
<i>B. gabonica</i>	Mufuma	male	adult	108	12
<i>B. gabonica</i>	Mufuma	female	adult	118	8

SVL: Snout-to-vent length; TL: tail length.

Table 2. Proteolytic activity of the Angolan snake venoms on FRET peptide substrate

Venom activity (UF/min/μg)	PMSF	Phenanthroline	
<u>Origin: Mufuma</u>			
<i>B arietans</i> male	13430.3±1674.1	1219.7±221.5* <i>Inhibition: 90%</i>	5432.3±945.6* <i>Inhibition: 60%</i>
<i>B. arietans</i> female	835.7±62.4	24.85±16.3* <i>Inhibition: 97%</i>	428.59±19.2* <i>Inhibition: 51%</i>
<u>Origin: Calandula</u>			
<i>B arietans</i> male	800.72±1.8	33.33±0* <i>Inhibition: 95%</i>	160.6±74.1* <i>Inhibition: 80%</i>
<u>Origin: Cuanza Sul</u>			
<i>B arietans</i> female	546.9±84.3	32.65±8.3* <i>Inhibition: 94%</i>	0* <i>Inhibition: 100%</i>
<u>Origin: Mufuma</u>			
<i>B gabonica</i> male	2293.62±84.7	1575.88±309.7 <i>Inhibition: 31%</i>	862.79±63.0* <i>Inhibition: 62%</i>
<i>B. gabonica</i> female	1952.9±285.7	1209.40±55.9 <i>Inhibition: 38%</i>	871.31±10.6* <i>Inhibition: 55%</i>

Venoms samples (1.0 μg) were incubated or not with inhibitors for 30 min at room temperature. Then, substrate (5 μM) was added to the wells and the venom activity was measured at 37 °C for 15 min, by spectrophotometry. The data represent the mean ± SD (n= 3 assays, each done in triplicate). *p<0.05 when compared the proteolytic activity of the venoms treated or not with the inhibitors.



Figure 1. Map with the provinces covered

N. nigricollis

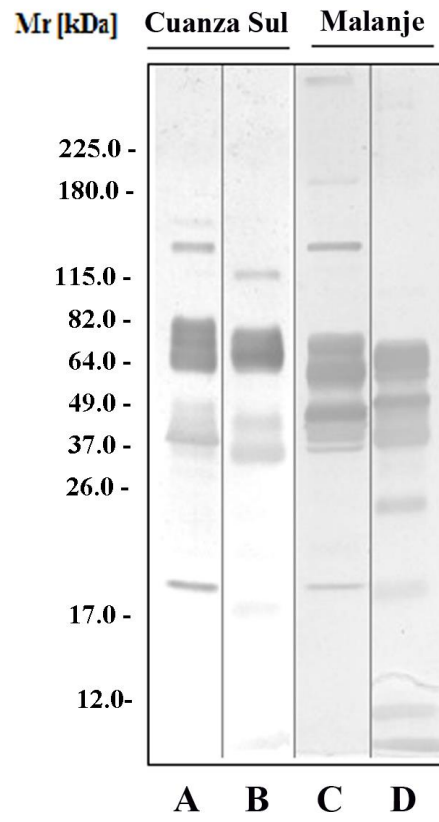


Figure 2.

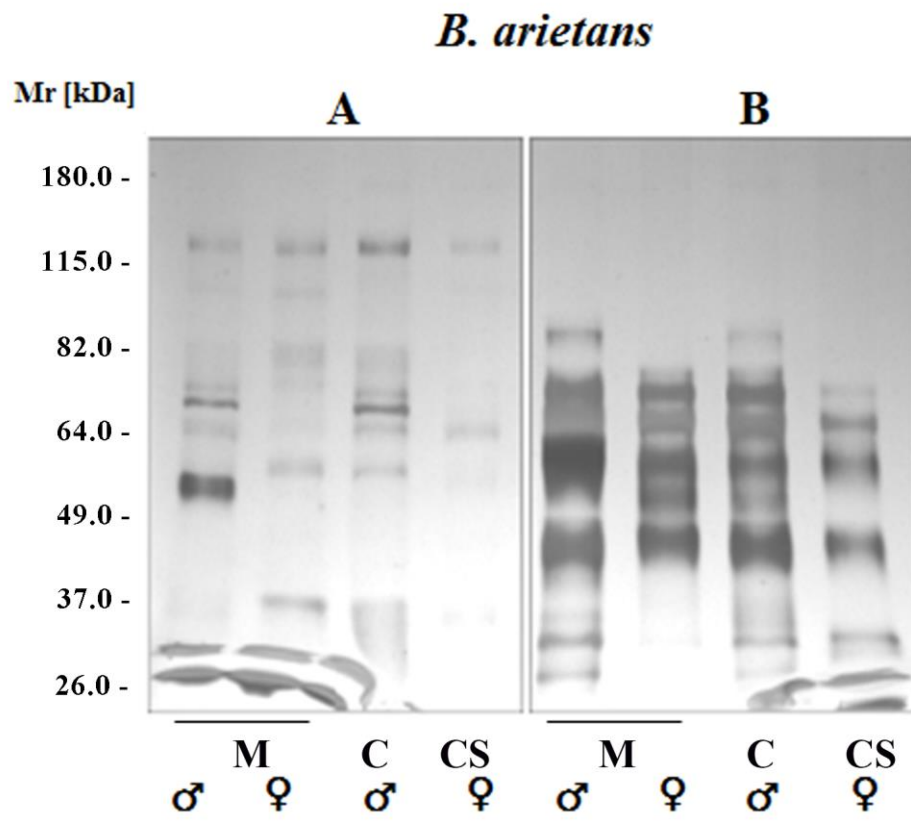


Figure 3

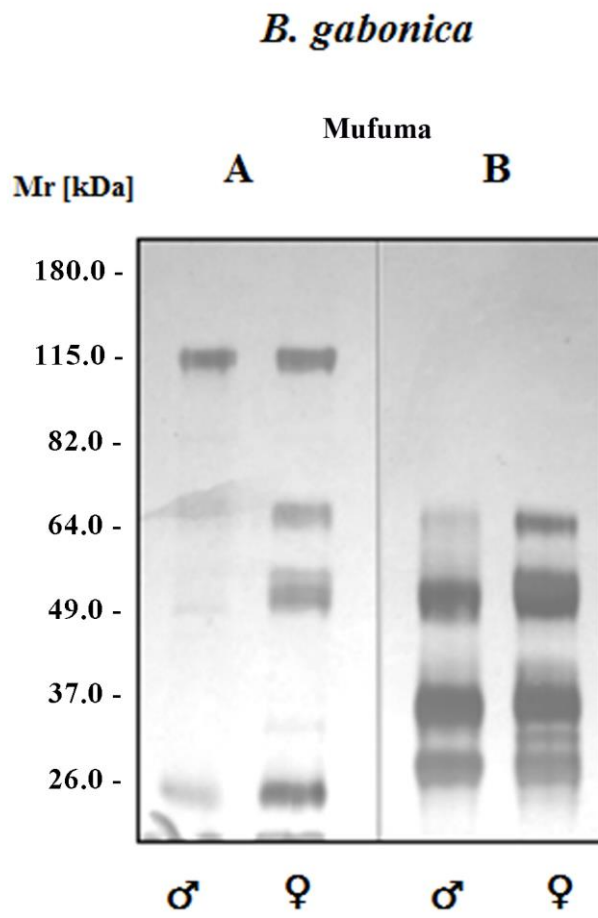


Figure 4.

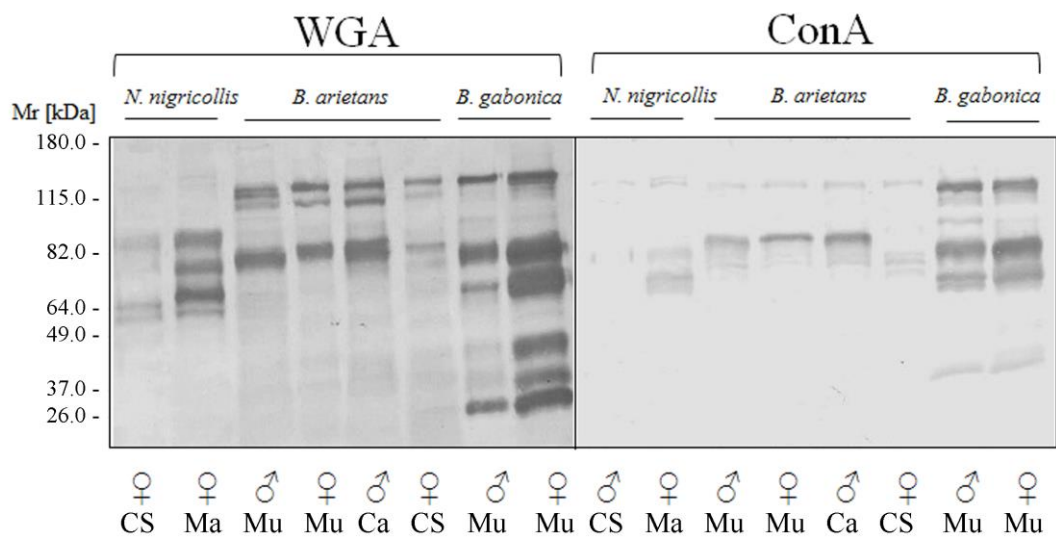
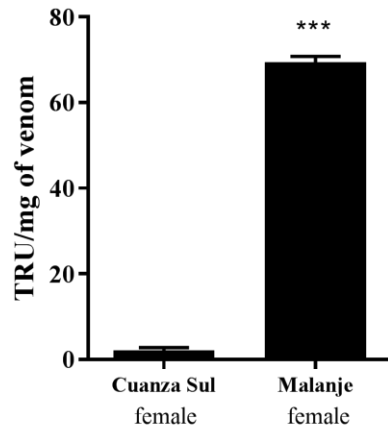
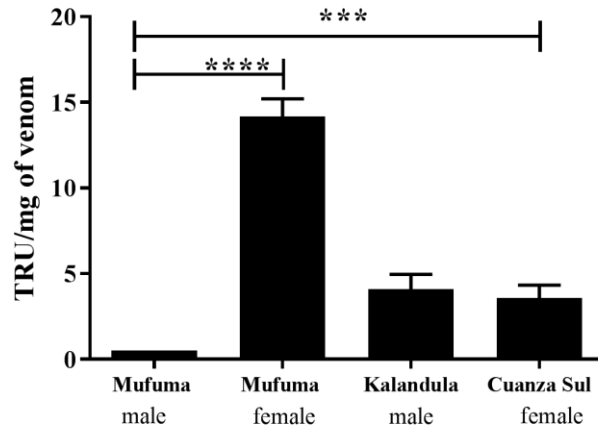


Figure 5.

Venoms: *N. nigricollis*



Venoms: *B. arietans*



Venoms: *B. gabonica*

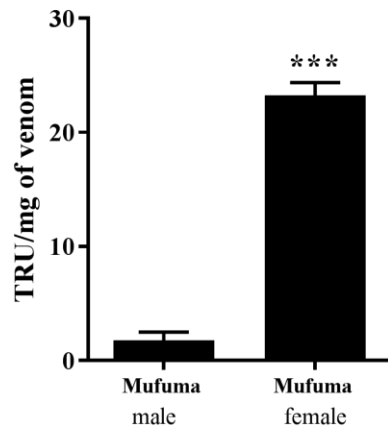


Figure 6.

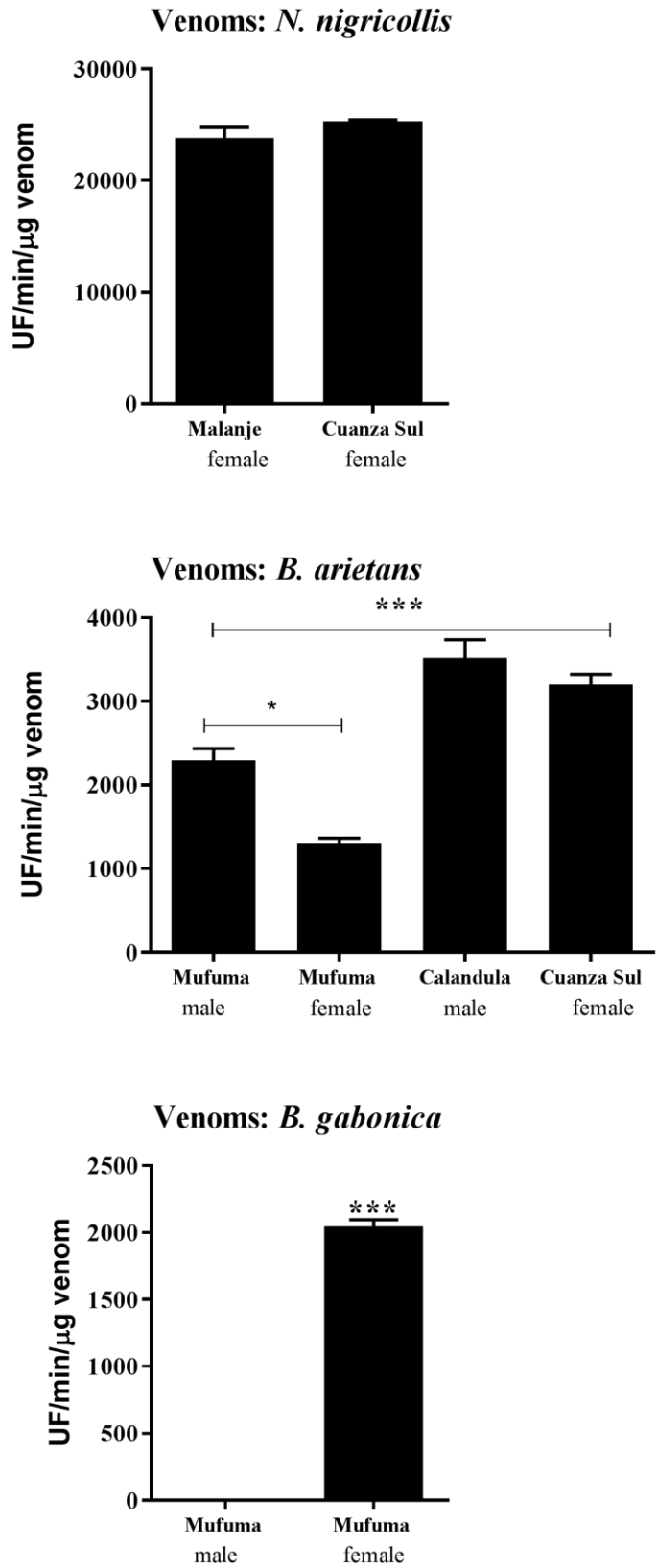
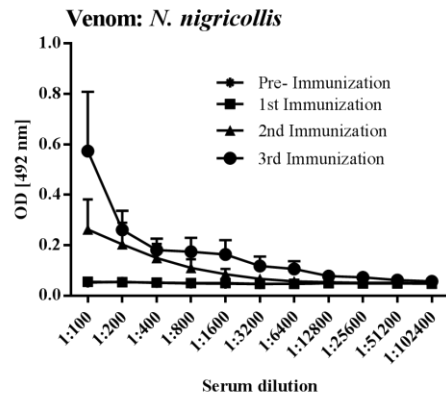
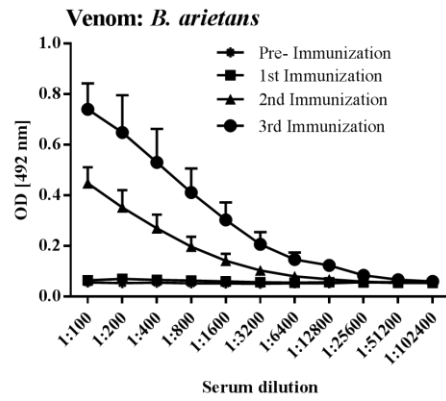


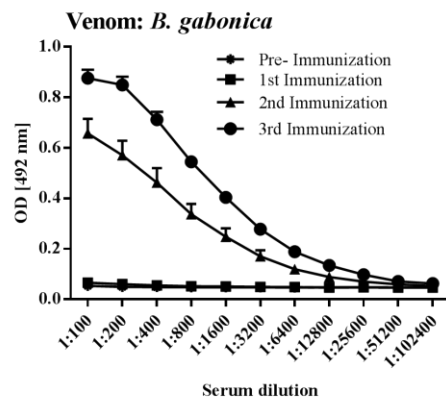
Figure 7.



Antibody Titers
 1st Immunization: 0
 2nd Immunization: 1: 400
 3rd Immunization: 1:1600



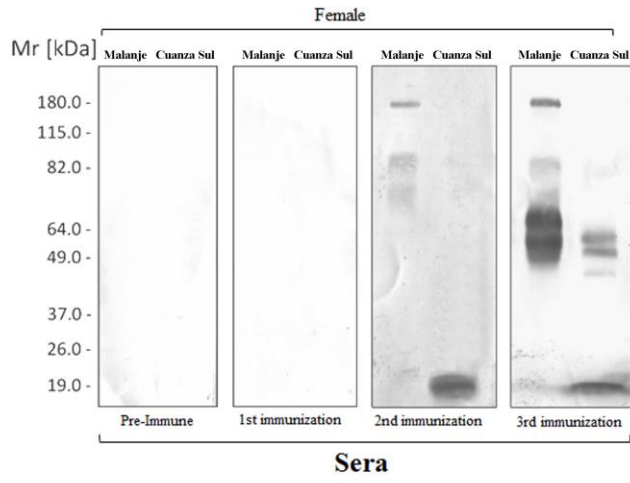
Antibody Titers
 1st Immunization: 0
 2nd Immunization: 1: 1600
 3rd Immunization: 1:6400



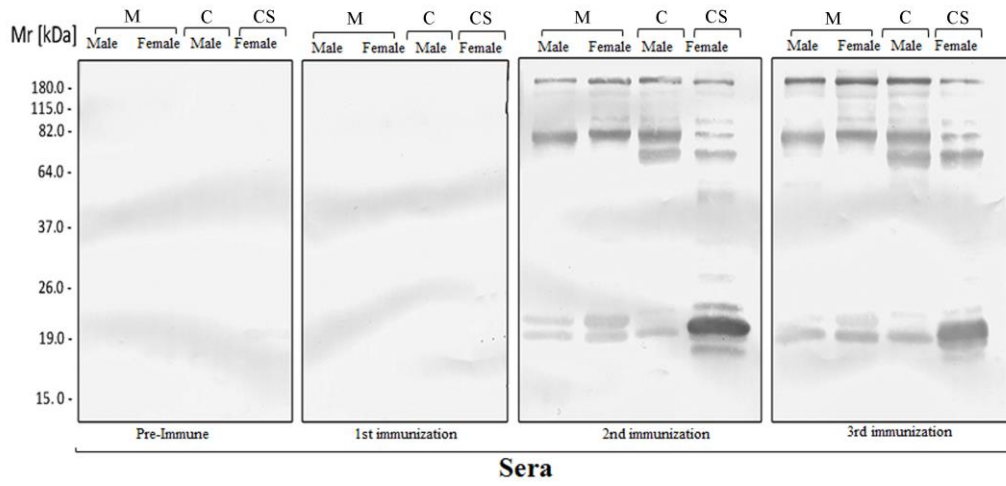
Antibody Titers
 1st Immunization: 0
 2nd Immunization: 1: 3200
 3rd Immunization: 1:6400

Figure 8.

A: Venoms of *N. nigricollis*



B: Venoms of *B. arietans*



C: Venoms of *B. gabonica*

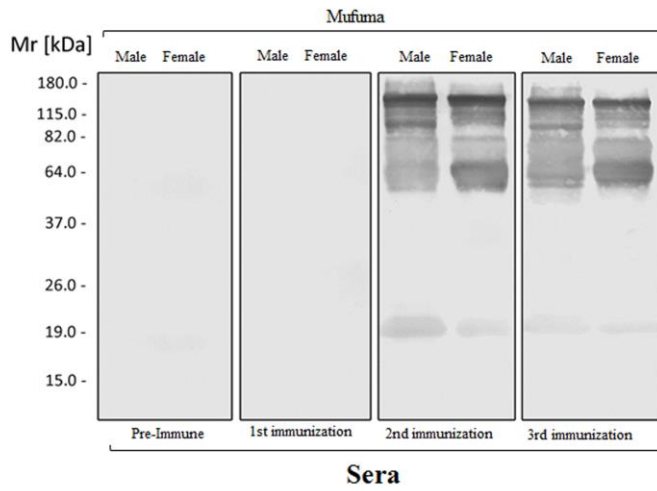


Figure 9