

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA**  
**CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HEMORRÁGICA DA PEÇONHA  
DE SERPENTES *Bothrops alternatus* (urutu-cruzeiro) E FRAÇÕES.**

**POLIANA ALMEIDA MIRANDA**

*Barbosa*  
Universidade Federal de Uberlândia  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Angélica Almeida Barbosa  
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

Monografia apresentada à  
Coordenação do Curso de Ciências  
Biológicas, da Universidade Federal de  
Uberlândia, para obtenção do grau de  
Bacharel em Ciências Biológicas.

**Uberlândia - MG**

**Abril - 2002**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA**  
**CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HEMORRÁGICA DA PEÇONHA  
DE SERPENTES *Bothrops alternatus* (urutu-cruzeiro) E FRAÇÕES.**

*POLIANA ALMEIDA MIRANDA*

**Prof. <sup>a</sup> Dr. <sup>a</sup> Maria Inês Homs Brandeburgo.**

Monografia apresentada à  
Coordenação do Curso de Ciências  
Biológicas, da Universidade Federal de  
Uberlândia, para obtenção do grau de  
Bacharel em Ciências Biológicas.

**Uberlândia – MG**

**Abril – 2002**



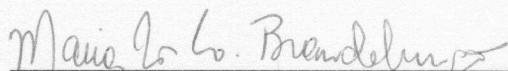
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA**  
**CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HEMORRÁGICA DA PEÇONHA  
DE SERPENTES *Bothrops alternatus* (urutu-cruzeiro) E FRAÇÕES.**

***POLIANA ALMEIDA MIRANDA***

Aprovada pela Banca Examinadora em 18/04/02

nota 100,0



Prof.ª Dr.ª Maria Inês Homsí Brandeburgo.

Prof.ª Dr.ª Amélia Hamaguchi.

Prof.ª Dr.ª Veridiana de Melo Rodrigues Ávila.

**Uberlândia, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.**

*Dedico este trabalho aos meus pais Maria Ruth e Adilson, pelo amor, dedicação, carinho e educação pessoal, pelo incentivo à minha formação, acadêmica e profissional. O meu carinho e admiração. Eu Amo Vocês.*



## *Agradecimentos*

*A Deus pela grande força que sempre me dá nos momentos de tristeza e alegria, pelas vezes que pensei em desistir e de alguma maneira me mostrava que esta não seria a melhor forma.*

*Aos meus irmãos Fabiana, Cristiano, Tatiana, Luciano e Rafael, que sempre estiveram do meu lado em todos os momentos.*

*A minha orientadora professora Dr<sup>a</sup> Maria Inês Homsí Brandeburgo pela orientação sempre eficiente, pela atenção e interesse na realização deste trabalho.*

*A professora Dr<sup>a</sup> Amélia Hamaguchi pela contribuição e disponibilidade em querer ajudar e ensinar a todos.*

*A professora Dr<sup>a</sup> Veridiana pela ajuda e opiniões, para o andamento do respectivo trabalho. Minha grande admiração e meu muito obrigado.*

*A Pentapharm do Brasil pelo fornecimento de animais para a realização deste trabalho.*

*A 46ª turma de Ciências Biológicas, pelos colegas e amigos que passaram em minha vida.*

*A todos os meus amigos do Laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais: Fran, Taty, Helen, Mirian, Luis Henrique, Carla, Júnia, Cynthia, Leonardo, Rone, Fábio Oliveira, Fábio Moroni, Rodrigo, Nenzinha, Tianinha, Cleuber, Elisângela, Marlene e Cris.*

*Aos meus amigos Luiz Fernando, Luiz Carlos, Gilvan e William que sempre estavam prontos a me ajudar na hora em que eu precisava.*

*A minha amiga Renata pelos momentos de alegria, dificuldades e farras.*

*A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.*



## SUMÁRIO

<b>1 – Introdução</b>	1
<b>2 – Objetivo</b>	7
<b>3 – Material</b>	8
3.1 – Obtenção da peçonha	8
3.2 - Materiais para cromatografia, eletroforese, dosagem protéica e atividade hemorrágica.	8
3.3 - Atividade Hemorrágica	9
<b>4 – Métodos</b>	10
4.1 – Fracionamentos da peçonha bruta de <i>Bothrops alternatus</i>	10
4.1.1 - Em gel de DEAE – Sephacel	10
4.2 – Filtração da Fração A4 em gel de Sephadex G-75	11
4.3 – Determinação da Quantidade Protéica	11
4.4 – Atividade Hemorrágica	11
4.5 – Eletroforese em gel de poliacrilamida e determinação do peso molecular	12
<b>5 – Resultados</b>	14
5.1 – Primeiro Fracionamento da peçonha bruta de <i>Bothrops alternatus</i>	14
5.1.1 – Em gel de DEAE – Sephacel	14
5.1.2 – Eletroforese em gel de poliacrilamida	16
5.1.3 – Atividade Hemorrágica	17
5.1.4 – Determinação da Dose Mínima Hemorrágica para a peçonha bruta	18
5.1.5- Determinação da Dose Mínima Hemorrágica da fração A4 do veneno de <i>Bothrops alternatus</i>	19
5.2 – Segundo fracionamento da peçonha bruta de <i>Bothrops alternatus</i>	20
5.2.1 - Em gel de DEAE-Sephacel	20
5.2.2 – Eletroforese em gel de poliacrilamida	22
5.2.3 – Atividade Hemorrágica	23
5.3 – Recromatografia das Frações A4, B4 e B6	24
5.3.1 – Em Sephadex G-75.	24

5.3.2 – Eletroforese em gel de poliacrilamida	26
5.3.3 – Atividade Hemorrágica	27
<b>6 – Discussão e Conclusão</b>	<b>28</b>
<b>7 – Referências Bibliográficas</b>	<b>33</b>



## ABREVIATURAS

PAGE – Eletroforese em gel de Poliacrilamida

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

PAGE-SDS – Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

TEMED – N, N, N', N' - tetrametiletilenodiamino

BIS – ACRILAMIDA – N, N' metileno-bis-acrilamida

TRIS – tris (hidroximetil) aminometano

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

AMBIC – Tampão bicarbonato de amônio

PM – peso molecular

mA – miliamperes

SP – grupo sulfopropil

DMH – Dose Mínima Hemorrágica

PB – Peçonha Bruta

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivos fracionar a peçonha de *Bothrops alternatus* e estudar a atividade hemorrágica do veneno e frações isoladas, quantificando a DMH (dose mínima hemorrágica) da peçonha bruta e uma de suas frações. Foram realizadas duas cromatografias em gel de DEAE-Sephacel para unir as frações mais hemorrágicas, e uma terceira cromatografia em gel de Sephadex G-75 para que pudéssemos purificar as toxinas hemorrágicas. O primeiro método de cromatografia testado com este veneno, obtiveram seis picos de absorbância a 280nm denominados de A1 a A6. Neste fracionamento, a atividade hemorrágica foi mais evidente para a fração A4. As eletroforeses realizadas com as frações obtidas nesta cromatografia serviram para acompanhar e avaliar o processo de purificação destes componentes protéicos, além de determinar o peso molecular das proteínas de interesse. A DMH calculada para este veneno foi 5,06µg. A segunda cromatografia da peçonha de *Bothrops alternatus* foi realizada usando-se a mesma resina (DEAE-Sephacel) nas mesmas condições da anterior, para se obter maior quantidade de material. No entanto, neste caso a reprodutibilidade da técnica foi comprometida e as frações mais hemorrágicas foram B3 e B6. A Determinação da DMH da fração A4 foi de 7,52µg. A terceira cromatografia em gel de Sephadex G-75, foi realizada com 20mg das frações mais hemorrágicas (A4, B4 e B6), onde se obtiveram quatro subfrações (AG1 a AG4). A subfração AG1 apresentou duas bandas majoritárias, com PM equivalente a 66.000 e 40.000 respectivamente, e apresentando um halo hemorrágico bastante evidente. A fração AG2 por sua vez apresentou uma única banda principal de PM equivalente a 30.000 e um halo hemorrágico bastante intenso. Já a fração AG3, apresentou uma banda majoritária com PM próximo de 25.000 com halo hemorrágico bastante espalhado, porém menos intenso que o de AG2. Finalmente, AG4 mostrou um menor halo hemorrágico, e uma banda característica de uma toxina hemorrágica de baixo peso molecular da classe I. Em síntese, este trabalho nos permitiu verificar que a peçonha de *Bothrops alternatus* é muito rica em toxinas hemorrágicas das diferentes classes estruturais.

**Palavras chaves:** Dose Mínima Hemorrágica (DMH), *Bothrops alternatus*, Atividade Hemorrágica.



## 1- INTRODUÇÃO

Na fauna brasileira existem nove famílias de serpentes, dentre as quais somente duas são consideradas peçonhentas e responsáveis pela quase totalidade dos acidentes: Elapidae e Viperidae (KLEMMER, 1963).

As serpentes da família Viperidae encontram-se distribuídas principalmente na América do Sul, possuem um aparelho inoculador especializado, constituídos pelos dois dentes maxilares superiores modificados (presas) e ligados às glândulas veneníferas por dois ductos, sendo, portanto o mais eficiente em termos de peçonha injetada (STORER et al., 1989).

No Brasil, especialmente na região Centro-Sul, cerca de 90% das picadas são devidas às serpentes do gênero *Bothrops* (jararaca, urutu, jararacussu, etc). Por isso, a maior parte dos estudos, em nosso meio, refere-se a esse gênero de serpente (BARRAVIERA, 1994).

Os acidentes ofídicos têm importância médica em virtude de sua grande frequência e gravidade.

As serpentes do gênero *Bothrops*, dentre elas a *Bothrops alternatus*, popularmente conhecida como urutu-cruzeiro, habitam preferencialmente ambientes úmidos como matas, áreas cultivadas e locais de proliferação de roedores. Estas serpentes possuem hábitos noturnos, são muito agressivas e quando se sentem ameaçadas atacam em silêncio

(BARRAVIERA, 1994). Suas peçonhas contêm principalmente uma mistura complexa de peptídeos farmacologicamente ativos e proteínas (mais de 90% do peso seco) que induzem uma ampla variedade de efeitos nas vítimas envenenadas. Contêm ainda carboidratos, lípidios, metais, e diversos íons (BIEBER, 1979). Os principais componentes das peçonhas que tem sido relacionados com o envenenamento botrópico são: fosfolipases A<sub>2</sub>, proteinases e nucleotidases, que são responsáveis pelas ações mionecróticas, edematogênicas, coagulantes, hemorrágicas e sobre agregação plaquetária (KINI e EVANS, 1990; ROSENBERG, 1979). O isolamento e caracterização de vários componentes destes venenos têm sido realizados e suas propriedades comparadas para mostrar importantes diferenças e similaridades. Os dados sugerem que apesar de pertencer à mesma família, os venenos de serpentes Crotalinae mostram uma diversidade quali-quantitativa notável de atividades biológicas que parece ser devida tanto ao gênero (GENÉ et al., 1989; SOTO et al., 1988) como a espécie, ou subespécies específicas (AIRD, 1985; AIRD e KAISER, 1985; BERNADSKY et al., 1986; FERREIRA et al., 1992; GENÉ et al., 1989; KORNALIK e TABORSKÁ, 1988). Idade, localização geográfica, condição climática, hábitos de dieta, procedimento da extração de veneno ou diferenças reais na composição dos venenos individuais da serpente parecem contribuir para a maioria destas diferenças (ADAME et al., 1990; CHIPPAUX et al., 1991; FURTADO et al., 1991; GLEEN et al., 1994).

Embora sejam raros os acidentes fatais por serpentes do gênero *Bothrops*, os casos se agravam devido à intensidade dos efeitos locais (BARRAVIERA, 1994).

As lesões locais são caracterizadas pela dor, edemas, bolhas e necrose, no local da picada, apresentam patogênese complexa, que inicialmente foi atribuída à ação proteolítica das toxinas envolvidas. Possivelmente, decorrem da atividade de proteases, hialuronidases e fosfolipases, da liberação de mediadores da resposta inflamatória, da ação das hemorraginas sobre o endotélio vascular e da ação pró-coagulante do veneno (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1999).

A maioria dos venenos botrópicos causa alterações no mecanismo hemostático por interferência na função plaquetária, danificando vasos sanguíneos e ativando fatores de coagulação tais como protrombina (fator II), fator X e fibrinogênio (fator I) (KAMIGUTI e CARDOSO, 1989). A ação direta dos venenos sobre o fibrinogênio (atividade semelhante à trombina) refere-se à sua capacidade de transformar o fibrinogênio em fibrina gel e não em rede, sendo esta facilmente degradada por processos fibrinolíticos secundários, melhorando assim as propriedades de fluxo sanguíneo (DENSON et al., 1972; STOCKER et al., 1982; FARID e TU, 1989; KAMIGUTI e CARDOSO, 1989; OUYANG et al., 1992). As enzimas



semelhantes à trombina são largamente distribuídas nos venenos Crotalídeos, onde, crotalase (MARKLAND e DAMUS, 1971) ancrod (HATTON, 1973), batroxobina (ITOH et al., 1988) flavoxobina (SHIED et al., 1988) botrombina (NISHIDA et al., 1994) e BthTI (OLIVEIRA, 2001) são exemplos desta classe que tem sido extensivamente estudada e caracterizada.

A balterobina, do veneno de *Bothrops alternatus*, foi purificada e caracterizada parcialmente como uma enzima semelhante à trombina (SMOLKA et al., 1998). Ela divide traços comuns com outras enzimas semelhantes à trombina do grupo das *Bothrops*, tais como peso molecular, formação de fibrina em gel, inibição por PMSF, atividade arginina amidase e valina como o aminoácido N-terminal (FARID e TU, 1989; OUYANG et al., 1992).

A botroalternina é um inibidor de trombina da peçonha de *Bothrops alternatus* isolada por CASTRO et al. (1998). É homóloga a botrojaracina de *Bothrops jararaca* (MARUYAMA et al., 1992) mas de algum modo menos eficiente já que não inibe completamente o efeito da trombina na agregação plaquetária.

Atribui-se aos venenos botrópicos uma ação preferencialmente vasculotóxica. É possível que a necrose das fibras musculares seja, em grande parte, devida à isquemia produzida pela falência da microcirculação local. Um dos sinais locais mais importantes do envenenamento botrópico é a hemorragia, que tem sido atribuída às enzimas proteolíticas (IWANAGA e SUZUKI, 1979; TABORDA, 1940; VITAL BRASIL, 1911).

Dentre os venenos botrópicos brasileiros o de *Bothrops jararacussu* parece atuar de modo diferente dos demais. Neste envenenamento, a lesão mais precocemente observada e com maior exuberância é a mionecrose. Assim, no segundo minuto após a injeção, parte do músculo já apresenta necrose. (SANTO NETO, 1987).

Os anti-venenos são considerados como o único tratamento efetivo para o envenenamento por serpentes. A seleção de um anti-veneno específico é baseada na identificação da serpente, e nos sinais e sintomas do envenenamento apresentados pelo paciente após a picada. Contudo, a identificação da serpente nem sempre é possível e em alguns casos os sinais e sintomas do envenenamento não são suficientes para apoiar o uso de uma terapia com anti-veneno específico. Nestes casos, análises de imunodiagnóstico poderiam ser instrumentos úteis para a identificação da serpente.

A heterogeneidade destes venenos pode ser responsável pelas diferenças nos sintomas clínicos observados após envenenamento por serpentes crotalíneas. Necrose tecidual extensiva e uma síndrome de desfibrinogenação caracterizada por baixos níveis de fibrinogênio e consumo de plaquetas sanguíneas são um achado freqüente, conseqüente de envenenamentos por peçonhas de *Bothrops* e *Lachesis muta*. Por outro lado, envenenamentos

devido a *Crotalus durissus terrificus* e a *Elapidea micrurus* estão associados com sintomas sistêmicos geralmente neurotóxicos, com efeitos moderados na coagulação sanguínea e integridade tecidual (AMARAL et al., 1988; ROSENFELD, 1976). Por não apresentar atividade proteolítica, o edema é discreto ou ausente, e não origina alterações hemorrágicas (AZEVEDO MARQUES et al., 1990).

Os venenos das serpentes botrópicas brasileiras são ricos em enzimas proteolíticas que atuam numa grande variedade de substratos naturais, tais como: caseína, hemoglobina, colágeno, gelatina, elastina, fibrinogênio, insulina e glucagon (IWANAGA e SUZUKI, 1979). Algumas destas enzimas são toxinas hemorrágicas que degradam proteínas da matriz extracelular (MATRISIAN, 1992), outras afetam a coagulação do sangue, agindo como procoagulante, convertendo o fibrinogênio em fibrina (MARKLAND e DAMUS, 1971; OUYANG e YANG, 1974; STOCKER e BARLOW, 1976; SELISTRE e GIGLIO, 1987), enquanto outras agem como anti-coagulante por exercer atividade fibrinogenolítica e fibrinolítica (BAJWA et al., 1980; KOMORI et al., 1985; DAOUD et al., 1986).

As proteínas dos venenos responsáveis por estas atividades atraíram considerável atenção devido a sua utilidade como potentes instrumentos nos testes de laboratório, ao uso clínico, e mais recentemente como modelos nos estudos teóricos da hemostasia e trombose (OUYANG et al., 1992).

A hemorragia, uma das atividades biológicas mais notáveis dos venenos viperídeos e crotalídeos, é relevante na patofisiologia do envenenamento (BJARNASSON e FOX, 1994). A medida dos diâmetros médios dos halos hemorrágicos obtidos após injeção intradérmica do veneno (KONDO et al., 1960; OHSAKA et al., 1966; THEAKSTON e REID, 1983) é específica, rápida e reprodutível. Contudo, problemas aparecem quando os halos hemorrágicos obtidos têm tamanhos similares mas cores de diferentes intensidades, sugerindo diferenças na potência hemorrágica. Isto torna a comparação dos resultados por diferentes autores difíceis, e representa um problema sério para a determinação do potencial anti-hemorrágico dos anti-venenos.

As hemorragias locais e sistêmicas são comuns em acidentes botrópicos e resultam provavelmente da interação de vários fatores presentes na peçonha (MANDELBAUM, 1990). Os principais fatores responsáveis pela hemorragia são as toxinas hemorrágicas (hemorraginas), cujo mecanismo de ação consiste na degradação das proteínas da matriz extracelular e pelo efeito citotóxico direto sobre as células endoteliais; sua ação ocorre quase que exclusivamente na membrana basal dos vasos capilares (KAMIGUTI et al., 1996).



Estas toxinas também são capazes de inativar inibidores plasmáticos da coagulação, inibidor da agregação plaquetária na forma direta e alterar a proteína de Von Willebrand e lesar o fibrinogênio (KAMIGUTI, et al. 1996).

Estudos bioquímicos têm mostrado que a maioria das toxinas hemorrágicas purificadas dos venenos de serpentes são metaloproteínases dependentes de zinco ou cálcio, com alta especificidade pelo substrato e apresentam tendência de hidrolisar a ligação peptídica X-leucina (TU, 1991), podendo causar hemorragia pela destruição enzimática da membrana basal, com subsequente perda da integridade vascular. O rompimento da membrana basal se daria ao nível das junções entre as células endoteliais, formando aberturas ou poros por onde se daria o extravasamento de eritrócitos e outros componentes do sangue. Estudos bioquímicos demonstraram que ambas as atividades hemorrágica e proteolítica são inibidas por agentes quelantes como EDTA e 1,10-orto fenantrolina. Estas toxinas são termolábeis e instáveis em meio ácido. As toxinas hemorrágicas apresentam grande diversidade em relação ao peso molecular, ao ponto isoelétrico e à dose mínima hemorrágica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1999).

Experimentalmente, o progresso da hemorragia é rápido e as lesões ocorrem alguns minutos após, dependendo da via de administração do veneno. As injeções intradérmica, subcutânea e intramuscular produzem hemorragias localizadas, enquanto injeções intravenosas e intraperitoneal podem causar lesões hemorrágicas sistêmicas em múltiplos órgãos distantes do local de aplicação (MARSH, 1994).

De acordo com BJARNASON & FOX (1994) as hemorraginas podem ser divididas em quatro classes distintas, de acordo com os seus pesos moleculares: Na classe P-I das metaloproteases, estão incluídas as pequenas proteínas com atividade hemorrágica relativamente baixa ou ausente e com massa molecular de 20-30 kDa. Estas possuem três domínios estruturais: pré e pró-domínios e domínio protease (HEXXHXXGXXH) ligante de zinco. Como exemplo dessa classe destacam-se as atrolisinas B, Cc, Cd de *Crotalus atrox* (BJARNASON and FOX, 1994). A classe P-II inclui as toxinas de tamanho médio com massa molecular de 30-60 kDa. Estas possuem um domínio semelhante a desintegrina no carboxi-terminal, este domínio semelhante a desintegrina possui a sequência XXCD, ao invés da sequência Arg-Gly-Asp (RGD) presente nas desintegrinas. Um representante típico dessa classe é atrolisina E de *Crotalus atrox* (SHIMOKAWA et al., 1998). Na classe P-III as proteases possuem além do domínio desintegrina, um domínio carboxi-terminal rico em resíduos de cisteína. Outra classe que tem sido descrita apresenta os mesmos domínios

estruturais das metaloproteases da classe P-III, e ainda possui um domínio adicional ligante de lectina com massa molecular de 80-100 kDa (classe P-IV).

KAMIGUTI et al. (1996) descreveram os efeitos de uma metaloproteínase hemorrágica de alto peso molecular, a jararagina (*B. jararaca*), sobre os componentes do plasma e das plaquetas envolvidos no mecanismo hemostático. As alterações desses componentes hemostáticos resultam em hemorragia.

A liberação de mediadores vasoativos capazes de abrirem as junções endoteliais foi sugerida por ISHIDA et al. (1986). Estes autores demonstraram que os princípios hemorrágicos isolados do veneno de *Trimeresurus flavoviridis* induzem a liberação de histamina e serotonina em vários órgãos isolados.

Estudos comparativos das propriedades imunológicas de metaloproteínases (fatores hemorrágicos e proteases) isoladas dos venenos de *B. jararaca*, *B. neuwiedi* e *B. moojeni*, mostraram que os fatores hemorrágicos contêm determinantes antigênicos comuns, enquanto as proteases são imunologicamente distintas. Os anti-soros específicos contra os fatores hemorrágicos foram capazes de neutralizar tanto a atividade hemorrágica dos homólogos como as atividades dos outros fatores hemorrágicos (MANDELBAUM e ASSAKURA, 1988).

PEREZ et al (1999) estudaram a atividade proteolítica, mionecrótica e hemorrágica causada por serpentes jovens, mostrando que essas atividades são mais intensas quando comparadas à peçonha de serpentes adultas.

Portanto, estudos visando a identificação dos componentes ativos das peçonhas de serpentes poderão contribuir para a compreensão de seus efeitos deletérios e possíveis funções terapêuticas.

Atualmente a soroterapia é o único meio utilizado no tratamento de acidentes por serpentes peçonhentas, no entanto, este método é incapaz de neutralizar os efeitos locais, agindo somente nos efeitos sistêmicos provocados pela peçonha. Devido a este fato, estudos visando o desenvolvimento da estratégia terapêutica mais eficiente têm se intensificado nas últimas décadas. Além disso, enzimas com atividade proteolítica estão sendo muito estudadas, pois podem desfazer os coágulos de fibrina em consequência às alterações no sistema hemostático (THWIN et al, 1998).



## 2-OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivos fracionar a peçonha de *B. alternatus* e estudar a atividade hemorrágica do veneno e frações, quantificando a DMH (dose mínima hemorrágica) da peçonha bruta e uma de suas frações.

### 3- MATERIAL

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

#### 3.1 - Obtenção da peçonha:

A peçonha bruta de *Bothrops alternatus* foi cedida pela Prof<sup>a</sup>. Ms. Vera Lúcia de Campos Brites, Setor de Répteis da UFU, do Instituto de Biologia, , e pelo biólogo Luiz Henrique Anzaloni Pedrosa, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. A peçonha bruta foi dessecada e depois armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.2 - Materiais para cromatografia, eletroforese, dosagem protéica e atividade hemorrágica.

DEAE-Sephacel e Sephadex G-75 (Amersham Pharmacia Biotech)

Acrilamida, Bis-acrilamida, TEMED, SDS, Coomassie Brilliant Blue R-250, EDTA, Soroalbumina Bovina, Azul de Bromofenol, Beta-mercaptoetanol, Persulfato de Amônio. Padrão de Peso Molecular Dalton Mark V II-L:  $\alpha$ -Lactoalbumina (PM 14.400),



Inibidor de Tripsina (PM 20.100), Anidrase Carbônica (PM 30.000), Ovoalbumina (PM 45.000), Albumina (PM 66.000), Fosforilase b (PM 97.000). (Sigma Chem. Co).

### **3.3 – Atividade Hemorrágica:**

Os camundongos Swiss, machos (20-30g) utilizados foram gentilmente cedidos pela Pentapharm do Brasil (Uberlândia-MG), e mantidos no Laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais da UFU.

Os demais reagentes foram utilizados em grau analítico.

## 4- MÉTODOS:

### 4.1 – Fracionamentos da peçonha bruta de *Bothrops alternatus*

#### 4.1.1 - Em gel de DEAE Sephacel

Cerca de 200 mg da peçonha bruta de *Bothrops alternatus* foram dissolvidos em 2 ml de tampão bicarbonato de amônio 0,05 M em pH 7.8. Em seguida a mistura foi centrifugada a 13.000 xg por 10 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi aplicado a uma coluna de troca iônica em gel de DEAE Sephacel (1,5x 15 cm), equilibrada com o mesmo tampão. A amostra foi eluída em temperatura ambiente pelo estabelecimento de um gradiente convexo de concentração usando o tampão bicarbonato de amônio 0,05 a 1M em pH 7.8.

Foram coletadas frações de 3ml/tubo num fluxo de 20ml/hora, em um coletor de frações GILSON. A absorvância de cada fração coletada foi lida em 280nm em um espectrofotômetro da SPEKOL (Zeiss), o gráfico traçado e os pools delimitados. Essas frações foram liofilizadas e testadas quanto à presença de atividade hemorrágica.



#### 4.2 – Filtração das Frações mais hemorrágicas da peçonha em gel de Sephadex G-

75

Cerca de 20mg da fração A4 do primeiro fracionamento mais as frações B4 e B6 do segundo fracionamento foram ressuspensos em tampão bicarbonato de amônio 0,05M pH 7.8 e aplicados a uma coluna de 2 x 95cm de dimensões, previamente preenchida com o gel de Sephadex G-75 e equilibrada com o mesmo tampão. As frações de 3ml obtidas desta cromatografia foram lidas a 280nm, o gráfico traçado e os pools delimitados. Essas subfrações foram liofilizadas e testadas quanto à presença de atividade hemorrágica.

#### 4.3 – Determinação da Quantidade Protéica:

Para quantificar as proteínas presentes nas amostras de peçonhas, soluções contendo de 0,1 a 2,0 mg de proteínas foram submetidas à dosagem pelo método do microbiureto, conforme descrito por ITZHAKI e GILL (1964), utilizando-se a soroalbumina bovina para estimar a reta padrão. As amostras de proteínas foram completadas para o volume de 1,0 ml com água, aos quais foram acrescentados 500 $\mu$ l dos reagentes R1 ou R2 (previamente preparados em nosso laboratório); a seguir, foi feita a leitura em espectrofotômetro SPEKOL UV VIS da Zeiss a 310 nm, contra um branco sem proteína. O reagente R1 é composto por 0,21% CuSO<sub>4</sub>, 5H<sub>2</sub>O dissolvido em NaOH 30,4% e o R2 é formado por uma solução de NaOH a 30%.

#### 4.4 – Atividade Hemorrágica

Esta técnica foi realizada segundo NIKAI et al. (1984). Aliquotas contendo 50 $\mu$ g de proteínas foram diluídas em solução salina (NaCl 0,9%), em um volume de 50 $\mu$ l e aplicados intradermicamente no dorso de camundongos, ligeiramente anestesiados com éter. Após 3 horas de inoculação, os animais foram sacrificados, as peles removidas e a presença de halos hemorrágicos na superfície interna da pele indicaram atividade positiva.

A dose mínima hemorrágica (DMH) foi determinada para o veneno bruto e fração A4, segundo o método descrito por KONDO et al. (1960), com algumas modificações. Foram utilizadas aliquotas que variavam de 2 $\mu$ g a 10,1 $\mu$ g e 3 $\mu$ g a 6,75 $\mu$ g da peçonha bruta e fração A4 respectivamente, tendo entre cada dose uma razão fixa de 1,5, dissolvidas em 50 $\mu$ l de solução salina. Estas amostras foram administradas intradermicamente no dorso de

camundongos utilizando-se grupos de 6 animais para cada dose da amostra. Após três horas de administração os animais eram sacrificados e as peles removidas e transferidas para um suporte que permitisse medir através de um paquímetro, dois diâmetros em ângulo reto. Com esses valores era calculado o diâmetro médio para cada dose do veneno. A seguir por meio de cálculos de regressão linear, foi obtida a DMH que corresponde à menor dose capaz de produzir uma lesão hemorrágica de 10 mm<sup>2</sup>.

#### 4.5 – Eletroforese em gel de poliacrilamida e determinação do peso molecular.

As eletroforeses para a estimativa dos pesos moleculares foram realizadas segundo o método de LAEMMLI (1970), utilizando-se géis de poliacrilamida com agentes desnaturantes na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol. Dois espaçadores em forma de fita foram utilizados para formar entre as placas um espaço retangular de aproximadamente 0,2 mm de espessura, as placas de vidro utilizadas na preparação dos géis mediam aproximadamente 10cm de largura, 10,5cm de comprimento e 0,1cm de espessura. Com o auxílio de um suporte de montagem, as placas foram imobilizadas verticalmente, formando assim uma câmara que foi preenchida com a solução do gel. Na preparação dos géis a 14%, foram utilizadas as seguintes soluções:

SOLUÇÕES ESTOQUES	VOLUME ( $\mu$ L)	
	GEL DE SEPARAÇÃO	GEL DE EMPILHAMENTO
Tris-HCl 2M pH 8,8	1170	-
Tris-HCl 2M pH 6,8	-	167
EDTA 200 nM	63	27
Acrilamida: bis (30:0, 8).	2920	435
Água desionizada	2015	1990
TEMED	7,5	2,5
Persulfato de amônio (10%)	37,5	18

Terminada a polimerização, a placa foi colocada em uma cuba de acrílico e conectada aos eletrodos. A eletroforese foi conduzida a 20mA de corrente, por aproximadamente 80 minutos. Foram utilizados marcadores de peso molecular citado no item 3.2.



A solução trizma base 0,1 M, EDTA 7,8 mM, glicina 0,77 M e SDS 0,3% (p/v) pH 8,3 foi utilizada como tampão para o cátodo e a mesma solução, porém sem glicina, para o ânodo.

As amostras foram dissolvidas em água desionizada. em seguida foi adicionado 50% de tampão STOP (Tris-HCl 187 mM pH 6,8, SDS 6%, EDTA 6 mM, azul de bromofenol 1% e glicerol 27%) e 10% de  $\beta$ -mercaptoetanol. Posteriormente, as amostras foram aquecidas à 100°C por 5 minutos e aplicadas ao gel de poliacrilamida.

Após a eletroforese, o gel foi retirado da placa e colocado em solução fixadora (Metanol 50%, Ácido acético 10% e água desionizada) por 5 minutos. Em seguida foi retirado desta solução e colocado em uma solução corante contendo Coomassie Brilliant Blue R250 a 2,5% e deixado cerca de 10 minutos. Após este procedimento retirou-se do corante e colocou-se em uma solução descorante (ácido acético 10%, etanol 30% e água desionizada).

Em seguida os géis foram prensado entre duas folhas de papel celofane poroso, em bastidores fixados por garras e deixados à temperatura ambiente por aproximadamente 2 a 3 dias para secagem. Após a secagem os géis foram analisados e fotografados.

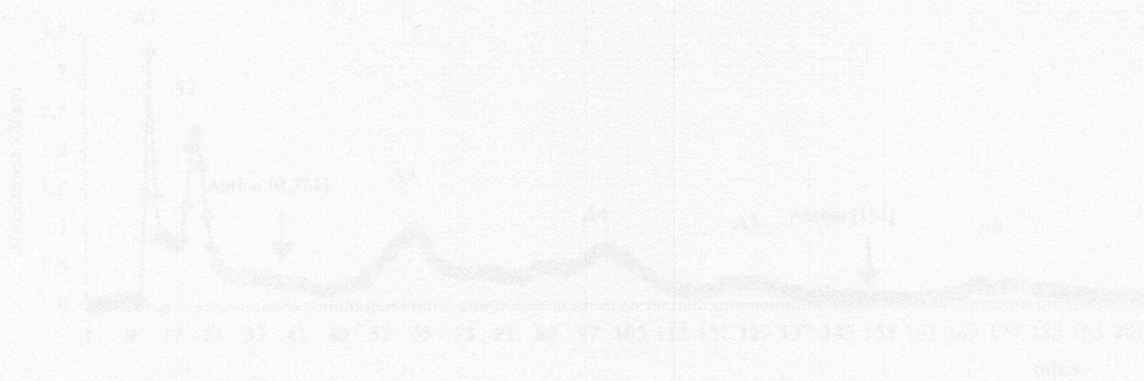


Figura 01. Cromatografia de 200mg da peçonha bruta de *B. alternatus* em gel de DEAE Sephacel (1,5 x 15cm), equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,05M, pH 7,8. A coluna foi eluída em um gradiente convexo de concentração usando tampão bicarbonato de amônio 0,05 x 150, num fluxo de 20 ml/hora em temperatura ambiente. Frações coletadas em pontos de eluição: A1 (tubo 11 ao 17); A2 (tubo 18 ao 27); A3 (tubo 28 ao 33); A4 (tubo 34 ao 39); A5 (tubo 40 ao 45); A6 (tubo 46 ao 51).

## 5- RESULTADOS:

### 5.1 – Primeiro fracionamento da peçonha bruta de *Bothrops alternatus*

#### 5.1.1 – Em gel de DEAE Sephacel.

A peçonha bruta de *Bothrops alternatus* foi submetida a uma cromatografia de troca iônica em gel de DEAE Sephacel. O perfil cromatográfico está mostrado na figura 1. A peçonha total foi resolvida em 6 frações distintas (A1 a A6). A atividade hemorrágica ficou restrita às frações A3, A4, A5 e A6, sendo a fração A4 a mais potente.

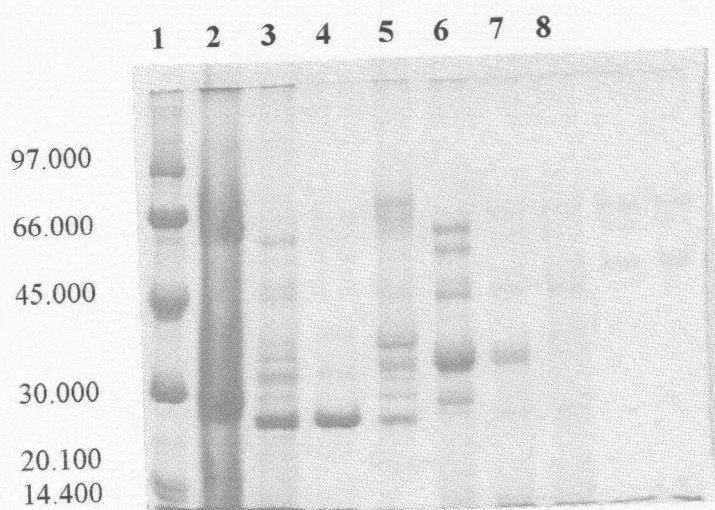
A recuperação protéica estimada por absorbância à 280nm foi de aproximadamente 67% (tabela 01).

Fração	Volume (ml)	Proteína (mg)	Atividade Hemorrágica (UI)
A1	10	12,44	0,00
A2	25	77,18	0,00
A3	55	30,53	4,98
A4	75	11,65	3,31
A5	115	11,83	0,18
A6	145	11,83	0,18



### 5.1.2 – Eletroforese em gel de poliacrilamida

A figura 02 mostra o resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% em condições desnaturantes, da peçonha bruta e das frações obtidas a partir do fracionamento em gel de DEAE Sephacel. Nesta mesma figura podemos observar que a fração A2 (linha 4) apresenta-se com uma única banda principal bem evidenciada, com peso molecular de aproximadamente 23.000. Já, a fração A4 (linha 6) esta muito heterogênea, pois apresenta diversas bandas.



**Figura 02:** Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes da peçonha bruta de *B. alternatus* e das frações obtidas no fracionamento com a resina DEAE Sephacel. **Linha 01:** Padrão de Peso Molecular: Dalton Mark VII-L: Fosforilase b (PM 97.000), Albumina (PM 66.000), Ovoalbumina (PM 45.000), Anidrase Carbônica (PM 30.000), Inibidor de Tripsina (PM 20.100),  $\alpha$ -Lactoalbumina (PM 14.400); **Linha 02:** peçonha bruta de *B. alternatus*;

**Linha 03:** Fração A1

**Linha 04:** Fração A2

**Linha 05:** Fração A3

**Linha 06:** Fração A4

**Linha 07:** Fração A5

**Linha 08:** Fração A6

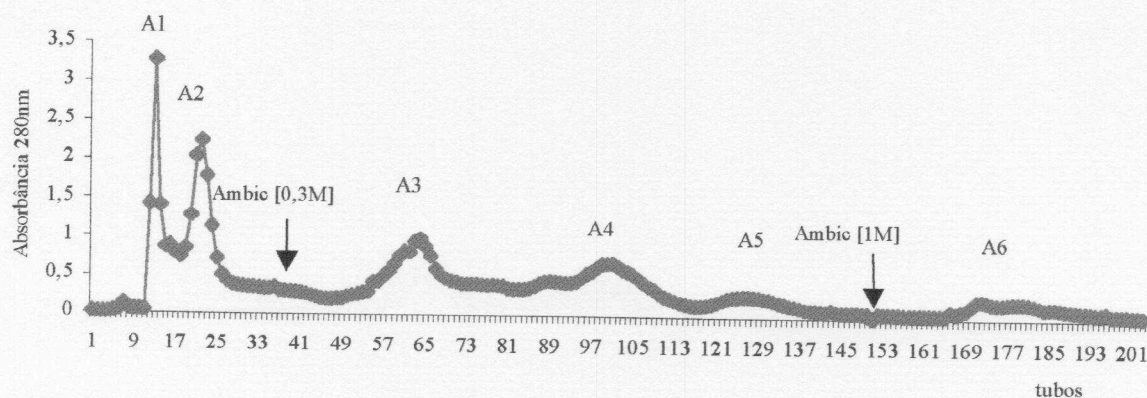


Figura 01: Cromatografia de 200mg da peçonha bruta de *B. alternatus* em gel de DEAE Sephacel (1,5 x 15cm), equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,05M, pH 7,8. A coluna foi eluída em um gradiente convexo de concentração usando tampão bicarbonato de amônio (0,05 a 1M), num fluxo de 20 ml/hora em temperatura ambiente. Frações de 3ml foram coletadas. Pontos de corte: A1 (tubo 11 ao 17); A2 (tubo 18 ao 27); A3 (tubo 55 ao 73); A4 (tubo 93 ao 118); A5 (119 ao 141); A6 (169 ao 192).

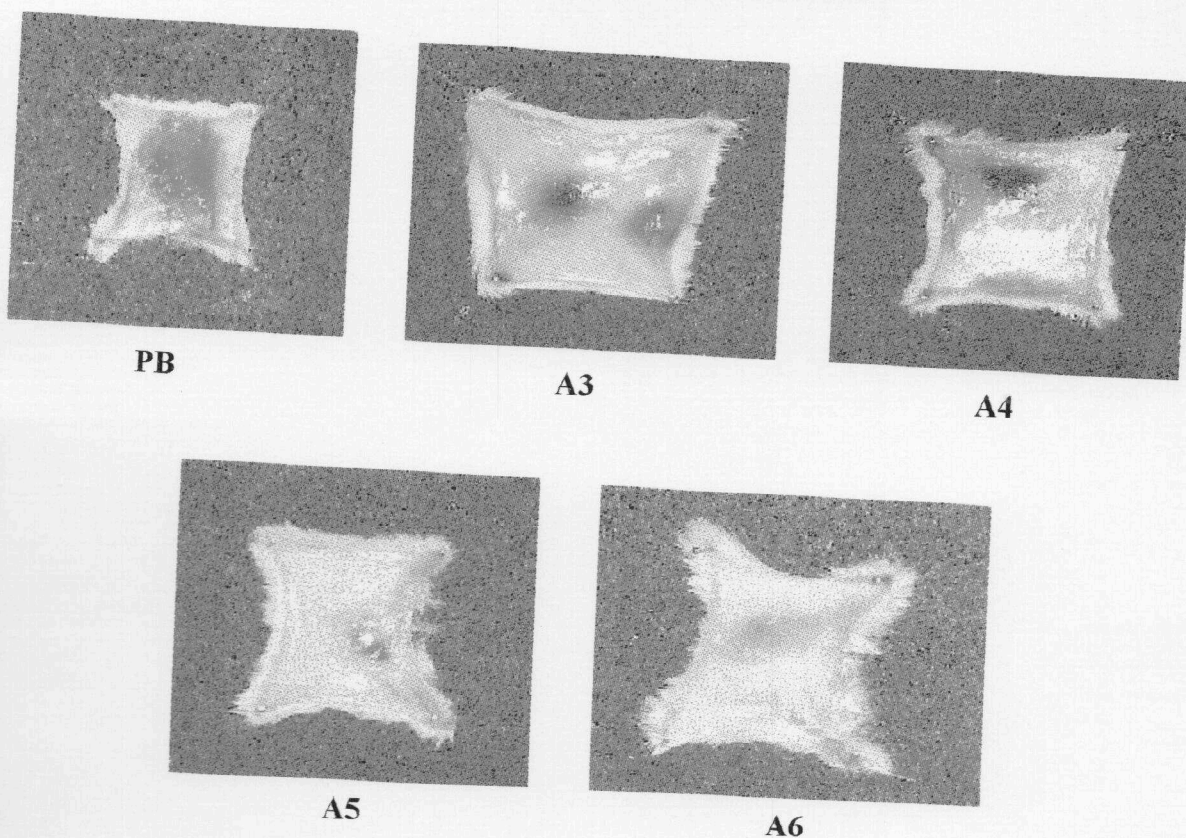
**Tabela 01: Recuperação Protéica por absorbância a 280nm das frações obtidas no 1º fracionamento em DEAE Sephacel da peçonha bruta de *Bothrops alternatus***

Amostras	A280nm	Recuperação%
PB	211,48	100%
A1	32,27	15,26
A2	30,76	14,54
A3	29,44	13,92
A4	27,18	12,85
A5	10,53	4,98
A6	11,65	5,51
Total	141,83	67,06



### 5.1.3 – Atividade Hemorrágica

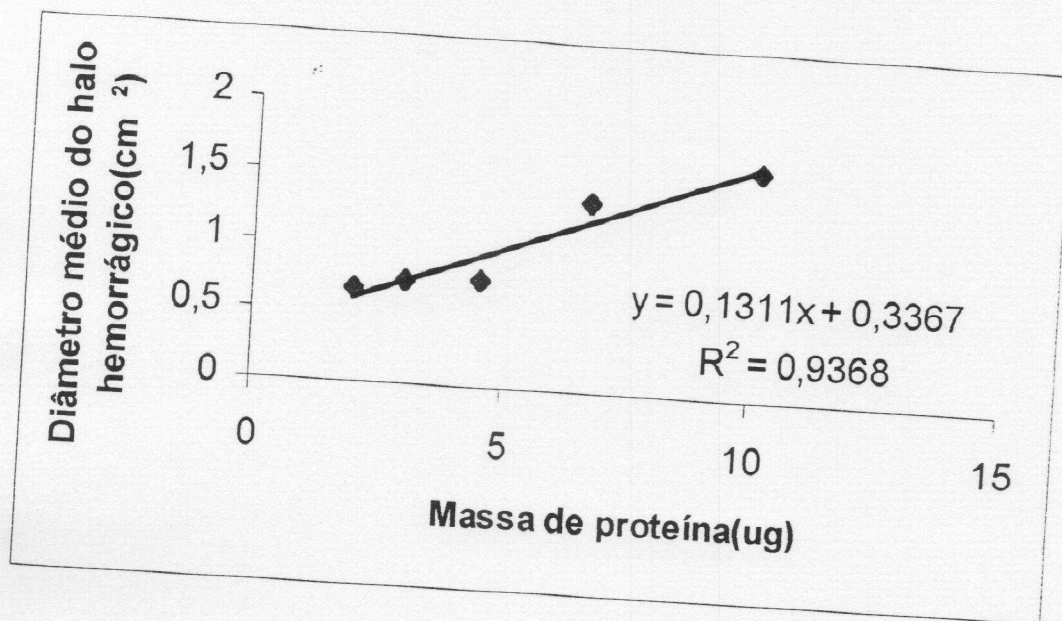
Os resultados obtidos para a atividade hemorrágica estão apresentados na figura 03. A atividade hemorrágica ficou restrita as frações A3, A4, A5 e A6, onde a fração A4 apresentou um halo hemorrágico mais intenso, sendo, portanto a mais hemorrágica.



**Figura 03:** Atividade hemorrágica da peçonha bruta e das frações obtidas no fracionamento com a resina DEAE Sephacel. Amostras contendo 50 $\mu$ g de proteínas diluídas em salina num volume final de 50 $\mu$ l foram inoculadas intradermicamente no dorso de camundongos machos. Após três horas os camundongos foram sacrificados para a observação dos halos hemorrágicos na face interna da pele.

#### 5.1.4 – Determinação da Dose Mínima Hemorrágica para a peçonha bruta.

A DMH (capaz de produzir uma lesão de  $10\text{mm}^2$ ), para a peçonha bruta foi de  $5,06\mu\text{g}$  (figura 4), determinada por cálculos de regressão linear.



**Figura 04:** Determinação da Dose Mínima Hemorrágica (DMH) da peçonha bruta de *Bothrops alternatus*. O ensaio foi realizado utilizando-se de  $2\mu\text{g}$  a  $10,1\mu\text{g}$  de proteína dissolvidas em  $50\mu\text{l}$  de solução salina fisiológica. Estas soluções foram inoculadas intradermicamente no dorso de camundongos machos. Para cada dose foram utilizados em média seis animais.



### 5.1.5 – Determinação da Dose Mínima Hemorrágica da fração A4 do veneno de *Bothrops alternatus*

A DMH (capaz de produzir uma lesão hemorrágica de  $10\text{mm}^2$ ) para a fração foi de  $7,52\mu\text{G}$  (FIGURA 5), determinada por cálculos de regressão linear.

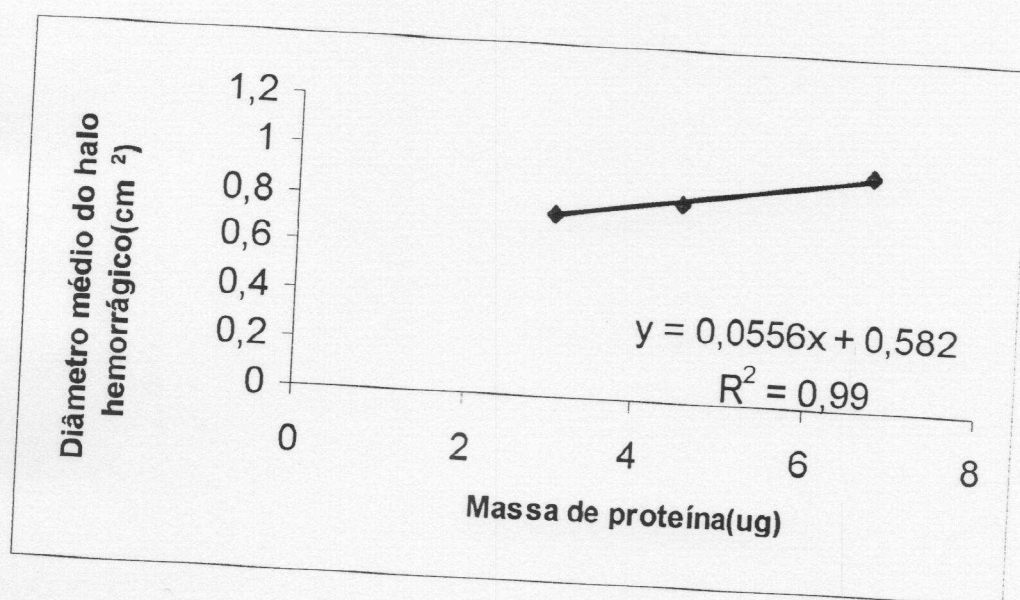


FIGURA 5: Determinação da Dose Mínima Hemorrágica (DMH) da fração A4 do veneno de *B. alternatus*. O ensaio foi realizado utilizando-se de  $3\mu\text{g}$  a  $10,1\mu\text{g}$  de proteína dissolvidas em  $50\mu\text{l}$  de solução salina fisiológica. Estas soluções foram inoculadas intradermicamente no dorso de camundongos machos. Para cada dose foram utilizados em média seis animais.

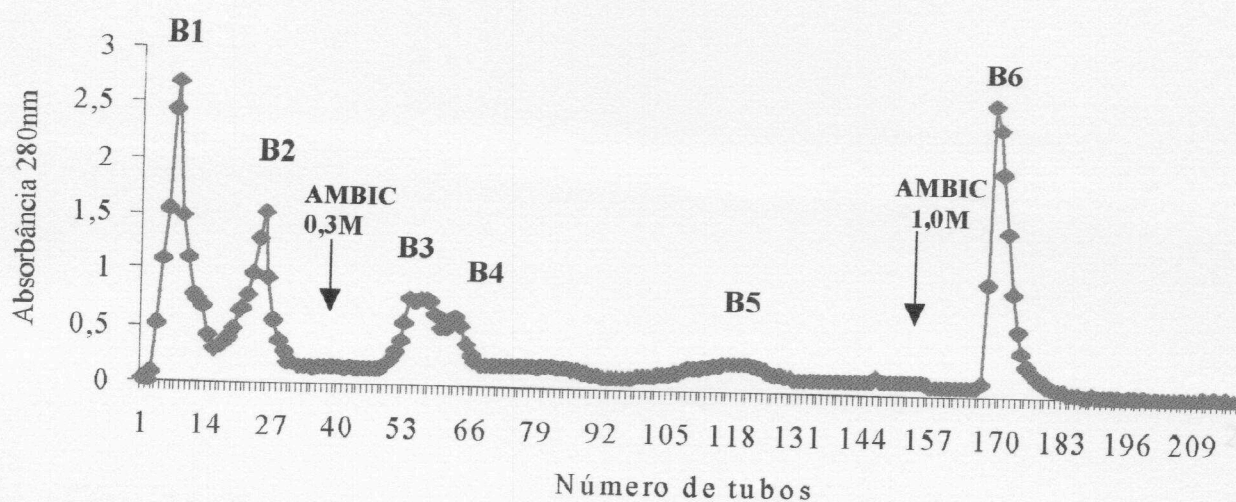
## 5.2 – Segundo fracionamento da peçonha bruta de *Bothrops alternatus*

### 5.2.1 – Em gel de DEAE Sephacel.

A peçonha bruta de *B. alternatus* foi submetida a uma cromatografia de troca iônica em gel de DEAE Sephacel. O perfil cromatográfico está mostrado na figura 6. A peçonha total foi resolvida em 6 frações distintas (B1 a B6), nas mesmas condições do primeiro fracionamento. A atividade hemorrágica ficou restrita às frações B3, B4 e B6, sendo as frações B3 e B6 as mais potentes.

A recuperação protéica estimada por absorbância à 280nm foi de aproximadamente 66% (tabela 02)





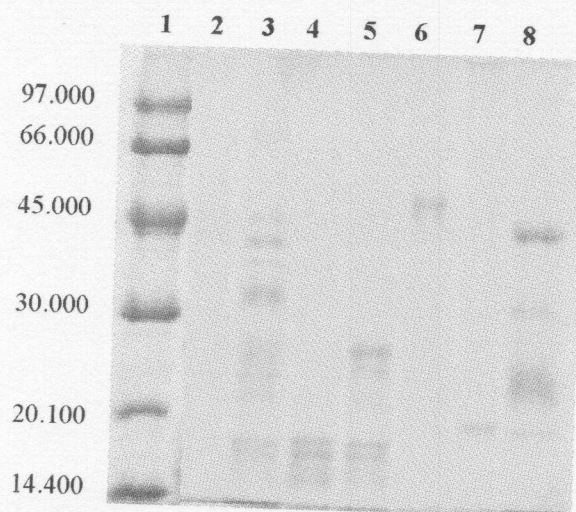
**Figura 06:** Cromatografia de 200mg da peçonha bruta de *B. alternatus* em gel de DEAE Sephacel ( 1,5 x 15 cm ), equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,05M, pH 7.8. A coluna foi eluída em um gradiente convexo de concentração usando o tampão bicarbonato de amônio ( 0,05 a 1,0M ), num fluxo de 20ml/hora em temperatura ambiente. Frações de 3ml foram coletadas. **Pontos de corte:** B1: tubo 4 a 14; B2: 18 ao 28; B3: tubo 57 ao 60; B4: 62 ao 67; B5: 107 ao 128; B6: 172 ao 178.

**Tabela 02: Recuperação Protéica por absorvância a 280nm das frações obtidas do 2º fracionamento em DEAE Sephacel da peçonha bruta de *Bothrops alternatus*.**

Amostras	Unidade de A280nm totais	Recuperação %
P B	182,87	100,00
B1	29,53	16,15
B2	28,68	15,68
B3	10,19	5,57
B4	7,76	4,24
B5	10,45	5,71
B6	31,52	17,24
Total	121,18	66,26

### 5.2.2 – Eletroforese em gel de poliacrilamida

A figura 07 mostra o resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% em condições desnaturantes, da peçonha bruta e das frações obtidas no segundo fracionamento em gel de DEAE Sephacel. Nesta mesma figura podemos observar que a fração B4 (linha 6 ) apresenta-se com uma única banda principal bem evidenciada, com peso molecular de aproximadamente 50.000.



**Figura 07:** Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes da peçonha bruta de *B. alternatus* e das frações obtidas no fracionamento com a resina DEAE Sephacel.

**Linha 01:** Padrão de Peso Molecular: Dalton Mark VII-L: Fosforilase b (PM 97.000)(PM 66.000), Ovoalbumina (PM 45.000), Anidrase Carbônica (PM 30.000), Inibidor de Tripsina (PM 20.100),  $\alpha$ -Lactoalbumina (PM 14.400); **Linha 02:** peçonha bruta de *B. alternatus*;

**Linha 03:** Fração B1

**Linha 04:** Fração B2

**Linha 05:** Fração B3

**Linha 06:** Fração B4

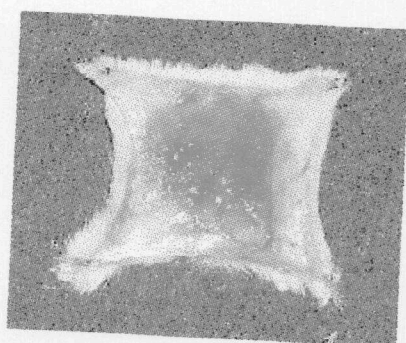
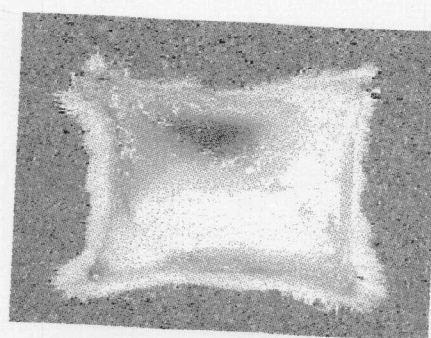
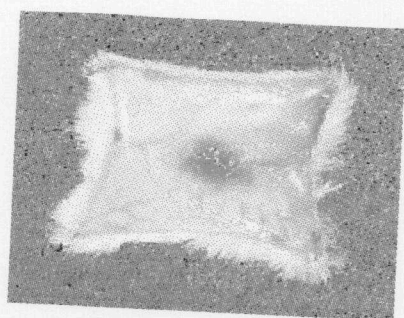
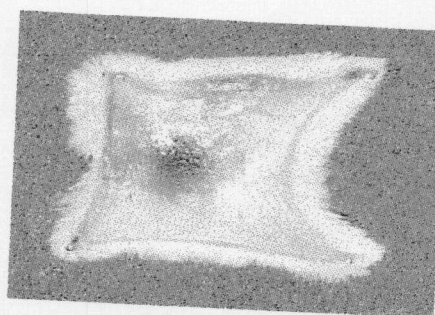
**Linha 07:** Fração B5

**Linha08:**FraçãoB6



### 5.2.3 – Atividade Hemorrágica

Os resultados obtidos para a atividade hemorrágica estão apresentados na figura 08. A atividade hemorrágica ficou restrita às frações B3, B4 e B6, onde B3 e B6 apresentaram um halo hemorrágico mais intenso, sendo portanto, as frações mais hemorrágicas.

**PB****B3****B4****B6**

**Figura 08:** Atividade hemorrágica da peçonha bruta (PB) e das frações obtidas no fracionamento com a resina DEAE Sephacel. Amostras contendo 50µg de proteínas diluídas em salina num volume final de 50µl, foram inoculadas intradermicamente no dorso de camundongos machos. Após três horas os camundongos foram sacrificados para a observação dos halos hemorrágicos na face interna da pele.

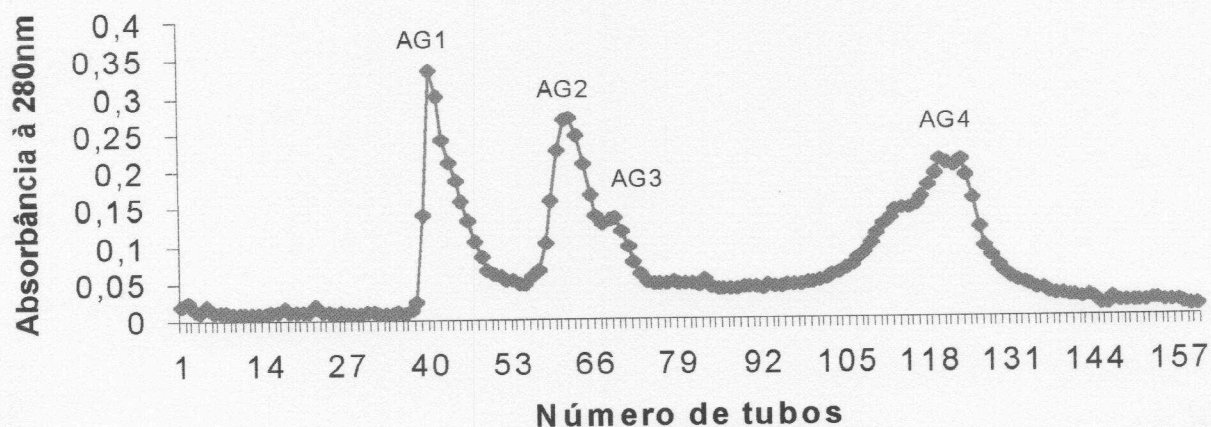
### **5.3 – Recromatografia das Frações A4, B4 e B6.**

#### **5.3.1 – Em Gel de Sephadex G-75.**

As frações mais hemorrágicas obtidas nos fracionamentos anteriores (A4, B4 e B6) estavam bastante heterogêneas. Assim, elas foram misturadas e submetidas a uma nova cromatografia de filtração em gel de Sephadex G - 75. O perfil cromatográfico obtido está mostrado na figura 10. Deste fracionamento resultaram quatro subfrações distintas, que foram designadas de AG1, AG2, AG3 e AG4. A atividade hemorrágica esteve presente em todas as subfrações, sendo a fração AG2 a mais ativa desta cromatografia.

A recuperação protéica estimada por absorbância à 280nm foi de aproximadamente 33% (tabela 03).





**Figura 10:** Cromatografia de 20 mg de proteínas, contendo as das frações A4, B4 e B6 em gel de Sephadex G-75 (2 x 95cm). A coluna foi equilibrada e eluída com tampão bicarbonato de amônio de 0,05M, num fluxo de 20ml/hora em temperatura ambiente. Frações de 3,0 ml foram coletadas.

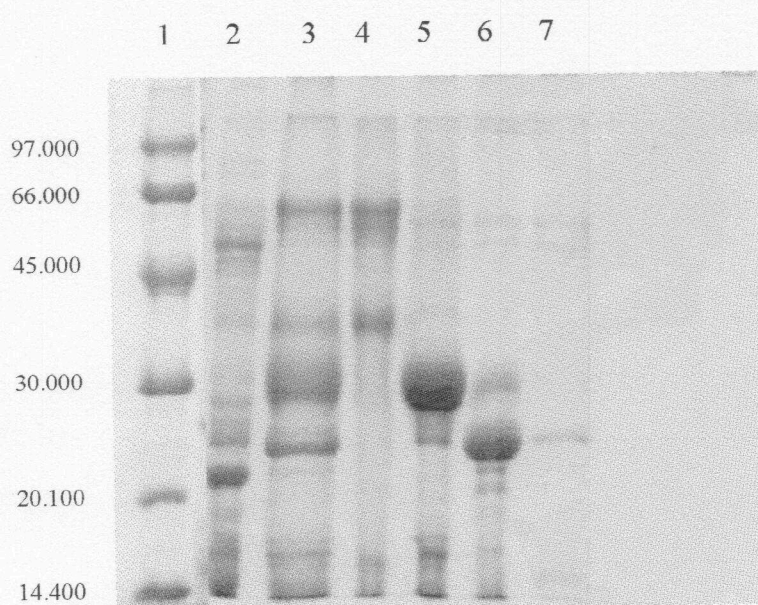
**Pontos de corte:** AG1 (tubo 39 ao 53); AG2 (tubo 55 ao 66); AG3 (tubo 67 ao 73); AG4 (tubo 103 ao 130).

**Tabela 03: Recuperação Protéica por absorbância a 280nm das subfrações obtidas do fracionamento em Sephadex G-75.**

Amostra	Unidade de A 280nm totais	Recuperação %
A4+B4+B6	61,36	100
AG1	5,29	8,62
AG2	4,82	7,85
AG3	1,89	3,08
AG4	8,04	13,10
Total	20,04	32,65

### 5.3.2 – Eletroforese em gel de poliacrilamida

A figura 11 mostra o resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% em condições desnaturantes, das subfrações obtidas por gel filtração em Sephadex G-75. Nesta figura podemos observar que a subfração AG4 (linha 7) apresenta-se com uma banda bem evidenciada, com peso molecular de aproximadamente 25.000.



**Figura 11:** Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes da fração de *B. alternatus* e das subfrações obtidas no fracionamento com a resina Sephadex – G75. **Linha 01:** Padrão de Peso Molecular: Dalton Mark VII-L: Fosforilase b (PM 97.000), Albumina (PM 66.000), Ovoalbumina (PM 45.000), Anidrase Carbônica (PM 30.000), Inibidor de Tripsina (PM 20.100),  $\alpha$ -Lactoalbumina (PM 14.400); **Linha 02:** peçonha bruta de *B. alternatus*; **Linha 03:** fração A4;

**Linha 04:** Subfração AG1

**Linha 05:** Subfração AG2

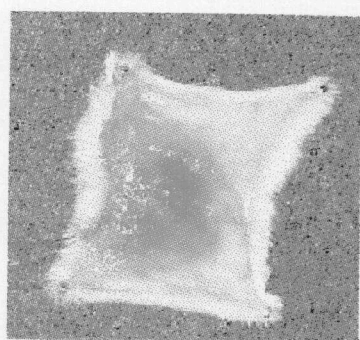
**Linha 06:** Subfração AG3

**Linha 07:** Subfração AG4

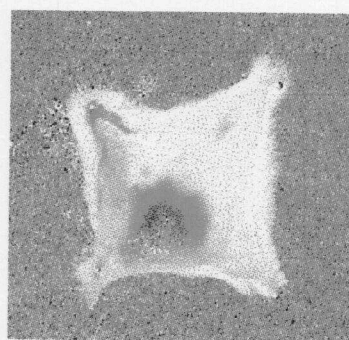


### 5.3.3 – Atividade Hemorrágica

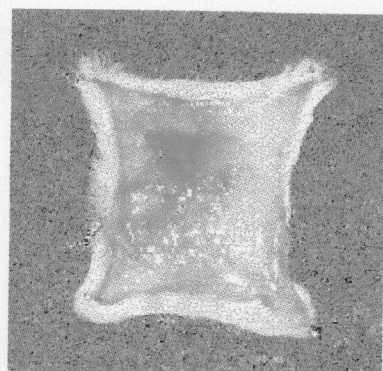
Os resultados obtidos para a atividade hemorrágica estão apresentados na figura 12. A atividade hemorrágica estava presente em todas as subfrações, sendo que a subfração AG2 apresentou um halo hemorrágico mais forte sendo, portanto a fração mais eficiente.



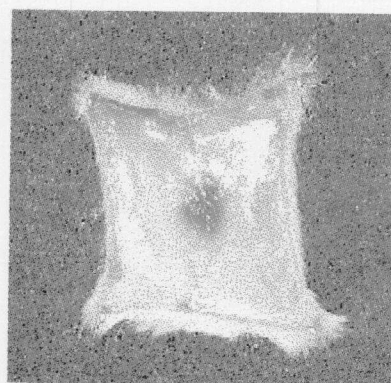
AG1



AG2



AG3



AG4

**Figura 12:** Atividade Hemorrágica das subfrações obtidas na filtração em gel de Sephadex G-75. Amostras contendo 15 $\mu$ g de proteínas diluídas em solução salina fisiológica num volume final de 50 $\mu$ l foram inoculadas intradermicamente no dorso de camundongos machos. Após três horas os camundongos foram sacrificados para a observação dos halos hemorrágicos na face interna da pele.

## 6- DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os acidentes ofídicos por serpentes do gênero *Bothrops* são os de maior importância epidemiológica no Brasil, por serem responsáveis por cerca de 90% dos envenenamentos registrados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1999). Os anti-venenos são considerados como o único tratamento específico para o envenenamento por serpentes. A seleção de um anti-veneno específico é baseada na identificação da serpente e nos sinais e sintomas do envenenamento apresentados pelo paciente após a picada. Contudo, a identificação da serpente não é sempre possível e em alguns casos os sinais e sintomas não são suficientes para apoiar o uso de uma terapia com anti-veneno específico.

Este trabalho teve como objetivos fracionar a peçonha de *Bothrops alternatus* e estudar a atividade hemorrágica do veneno e frações, quantificando a DMH (dose mínima hemorrágica) da peçonha bruta e uma de suas frações.

O fracionamento em gel de DEAE-Sephacel foi realizado com tampão bicarbonato de amônio ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ), por ser um sal volátil, facilmente eliminado na liofilização. O pH próximo ao fisiológico e a temperatura ambiente foram escolhidos com a expectativa de preservar as proteínas nas suas formas nativas, não sendo portanto, necessário submeter as frações obtidas à etapa de dessalificação por diálise ou a uma filtração.

Neste tipo de resina de troca iônica, moléculas com cargas do mesmo sinal que a resina são eluídas primeiramente, seguidas por moléculas com carga oposta.



O primeiro método de cromatografia testado com veneno da serpente *Bothrops alternatus* foi o de troca iônica em gel de DEAE-Sephacel, onde se obteve seis picos de absorvância a 280nm denominados de A1 a A6. Neste fracionamento, a atividade hemorrágica foi mais evidente para fração A4.

O rendimento protéico em absorvância a 280nm deste fracionamento foi de 67% e a fração A4 correspondeu a 13% da peçonha bruta.

As peçonhas animais apresentam uma mistura de várias substâncias tóxicas, sobretudo de natureza protéica, que provocam distúrbios que afetam o sistema de coagulação sanguínea e causam edema, necrose local, hemorragia, entre outros. As hemorragias aparecem normalmente logo após a intoxicação e são resultantes da ação das hemorraginas (enzimas proteolíticas), que produzem lesões nas paredes dos pequenos vasos sanguíneos.

De acordo com BJARNASON & FOX (1994) as hemorraginas podem ser divididas em quatro classes distintas, de acordo com os seus pesos moleculares: Na classe P-I das metaloproteases, estão incluídas as pequenas proteínas com atividade hemorrágica relativamente baixa ou ausente e com massa molecular de 20-30 kDa. Estas possuem três domínios estruturais: pré e pró-domínios e domínio protease (HEXXHXXGXXH) ligante de zinco. Como exemplo dessa classe destacam-se as atrolisinas B, Cc, Cd de *Crotalus atrox* (BJARNASON and FOX, 1994). A classe P-II inclui as toxinas de tamanho médio com massa molecular de 30-60 kDa. Estas possuem um domínio semelhante a desintegrina no carboxi-terminal, este domínio semelhante a desintegrina possui a seqüência XXCD, ao invés da seqüência Arg-Gly-Asp (RGD) presente nas desintegrinas. Um representante típico dessa classe é atrolisina E de *Crotalus atrox* (SHIMOKAWA et al., 1998). Na classe P-III as proteases possuem além do domínio desintegrina, um domínio carboxi-terminal rico em resíduos de cisteína. Outra classe que tem sido descrita apresenta os mesmos domínios estruturais das metaloproteases da classe P-III, e ainda possui um domínio adicional ligante de lectina com massa molecular de 80-100 kDa (classe P-IV). As eletroforeses realizadas com as frações obtidas nesta cromatografia serviram para acompanhar e avaliar o processo de purificação destes componentes protéicos além de determinar o peso molecular das proteínas de interesse. Em géis de PAGE-SDS a 14% na presença de agentes desnaturantes a fração A4 apresentou várias bandas, evidenciando ser bastante heterogênea, ou seja, presença de diversas proteínas.

A DMH (figura 04), calculada para o veneno de *Bothrops alternatus* foi 5,06µg, quando comparada com a DMH de *Bothrops moojeni* (7,2 µg), *B. jararaca* (5,96µg) e *B.*

*alternatus* (5,49 $\mu$ g). Estes valores referem-se ao trabalho realizado por ALVES (1995), mostrando que não houve diferença significativa na DMH para os venenos de *B. alternatus*. Estes valores de DMH mostram que a peçonha de *Bothrops alternatus* é altamente hemorrágica dentre todas as espécies.

A segunda cromatografia da peçonha de *Bothrops alternatus* foi realizada usando-se a mesma resina (DEAE-Sephacel) nas mesmas condições da anterior, para se obter maior quantidade de material. No entanto, neste caso a reprodutibilidade da técnica foi comprometida e as frações mais hemorrágicas foram B3 e B6.

O rendimento protéico por absorvância a 280nm deste segundo fracionamento foi de 66% e a porcentagem da fração B4 representou somente 4,24% da peçonha bruta.

Quando comparamos estes dois fracionamentos podemos verificar que ocorreram alterações no perfil cromatográfico. Essas alterações podem estar relacionadas com o tampão utilizado durante o fracionamento. No primeiro fracionamento o sal utilizado foi sintetizado em nosso laboratório. Já no segundo fracionamento, o sal utilizado foi o da Synth. Podemos dizer que o grau de pureza do sal do primeiro fracionamento possibilitou uma melhor separação das toxinas hemorrágicas, quando comparados ao segundo fracionamento.

Em géis de PAGE-SDS a 14% na presença de agentes desnaturantes, a fração B4 apresentou uma banda principal de peso molecular mais ou menos de 50.000. Estas proteínas têm características ácidas e estão incluídas na classe III das toxinas hemorrágicas que apresentam três domínios, sendo eles, pré e pró-domínios e domínio protease (BJARNASON & FOX, 1994). Estudos bioquímicos mostram que a maioria das toxinas hemorrágicas purificadas dos venenos de serpentes são metaloproteinases dependentes de zinco ou cálcio (MARSH, 1994) e podem causar hemorragia pela destruição da membrana basal, com subsequente perda da integridade vascular.

A DMH (Dose Mínima Hemorrágica) da fração A4 foi de 7,52 $\mu$ g, sugerindo uma menor atividade hemorrágica para a toxina purificada do que para o veneno. Este fato pode ser explicado em razão do tratamento dado à alíquota da fração A4 usada para os ensaios de DMH. Neste caso, após liofilização, uma parte do material sólido de A4 foi ressuscitado em solução salina, dosado para a quantidade de proteínas e congelado e descongelado por diversas vezes, durante os ensaios das diferentes doses para se determinar a DMH. Por se tratar de material protéico, com elevada atividade proteolítica e altamente sensível a variação de pH e temperatura, é muito provável que tenha ocorrido proteólise e desnaturação das enzimas ali presentes.



Para uma terceira cromatografia foi feita a união das frações mais hemorrágicas (A4, B4 e B6), e desta união fez-se um pool com 20mg para purificar os fatores hemorrágicos. O fracionamento em gel de Sephadex G-75 foi realizado também com tampão bicarbonato de amônio ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ). O gel de Sephadex G-75 foi escolhido porque na cromatografia de filtração ou exclusão molecular, a resina é constituída de moléculas porosas feitas de um polímero insolúvel altamente hidratado (COLLINS, 1990), e é adequada para separar proteínas e peptídeos globulares numa faixa de peso molecular entre 3.000 e 70.000, conforme indicações do fabricante. Foi usada uma coluna de vidro, contendo uma placa porosa, na qual a resina foi empacotada.

As proteínas de alto peso molecular fluem mais rápido através da coluna do que as de baixo peso, pois estas entram nos poros da resina percorrendo um caminho mais longo e eluindo por último (STRYER, 1992).

Neste fracionamento, a atividade hemorrágica foi detectada em todas as subfrações, sendo a AG2 mais intensa e, portanto a mais eficiente. Deve ser ressaltado que a quantidade de amostra para a atividade hemorrágica nestes ensaios foi de 15 $\mu\text{g}$  de proteínas e, portanto mais de três vezes menor que a quantidade de proteínas para os ensaios anteriores (50 $\mu\text{g}$ ), e os halos hemorrágicos observados eram equivalentes nos diferentes ensaios. Estes resultados indicam fortemente, um grau de pureza muito maior para as toxinas do último fracionamento.

Os resultados obtidos por PAGE-SDS com estas frações (Fig. 11) confirmam o que era esperado na cromatografia de gel filtração e nos ensaios de atividade hemorrágica.

Assim, pode-se observar que a subfração AG1 contém duas bandas majoritárias, com PM equivalente a 66.000 e 40.000 respectivamente, e com apenas 15 $\mu\text{g}$  apresentam um halo hemorrágico maior, mas não o mais forte. A fração AG2 por sua vez apresentou uma única banda principal de PM equivalente a 30.000 e halo hemorrágico menor que o de AG1, porém bem mais intenso. Já fração AG3, apresenta uma banda principal com PM próximo de 25.000 e um contaminante como da fração AG2. O halo hemorrágico observado foi mais espalhado, porém menos intenso que o de AG2. Finalmente AG4 que mostrou praticamente um contaminante de AG3 e o menor halo hemorrágico, e apresenta uma banda característica de uma toxina hemorrágica de baixo peso molecular da classe I (BJARNASON & FOX, 1994).

Estudos realizados sugerem que as diferentes intensidades de cor dos halos hemorrágicos produzidos pelos venenos de *Bothrops* estudados podem ser explicadas como o resultado de diferença na quantidade de hemoglobina contida nos halos hemorrágicos produzidos por cada veneno. Os efeitos de vários fatores presentes nos venenos de *Bothrops*

(tais como concentração individual e atividade de proteases hemorrágicas, mais uma grande variedade de componentes capazes de alterar a vascularização local) podem ser combinados para produzir halos hemorrágicos de tamanhos similares com diferentes quantidades de hemoglobina possível de ser extraída (ESMERALDINO, 1998).

Em síntese, este trabalho nos permitiu verificar que a peçonha de *Bothrops alternatus* é muito rica em toxinas hemorrágicas das diferentes classes estruturais. Portanto, estudos futuros visando o isolamento e a caracterização bioquímica dessas enzimas, poderão fornecer valiosas contribuições nos diferentes campos de conhecimento. Assim, maiores investigações sobre a toxicidade e atividades enzimáticas, por exemplo, poderão contribuir para os estudos de utilização terapêutica destas enzimas, pois muitas possuem ação anti-trombótica e podem ser utilizadas na prevenção de alguns distúrbios da coagulação sanguínea, além da inegável contribuição aos estudos sobre relação estrutura-função de proteínas.



## 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ADAME, B.L.; SOTO, J.G.; SECRAW, D. J.; PEREZ, J.C.; GLENN, J.L.; STRAIGHT, R.C.1990. Regional variation of biochemical characteristics and antigeneity in Great Basin (*Crotalus viridis lotosus*) venom. **Comp. Biochem. Physiol.** 97B; 95-101.

AIRD, S.D.1985. A quantitative assessment of variations in venom constituents within and between three nominal rattlesnakes subspecies. **Toxicon** 23:1000-1004.

AIRD, S.D.; KAISER, I.I.1985. Comparative studies on three rattlesnakes toxins. **Toxicon** 23:361-274.

AMARAL, C.F.S.; REZENDE, N.A.; PEDROSA, T.M.G.; SILVA, O.A.; PEDROSO, E.R.P.1988. A fibrinogenemia secundária a acidente ofídico crotálico (*Crotalus durissus terrificus*). **Rev. Inst. Méd. Trop.** São Paulo 30:288-292.

ALVES, A.G.1995. **Estudo comparativo de atividades biológicas presentes nas peçonhas de algumas serpentes brasileiras: *Bothrops moojeni*, *Bothrops alternatus*, *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus sp* (VIPERIDAE-CROTALINAE).** Monografia. Universidade Federal de Uberlândia.p.44.

ASSAKURA, M. T.;REICHL, A. P.;ASPERTI, M.C.; et al.1985.Isolation of the major proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops moojeni* (caissaca). **Toxicon**.v. 23, p. 691-706.

AZEVEDO MARQUES, M.M.; CUPO, P.; FARIA, C.S.; AMARAL, S. and HERING, S.E. 1990. Rattlesnake bites clinical features and complementaru tests. **Mem. Inst. Butantan** 52 (suppl.), 27-30.

BAJWA, S. S.; MARKLAND, F. S.; RUSSEL, F. E. 1980. Fibrinolytic enzymes in western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. **Toxicon**, 18: p 285.

BARRAVIERA, B. (coordenador) 1994. **Venenos animais: uma visão integrada**, 1ª edição. Rio de Janeiro: Ed. de Publicações Científicas, 411p.

BERNADSKY, G.; BDOLAH, A.; KOCHVA, E.1986. Gel permeation pattern of bvenoms from eleven species of the genus *Vipera*. **Toxicon** 24:721-725

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W.; 1994. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmac Theor** 62, 325 – 372.

BORKOW, G.; GUTIERREZ, J. M.; OVADIA, M. 1993. Isolation and characterization of synergistic hemorrhagins from the venom of the snake *Bothrops asper*.**Toxicon**.v. 31, p. 1137-50.

CHIPPAUX, J.P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J., 1991. Snake venom variability: Methods of study, results and interpretation. **Toxicon** 29:1279-1303.



COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. And BONATO, P. S. Coorde.1999. **Introdução a métodos cromatográficos**. 4ª ed. Unicamp, Campinas, 7-115.

DAOUD, E.; TU, A. T.; EL-ASMAR, M. F. 1986. Isolation and characterization of anticoagulant proteinase cerastase F – 4, from *Cerastes cerastes* (Egyptian Sand Viper) venom. **Thromb. Res.** 42; p 52.

DAVIS, B. J. 1964. Disk eletrophoresis II, method and application to human serum proteins. **Ann. NY. Acad. Sci.**, 121; 404.

DENSON, K. W. E.; RUSSELL, F. E.; ALMAGRO, D.; BISHOP, R. C. 1972. Characterization of the coagulant activity of some snake venoms. **Toxicon**, 10: p 557.

FARID, T. M.; TU, A. T. 1989. Characterization cerastobin, a thrombin – like from venom of Ceraste Viper (Sahara Sand Viper). **Biochem.**, 28: p 371.

FERREIRA, M.L.; MOURA-DA-SILVA, A.M.; FRANÇA, F.O.S; CARDOSO, J.L.; MOTA, I.1992. Toxic activities of venoms from nine *Bothrops* species and their correlation with lethality and necrosis. **Toxicon** 30:1603-1608.

FURTADO, M.F.D.; MARUYAMA, M.; KAMIGUTI, A .S.; ANTONIO, L.C.1991. Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. **Toxicon** 29:219-226.

GENÉ, J.A.; ROY, A.; ROJAS, G.; GUTIERREZ, J.M.; CERDAS, L.1989. Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activies os Costa Rica crotalinae snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. **Toxicon** 27:841-848.

GLENN, J.L.; STRAIGHT, R.C.; WOLT, T.B.1994. Regional variation in the presence of canabrate toxin in *Croalus horridus* venom. **Comp. Biochem. Physiol. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.** 107:337-346.

H. C. CASTRO, D. L. S. DUTRA, A. L. OLIVEIRA-CARVALHO and R. B. ZINGALI. 1998. Bothroaltein, a thrombin inhibitor from the venom of *B. alternatus*. **Toxicon** 36, 1903-1912.

HATTON, M.W. 1973. Studies on the coagulant enzyme from *Agkistrodon rhodstoma* venom: isolation and some properties of the enzyme. **Biochem. J.** 131, 799-807.

ISHIDA, Y.; YAMASHIDA, S.; OSHAKA, A.; TAKAHASHI, T. and OMORI-SATOHT. 1986. Pharmacology studies of the hemorrhagic principles isolated from the venom of *Trimeressurus flavoridis*, a crotalid. In: *Animal, Plant and Microbial Toxins*. (OSHAKA, <sup>a</sup>; HAYASJI, K.; SAWAI, Y.;Eds.), 2, 263. Plenum, New York.

ITOH, N.; TANAKA; N. FUNAKOSHI, I.; KAWASAKI, T.; MIHASHI, S. and YAMASHINA, I.1988. Organization of the gene for batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme. **J. Biol. Chem.** 263, 7628-7631.

ITZHAKI, R. F.; GILL, D. M. 1964. A microbiouret method for stimating proteins. **Analitycal Biochemistry**, 9: 401.

IWANAGA, S. G. e SUZUKI, T.1979. Enzymes in snake venom. In: Lee, C.Y.Snake venoms. **New York, Springer Verlag**, p 61- 158.

KAMIGUTI, A. S.; CARDOSO, J. L. C. 1989. Haemostatic changes caused by the venom South American snakes. **Toxicon**, 27: p 955.

KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R. M.; THEAKSTON, R. D. G.; ZUZEL, M. 1996. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, 34: p 627.



KINI, R.M.; EVANS, H.J.1990. Review article: effects os snake venom proteins on blood platelets. **Toxicon** 28:1387-1422.

KOMORI, Y.; HAGIHARA, S.; TU, A. T. 1985. Specificity of hemorrhagic proteinase from *Crotalus atrox* (Western diamondback rattlesnake) venom. **Biochem. Biophys. Acta**, 829: p 127.

KONDO, H.; KONDO, S.; IKÉZAWA, H.; MURATA, R.; OHSAKA, A., 1960. Studies on the quantitative method for the determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. **Jpn. J. Med. Sci. & Biol.** 13, 43-51.

KORNALIK, F.; TÁBORSKÁ, E.1988 Intraspecies variability in the composition of the coagulant active snake venoms. In: PIRKLE, H.; MARKLAND, F.S (eds). Hemostasis an animal venoms. **New York: Marcel Dekker**; 503-513.

LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins, during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227: 680.

MANDELBAUM, F. R.; ASSAKURA, M. T. 1988. Antigenic relationship of hemorrhagic factor and proteases isolated form the venom of three species of *Bothrops* snakes. **Toxicon**, 26: p 399.

MANDELBAUM, F. R.; ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P.1984. Characterization of two hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops neuwiedi* (jararaca pintada). **Toxicon**. v. 22, p. 193-196.

MARCUS B. SMOLKA, SÉRGIO MARANGONI, BENEDITO OLIVEIRA and JOSÉ C. NOVELLO. 1998. Purification and partial characterization of a thrombin-like enzyme, balterobin, from the venom of *B. alternatus*. **Toxicon** 36, 1059-1063.

- MARKLAND, F. S.; DAMUS, P. S. 1971. Purification and properties of an enzyme from the venom of *Crotalus adamanteus*. **J. Biol. Chem.**, 246: p 6460.
- MARSH, N. 1994. Snake venom hemorrhagins. **Mem. Inst. Butantan** 52, (supl.)35-40
- MARUYAMA, M. SUGIKI, M.; YOSHIDA, E.; MIHARA, H.; NAKAJIMA, N. 1992. Broad substrate specificity of snake venom fibrinolytic enzymes: Possible role in hemorrhage. **Toxicon**, 30. 1387-1397.
- MATRISIAN, L. M. 1992. The matrix-degrading metalloproteinases. **BioEssays**, 14: p. 455.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1999. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 131 p.
- NIKAI, T.; MORI, N.; KISHIDA, M.; SUGIHARA, H. and TU, A. T. 1984. Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin from the venom of *Crotalus atrox*, **Arch. Biochem. Biophys.**, v.231, p. 309-311.
- NISHIDA, S.; FUJIMURA, Y.; MIURA, S.; OZAKI, Y.; USAMI, Y.; SUZUKI, M.; TITANI, K.; YOSHIDA, E.; SUGIMOTO, M.; YOSHIOKA, A. and FUKUI, H. 1994 Purification and characterization of bothrombin, a fibrinogen-clotting serine protease from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry** 33, 1843-1849.
- OHSAKA, A.; OMORI-SATOH, T.; KONDO, H.; KONDO, S.; MURATA, R., 1966. Biochemical and pathological aspects of hemorrhagic principles in snake venoms with special reference to Habu (*Trimeresurus flavoviridis*) venom. **Mem. Inst. Butantan**, 33, 193-205.
- OLIVEIRA, F. 2001. **Novas Proteases da peçonha de *Bothrops moojeni* (Caíçaca): Purificação de quatro isoformas de fibrinogenases (Bthxs) e caracterização bioquímica**. Tese de doutorado. Brasília-DF. p.141.



- OUYANG, C.; TENG, C. M.; HUANG, T. 1992. Characterization of snake venom components acting on blood coagulation and platelet function. *Toxicon*, 30: p 945.
- OUYANG, C.; YANG, F. Y. 1974. Purification and properties of the thrombin – like enzyme from *Trimeresurus gramineus* venom. *Biochem. Biophys. Acta*, 351: p 354.
- PEREZ, O. A.; KOSCINCZUK, P.; NEGRETTE, M. S. et al. 1999. Effects of *Bothrops alternatus* venom from Argentina on muscle and different organs in mice. *Acta. Physiol. Pharmacol Ther Latinoam*. V. 46, n. 02, p. 97-102.
- REISFELD, R. A.; LEWIS, V. L.; WILLIAMS, D. E. 1962. Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Nature*, 4838: 281.
- ROSENBERG, P. 1979. Enzymes in snake venoms. In: LEE, C.Y. (ed). Handbook of experimental pharmacology, vol. 52. Snake venoms. Berlin: Springer; 404-434.
- ROSENFELD, G. 1976 Acidentes por animais peçonhentos (serpentes, aranhas e escorpiões). In: Vernesi, R. (ed). Doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 970-983.
- SANTO NETO, H. 1987 **Aspectos morfológicos das alterações musculares produzidas pelo veneno de *Bothrops jararacussu* e seus componentes: estudos com microscopia óptica e eletrônica.** Tese de doutoramento, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.
- SELISTRE, H. S.; GIGLIO, J. R. 1987. Isolation and characterization of the a thrombin – like enzyme from the venom of the snake *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa). *Toxicon*, 25: p. 1135.
- SELISTRE, H. S.; QUEIROZ, L. S.; CUNHA, O.A. B.; SOUZA, G. E. P. et al. 1990. Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema inducing toxins from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. *Toxicon*.v. 28, p. 261-73.

- SHIEH, T.C.; KAWABATA, S.; KIHARA, H.; OHNO, M. and IWANAGA, S. 1988. Amino acid sequence of a coagulant enzyme, flavoxobin, from *Trimeresurus flavoridis* venom. **J. Biochem.** 103, 596-605.
- SOTO, J.C.; PEREZ, J.C.; MINTON, S.A. 1988. Proteolytic, hemorrhagic and hemolytic activities of snake venoms. **Toxicon** 26:875-882.
- STOCKER, K.; BARLOW, G. H. 1976. The coagulant enzyme from *Bothrops atrox* venom (bathroxobin). In: *Methods in Enzymology* 45B, 214 – 233. (LORAND, L. Ed) New York, Academic Press.
- STOCKER, K.; FISCHER, H. and MEIER, J. 1982. Thrombin-like snake venom proteinases. **Toxicon** 20: 265-273.
- STORER; T. L.; et al. 1989. **Zoologia Geral**. 6ª Ed. revista e aumentada. Companhia Editora Nacional (Biblioteca Universitária, série 3, Ciências puras; v. 8), 816p. ISBN, p. 656.
- TABORDA, L. C. 1940. A influência da temperatura sobre o princípio tóxico, coagulante e proteolítico do veneno de *Bothrops jararaca*. **Mem. Inst. Butantan**, 14: 167-175.
- THEAKSTON, R.D.G.; REID, H.A., 1983. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. **Bulletin of the World Organization** 61,949-956.
- THWIN, M. M.; GOPALAKRISHNAKONE, P. 1998. Snake envenomation and protective natural endogenous proteins: a mini review of the recent developments. **Toxicon**. v. 36, n.11, p. 1471-82.
- TU, A.T. 1997. *Venoms: Chemistry and molecular biology*, I, II. New York, John Wiley e Sons.
- VITAL BRAZIL. 1911. *La defense contre l'Ophidisme*. São Paulo. Pocaí e Weiss.