

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA BIOQUÍMICA

ESTUDO COMPARATIVO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS PRESENTES NAS
PEÇONHAS DE ALGUMAS SERPENTES BRASILEIRAS: *Bothrops moojeni*,
Bothrops alternatus, *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus* sp (VIPERIDAE-
CROTALINAE)

GISLAINE APARECIDA ALVES

MONOGRAFIA APRESENTADA À COORDENAÇÃO DO CURSO DE
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA,
PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE BACHAREL EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS.

UBERLÂNDIA - MG

DEZEMBRO / 1995

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA BIOQUÍMICA

ESTUDO COMPARATIVO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS PRESENTES NAS
PEÇONHAS DE ALGUMAS SERPENTES BRASILEIRAS: *Bothrops moojeni*,
Bothrops alternatus, *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus* sp (VIPERIDAE-
CROTALINAE)

GISLAINE APARECIDA ALVES

MARIA INÊS HOMSI BRANDEBURGO

MONOGRAFIA APRESENTADA À COORDENAÇÃO DO CURSO DE
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA,
PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE BACHAREL EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS.

UBERLÂNDIA - MG

DEZEMBRO / 1995

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA BIOQUÍMICA

ESTUDO COMPARATIVO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS PRESENTES NAS
PEÇONHAS DE ALGUMAS SERPENTES BRASILEIRAS: *Bothrops moojeni*,
Bothrops alternatus, *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus* sp. (VIPERIDAE-
CROTALINAE)

GISLAINE APARECIDA ALVES

Aprovada pela comissão examinadora em 15/12/95 Conceito 100,0

Maria Inês Co. Brandeburgo
Maria Inês Homsí Brandeburgo

Nilson Penha da Silva
Nilson Penha da Silva

Có-Orientador

Carlos Alberto de Oliveira

Carlos Alberto de Oliveira

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
Barcelos

Prof.^a Nora-Ney Santos Barcelos

Coordenadora do Curso de Licenciatura em
Genética Bioquímica

Nora-Ney Santos Barcelos

Coordenadora do curso

Uberlândia, 15 de dezembro de 1995

Dedico este trabalho,

*Com muito amor ao Carlos Siqueira, pelo apoio, compreensão e carinho
nos momentos mais difíceis*

À minha família, por ter me proporcionado a realização deste trabalho

À Maria Inês, primeiramente pela amizade e pela perfeita orientação

Agradecimentos,

Aos conselheiros, Nilson e Carlos, pela colaboração para a realização deste trabalho.

Aos membros do nosso grupo Peçonha, Andreimar, Veridiana, Fábio, Luciana, Márcia, Paula e Fernanda, pela união e sincera amizade.

Em especial à Veridiana, pela atenção e interesse na realização deste trabalho

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica, alunos e funcionários, pelo companheirismo.

A todos os professores do departamento de Genética Bioquímica.

E a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Resumo	V
1.0 - Introdução	1
2.0 - Objetivo	6
3.0 - Metodologia	7
3.1 - Obtenção de Veneno Bruto	7
3.2 - Ensaio Biológicos	7
3.3 - Filtração da peçonha total em gel de Sephadex G-75	7
3.3.1 - Preparação da resina	7
3.3.2 - Preparação das peçonhas	8
3.3.3 - Filtração da peçonha total	8
3.4 - Dosagem de Proteína	8
3.5 - Atividades enzimáticas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	8
3.5.1 - Atividade coagulante	8
3.5.2 - Atividade fosfolipásica	9
3.5.3 - Atividade hemorrágica	9
3.5.3.1 - Determinação da DMH	9
3.6 - Eletroforese em gel de poliacrilamida	10
3.6.1 - PAGE - SDS	10
3.6.2 - Na ausência de agentes desnaturantes	11
3.6.2.1 - PAGE - proteínas ácidas	11
3.6.3 - Revelação e secagem dos géis	11
4.0 - Resultados	12
4.1 - Fracionamento das peçonhas	12
4.2 - Rendimento proteico e atividade PLA2 específica	21
4.3 - Atividades biológicas	27
4.4 - Eletroforeses (PAGE)	31
5.0 - Discussão	34
6.0 - Referências bibliográficas	38

Resumo

As serpentes da família Viperidae possuem uma maior especialização em termos de inoculação da peçonha. Suas presas canaliculadas e curvadas para trás, na porção anterior do maxilar superior, permitem a ereção das mesmas no momento do bote. A peçonha é secretada por um par de glândulas, uma em cada lado do maxilar superior, e ligada por um ducto à presa.

No Brasil as serpentes da família Viperidae, subfamília Crotalinae, compreendem os gêneros: *Bothrops*, conhecidas popularmente como jararacas; *Crotalus*, as cascavéis; e *Lachesis* conhecidas por surucucu.

As serpentes do gênero *Bothrops* se caracterizam por apresentarem peçonhas com intensa ação coagulante e atividade proteolítica, causar mionecrose no local da picada e por induzir estado de choque, que é a causa mais frequente de morte.

As serpentes do gênero *Crotalus* apresentam forte letalidade, alta atividade neurotóxica e miotóxica, e fraca propriedade proteolítica, hemorrágica e efeito formador de edema. A principal toxina da peçonha de *Crotalus*, a crotoxina, é uma mistura de várias isoformas que diferem significativamente na sua estrutura molecular.

Este trabalho teve como objetivo o estudo comparativo das atividades enzimáticas: PLA₂, coagulante e hemorrágica, das peçonhas totais e suas frações, de serpentes da subfamília Crotalinae (*B. alternatus*, *B. jararaca*, *B. moojeni* e *C. durissus* sp.).

As peçonhas foram centrifugadas, o sobrenadante amarelo límpido obtido foi aplicado a uma coluna de Sephadex G-75, equilibrada com o mesmo tampão da amostra. Foi feita a dosagem de proteínas pelo método do Microbiureto.

Foram estudadas as atividades coagulante, PLA₂ e hemorrágica. As eletroforeses foram realizadas para o acompanhamento dos fracionamentos.

A peçonha mais coagulante foi a de *B. jararaca*, seguida por *B. moojeni* e *C. Durissus* sp. No entanto, a fração com maior atividade coagulante dentre as peçonhas estudadas foi a fração D2 de *C. durissus*.

A peçonha botrópica mais hemorrágica foi a de *B. alternatus*, seguida pela de *B. moojeni* e *B. jararaca*. É interessante observar que as principais toxinas hemorrágicas botrópicas são os componentes de maior PM das peçonhas, pois foram eluídas sempre na primeira fração do Sephadex G-75 e apresentaram PM entre 30.000 e 65.000 por PAGE-SDS. Nossos resultados mostram que esta atividade é particularmente importante para peçonhas botrópicas, pois foi encontrado na maioria das frações isoladas e pouco significante para peçonhas crotálicas.

A peçonha com maior atividade PLA₂ foi a *B. moojeni*, seguida pela peçonha de *C. durissus* e *B. alternatus*, a de menor atividade foi a de *B. jararaca*. Para as peçonhas de *B. moojeni* e *C. durissus* esta enzima deve ser especialmente importante, pois as isoformas de maior atividade específica estavam presentes nas principais frações obtidas, representando mais de 40% do total de proteínas da peçonha. Deve ser ressaltado que a atividade PLA₂ é a principal responsável pelo efeito miotóxico local apresentado pelas peçonhas botrópicas, e pelo efeito neurotóxico e letal das peçonhas de *Crotalus durissus* sp.

ABREVIÇÕES USADAS

- CaCl₂ - Cloreto de Cálcio
- DMH - Dose mínima Hemorrágica
- EDTA - Ácido etilenediaminetetra acético
- Hcl - Ácido Clorídrico
- NaOH - Óxido de Sódio
- NH₄HCO₃ - Bicarbonato de Amônio
- PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida
- pH - Ponto Hidrogeniônico
- PLA2 - Atividade fosfolipásica
- SDS - Dodecil Sulfato de Sódio
- TEMED - N',N',N',N' - Tetrametiletlenodiamino
- UFU - Universidade Federal de Uberlândia
- USP - Universidade de São Paulo
- V.B. - Veneno Bruto

1.0 - INTRODUÇÃO

As serpentes possuem um atributo a mais para a digestão de seu alimento, a presença da peçonha. As serpentes “não peçonhentas” também possuem veneno usado como auxiliar na digestão, mas não possuem mecanismo inoculador, presente nas serpentes ditas peçonhentas. O que difere uma serpente não peçonhenta de uma peçonhenta é a capacidade que as últimas têm de inocular a sua peçonha (Storer, 1990).

As principais serpentes peçonhentas estão compreendidas em três famílias: Hydrophidae, Elapidae e Viperidae (Schmidt, 1976; Klemmer, 1963; Kochva, 1987). Elas possuem um par de dentes especializados, nos dois ossos maxilares, os quais conduzem a peçonha, usada para matar o animal e também para a sua defesa. A peçonha é injetada por ação capilar. As serpentes não peçonhentas não possuem sistema inoculador de veneno, produzindo-o apenas para a digestão de seus alimentos.

As serpentes da família Viperidae possuem uma maior especialização em termos de inoculação da peçonha. Suas presas canaliculadas e curvadas para trás, na porção anterior do maxilar superior, permitem a ereção das mesmas no momento do bote (Grantsau, 1991). A peçonha é secretada por um par de glândulas, uma em cada lado do maxilar superior, e ligada por um ducto à presa (Storer, 1991).

No Brasil as serpentes da família Viperidae, subfamília Crotalinae, compreendem os gêneros: *Bothrops*, conhecidas popularmente como jararacas; *Crotalus*, as cascavéis; e *Lachesis* conhecidas por surucucu (Grantsau, 1991).

O gênero *Bothrops* compreende vinte espécies, dentre as quais *Bothrops moojeni*, *Bothrops alternatus*, e a *Bothrops neuwiedi*; a espécie *B. neuwiedi* se divide em doze subespécies; o gênero *Crotalus* tem uma espécie, a *Crotalus durissus* e seis subespécies; o gênero *Lachesis* tem uma espécie, a *Lachesis muta* e duas subespécies (Grantsau, 1991).

A peçonha tem aproximadamente 90% de seu peso seco em proteínas, compreendendo grande variedade de enzimas e toxinas não enzimáticas (Schmidt, 1976). A parte não protéica é representada por carboidratos, lipídeos e compostos de baixo peso molecular, como nucleosídeos e diversos íons (Chippaux, 1991). Muitas peçonhas têm uma cor amarelada devido à presença de L-minoácido-oxidase, a qual contém riboflavina como um grupo prostético (Barraviera, 1994).

As serpentes do gênero *Bothrops* se caracterizam por apresentarem peçonhas com intensa ação coagulante e atividade proteolítica, causar

mionecrose no local da picada e por induzir estado de choque, que é a causa mais frequente de morte.

O simples teste de coagulação tem sido usado no diagnóstico de envenenamento sistêmico por *Bothrops*, no Brasil. A maioria das picadas ocorrem em áreas rurais onde os laboratórios não têm equipamentos adequados, tendo condições somente para a realização de testes básicos (Sano-Martins, 1994). Por isso, o teste de coagulação é recomendado pelo Ministério da Saúde, para o diagnóstico e tratamento de acidentes Botrópicos (Sano-Martins, 1994). A peçonha botrópica induz a coagulação por produzir atividade semelhante à tromboplastina; possuir um ativador do fator X; ativar o fator V; ativar a protrombina e possuir atividade semelhante à trombina.

A maioria dos venenos botrópicos têm capacidade de ativar o fator X e a protrombina na cascata da coagulação sanguínea. Quando ocorre a ativação do fator X, há também consumo de fatores V, VII e plaquetas, levando à produção do quadro de coagulação intravascular disseminada (Barraviera, 1994).

A ação coagulante que as peçonhas das serpentes dos gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis* têm é devida principalmente à capacidade de transformar diretamente o fibrinogênio em fibrina (Barraviera, 1994), conhecida como ação coagulante do tipo trombina. Mas, de forma distinta à da trombina este componente não ativa o fator XIII da coagulação, resultando no consumo de fibrinogênio com incoagulabilidade sanguínea.

O envenenamento sistêmico de humanos por serpentes do gênero *Bothrops*, *Lachesis* e *Crotalus* no Brasil tem resultado na incoagulabilidade sanguínea (Sano-Martins, 1994).

A peçonha botrópica também pode causar hemorragia local ou sistêmica a nível de pulmões, cérebro e rins. O edema no local da picada é decorrente de lesão tóxica no endotélio de vasos sanguíneos, causada provavelmente por:

- toxinas hemorrágicas, que rompem a microvasculatura, induzindo extravasamento;
- fosfolipases A2 (PLA2), que induzem a liberação de compostos farmacologicamente ativos;
- proteases, que agem sobre o cininogênio e liberam cininas, que podem ser ativadas pelo fator XII da coagulação, liberado pela lesão da microvasculatura;
- componentes do sistema complemento, que participam nas reações inflamatórias (Gutierrez, 1989).

A ação vasculotóxica sistêmica é causada por fatores hemorrágicos denominados hemorraginas. Estas agem sobre vasos capilares, destruindo inicialmente a membrana basal e causando posteriormente sua ruptura.

As serpentes do gênero *Crotalus* apresentam forte letalidade, alta atividade neurotóxica e miotóxica, e fraca propriedade proteolítica, hemorrágica e efeito formador de edema (Gutierrez, 1991). A principal toxina da peçonha de *Crotalus*, a crotoxina, é uma mistura de várias isoformas que diferem significativamente na sua estrutura molecular (Faure, 1978).

A crotoxina é composta de duas subunidades, uma proteína com características básicas, denominada fosfolipase A2 de baixa toxicidade, e uma proteína ácida denominada crotapotina, que potencia a toxicidade mas inibe a atividade da fosfolipase A *in vitro*. A ligação química entre a fosfolipase A2 e a crotapotina é uma ligação fraca e reversível (Conti, 1986).

As frações neurotóxicas do veneno crotálico são aquelas que produzem efeitos tanto a nível de sistema nervoso central quanto de sistema nervoso periférico. Apresentam como principal componente neurotóxico a crotoxina, responsável por um maior efeito no bloqueio da transmissão neuromuscular, sugerindo que as paralisias motoras e respiratórias no acidente crotálico sejam decorrentes do bloqueio da junção neuromuscular. Pode-se concluir que esta neurotoxina atue a nível pré-sináptico, inibindo a liberação de acetilcolina (Barraviera, 1994).

A atividade miotóxica sistêmica caracterizada pela liberação de mioglobina para o sangue e a urina, está bem estabelecida com base em observações clínicas, dados laboratoriais e comprovações por meio de biópsia muscular. A crotamina (Chang, 1978), uma miotoxina desta peçonha, é capaz de causar a despolarização do potencial de membrana de células musculares, induzindo um influxo de cálcio.

O efeito miotóxico no local da picada predomina na peçonha de serpentes do gênero *Bothrops*, enquanto a miotoxicidade sistêmica ocorre nas picadas por *Crotalus*, sendo a espécie *Crotalus durissus* sp. e suas subespécies altamente neurotóxicas (Schmidt, 1976).

Para melhor compreender os diversos efeitos causados no envenenamento ofídico, os pesquisadores têm isolados as diferentes toxinas das peçonhas e estudado suas características estruturais e atividades biológicas. Assim, do veneno de *B. neuwiedi* foram isolados dois fatores hemorrágicos denominados NHFa e NHFb (Mandelbaun et al., 1984); três (HF1, HF2, HF3) de *B. jararaca* (Assakura et al, 1986) e três de *B. insularis* (Selistre et al, 1990a).

A variação de uma toxina dentro de uma espécie, pode ser observada em função da idade, das condições de vida e da distribuição geográfica (Iwanaga e Suzuki, 1979). Mas também podem ser observadas similaridades entre a peçonha do filhote de uma subespécie, *C. d. durissus*, com a peçonha do adulto de outras subespécies, a *C. d. terrificus*, (Gutierrez, 1991). A presença e concentração de toxinas na peçonha e o seu respectivo efeito é característica de cada espécie (Chippaux, 1991).

As hemorraginas isoladas de venenos botrópicos são proteínas estruturalmente similares. Foi também verificado que estas hemorraginas têm epítomos similares às hemorraginas de *Crotalus* norte-americana.

A ação dos fatores hemorrágicos pode estar relacionada com a atividade proteolítica, podendo causar lesões nos capilares devido a uma ação direta dessas enzimas (Mandelbaum, 1990).

As PLA2 são enzimas que catalisam a hidrólise da ligação 2-acil éster de 3-n-fosfolípídeo, liberando ácidos graxos livres e lisofosfatídeos (Chippaux, 1991). Esta enzima é extremamente estável, tendo sido isolada de uma variedade de venenos, como os de abelhas e serpentes. Nas peçonhas de serpentes estas enzimas exercem função como: miotoxicidade; indução da agregação plaquetária; efeito hemolítico indireto; edematogênico e anticoagulante (Kini e Evans, 1989). Várias miotoxinas com atividades PLA2 já foram isoladas de peçonhas botrópicas, tais como: bothropstoxina II de *B. jararacussu* (Homsí-Brandeburgo et al, 1988), três miotoxinas da peçonha de *B. asper* (Gutiérrez et al, 1984a, b, c, 1986a), uma miotoxina ácida de *B. insularis* (Selistre et al, 1990a, b) e uma miotoxina de *B. atrox* (Lomonte et al, 1990).

Alguns fatores coagulantes de peçonhas botrópicas também foram isolados, como a batroxobina da *Bothrops atrox* (Fichman e Henriques, 1962), um fator coagulante do veneno de *B. insularis* (Selistre, 1985) e um de *B. jararaca* (Mandelbaum et al., 1982).

As alterações da coagulação sanguínea têm sido investigadas *in vitro* e *in vivo*. O veneno de *B. jararaca* possui uma fração denominada botrocetina, que tem atividade agregante plaquetária *in vitro* (Seegers & Ouyang, 1979). Os venenos de outras serpentes, entre elas a *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops atrox*, possuem frações denominadas respectivamente de convulxina e trombocetina, que induzem agregação plaquetária e aglutinação das plaquetas *in vitro* (Barraviera, 1994).

Com base nas similaridades existentes entre as peçonhas é produzido no Brasil o soro antibotrópico a partir de um pool de cinco espécies de *Bothrops* (Leite, 1991).

Existem portanto, algumas enzimas presentes nas peçonhas crotalíneas que são responsáveis pelos principais efeitos observados após o envenenamento, destacando-se as atividades: PLA₂, coagulante e hemorrágica.

A análise destas enzimas em peçonhas das diferentes espécies podem nos mostrar semelhanças e diferenças características de cada uma.

2.0 - OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo o estudo comparativo das atividades enzimáticas: PLA2, coagulante e hemorrágica, das peçonhas totais e suas frações, de serpentes da subfamília Crotalinae (*B. alternatus*, *B. jararaca*, *B. moojeni* e *C. durissus* sp.). O rendimento de cada fracionamento foi acompanhado.

Todas as peçonhas e suas respectivas frações foram monitoradas por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) em condições nativa e desnaturante.

3.0- METODOLOGIA

3.1 - OBTENÇÃO DO VENENO:

A peçonha bruta de *Bothrops moojeni* e *B. alternatus* foi gentilmente doada pela Professora Vera Lúcia Brites, do Departamento de Biociências da UFU. As peçonhas de *Crotalus durissus* sp. e *Bothrops jararaca* foram obtidas do Instituto Butantan. A peçonha de *Crotalus* consiste em um pool, coletado das seis subespécies de *Crotalus durissus* brasileiras, a saber: *C. d. cascavela*, *C. d. collilineatus*, *C. d. marajoensis*, *C. d. ruruima*, *C. d. terrificus* e *C. d. dryinus*.

As peçonhas de *B. moojeni* e *B. alternatus* estavam no estado líquido, congeladas a -20° C, enquanto que as de *B. jararaca* e *C. durissus* estavam dessecadas.

3.2 - ENSAIOS BIOLÓGICOS

Os camundongos albinos e machos utilizados foram fornecidos pelo Biotério da empresa VALEÉ NORDESTE S/A, em Uberlândia - MG, e pelo Biotério da USP - Ribeirão Preto S.P.

O plasma sanguíneo foi gentilmente doado pelo setor do Banco de Sangue, Fundação Hemominas UFU.

3.3 - FILTRAÇÃO DA PEÇONHA TOTAL EM GEL DE SEPHADEX G-75

3.3.1 - PREPARAÇÃO DA RESINA.

Inicialmente a resina foi colocada para inchar em água destilada, segundo indicações do fabricante. Posteriormente a resina foi suspensa em solução de NaOH 0,5 N, filtrada em funil de placa porosa em um sistema a vácuo e lavada com água destilada até a obtenção de uma solução de pH neutro; repetiu-se o mesmo processo com HCl 0,5 N, elevando-se o pH com exaustivas lavagens com água. Finalmente foi suspensa em tampão bicarbonato de amônio 0,05M pH 7.8.

A resina foi conservada acrescentando-se Azida Sódica, na proporção de 1 mL de Azida para cada 1000 mL de solução tampão de eluição das cromatografias.

3.0- METODOLOGIA

3.1 - OBTENÇÃO DO VENENO:

A peçonha bruta de *Bothrops moojeni* e *B. alternatus* foi gentilmente doada pela Professora Vera Lúcia Brites, do Departamento de Biociências da UFU. As peçonhas de *Crotalus durissus* sp. e *Bothrops jararaca* foram obtidas do Instituto Butantan. A peçonha de *Crotalus* consiste em um pool, coletado das seis subespécies de *Crotalus durissus* brasileiras, a saber: *C. d. cascavela*, *C. d. collilineatus*, *C. d. marajoensis*, *C. d. ruruima*, *C. d. terrificus* e *C. d. dryinus*.

As peçonhas de *B. moojeni* e *B. alternatus* estavam no estado líquido, congeladas a -20°C , enquanto que as de *B. jararaca* e *C. durissus* estavam dessecadas.

3.2 - ENSAIOS BIOLÓGICOS

Os camundongos albinos e machos utilizados foram fornecidos pelo Biotério da empresa VALEÉ NORDESTE S/A, em Uberlândia - MG, e pelo Biotério da USP - Ribeirão Preto S.P.

O plasma sanguíneo foi gentilmente doado pelo setor do Banco de Sangue, Fundação Hemominas UFU.

3.3 - FILTRAÇÃO DA PEÇONHA TOTAL EM GEL DE SEPHADEX G-75

3.3.1 - PREPARAÇÃO DA RESINA.

Inicialmente a resina foi colocada para inchar em água destilada, segundo indicações do fabricante. Posteriormente a resina foi suspensa em solução de NaOH 0,5 N, filtrada em funil de placa porosa em um sistema a vácuo e lavada com água destilada até a obtenção de uma solução de pH neutro; repetiu-se o mesmo processo com HCl 0,5 N, elevando-se o pH com exaustivas lavagens com água. Finalmente foi suspensa em tampão bicarbonato de amônio 0,05M pH 7.8.

A resina foi conservada acrescentando-se Azida Sódica, na proporção de 1 mL de Azida para cada 1000 mL de solução tampão de eluição das cromatografias.

3.3.2 - PREPARAÇÃO DAS PEÇONHAS

Para as peçonhas que estavam liofilizadas foram pesados 300 mg e dissolvidos em 1mL de tampão bicarbonato de amônio 0,05M pH 7,8 (NH_4HCO_3). E para as peçonhas que estavam líquidas foram centrifugados 1mL da peçonha acrescidos de 1mL do mesmo tampão. Após centrifugar a 1000 g por 10 min, o sobrenadante foi separado, e ao precipitado acrescentou-se mais 1 mL do tampão centrifugado-o novamente nas mesmas condições, até que se adquiriu uma solução límpida. Os sobrenadantes foram juntados e denominados Veneno Bruto (V.B.).

3.3.3 - FILTRAÇÃO DA PEÇONHA TOTAL:

Do sobrenadante amarelo límpido, com um volume final de aproximadamente 4 mL, foram retiradas e armazenadas três alíquotas de 10 μL cada, para dosagem de proteínas e realização de testes enzimáticos. O restante foi aplicado em coluna de Sephadex G-75, com 2,0 x 106 cm de dimensão, equilibrada previamente com o mesmo tampão em temperatura ambiente, exceto quando especificado. Foram coletadas frações de 5 mL, num fluxo de 20 mL/h em um coletor de frações da INCIBRÁS.

Para cada fração foi lida a absorbância em A_{280} nm em espectrofotômetro SPEKOL, e posteriormente traçado um gráfico.

3.4 - DOSAGEM QUANTITATIVA DE PROTEÍNA

As amostras contendo de 0,1 a 2,0 mg / 1 mL de proteína foram dosadas pelo método do Microbiureto, conforme descrito por ITZHAKI e GILL (1964). A reta padrão foi construída com soroalbumina bovina (BSA), considerando se o seu coeficiente de extinção molar $E^{1,0 \text{ mg/mL}} \text{ em } 278_{\text{nm}} = 0,666$ (DOTY e GEIDUSCHEC, 1953).

3.5 - ATIVIDADES ENZIMÁTICAS *IN VITRO* E *IN VIVO*

3.5.1- ATIVIDADE COAGULANTE

O plasma foi separado em alíquotas de 200 μL cada, e incubado em banho-maria a 37°C .

Cada amostra contendo 10 µg de proteína foi completada para 50µL de salina (NaCl a 0.9%), esta solução foi aplicada aos 200 µL do plasma incubado a 37°C.

A atividade coagulante foi determinada medindo-se o tempo de coagulação pelo imediato sinal de formação da rede de fibrina, após adicionar as amostras ou o controle contendo somente solução de CaCl₂ a 0,25M.

3.5.2 - ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA

Foi determinada por titulação potenciométrica segundo o método descrito por DE HAAS et al (1968). Como substrato foram utilizados 1,5 mL de uma emulsão contendo uma gema de ovo em 50 mL de água destilada, 1mL de desoxicolato de sódio 0.03M e 0,1 mL de CaCl₂ 0,6M e o volume final foi completado para 10 mL com água destilada.

A quantidade de amostra ensaiada foi de 20µL para a determinação da atividade ao longo do perfil cromatográfico e de 20µg de proteína para a atividade específica da peçonha total e suas frações.

Os ácidos graxos liberados enzimaticamente foram titulados com NaOH 0,1248N em pH 8,0 e temperatura ambiente. A atividade foi expressa em microequivalentes de base consumida por minuto, por mL, e a atividade específica pelo número de microequivalentes de base consumida por minuto, por mg de proteína.

3.5.3 - ATIVIDADE HEMORRÁGICA

Realizada segundo NIKAI (1984).

As amostras com cerca de 10µg da peçonha total e suas frações foram diluídas em 50µL de Salina, e inoculadas por via intradérmica em dorso de camundongos machos, anestesiados com éter etílico. Após três horas da aplicação, os animais foram sacrificados, as peles removidas e a atividade evidenciada pela presença de halo hemorrágico.

3.5.3.1 - Determinação da DMH

A dose mínima hemorrágica (DMH) foi determinada somente para as peçonhas brutas.

Foram testadas três doses de cada peçonha, preparadas como descrito no item anterior, contendo 5, 10 e 15 µg de proteínas respectivamente e utilizados três animais para cada dose. Os halos hemorrágicos foram

medidos em dois ângulos retos (90°), utilizando-se um paquímetro. Foi definida como DMH a menor concentração de proteínas necessária para produzir um halo hemorrágico com 10 mm^2 de diâmetro.

O cálculo da DMH foi realizado tirando-se inicialmente a média aritmética para cada dose aplicada e colocando-se este valor em gráfico de cm^2 de halo hemorrágico versus massa de proteínas. Por regressão linear foi encontrado o valor da DMH para cada peçonha.

3.6 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE)

3.6.1 - PAGE - SDS (LAEMMLI, 1970)

Foram realizadas eletroforeses em gel de poliacrilamida na presença de agentes desnaturantes (SDS) em concentração de 15% em acrilamida, para a estimativa dos pesos moleculares aparentes das proteínas contidas nas peçonhas.

Soluções estoque	Volume μl	
	Gel de separação	Gel de empilhamento
Tris - HCl 2M pH 8,8	1175	-
Tris - HCl 2M pH 6.8	-	125
Água desionizada	75	20
EDTA 200mM	75	20
Acrilamida:Bis-acrilamida (30:0.8)	3125	325
Água desionizada	1750	1500
TEMED	7,5	2,5
PSA (10% p/v)	37,5	17,5

O tampão dos eletrodos foi constituído por 0,1M de Tris, 7,8 mM de EDTA e 0,3% de SDS. Para o eletrodo superior foi adicionado ao tampão 0,77M de glicina.

As amostras contendo cerca de $30 \mu\text{g}$ de proteínas foram dissolvidas em água desionizada com 50% de STOP, 10% de β - Mercaptoetanol, e fervidas por dois minutos em banho maria a 100°C .

O tampão da amostra, o STOP, foi preparado com 0,187 M de Tris-HCl pH 6,8, 6% de SDS, 6mM de EDTA, azul de bromofenol e 27,6% de glicerol.

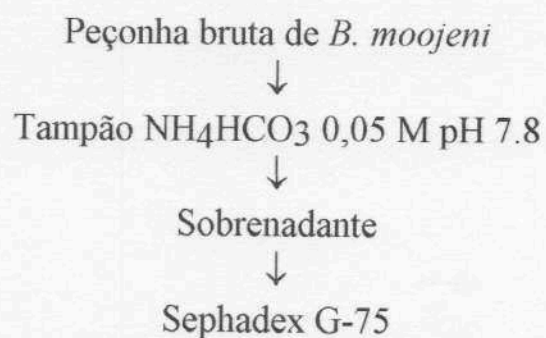
4.0 - RESULTADOS

4.1 - FRACIONAMENTO DAS PEÇONHAS

Os fracionamentos realizados em gel de Sephadex G - 75, como descrito no item 3.2, foram esquematizados nas figuras de 1 a 4.

O perfil cromatográfico feito pela leitura da absorbância em 280 nm e a atividade PLA2 determinada ao longo do perfil, são mostrados nas figuras de 5 a 8. As frações obtidas foram designadas de M1 a M5 para *B.moojeni*; J1 a J7 para *B. jararaca*; A1 a A5 para *B. alternatus* e D1 a D4 para *C. durissus*.

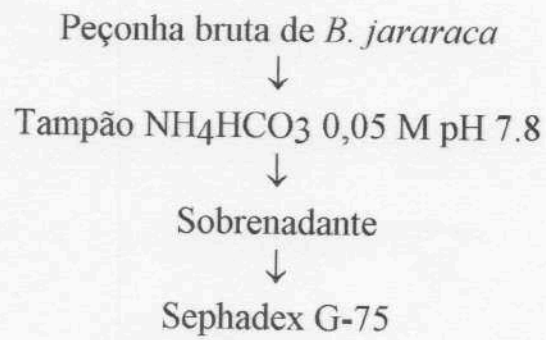
Conforme se pode observar pelas figuras 5 e 6 o perfil cromatográfico obtido nos fracionamentos de *B. moojeni* e *B. jararaca* são muito parecidos, enquanto que o perfil de *B. alternatus* se assemelha mais ao de *C. durissus sp* (figuras 7 e 8).



M1	M2	M3	M4	M5	M6
		1	1		
2	2	2			
3	3	3	3		

Figura 1 - Fluxograma da purificação parcial de proteínas biologicamente ativas da peçonha de *B. moojeni*

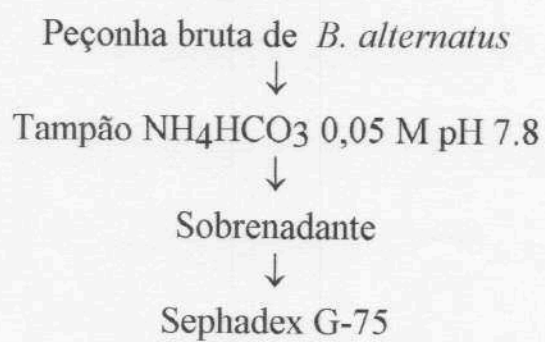
Legenda: 1- Atividade Fosfolipásica
 2- Atividade coagulante
 3- Atividade Hemorrágica



J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7
	1	1	1			
	2					
	3	3	3			

Figura 2 - Fluxograma da purificação parcial de proteínas biologicamente ativas da peçonha de *B. jararaca*

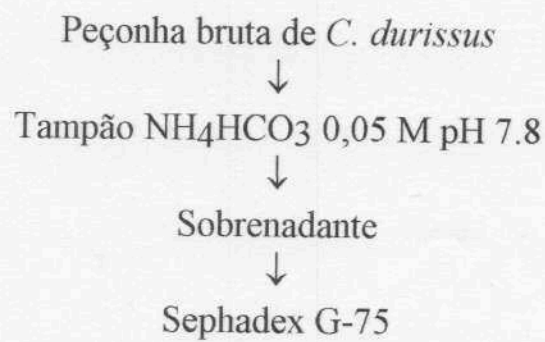
Legenda: 1- Atividade Fosfolipásica
 2- Atividade coagulante
 3- Atividade Hemorrágica



A1	A2	A3	A4	A5
		1		
2	2			
3	3	3		

Figura 3 - Fluxograma da purificação parcial das proteínas biologicamente ativas da peçonha de *B. alternatus*.

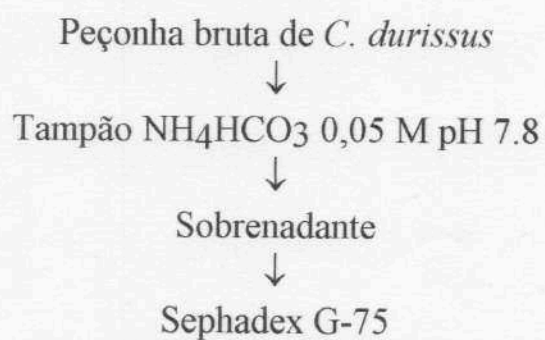
Legenda: 1- Atividade Fosfolipásica
 2- Atividade coagulante
 3- Atividade Hemorrágica



D1	D2	D3	D4	D5
	1			
2	2			
	3			

Figura 4 - Fluxograma da purificação parcial das proteínas biologicamente ativas da peçonha de *C. durissus*.

Legenda: 1- Atividade Fosfolipásica
 2- Atividade coagulante
 3- Atividade Hemorrágica



D1	D2	D3	D4	D5
	1			
2	2			
	3			

Figura 4 - Fluxograma da purificação parcial das proteínas biologicamente ativas da peçonha de *C. durissus*.

Legenda: 1- Atividade Fosfolipásica
2- Atividade coagulante
3- Atividade Hemorrágica

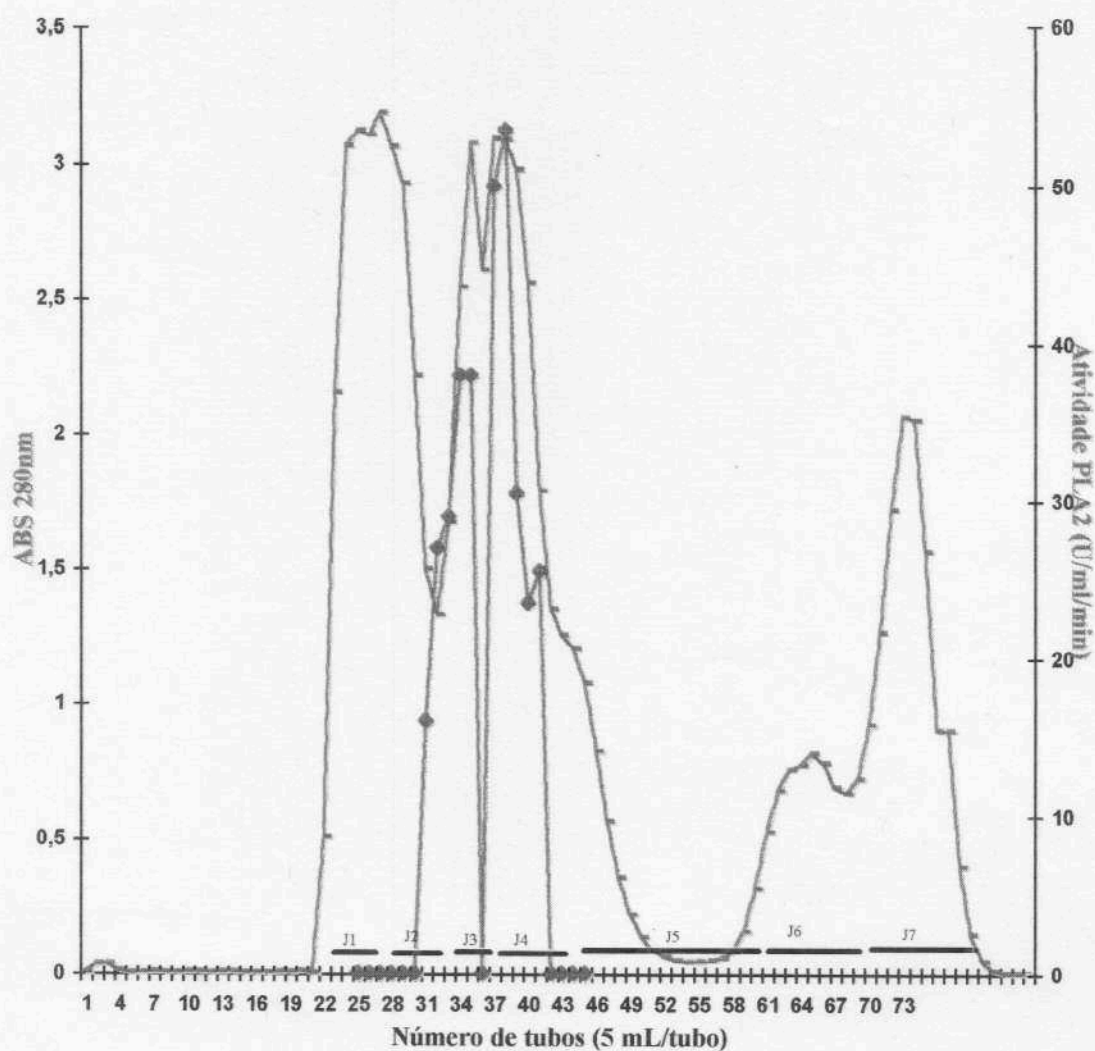


Figura 6 - Fracionamento de 195,64 mg de proteína, da peçonha de *B. jararaca* em Sephadex G-75, em uma coluna de 106 x 2,0 cm, tampão Bicarbonato de Amônio 0,05M pH 7,8. Fluxo de 20 mL/h. a 4° C.

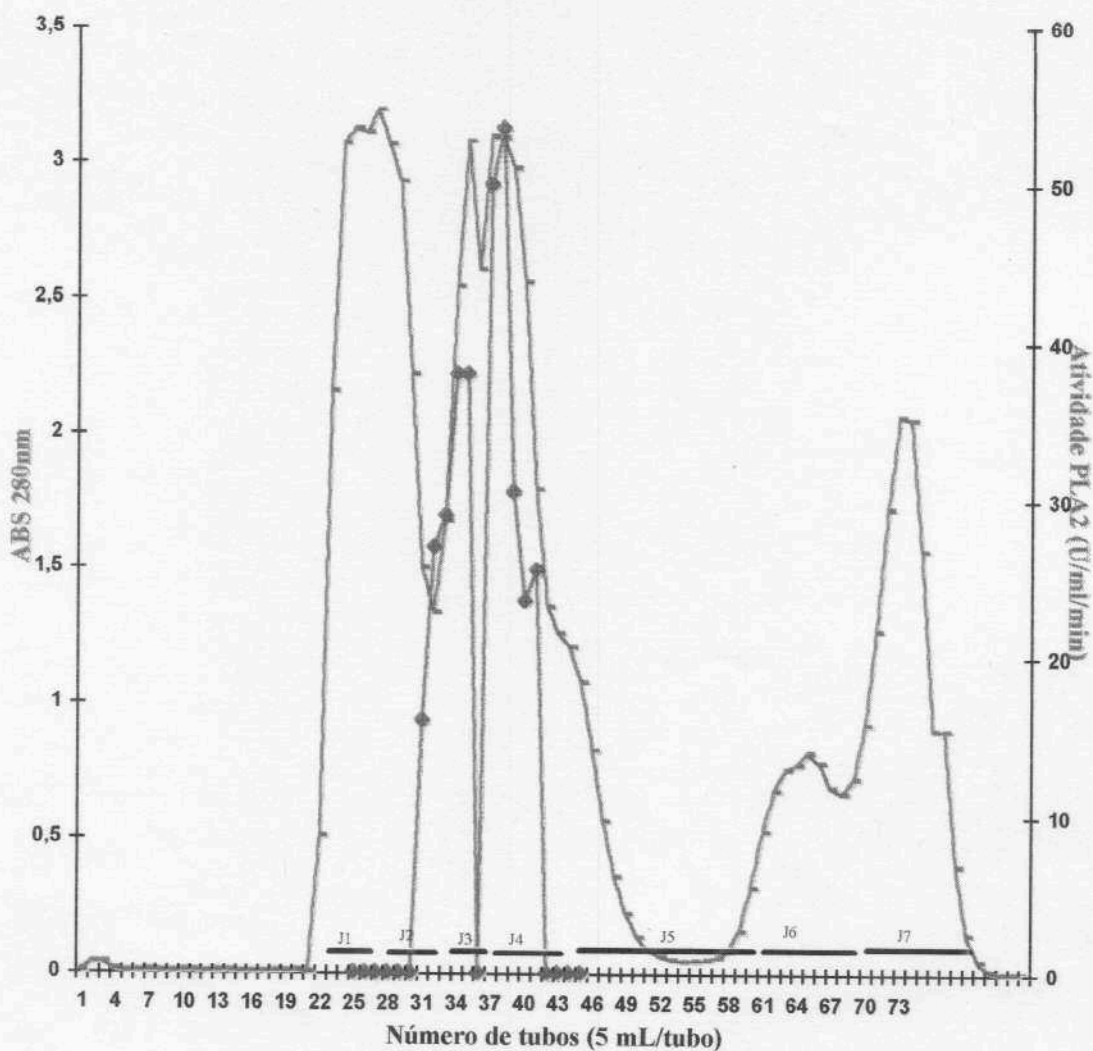


Figura 6 - Fracionamento de 195,64 mg de proteína, da peçonha de *B. jararaca* em Sephadex G-75, em uma coluna de 106 x 2,0 cm, tampão Bicarbonato de Amônio 0,05M pH 7,8. Fluxo de 20 mL/h. a 4° C.

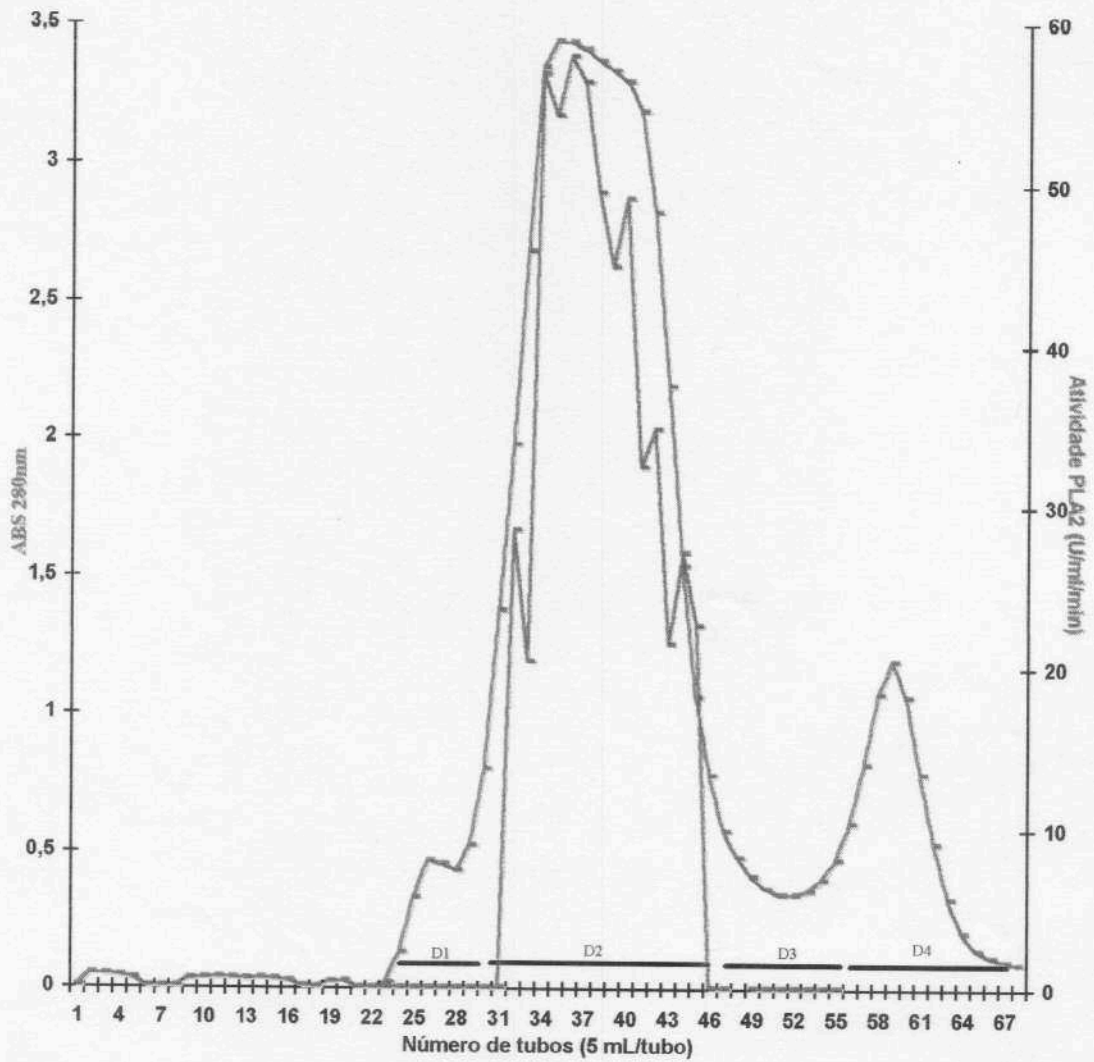


Figura 8 - Fracionamento de 267,55 mg de proteína, da peçonha de *C. durissus* em Sephadex g-75, em uma coluna de 106 x 2,0 cm, tampão Bicarbonato de Amônio 0,05M pH 7,8. Fluxo de 20 mL/h. a 4° C..

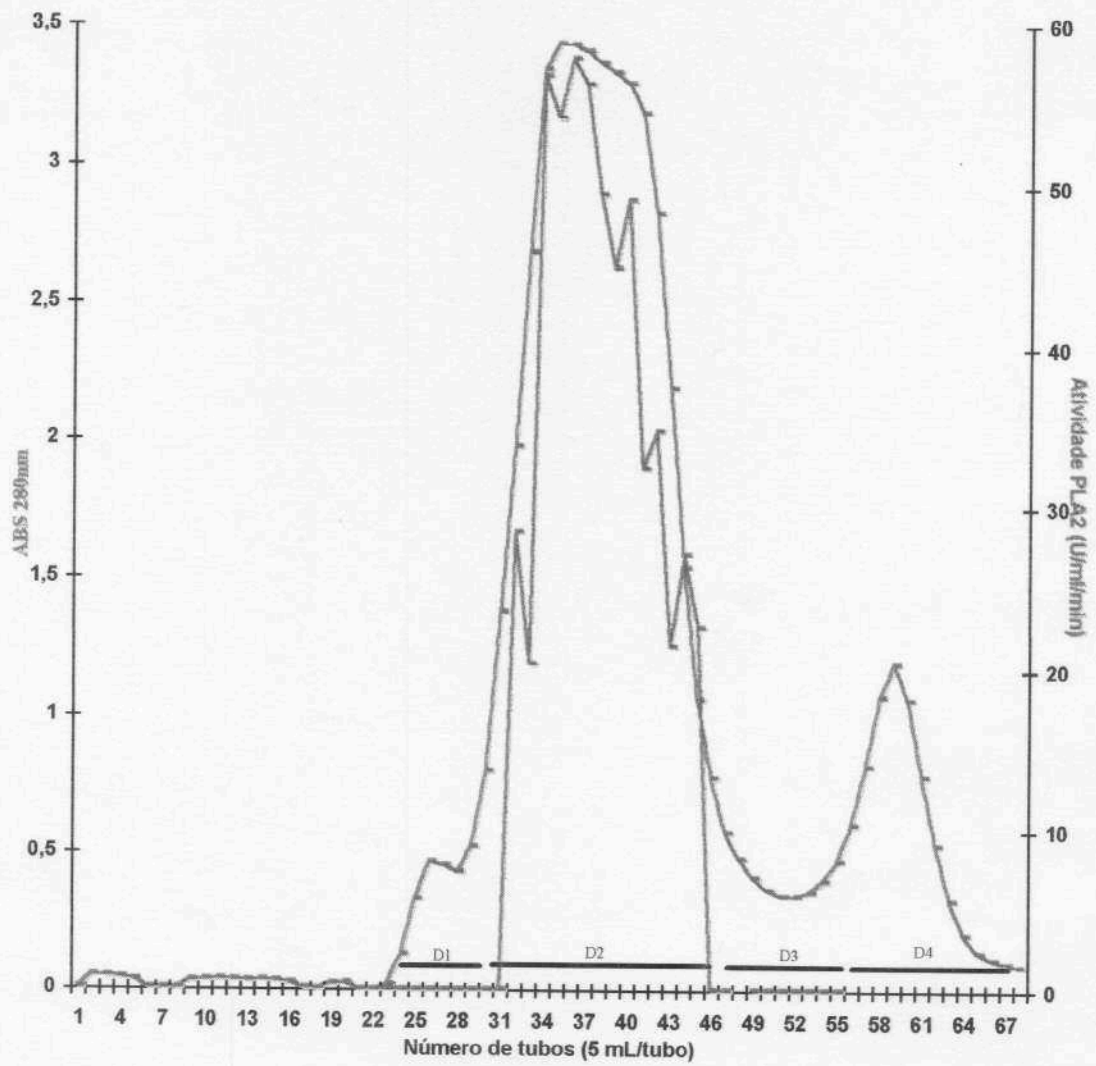


Figura 8 - Fracionamento de 267,55 mg de proteína, da peçonha de *C. durissus* em Sephadex g-75, em uma coluna de 106 x 2,0 cm, tampão Bicarbonato de Amônio 0,05M pH 7,8. Fluxo de 20 mL/h. a 4° C..

Tabela 2 - Atividade enzimática específica e rendimento das frações da peçonha de *B. jararaca* obtidas por filtração em Sephadex G-75

Frações	Proteína		Atividade Fosfolipásica					
	A280 % recup.	mg	% recup.	U totais	recup. A.E. U/mg	fator purf		
Peq. bruta	355,19	100,0	195,64	100,0	3.463	100	17,3	1
J1	33,9	9,5	66,02	37,65	-	-	-	-
J2	11,52	3,2	11,52	6,57	203	6,8	17,68	1,02
J3	39,56	11,1	17,60	10,04	715,4	20,6	40,65	2,3
J4	102,90	29,0	48,82	27,84	1367	39,5	28	1,6
J5	2,40	0,7	5,85	3,34	-	-	-	-
J6	18,23	5,1	22,06	12,58	-	-	-	-
J7	17,21	4,8	3,50	1,98	-	-	-	-
Total	255,00	63,4	175,37	89,64	2284,4	66,9	-	-

*Quantificação pelo método do microbiureto

**Média de dois ensaios

Tabela 4 - Atividade enzimática específica e rendimento das frações da peconha de *C. durissus* sp obtidas por filtração em Sephadex G-75

Frações	Proteína				Atividade Fosfolipásica			
	A280	% recup.	mg	% recup.	U totais	recup.	A.E. U/mg	fator purif.
Peç.total	365	100	267,55	100	9257,2	100	34,6	1
D1	3,31	0,9	6,2	2,32	-	-	-	-
D2	204,7	60	138,25	51,67	6594,5	71	47,7	1,4
D3	27,47	7,5	16,25	6,17	-	-	-	-
D4	27,22	7,4	15,95	5,96	-	-	-	-
Total	262,7	75,8	224,38	83,89	6594,5	71	-	-

*Quantificação pelo método do microbiureto

**Média de dois ensaios

Tabela 3 - Atividade enzimática específica e rendimento das frações da peçonha de *B. alternans* obtidas por filtração em Sephadex G-75

Frações	Proteína				Atividade Fosfolipásica			
	A280	% recup.	mg	% recup.	U totais	recup.	A.E. U/mg	fator purif.
Peq. total	308,25	100	193,65	100	6545,4	100	33,8	100
A1	89,82	29,14	25,8	13,32	-	-	-	-
A2	10,68	3,46	4,5	2,3	-	-	-	-
A3	123,23	40,97	64,1	33,10	3397,3	51,9	53	1,56
A4	15,53	5,38	7,7	4,0	-	-	-	-
A5	42,14	13,67	33,4	17,28	-	-	-	-
Total	281,4	91,28	193,65	70,0	3397,3	51,9	-	-

*Quantificação pelo método do microbiureto

**Média de dois ensaios

4.3 - ATIVIDADES BIOLÓGICAS

As atividades coagulante e hemorrágica foram ensaiadas em todas as peçonhas e nas frações.

Os resultados obtidos para a atividade hemorrágica provocada tanto pela peçonha total, quanto pelas frações são apresentados na figura 10. Pode-se verificar que as frações correspondentes ao primeiro pico do fracionamento das peçonhas botrópicas são as principais responsáveis por este efeito.

Em *B. moojeni* e *B. jararaca* esta atividade foi encontrada nas quatro primeiras frações, em *B. alternatus* encontrou-se nas três primeiras e em *C. durissus* foi encontrada apenas na segunda fração.

A DMH calculada para as peçonhas botrópicas é mostrada na figura 11 e foi obtida como descrito no item 3.5.3.1. Para *C. durissus* não foi determinada, pois esta possui uma atividade hemorrágica muito baixa (ver figura 10) tendo entretanto um alto efeito letal. Com isso as doses necessárias para se calcular a DMH causavam a morte dos camundongos, antes do tempo necessário para a verificação desta atividade.

A atividade coagulante sobre o plasma foi realizada para as peçonhas totais e suas frações, conforme descrito no item 3.5.1 e é mostrada na tabela 5. Pode se verificar que a peçonha de *B. jararaca* é a mais coagulante, enquanto que a de *C. durissus* é a menos coagulante.

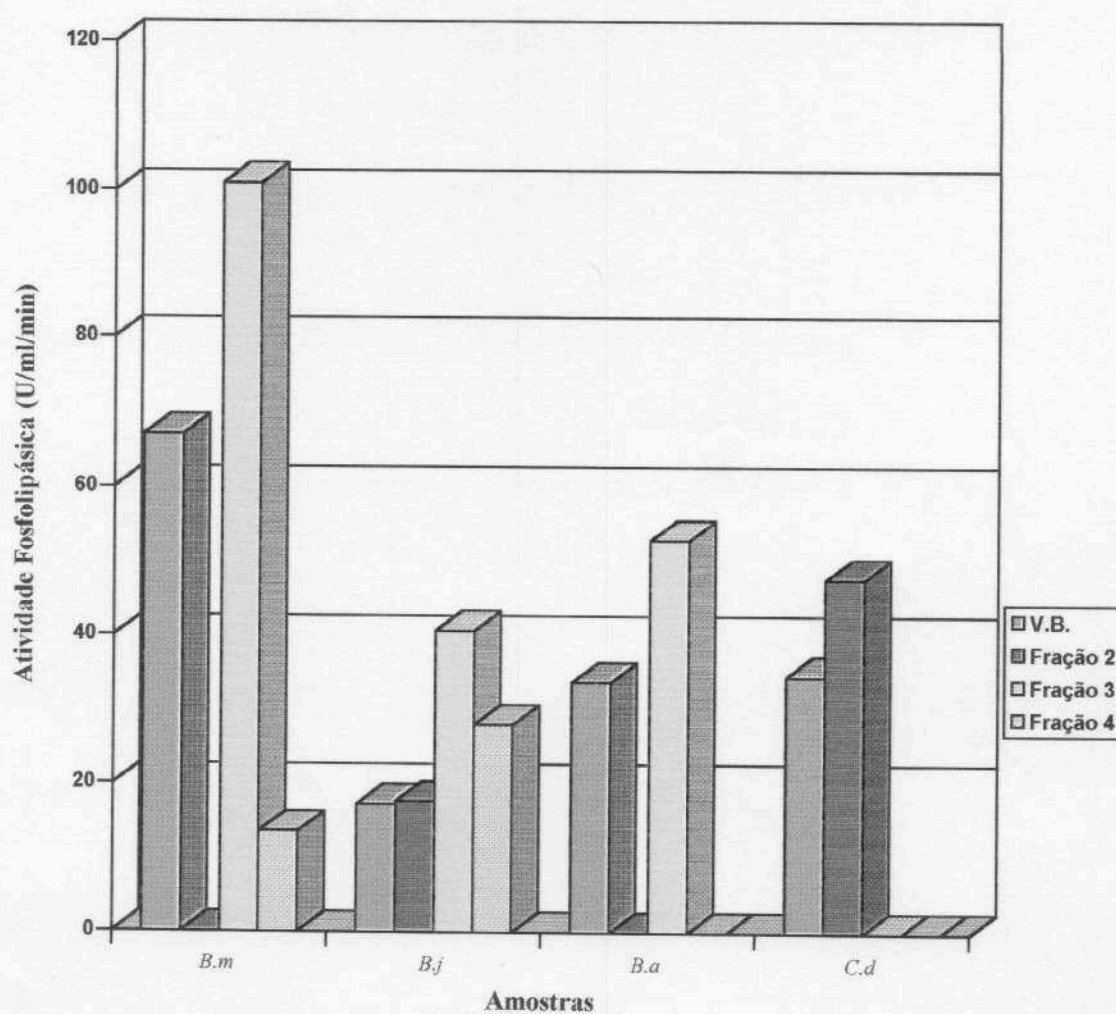


Figura 9- Atividade PLA2 sobre a gema do ovo realizada com 20 μg de proteína das peçonhas totais e suas frações. As amostras foram aplicadas em substrato pH 8 e tituladas com NaOH 0,1242N por três minutos em temperatura ambiente. A atividade específica foi expressa em U/mg/min

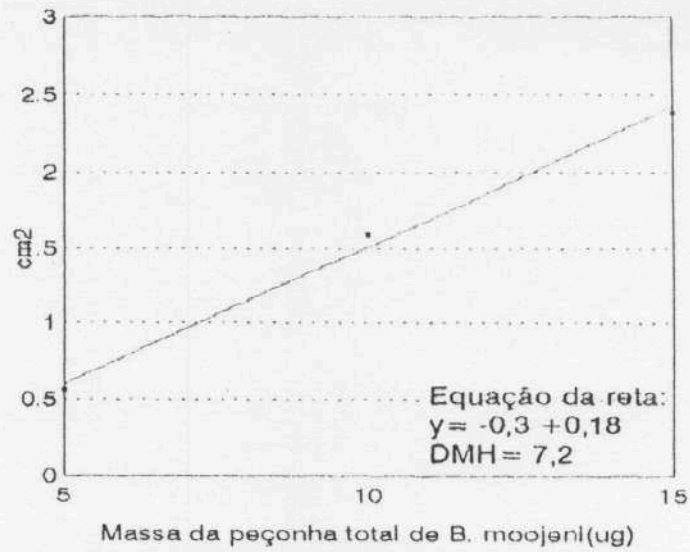
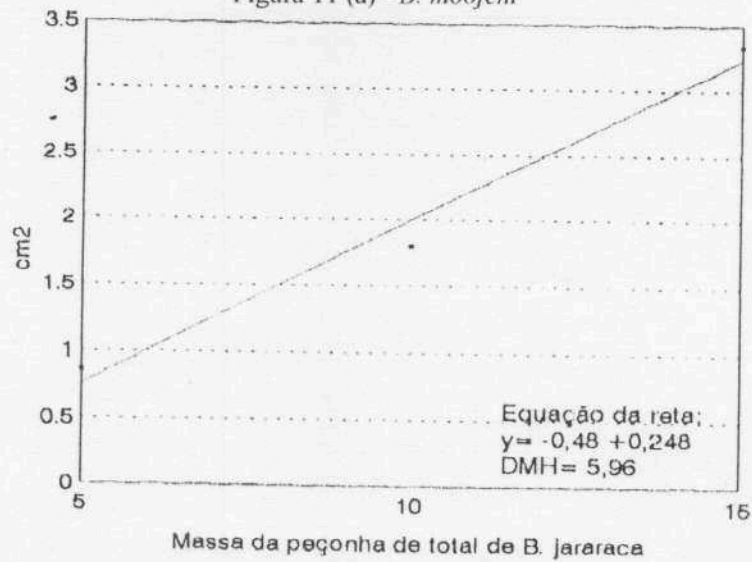
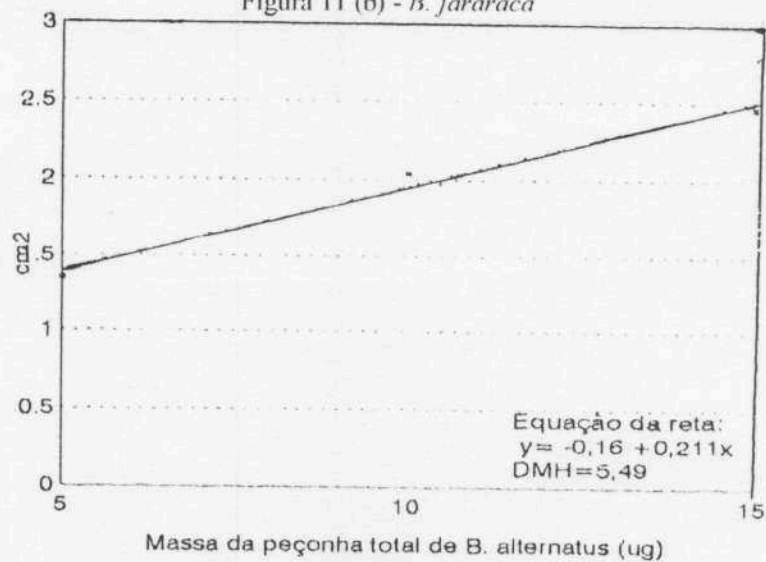
Figura 11 (a) - *B. moojeni*Figura 11 (b) - *B. jararaca*Figura 11 (c) - *B. alternatus*

Figura 11 (a - c) - Determinação da Dose Mínima Hemorrágica das peçonhas totais de *B. moojeni* (a), *B. jararaca* (b) e *B. alternatus* (c). O ensaio foi realizado utilizando-se de 5 a 15 μg de proteína dissolvidas em 0,05 ml de solução salina fisiológica e injetadas por via intradérmica no dorso de camundongos machos. Para cada dose foram utilizados em média três animais

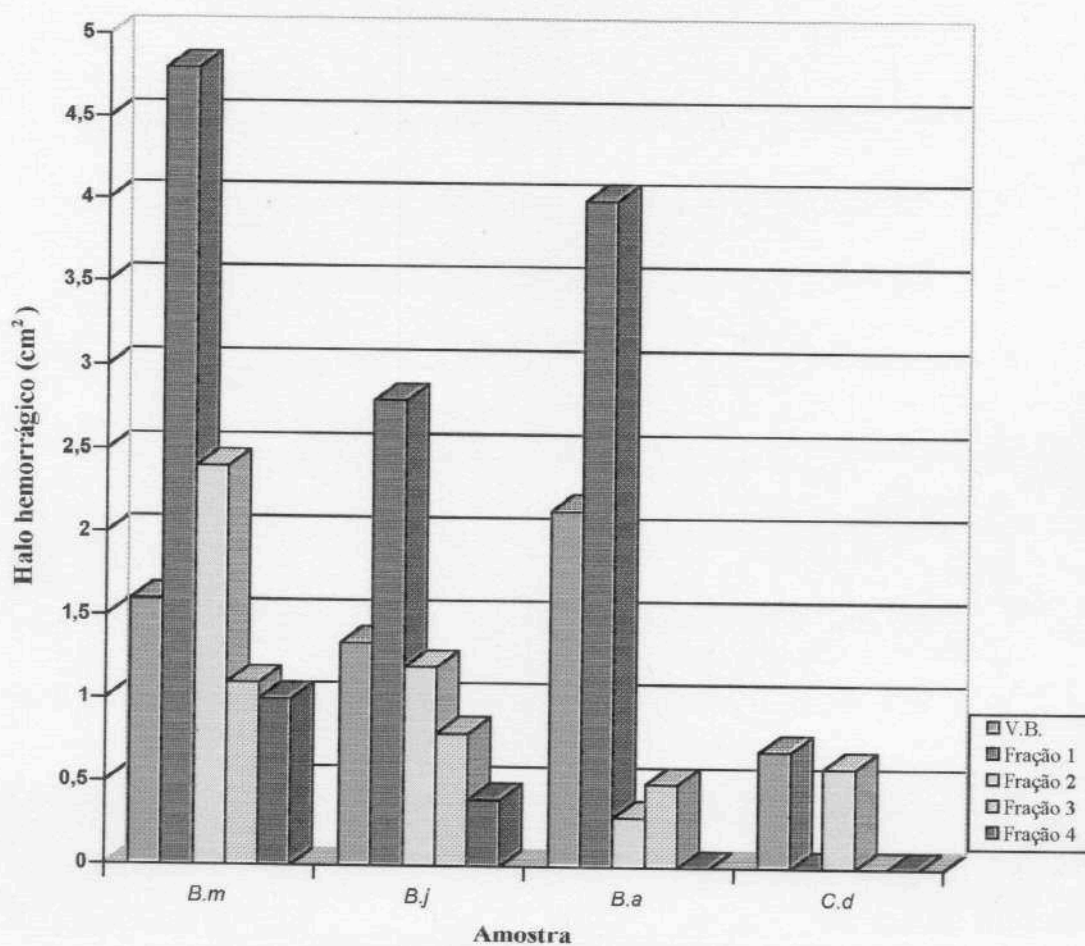


Figura 10 - Atividade hemorrágica realizada com 10 μg de proteína tanto para peçonha total quanto para as suas frações obtidas da filtração em Sephadex G - 75, a medida do halo foi expressa em cm^2 . As amostras foram dissolvidas em 0,05 ml de solução salina e injetadas intradérmico no dorso de camundongo. O halo foi verificado em comparação com um controle

4.4 - ELETROFORESES (PAGE)

Para acompanhar o fracionamento das proteínas contidas nas diferentes peçonhas, foram realizadas eletroforeses (PAGE) em condições nativas e desnaturantes (SDS), como mostrado nas figuras de 12 a 15. Realizado conforme descrito no item 3.6.

As frações obtidas nos fracionamentos ainda estão bastante impuras, dado o elevado número de bandas que podemos visualizar para cada fração nas PAGEs não desnaturantes (figuras 12 a 15).

A PAGE - ácida para peçonha e frações de *B. moojeni* mostra que os principais componentes da peçonha são proteínas ácidas (mobilidade eletroforética intermediária ou elevada), e que estes componentes estão presentes na fração M2 que contém as proteínas coagulantes e hemorrágicas (figura 1). PAGE - SDS mostra que a fração M2 é formada principalmente por proteínas com P.M. entre 24000 e 36000 (figura 12).

A PAGE - ácida para peçonha e frações de *B. jararaca* mostra que as proteínas estão distribuídas ao longo do perfil eletroforético, sendo que as frações J5 a J7 não apresentaram bandas eletroforéticas. PAGE - SDS mostra que as frações J1 e J2, que contém as proteínas coagulantes e hemorrágicas, são compostas principalmente, por proteínas com P.M. entre 66000 e 45000 (figura 13).

Para a peçonha bruta de *B. alternatus* e suas frações a PAGE - ácida mostra que as principais proteínas da peçonha bruta estão presentes na fração A3 que contém as proteínas PLA2 e hemorrágicas (figura 3). A PAGE - SDS mostra que esta fração é composta principalmente por proteínas com P.M. entre 29000 e 14200 (figura 14).

A peçonha bruta e as frações de *C. durissus* sp. apresentam uma baixa mobilidade em PAGE - ácida, demonstrando que os seus principais componentes devem ser proteínas básicas. A PAGE-SDS mostra que a banda principal desta peçonha tem PM aparente de 18000 e que estas proteínas estão contidas principalmente na fração D2 (figura 15).

Tabela 5: Atividade coagulante realizada com cerca de 10 µg de proteína das peçonhas totais e suas frações, obtidas da Filtração em Sephadex G - 75. O plasma foi incubado a 37°C, as amostras foram aplicadas e o tempo cronometrado até a formação da rede de fibrina, em comparação com um controle contendo Ca Cl₂ 0,25M.

B. moojeni		B. jararaca		B. alternatus		C. durissus	
Frações	temp. de coag. *	Frações	temp. de coag. *	Frações	temp. de coag. *	Frações	temp. de coag. *
V.B.	27	V.B.	23,8	V.B.	40	V.B.	43
M1	20	J1	17,5	A1	34	D1	37,1
M2	16	J2	121,5	A2	186	D2	14,7
M3	194,6	J3	**	A3	**	D3	**
M4	**	J4	**	A4	**	D4	**
M5	**	J5	**	A5	**		
M6	**	J6	**				
		J7	**				
Controle 540		Controle 540		Controle 540		Controle 540	

* O tempo de coagulação foi marcado em segundos

** Estas frações não apresentaram atividade coagulante

Figura 12-(a)

Figura 12-(b)

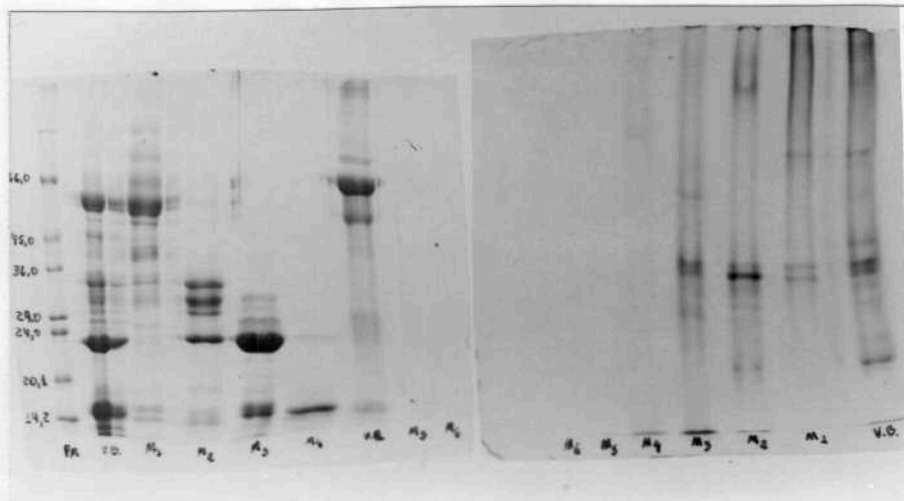


Figura 12- Eletroforese da peçonha de *B. moojeni* e suas frações em gel de poliácridamida a 15%,(a) com agentes desnaturantes (SDS); e (b) sem agentes desnaturantes em pH 4,5. Com uma corrente constante e voltagem de 20mA por duas horas e meia.

Figura 13-(a)

Figura 13-(b)

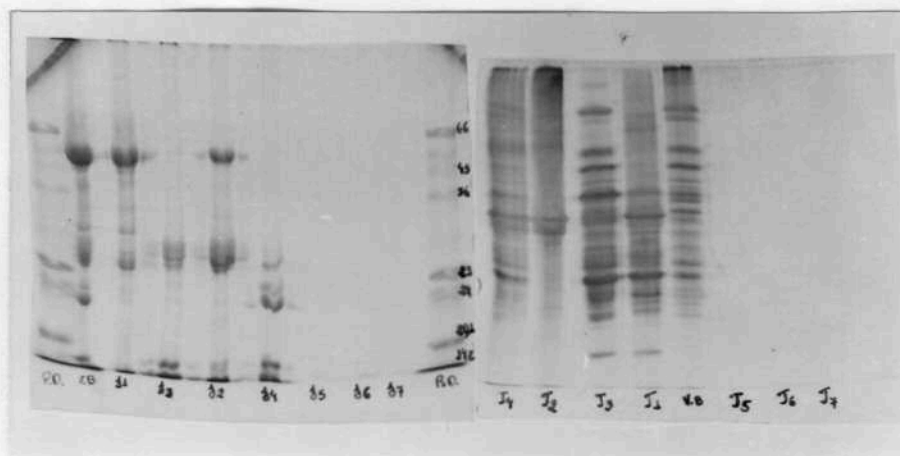


Figura 13- Eletroforese da peçonha de *B. jararaca* e suas frações em gel de poliácridamida a 15%,(a) com agentes desnaturantes (SDS); e (b) sem agentes desnaturantes em pH 4,5. Com uma corrente constante e voltagem de 20mA por duas horas e meia.

Figura 14-(a)

Figura 14-(b)

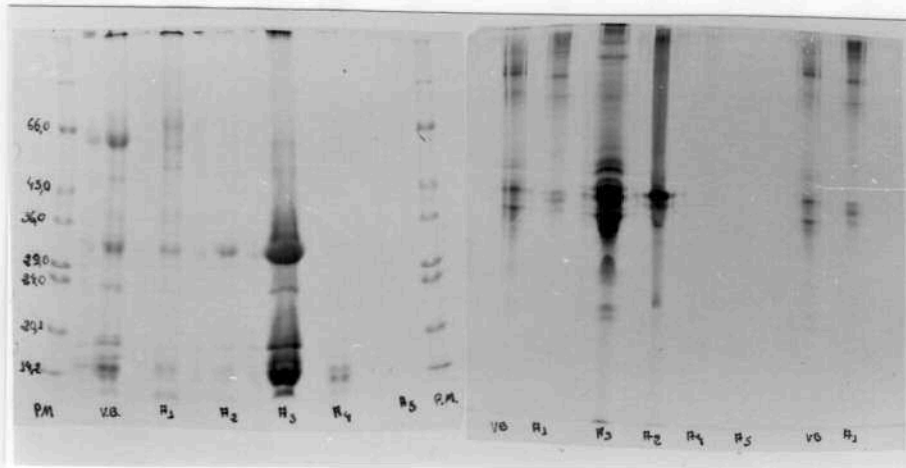


Figura 14- Eletroforese da peçonha de *B. alternatus* e suas frações em gel de poliacrilamida a 15%,(a) com agentes desnaturantes (SDS); e (b) sem agentes desnaturantes em pH 4,5. Com uma corrente constante e voltagem de 20mA por duas horas e meia.

Figura 15-(a)

Figura 15-(b)

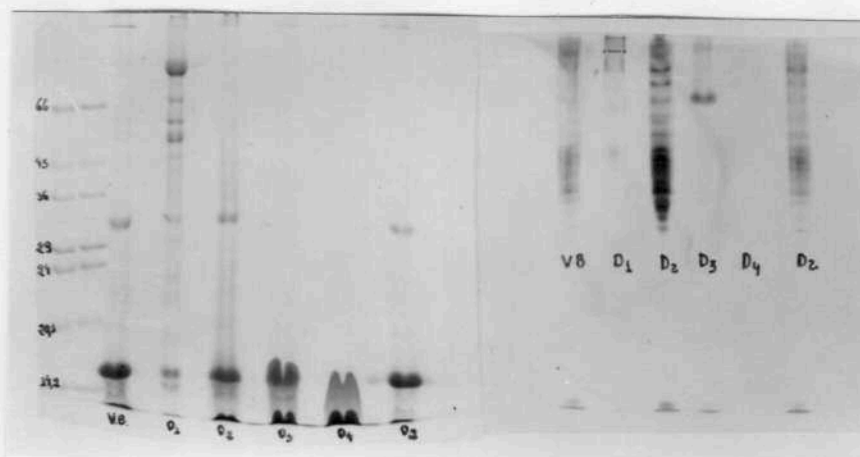


Figura 15- Eletroforese da peçonha de *C. durissus sp.* e suas frações em gel de poliacrilamida a 15%,(a) com agentes desnaturantes (SDS); e (b) sem agentes desnaturantes em pH 4,5. Com uma corrente constante e voltagem de 20mA por duas horas e meia.

O fracionamento das peçonhas, nos levou à separação parcial das proteínas biologicamente ativas presentes nas mesmas. As principais atividades biológicas detectadas nas peçonhas de serpentes da subfamília Crotalinae foram a coagulante, hemorrágica e fosfolipásica. Deve ser ressaltado que a atividade PLA2 é a principal responsável pelo efeito miotóxico local apresentado pelas peçonhas botrópicas, e pelo efeito neurotóxico e letal das peçonhas de *Crotalus durissus* sp.

Pela leitura da absorbância em A_{280} nm no decorrer dos fracionamentos, obtivemos seis frações para *B. moojeni*; sete para *B. jararaca*; cinco para *B. alternatus* e 4 para *C. durissus* sp. (Figuras 1 a 4). A atividade PLA2 determinada ao longo do perfil cromatográfico foi encontrada em todos os fracionamentos no segundo pico de A_{280} (figuras 5 a 8).

A semelhança encontrada no perfil cromatográfico para as peçonhas de *B. moojeni* e *B. jararaca* também foi observada para os fracionamentos de *B. neuwiedi* e *B. jararacussú* realizados nas mesmas condições em nosso laboratório (resultados não mostrados neste trabalho)

Conti (1986) obteve cinco picos ao filtrar a peçonha de *C. durissus* em gel de Sephadex G-75 equilibrada e eluída com tampão Formato de Amônio 0,05M, pH 3,5. O pico de maior absorbância correspondeu à fração da crotóxina, principal proteína contida nesta peçonha e constituída por duas subunidades; uma ácida denominada crotapotina e outra básica que é uma PLA2. Nossos resultados indicam que o complexo crotoxínico deve estar presente na fração D2 da filtração realizada, por ser a única que apresentou atividade PLA2 e também por ser a principal fração desta cromatografia.

Nas peçonhas de *B. alternatus* e *C. durissus* sp. esta enzima estava contida somente nas frações de maior absorbância (A3 e D2 respectivamente) e que concentrou a maior porcentagem da peçonha total (tabelas 3 e 4). É sabido que as PLA2 apresentam PM entre 12.000 e 18.000 e se observarmos a PAGE - SDS para as frações D2 e A3 (figura 14 e 15), podemos verificar a presença de uma banda principal nesta faixa de PM.

Na peçonha de *B. moojeni* esta atividade foi encontrada principalmente na fração M3, enquanto que para *B. jararaca* ficou distribuída nas frações J2, J3 e J4 (figura 9). PAGE - SDS para estas frações também mostram bandas na faixa de PM ao redor de 15.000. Por outro lado, todas as peçonhas estudadas apresentaram uma atividade PLA2 específica (tabelas 1 a 4) menor que a da abelha *Apis mellifera* que é de 175 unidades. (dados colhidos em nosso laboratório), demonstrando que as fosfolipases da peçonha de abelha são mais ativas.

5.0 - DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Entre os animais peçonhentos que acometem a população humana as serpentes são as mais frequentes, levando a quadros clínicos sérios e podendo chegar ao óbito se não tratados. O efeito da peçonha pode levar também a necrose total do membro afetado (Chipaux, et al 1991).

As serpentes do gênero *Bothrops* são bastante comuns na América do Sul (Chipaux, et al 1991), apresentando maior frequência nos acidentes ocorridos no Brasil, onde as vítimas são atingidas principalmente nos membros inferiores (Barraviera, 1994). O envenenamento provocado por estas serpentes pode causar hemorragia e necrose no local da picada, podendo ser necessária a amputação do membro afetado. Quando não tratado nas primeiras 6 horas estes efeitos locais geralmente não são revertidos devido ao intervalo de tempo decorrido entre o acidente e o tratamento.

As serpentes do gênero *Crotalus* são encontradas de um modo geral, nas regiões secas e pedregosas do Brasil. Não são encontradas em florestas ou matas úmidas (Barraviera, 1994). Os efeitos locais provocados pela picada são pouco evidentes, apresentando uma forte ação neurotóxica e miotóxica sistêmica, responsáveis pela maior frequência de óbitos nos acidentes Crotálicos.

Este trabalho teve como objetivo: 1 - O fracionamento parcial das peçonhas de serpentes da subfamília Crotalinae, gêneros *Bothrops* (*B. moojeni*, *B. jararaca*, *B. alternatus*) e *Crotalus* (*C. durissus sp.*). 2 - A determinação e comparação de algumas das principais atividades biológicas responsáveis pelo envenenamento.

O fracionamento em gel de Sephadex G-75 foi realizado com tampão NH_4HCO_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.

O gel de Sephadex G-75 foi escolhido baseando-se na técnica de cromatografia de filtração ou exclusão molecular. Esta 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 PM 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 fazendo um caminho mais longo, eluindo por último (Stryer, 1992).

da mesma ordem de grandeza para todas elas entre 5 e 7 μg para um halo de 1 cm^2 .

De maneira geral foi observado que os componentes responsáveis pelas atividades testadas na peçonha de *C. durissus sp.* são menos ativos do que os das peçonhas Botrópicas, entretanto esta peçonha apresenta alta letalidade. Este fato é devido ao efeito neurotóxico da peçonha de *C. durissus* que é responsável pela alta letalidade desta peçonha, e que não está presente nas peçonhas botrópicas (Chippaux, 1991).

A liofilização foi o método utilizado para concentrar as amostras, porque consiste num processo de secagem a vácuo em baixas temperaturas, condições que preservariam melhor a configuração molecular das proteínas.

A atividade coagulante foi encontrada em todas as peçonhas, sendo que as de *B. jararaca* e *B. moojeni*, são mais coagulantes enquanto *B. alternatus* e *C. durissus* são menos coagulantes. Encontra-se descrito na literatura que as peçonhas de *B. moojeni*, *B. jararaca* e *B. atrox* exibem alta atividade coagulante (Leite, 1991), o que está em concordância com nossos resultados. Por outro lado as peçonhas de *B. jararacussu* e *B. neuwiedi pauloensis* apresentam menor atividade (resultados obtidos em nosso laboratório).

Entre as frações obtidas nos quatro fracionamentos esta atividade foi sempre encontrada nas três primeiras frações. A fração dois de *C. durissus* e *B. moojeni* foram as que apresentaram maior atividade coagulante, para as outras peçonhas a atividade foi maior na primeira fração (tabela 5).

A ação coagulante pode ou não estar relacionada com a atividade hemorrágica. É descrito na literatura (Ownby et al, 1978) que os fatores hemorrágicos isolados da peçonha de *C. atrox* provocam danos capilares e agregação plaquetária, e Oshaka (1979) sugeriu um efeito inibitório sobre a agregação e formação de trombo para as hemorraginas de *T. flavoridis*.

Isto nos mostra que diferentes peçonhas podem produzir um mesmo efeito hemorrágico, mas por mecanismos de ação diferentes.

A atividade hemorrágica foi maior para as peçonhas de *B. alternatus* e menor para a de *C. durissus*. No entanto a fração 1 de *B. moojeni* foi a que apresentou maior atividade hemorrágica (figura 10).

Esta atividade ficou bem evidenciada nas três primeiras frações de Bothrops, sendo que em *C. durissus* foi encontrada apenas na segunda fração. É descrito na literatura que as principais proteínas hemorrágicas já isoladas de serpentes da subfamília Crotalinae são proteínas ácidas que apresentam PM entre 24.000 e 60.000.

Conforme podemos verificar pela figura 10 a fração 1 para as peçonhas botrópicas e a fração 2 para a de *C. durissus* contém as principais proteínas hemorrágicas de cada peçonha e na análise por PAGE- SDS podemos observar que as bandas principais apresentam PM entre 30.000 e 66.000

O método para a medida do halo hemorrágico ainda não é muito satisfatório quanto ao aspecto quantitativo. Está em andamento em nosso laboratório a padronização de um novo método, que mede por absorbância a quantidade de hemoglobina liberada no músculo.

A peçonha de *B. alternatus*, foi a que apresentou menor DMH, seguida pela de *B. moojeni* e *B. jararaca* (figura 11). No entanto, todas essas peçonhas mostraram elevada atividade hemorrágica, uma vez que a DMH calculada foi

- DAVIS, B. J. (1964). **Disc eletrophoresis. II Method and properties of phospholipase a from porcine pancreas.** *Biochem. Biophys. Acta.* 159 - 103
- DE HAAS, G. H.; POSTEMA, N. M. (1968). **Purification and properties of phospholipase a from porcine pancreas.** *Biochem. Biophys. Acta.* 159-103.
- DOTY, P. ; GEIDUSCHEC, E. P. (1953).In: **The proteins** (Neurath, H. and Bailey, K. Eds), I-A:434.
- FAURE, G. , BON.C, (1978). **Several isoforms of crotoxin are present in individual venoms from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*.** *Toxicon* 25: P.229.
- FERREIRA, M. L.; MOURA DA SILVA, A. M.; FRANÇA, F. O. S.;CARDOSO, J. L. and MOTA, (1992). **Toxin activities of venoms from nine *Bothrops* species and their correlation with lethality and necrosis.** *Toxicon*, 30(12): 1603-1608.
- FICHMAN, M. and HENRIQUES, O. B. (1962). **Further studies on the purification of the blood-clotting enzyme from the venom of *Bothrops jararaca*.** *Arch. Biochem. Biophys.* , 98: 95-99.
- FAURE, G. , BON.C, (1988). **Crotoxin, a phospholipase A2 neurotoxin from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*; purificação of several isoforms and comparison of their molecular structure and of their biological activities.** *Biochemistry* 26-27(2): P.730-8.

6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ARAÚJO, A.L. (1990). **Isolamento e caracterização da fosfolipase presente no veneno *Bothrops lanceolatus***. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Campinas, São Paulo.
- ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P. and MANDELBAUM, F. R. (1986). **Comparation of imunological, biochemical and biophysical properties of three hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops jararaca* (jararaca)**. *Toxicon*, 24:943.
- BARRAVIERA, B. (1994). **Venenos animais: uma visão intregada**. Editora de Publicações Científicas Ltda.
- CHANG, C.C. and TSENG, K. H. (1978). **Effect of crotamine, a toxin of South American rattlesnake venom on the sodium channel of murine skeletal muscle**. *Br. J. Pharmacol*, 63:551 - 559
- CONTI, M. A. B. (1986). **Estrutura primária da cadeia da Crotopotina**. Tese de doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidaed de São Paulo.
- COLINS, C. H., BRAGA, G. L. and BONATO, P. S., coorde.(1990). **Introdução a métodos cromatográficos**. 4^a ed. Unicamp, Campins, 7 - 115.
- CHIPAUX, J. P.; WILLIANS, V. and WHITE J. (1991). **Rewiew article: Snake venom variability: Methods of study results and interpretation**. *Toxicon* 29(11): P. 1270-1303.

- ITZHAKI, R. F. and GILL, D. M. (1964) **A microbiuret method for stimulating proteins**. *Anal. Biochem* 9: 401.
- IWANAGA, S. and SUSUKI, T. (1979). **Enzymes in snake venoms**. In: **Handbook of Experimental Pharmacology**. Snakes Venoms vol 52: 61-144 (LEE, C. Y., ED.) Berlin Springer.
- KINI, R. M. and EVAS, H. J. (1989). **A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂**. *Toxicon*, 27(6): 613-635.
- KLEMMER, K. (1963). Liste der rezenten Giftschlangen. Elapidae, Hydrophidae, Viperidae and Crotalidae. In: **Die Giftschlangender Erde. Wirking and Antigenitat der Gifte Therapie von Giftschlangenbissen**. Bejhringwerk- Mitteilunem. 255. Marburg /Lahn Elwert.
- KOCHVA, E. (1987). **The origen of snakes and evolution of the venom apparatus**. *Toxicon* 25: 65.
- LAEMI, U. K. (1970). **Cleavagem of structural protines during the assembly of the head of bacteriophage T4**. *Nature*, 227:680-685
- LEITE, L. C. C.; FURTADO, M. F. D; CORREIA, T. C. and RAW, I. (1992). **Characterization of the snake venoms from seven Brazilian species of *Bothrops* By FPLC Anion-Exchange Chromatography**. *Comp. Biochem. Physiol.* 102b: 515-520.
- LOMONTE, B. ; GUTIERREZ, J. M. ; FURTADO, M. F.; OTERO, R.; ROSSO, J. P. ; VARGAS, O.; CARMONA, E. and ROVIRA, M. (1990).

- DAVIS, B. J. (1964). **Disc eletrophoresis. II Method and properties of phospholipase a from porcine pancreas.** *Biochem. Biophys. Acta.* 159 - 103
- DE HAAS, G. H.; POSTEMA, N. M. (1968). **Purification and properties of phospholipase a from porcine pancreas.** *Biochem. Biophys. Acta.* 159-103.
- DOTY, P. ; GEIDUSCHEC, E. P. (1953).In: **The proteins** (Neurath, H. and Bailey, K. Eds), I-A:434.
- FAURE, G. , BON.C, (1978). **Several isoforms of crotoxin are present in individual venoms from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*.** *Toxicon* 25: P.229.
- FERREIRA, M. L.; MOURA DA SILVA, A. M.; FRANÇA, F. O. S.;CARDOSO, J. L. and MOTA, (1992). **Toxin activities of venoms from nine *Bothrops* species and their correlation with lethality and necrosis.** *Toxicon*, 30(12): 1603-1608.
- FICHMAN, M. and HENRIQUES, O. B. (1962). **Further studies on the purification of the blood-clotting enzyme from the venom of *Bothrops jararaca*.** *Arch. Biochem. Biophys.* , 98: 95-99.
- FAURE, G. , BON.C, (1988). **Crotoxin, a phospholipase A2 neurotoxin from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*; purificação of several isoforms and comparison of their molecular structure and of their biological activities.** *Biochemistry* 26-27(2): P.730-8.

- ITZHAKI, R. F. and GILL, D. M. (1964) **A microbiuret method for stimulating proteins.** Anal. Biochem 9: 401.
- IWANAGA, S. and SUSUKI, T. (1979). **Enzymes in snake venoms.** In: **Handbook of Experimental Pharmacology.** Snakes Venoms vol 52: 61-144 (LEE, C. Y., ED.) Berlin Springer.
- KINI, R. M. and EVAS, H. J. (1989). **A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂.** Toxicon, 27(6): 613-635.
- KLEMMER, K. (1963). Liste der rezenten Giftschlangen. Elapidae, Hydrophidae, Viperidae and Crotalidae. In: **Die Giftschlangender Erde. Wirking and Antigenitat der Gifte Therapie von Giftschlangenbissen.** Bejhringwerk- Mitteilugem. 255. Marburg /Lahn Elwert.
- KOCHVA, E. (1987). **The origin of snakes and evolution of the venom apparatus.** Toxicon 25: 65.
- LAEMI, U. K. (1970). **Cleavagem of structural protines during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature, 227:680-685
- LEITE, L. C. C.; FURTADO, M. F. D; CORREIA, T. C. and RAW, I. (1992). **Characterization of the snake venoms from seven Brazilian species of *Bothrops* By FPLC Anion-Exchange Chromatography.** Comp. Biochem. Physiol. 102b: 515-520.
- LOMONTE, B. ; GUTIERREZ, J. M. ; FURTADO, M. F.; OTERO, R.; ROSSO, J. P. ; VARGAS, O.; CARMONA, E. and ROVIRA, M. (1990).

- OSHAKA, C. L., BJARNASOS, J., and TU, A. T. (1978). **Hemorrhagic, necrotizing and edemaforming effects of snake venoms.** In: **Snake Venoms** (Lee, C. Y.). Springer-Verlag Berlin.
- QUEIROZ, L. S.; SANTOS-NETO, H. ; SIMIONI, L. R.; FRANCESCHI, J. P. (1984). **Muscle necrosis and regeneration after envenomation by *Bothrops jararacussu* snake venom.** *Toxicon* 22: 339.
- QUEIROZ, L. S.; SANTOS-NETO, H.; ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P. and MANDELBAUM, F. R. (1985). **Pathological changes in muscle caused by hemorrhagic and proteolytic factors from *B. jararaca* snake venom.** *Toxicon*, 23:41.
- SANO-MARTINS, I.S.; FAN, H.W.; CASTRO, S.C. B.; TOMY, S. C.; FRANCA, F.O. S.; JORGE, M. T.; KAMIGUTI, A. S; WARRELL, D. A.; THEAKSTON, R. D. G., and BIASG (1994). **Reability of the simple 20 minute whole Blood Clotting test (WBCT 20) as an indicator of low plasma fibrinogen concentration in patients envenomed by *Bothrops* snakes.** *Toxicon* 32(9):1045-1050.
- SCHMIDT, M. E.; ABDELBAKI, Y.Z. and TU, A. . T.(1976). **Nephrotoxic action of rattlesnake and Sea snake venoms: an electron-microscopic study.** *J. Path.* 118..
- SCHMIDT, M. E.; ABDELBAKI, Y.Z. and TU, A. . T.(1972). **Fine structural changes of myelinated nerve associated with copperhead envenomation.** *Acta Neuropath* 21:68.

- OSHAKA, C. L., BJARNASOS, J., and TU, A. T. (1978). **Hemorrhagic, necrotizing and edemaforming effects of snake venoms.** In: **Snake Venoms** (Lee, C. Y.). Springer-Verlag Berlin.
- QUEIROZ, L. S.; SANTOS-NETO, H. ; SIMIONI, L. R.; FRANCESCHI, J. P. (1984). **Muscle necrosis and regeneration after envenomation by *Bothrops jararacussu* snake venom.** *Toxicon* 22: 339.
- QUEIROZ, L. S.; SANTOS-NETO, H.; ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P. and MANDELBAUM, F. R. (1985). **Pathological changes in muscle caused by hemorrhagic and proteolytic factors from *B. jararaca* snake venom.** *Toxicon*, 23:41.
- SANO-MARTINS, I.S.; FAN, H.W.; CASTRO, S.C. B.; TOMY, S. C.; FRANCA, F.O. S.; JORGE, M. T.; KAMIGUTI, A. S; WARRELL, D. A.; THEAKSTON, R. D. G., and BIASG (1994). **Reability of the simple 20 minute whole Blood Clotting test (WBCT 20) as an indicator of low plasma fibrinogen concentration in patients envenomed by *Bothrops* snakes.** *Toxicon* 32(9):1045-1050.
- SCHMIDT, M. E.; ABDELBAKI, Y.Z. and TU, A. . T.(1976). **Nephrotoxic action of rattlesnake and Sea snake venoms: an electron-microscopic study.** *J. Path.* 118..
- SCHMIDT, M. E.; ABDELBAKI, Y.Z. and TU, A. . T.(1972). **Fine structural changes of myelinated nerve associated with copperhead envenomation.** *Acta Neuropath* 21:68.