

JOHARA BOLDRINI FRANÇA

ESTUDO COMPARATIVO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS
PRESENTES NAS PEÇONHAS DE TRÊS SERPENTES
BRASILEIRAS: *Bothrops moojeni*, *Bothrops neuwiedi pauloensis* E
Crotalus durissus sp.

**Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Uberlândia como
requisito parcial à obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas**

**Orientadora: Dra. Maria Inês Homs
Brandeburgo.**

Uberlândia – MG

2005

JOHARA BOLDRINI FRANÇA

ESTUDO COMPARATIVO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS
PRESENTES NAS PEÇONHAS DE TRÊS SERPENTES
BRASILEIRAS: *Bothrops moojeni*, *Bothrops neuwiedi pauloensis* E
Crotalus durissus sp.

Monografia apresentada à
Coordenação do curso de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito parcial à
obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Banca examinadora:

Uberlândia, 21 de dezembro de 2005.

Dra. Maria Inês Homs Brandeburgo-UFU

Dra. Hérica Lima Santos-UFU

Msc. Renata Santos Rodrigues-UFU

OFERECIMENTO

Ofereço este trabalho às pessoas mais importantes de minha vida: Meus pais Marlene e Gilberto. Devo a eles tudo que eu sou hoje, moralmente, intelectualmente e fisicamente e espero um dia poder retribuir todo o bem que eles me proporcionaram!

“Honrar ao Pai e a Mãe não é somente respeitá-los, mas também assisti-los nas suas necessidades; proporciona-lhes o repouso na velhice; cercá-los de solicitude, como eles fizeram por nós na infância. Infeliz, portanto aquele que se esquece de sua dívida para os que o sustentaram, os que com a vida material, lhe deram também a vida moral, e que frequentemente se impuseram duras privações para lhe assegurarem o bem-estar!”

O Evangelho segundo o Espiritismo

Meus Pais, serei eternamente grata!!!

AGRADECIMENTOS

A Deus pela dádiva de cada dia e pela saúde proporcionada, que me permitiu o dom do trabalho e do estudo.

A minha orientadora Dr^a Maria Inês Homsí Brandeburgo pela orientação repleta de sabedoria, pelos estímulos positivos na minha carreira, e pela dedicação na realização deste trabalho.

A professora Dr^a Veridiana de Melo Rodrigues por estar sempre presente e disposta a ajudar a todos com suas brilhantes idéias.

A professora Dr^a Amélia Hamaguchi pela colaboração e esclarecimento em todos os momentos de dúvida

A amiga Renata Santos Rodrigues, pessoa que eu tanto amo e que me proporcionou momentos de felicidade e de aprendizado mútuo. A cada dia eu acredito mais na idéia de que nossa amizade não aconteceu por acaso... Pois não é possível tirar tanto aprendizado e tanto carinho de uma mera fatalidade! Obrigada por ter entrado na minha vida e mais obrigada ainda por ter permanecido nela! Te adoro de verdade !!!!!

A professora e amiga Dr^a Hérica Lima, que em pouco tempo foi responsável por grandes realizações nos trabalhos de muitos alunos. Obrigada pelas significativas ajudas e conselhos e pela alegria que sua presença trouxe ao nosso dia a dia.

Aos meus avós Elza e Ézio, por terem cuidado de mim e das minhas irmãs como verdadeiras filhas nos dando educação recheada de carinho e compreensão. Vovó e vovô: Amo vocês!

A minha irmã Jaciara e ao meu cunhado Geraldo que são como pais para mim, me apoiando nos momentos em que eu não tinha mais a quem recorrer e trouxeram ao mundo duas crianças que me dão doses diárias de amor e satisfação: Nathália e João Matheus.

A minha irmã Janaína, que mesmo estando distante, nunca deixou de se preocupar comigo. Obrigada pelas nossas sessões de filmes, pelas gargalhadas, por ter colocado em nossa família uma pessoa tão especial e única que é o Rodrigo e pela dedicação com nossa família. Você é essencial para minha felicidade!

A amiga Marília desejo muito sucesso e felicidade nesta nova etapa, e espero que em breve estejamos novamente próximas e trocando confidências.

As amigas Daiana e Carol, com as quais dividi tarefas e afinidades. Vocês têm um brilho todo especial, principalmente quando estão juntas!

As amigas Cristiane Baldo e Carla Menezes, das quais sinto muitas saudades. Com elas muito aprendi, me diverti e me senti especial em um momento de dificuldades. Serei eternamente grata por essa amizade!

Ao amigo Fábio Lucas que foi a primeira pessoa a me oferecer ajuda, e que tanto contribuiu para minha realização. Obrigada do fundo do meu coração e espero que você seja feliz no caminho que escolher seguir.

Ao amigo Luís Henrique. Você foi sempre uma pessoa responsável e um verdadeiro cientista, ao mesmo tempo em que se dedicou às amizades e a vida social.

Aos colegas do Laboratório: Mário Sérgio, que com seu jeito simples conquistou a todos, Mirian, pela sua responsabilidade e assiduidade, Leonardo e Robson, que são os mais novos integrantes dessa equipe, Luís Antônio, que escolheu lutar pelo seu sonho, Luís Carlos

com suas piadas que alegam qualquer ambiente, Luís Fernando por sua tão agradável companhia e disponibilidade em ajudar, Danilo, que está sempre inovando e ousando em seus trabalhos.

As amizades tão especiais que conquistei durante essa jornada na Universidade: Camila, sempre companheira e engraçada, Thaís, sempre meiga e sincera, Daniela Carolina, que se mostrou uma pessoa forte e responsável, Clarissa e Renata, com as quais passei noites em claro tornando nosso estudo mais agradável e divertido.

A Marlene que sempre trabalhou com muita responsabilidade e alegria, e animou nossas festas.

A Tianinha e à Dona Nenzinha pelas ajudas indispensáveis. Sem vocês nosso trabalho se tornaria muito mais árduo.

A amiga Andréia, que em um curto espaço de tempo, conquistou minha amizade, meu carinho, minha confiança e meu amor. Obrigada por toda a dedicação a essa amizade que tanto me fez bem. Você é uma pessoa que eu jamais esquecerei e jamais me arrependerei de dizer que sou eternamente grata ao seu companheirismo!

A amiga Fabiana que mesmo do outro lado do mundo participou da minha vida como ninguém! Essa é a verdadeira amizade!

A amiga Flávia Alcova, minha amiga e companheira de tantos maravilhosos anos. Eu te amo do fundo do coração e faço questão de sempre te ter por perto! Obrigada por me mostrar, junto com a Fabiana, o sentido da verdadeira amizade!

As amigas Kátia e Karina. Em vocês descobri uma amizade surpreendente! Desejo nunca mais me afastar de vocês!

As amigas Flávia Lebre e Lúgia que nem o tempo, nem à distância conseguiram apagar essa amizade!

Aos amigos do INGEB: Ana Paula, Cynara, Luciana, Faustinho, Silvia, Guilherme, Paula, Vinícius, Gabriel, Vicentinho, Leo, Ana Clara, Rogério, Daniela, Camila e a todos os colegas do instituto pelos ótimos momentos que passamos juntos!

A CNPQ por prestar indispensável apoio financeiro ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos demais professores do INGEB por sempre serem prestativos a nos auxiliar na realização de nossos trabalhos.

À professora Dra. Tânia Machado de Almeida por prestar auxílio indispensável na confecção e interpretação das lâminas histológicas

À Professora Dra. Eliane Candiani Arantes, que me recepcionou calorosamente no estágio realizado na Faculdade de Farmacologia da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto, me auxiliando, ensinado e fornecendo gentilmente condições de trabalho para realização dos testes hialuronidásicos.

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

*“Quanto mais é permitido ao homem
penetrar pelos conhecimentos dos
segredos da natureza, maior deve ser
sua admiração pelo poder e sabedoria do
Criador.”*

O Livro dos Espíritos

RESUMO

A peçonha botrópica é uma fonte de substâncias farmacologicamente ativas que causam intensos efeitos locais e sistêmicos. A peçonha crotálica é caracterizada por efeitos sistêmicos e letalidade. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar as variações nas atividades biológicas de peçonhas de serpentes do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. As peçonhas brutas de *Bothrops neuwiedi pauloensis*, *Bothrops moojeni* e *Crotalus durissus* sp. foram testadas para as atividades fibrinogenolítica, hemorrágica, fosfolipásica (PLA₂), coagulante, edematogênica, miotóxica direta e indireta e hemolítica indireta. Foi evidenciado na peçonha de *Bothrops moojeni* uma alta atividade fibrinogenolítica, degradando completamente a cadeia A α e B β do fibrinogênio com 5 minutos de reação, seguida de *Bothrops neuwiedi pauloensis* e *Crotalus durissus* sp. que degradaram essas cadeias com 15 e 45 minutos respectivamente. A peçonha mais hemorrágica foi a de *Bothrops moojeni*. *Bothrops neuwiedi pauloensis* mostrou uma atividade mais fraca em comparação com a primeira, e na peçonha de *Crotalus durissus* sp. não foi observada atividade hemorrágica. *Bothrops moojeni* apresentou uma alta atividade fosfolipase A₂, seguido de *Bothrops neuwiedi pauloensis*. Esta atividade foi mais fraca com *Crotalus durissus* sp., em comparação com as outras peçonhas. A peçonha de *Crotalus durissus* sp. induziu fortemente a coagulação sanguínea *in vitro*. A mínima dose coagulante (DMC) desta peçonha foi de 3,67 μ g de peçonha bruta. *Bothrops moojeni* e *Bothrops neuwiedi pauloensis* apresentaram uma DMC de 4,92 μ g e 14,42 μ g respectivamente. *Bothrops neuwiedi pauloensis* induz um intenso crescimento de edema, seguido de *Bothrops moojeni* e *Crotalus durissus* sp. As três peçonhas apresentaram atividade PLA₂, porém as peçonhas de *Bothrops moojeni* e *Bothrops neuwiedi pauloensis* foram as mais ativas com uma atividade específica de 122 e 111 U/mg/min respectivamente, contra uma atividade de 36,42 U/mg/min da peçonha crotálica. Os resultados obtidos para atividade hemolítica indireta corroboraram com os resultados desta última atividade. A miotoxidade foi intensa para as três peçonhas estudadas, porém estas diferiram entre si nas intensidades de formação de edema, necrose, inflamação e hemorragia, sendo que a peçonha de *Crotalus durissus* sp. não gerou extravasamento sanguíneo entre as fibras musculares. Não foi estabelecida uma relação direta entre esta atividade e a miotoxidade por dosagem de CK plasmático, pois esta apresentou um perfil discrepante, mostrando uma maior atividade de *Crotalus durissus* sp. seguida de *Bothrops moojeni* e *Bothrops neuwiedi pauloensis*. As peçonhas de *bothrops moojeni* e *Crotalus durissus* sp. também foram testadas para atividade hialuronidásica, juntamente com outras peçonhas disponíveis no laboratório: *Bothrops alternatus*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu* e *Crotalus durissus terrificus*. As peçonhas crotálicas apresentaram uma atividade extremamente mais intensa em relação às peçonhas botrópicas. Este estudo mostrou que as peçonhas botrópicas são mais severas no desenvolvimento da maioria dos efeitos biológicos testados.

Palavras-chave *Bothrops neuwiedi pauloensis*; *Bothrops moojeni*, *Crotalus durissus*; estudo comparativo.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCTA – Brometo de etiltrimetilamônio

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

BSA – Soroalbumina Bovina

CK – Creatina Quinase

DMC – Dose Mínima Coagulante

DMH – Dose Mínima Hemorrágica

EDTA – Ácido etilenediaminotetra acético

KDa – quilo Daltons

M – Molar

nm – nanômetros

PAGE – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

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

PBS – Tampão fosfato em salina

pH – Ponto Hidrogeniônico

PLA₂ – fosfolipase A₂

PM – Peso Molecular

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

TEMED – N, N, N', N' - tetrametiletenodiamino

TRIS – Tris (hidróximetil) aminometano

UFU – Universidade Federal de Uberlândia

V.B. – Veneno Bruto

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	8
3. MATERIAIS.....	9
3.1. Peçonhas.....	9
3.2. Animais de experimentação.....	9
3.3. Eletroforeses.....	9
3.4. Atividades Biológicas e Enzimáticas.....	10
3.5. Padrão de Pesos Moleculares.....	10
4. MÉTODOS.....	11
4.1. Dosagem Quantitativa de Proteínas.....	11
4.2. Determinação das Atividades Biológicas.....	11
4.2.1. Atividade Coagulante.....	11
4.2.1.1. Determinação da Dose Mínima Coagulante (DMC).....	11
4.2.2. Atividade Fosfolipase A ₂	12
4.2.3. Atividade Hemolítica Indireta.....	12
4.2.4. Atividade Hemorrágica.....	13
4.2.4.1. Determinação da Dose Mínima Hemorrágica (DMH).....	13
4.2.5. Teste de Degradação do Fibrinogênio Bovino.....	14
4.2.6. Atividade Miotóxica.....	14
4.2.7. Atividade Miotóxica Indireta por Dosagem de Creatina Quinase (CK).....	15
4.2.8. Atividade Edematogênica.....	15
4.2.9. Atividade Hialuronidásica.....	16
4.2.9.1. Teste de Zimograma.....	16
4.2.9.2. Teste Turbidimétrico.....	16
4.3. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE).....	17
4.3.1. Eletroforese em Condições Desnaturantes (PAGE-SDS).....	17
4.3.2. Condições Nativas em pH Ácido.....	17
4.3.3. Condições Nativas em pH Alcalino.....	18

4.3.4. Revelação e Secagem dos Géis.....	18
5. RESULTADOS.....	19
5.1. Eletroforeses.....	19
5.2. Atividade Coagulante.....	22
5.3. Atividade Hemorrágica.....	24
5.4. Atividade Fibrinogenolítica.....	26
5.5. Atividade Fosfolipásica.....	28
5.6. Atividade Hemolítica Indireta.....	29
5.7. Atividade Edematogênica.....	30
5.8. Atividade Miotóxica por análise morfológica.....	31
5.9. Atividade Miotóxica por Dosagem de Creatina Quinase (CK).....	36
5.10. Determinação da Atividade Hialuronidásica pelo Método Turbidimétrico.....	37
5.11. Zimograma de Atividade Hialuronidásica.....	40
6. DISCUSSÃO.....	41
7. CONCLUSÃO.....	49
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
9. ANEXOS.....	58

1. INTRODUÇÃO

Aproximadamente um terço de todos os répteis produzem alguma toxina bucal, de tal forma que glândulas salivares modificadas são encontradas em todas as famílias de serpentes superiores (GANS, 1978), sendo estas responsáveis pela produção da peçonha. As glândulas localizam-se lateralmente ao maxilar superior e são ligadas às presas por ductos que promovem a inoculação por capilaridade (STORER, 2002).

A peçonha consiste em uma complexa mistura de proteínas, peptídeos, lipídios, polissacarídeos e substâncias químicas inorgânicas (GANS, 1978). Polipeptídeos e proteínas estão presentes em maiores proporções, chegando a compor de 90-95% do peso seco desta. Estes componentes são fatores com forte atividade biológica e apresentam a função de matar ou imobilizar a presa e também de contribuir na digestão da mesma.

A ação da peçonha pode desencadear severas desordens metabólicas. Dentre estes efeitos podemos destacar neurotoxicidade, cardiotoxicidade, edematogenicidade, miotoxicidade, ações coagulantes, hemostáticas, hemorrágicas, nefrotóxicas e hepatóxicas. (CHIPPAUX, 1991).

Os acidentes ofídicos representam sérios problemas para a saúde pública, principalmente dos países tropicais, onde a frequência com que ocorrem é particularmente alta, assim como a mortalidade por estes causadas (PINHO & PEREIRA, 2001). No Brasil são registrados anualmente de 19 mil a 22 mil acidentes envolvendo ataque de serpentes a seres humanos, com um índice de mortalidade de 0,45%. A maioria dos casos é atribuída a serpentes da família Viperidae, especificamente aos gêneros *Bothrops* (jararaca, jararacuçu, urutu) e *Crotalus* (cascavéis), respectivamente pertencentes às subfamílias Viperinae e Crotalinae. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001 apud PINHO et al., 2004).

Os acidentes crotálicos são caracterizados pela presença de acometimento renal, associados a sinais decorrentes de ação neurotóxica, com mínimas alterações no local da picada (GUTIERREZ, 1990). A peçonha botrópica pode afetar o organismo animal indiretamente pela liberação de substâncias farmacologicamente ativas, e diretamente, através de sua ação nas membranas celulares. (FRANCESCHI, 1990). As manifestações clínicas do acidente botrópico incluem alterações no local da picada, como a dor acompanhada de edema, eritema, equimoses, frictemas sanguinolentos e necrose tecidual, não sendo observadas ações neurotóxicas (AMARAL et al., 1986). Dentre os efeitos sistêmicos dos acidentes botrópicos podemos destacar incoagulabilidade sanguínea, que ocorre com mais frequência em acidentes envolvendo serpentes jovens, e trombocitopenia. (SANO-MARTINS, 1990).

Muitas dessas alterações na homeostasia do organismo humano devem-se principalmente a três das principais enzimas encontradas nas peçonhas: enzimas coagulantes, fatores hemorrágicos e fosfolipase A₂.

Os efeitos coagulantes das peçonhas de serpentes devem-se principalmente a três mecanismos de atuação: 1) Ativação do fator X da cascata de coagulação sanguínea; 2) Conversão da protrombina em trombina e 3) Conversão do fibrinogênio em fibrina (ação de enzimas trombin-like). As serpentes botrópicas parecem apresentar as atividades 1 e 3 enquanto as serpentes crotálicas parecem apresentar preferencialmente a ação 3 (GANS, 1978).

O envenenamento sistêmico humano por serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*, freqüentemente resulta em incoagulabilidade sanguínea (SANO-MARTINS et al., 1994). Este efeito deve-se, entre outros fatores, a ação de serinoproteases que clivam os fibrinopeptídeos A e B do fibrinogênio promovendo uma depleção dos níveis de fibrinogênio sanguíneo, e não ativam o fator XIII da cascata de coagulação, responsável por promover ligações cruzadas entre os monômeros de fibrina. Sem a ativação deste fator, somente o coágulo “frouxo” é formado, sendo

este rapidamente removido da corrente sanguínea, tanto pela ação de fibrinólise quanto pela ação do sistema retículo endotelial. (MARKLAND, 1998).

São encontradas também nas peçonhas botrópicas, metaloproteases com função fibrinogenolítica, que geram incoagulabilidade sanguínea assim como as serinoproteases anteriormente citadas. Estas clivam preferencialmente a cadeia A- α do fibrinogênio, seguida da clivagem da cadeia B- β (MARKLAND, 1998). Somente uma toxina capaz de clivar a cadeia γ foi purificada da peçonha de *Crotalus atrox* (toxina hemorrágica) (NIKAI et al., 1984 apud OUYANG et al., 1992).

Outros fatores encontrados em peçonhas de serpentes geram alterações na hemostasia corporal: 1) Agentes estimulantes da secreção de ativador de plasminogênio, 2) Ativação do fator V da cascata de coagulação, 3) ativação do fator XI da cascata de coagulação, 4) ativação da proteína C, 5) Indutores de agregação plaquetária, 6) Inibidores de agregação plaquetária, 7) Fator de von Willebrand dependente da indução de agregação plaquetária (OUYANG et al, 1992).

As fosfolipases A₂ são pequenas enzimas que causam uma variedade de efeitos farmacológicos interferindo nos processos fisiológicos normais. Elas ocorrem na natureza nas formas intracelular e extracelular tendo a função de hidrolisar diversos fosfolipídeos (KINI, 2003). Com a atividade da enzima, os fosfolipídeos são hidrolisados, desestruturando a membrana e comprometendo sua permeabilidade seletiva (MOLLIER et al., 1990). Esta hidrólise ocorre na posição sn-2 dos fosfolipídios liberando lisofosfolipídeos e ácidos graxos (KINI, 2003).

As fosfolipases A₂ podem exercer efeitos como: Miotoxicidade, indução ou inibição da agregação plaquetária, efeitos hemolíticos indiretos, edematogenicidade e efeitos anticoagulantes.(KINI & EVANS, 1989).

A ação miotóxica apresenta-se mais acentuada nos acidentes botrópicos, sendo que existem no mínimo dois diferentes caminhos pelos quais cada peçonha botrópica afeta as células musculares: 1) diretamente pela ação de miotoxinas que afetam a integridade da membrana plasmática das células musculares esqueléticas 2) indiretamente por uma condição isquêmica que se desenvolve secundariamente ao rompimento vascular no músculo esquelético (GUTIERREZ & LOMONTE, 1989).

A hemorragia é um dos mais impressionantes sintomas ocorridos após a picada das serpentes das subfamílias Viperinae e Crotalinae e pode ser local ou sistêmica. Em casos menos severos, estes efeitos são limitados aos tecidos cutâneos e subcutâneos em torno do ferimento. Porém, as manifestações mais dramáticas podem envolver degenerações teciduais e necrose (GANS, 1978). Isto se deve principalmente à atividade de toxinas hemorrágicas, porém outros fatores contribuem para o desenvolvimento de hemorragias no indivíduo acometido, como componentes responsáveis pela incoagulabilidade sanguínea. Várias metaloproteases têm sido isoladas de diferentes peçonhas de serpentes e muitas delas têm sido caracterizadas como hemorraginas (MANDELBAUM, 1990).

Ohsaka et al (1979 apud GUTIERREZ & LOMONTE, 1989) desenvolveram um trabalho pioneiro com o objetivo de elucidar a natureza e o mecanismo de ação de fatores hemorrágicos isolados de *Trimeresurus flaviridis*, que os levou a concluir que tais toxinas induzem hemorragias por “diapedesis”, ou seja, pela abertura das junções intercelulares das células endoteliais dos capilares, com o conseqüente extravasamento sanguíneo. Por outro lado, Ownby et al (1978; 1987 apud GUTIERREZ & LOMONTE, 1989) apresentaram fortes evidências de toxinas hemorrágicas isoladas de *Crotalus atrox* e *Crotalus horridus* que causam hemorragia “per rhexis”, ou seja, por romper a integridade das células endoteliais, permitindo que os eritrócitos extravasassem pelas lacunas formadas no endotélio.

Estas enzimas podem ser divididas em quatro classes distintas de acordo com os seus pesos moleculares. A classe P-I das metaloproteases compreende enzimas de baixo peso molecular (20 à 30 kDa) e com baixa ou nenhuma hemorragia. As proteínas da classe P-II são toxinas de tamanho médio (30 à 60 kDa) e possuem um domínio semelhante a desintegrina na região carboxiterminal. A classe P-III inclui proteínas que apresentam além do domínio desintegrina, um carboxiterminal rico em resíduos de cisteína (BJARNASON & FOX, 1994). Uma quarta classe já foi descrita e compreende enzimas menos hemorrágicas que a classe P-III com massa molecular entre 80 e 100 kDa (HATI et al, 1999).

Como anteriormente citado, as peçonhas botrópicas são caracterizadas também pelo rápido desenvolvimento de edema e reação inflamatória no local da picada. Tais sintomas são consequência da ação conjunta de uma variedade de substâncias: 1) toxinas hemorrágicas que rompem a microvasculatura promovendo o extravasamento, 2) toxinas que agem diretamente sobre as células endoteliais dos capilares e vênulas, aumentando sua permeabilidade 3) fosfolipases e citotoxinas que induzem o aumento da produção de histamina por mastócitos, 4) fosfolipases A₂ que liberam o ácido araquidônico dos fosfolipídios de membranas celulares, iniciando um processo de síntese de prostaglandinas 5) proteases que agem no cininogênio plasmático, liberando cininas, 6) componentes do sistema complemento, particularmente C3_a e C5_a, participantes da reação inflamatória. (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1989).

As peçonhas de serpentes possuem, além de compostos tóxicos, substâncias não-tóxicas que potencializam a ação da peçonha por aumentar a distribuição da mesma no organismo da presa. Tu e Hendon (1983) demonstraram experimentalmente que as hialuronidases desempenham um papel como “fator de espalhamento” na ação tóxica das peçonhas. Apesar das hialuronidases não apresentarem toxicidade por si só (XU *et al.*, 1982) esta contribui para o envenenamento sistêmico por acelerar a absorção e difusão da peçonha nos tecidos da vítima (PUKRITTAYAMEE *et al.*, 1988).

As hialuronidases são enzimas que participam da degradação de mucopolissacarídeos, componentes fundamentais da derme (KREIL, 1995). Foi demonstrado que existem pelo menos três tipos de hialuronidases e que elas hidrolisam o ácido hialurônico através de mecanismos distintos (MEYER, 1971). O primeiro grupo inclui as β -N-acetil-D-hexosaminidases que degradam o substrato de alto peso molecular a um tetrassacarídeo como principal produto final. No caso da enzima testicular, a qual é um protótipo deste grupo, tem sido demonstrado que ela também catalisa reação de trans glicosilação (CRAMER et al., 1994; TAKAGAKI et al., 1994) visto que hexa, di e octassacarídeos também são formados durante a hidrólise do ácido hialurônico. O segundo tipo é representado pelas hialuronidases de sanguessugas, as β -endoglucuronidases. E finalmente, as hialuronidases bacterianas que são liases que agem via β -eliminação, formando dissacarídeos como principal produto final.

. Cada população de serpentes apresenta sua própria necessidade na ação de sua peçonha, e a proporcional mistura de efeitos é ao menos em parte determinada pelo tipo da respectiva presa. Desta forma podemos afirmar que a presença e a concentração de toxinas na peçonha é característica de cada espécie (CHIPPAUX et al, 1991). Gloyd (1940 apud CHIPPAUX et al, 1991) sugeriu que as especializações na composição das peçonhas podem ocorrer independentemente das variações morfológicas. Diversos estudos comparativos têm sido realizados com a finalidade de caracterizar as variações das atividades enzimáticas, não somente de diferentes espécies, mas também de serpentes de diferentes idades e procedência.

A variedade entre as peçonhas de serpentes foi primeiramente observada em casos clínicos na antiguidade, e atribuída a fatores exógenos naturais. Aristóteles, em "*Historia Animalium*" acreditava que o calor era o fator predisponente para o aumento da toxicidade das peçonhas, comparando acidentes ocorridos na Grécia e na África do Norte, mas nenhuma descrição das espécies estudadas foi dada. Pare, em "*Traide sur les Venins*" notou uma variação

sazonal na peçonha de *Vipera aspis* e observou uma atividade mais severa da peçonha em acidentes ocorridos no verão e primavera. (CHIPPAUX et al, 1991).

Furtado et al.(2003) comparou os efeitos biológicos da peçonha de 15 serpentes jovens de *Crotalus durissus terrificus* em relação ao de sua progenitora, relatando uma maior atividade enzimática, ação miotóxica e coagulante na peçonha de serpente jovem.

Rodrigues et al. (1998) realizaram estudos comparativos envolvendo pools de peçonha de *Bothrops neuwiedi* e das subespécies *Bothrops neuwiedi pauloensis* e *Bothrops neuwiedi urutu* coletadas no estado de São Paulo e Minas Gerais respectivamente. A partir destas análises foi possível detectar toxinas básicas com diferentes pontos isoeletricos nas peçonhas procedentes de São Paulo, estando estas ausentes nos pools correspondentes de Minas Gerais. Duas isoformas de miotoxinas foram isoladas da peçonha de serpentes de São Paulo, e três da peçonha de serpentes de Minas Gerais. A caracterização bioquímica dessas toxinas evidenciou alta similaridade em relação à miotoxina Lys-49 de outras peçonhas bothrópicas.

Estes estudos podem trazer importantes contribuições, não só para a área básica de pesquisa, como também para as áreas terapêuticas. O conhecimento das variações intra e inter-específicas pode permitir uma maior eficácia no tratamento de vítimas de picadas de serpentes, e dos sintomas característicos de cada acidente, e ainda contribuir na escolha do anti-veneno mais apropriado.

2. OBJETIVOS

O trabalho realizado teve como objetivo o estudo comparativo das atividades enzimáticas e biológicas: fosfolipase A₂, hemolítica indireta, coagulante, hemorrágica, fibrinogenolítica, edematogênica, miotóxica direta e indireta das peçonhas totais de serpentes da subfamília Crotalinae (*Bothrops moojeni*, *Bothrops neuwiedi* *pouloensis* e *Crotalus durissus* sp.), e a investigação da atividade hialuronidásica das peçonhas presentes no laboratório (*Bothrops moojeni*, *Bothrops alternatus*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu*, *Crotalus durissus terrificus* e *Crotalus durissus* sp.)

3. MATERIAIS:

3.1. PEÇONHAS

As peçonhas brutas de *Bothrops moojeni* e *Bothrops neuwiedi pauloensis* foram adquiridas da Pentapharm do Brasil, após extração da peçonha de serpentes coletadas no município de Uberlândia, e mantidas em cativeiro. A peçonha de *Crotalus durissus* sp. foi doada pelo Instituto Butantã-SP. As peçonhas brutas foram utilizadas na forma dessecada e permaneceram conservadas à -20°C.

3.2. ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Os camundongos Swiss machos utilizados foram doados pelo Biotério da empresa VALEÉ NORDESTE S/A, e mantidos no Laboratório de experimentação animal da Universidade Federal de Uberlândia (LEA). O plasma bovino foi doado pelo Hospital de Medicina Veterinária da mesma Instituição.

3.3. ELETROFORESES

Acrilamida, bis acrilamida, TEMED, SDS, Comassie Brilliant Blue R-250, azul de bromofenol, β -mercaptoetanol, persulfato de amônio (Sigma Chem. Co), Tris, glicerol, EDTA, fucsina básica.

3.4. ATIVIDADES ENZIMÁTICAS E BIOLÓGICAS

Desoxicolato de sódio, Fibrinogênio Bovino (Sigma Chem. Co), Kit CK NAC Cinético (Bioclin), ácido hialurônico (Sigma), Stains-all (1-ethyl-2-[3-(1-ethylnaphthol[1,2-d] thiazolin-2-ylidene) - 2 - methylpropenyl] naphthol [1,2-d] thiazolium bromide (Cat. No. 2718 da Eastman Kodak Company, Rochester, NY, U.S.A.) e brometo de cetiltrimetilamônio (BDH Chemical Ltda.).

3.5. PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DE PESO MOLECULAR

Os padrões para determinação de peso molecular foram: fosforilase b (PM 97kDa) albumina (PM 66 kDa), ovoalbumina (PM 45 kDa), anidrase carbônica (PM 30kDa), inibidor de tripsina (PM 20,1 kDa), α -lactoalbumina (PM 14,4 kDa) (Amersham Bioscience).

4. MÉTODOS

4.1. DOSAGEM QUANTITATIVA DE PROTEÍNAS

As amostras contendo de 0,1 a 2,0 mg de proteína da peçonha bruta foram dosadas pelo método do Microbiureto, conforme descrito por Itzhazi e Gill (1964). A reta padrão foi construída com soroalbumina bovina (BSA). As amostras de proteínas foram completadas para o volume de 1,0 ml, sendo acrescidas a estas 500 μ L dos reagentes R₁ (0,21% de CuSO₄ dissolvido em NaOH a 30,4%) e R₂ (NaOH a 30,0%).

4.2. DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

4.2.1. ATIVIDADE COAGULANTE (ASSAKURA *et al.*, 1992)

O plasma bovino foi separado em alíquotas de 100 μ L cada e incubado em cubetas termostatizadas a 37°C. Diferentes doses do veneno bruto foram completadas para 20 μ L com solução de salina (NaCl a 0,9%) e aplicadas ao plasma. O tempo de coagulação corresponderá ao tempo determinado pelo imediato aparecimento da formação da rede de fibrina detectada pelo aparelho Coagulômetro Quick Timer (Drake Ltda).

4.2.1.1. DETERMINAÇÃO DA DOSE MÍNIMA COAGULANTE (DMC).

O experimento foi realizado como descrito no item 4.2.1. e a dose mínima coagulante (DMC) foi determinada após testes envolvendo cinco diferentes doses de cada peçonha sendo utilizados três animais para cada dose. Foi calculada a média aritmética para o tempo de coagulação de cada dose e os valores obtidos foram colocados em um gráfico de tempo de coagulação em segundos por dose de veneno bruto em μg . A DMC foi definida como a menor dose capaz de coagular o plasma bovino em 30 segundos.

4.2.2. ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA

Foi utilizada como substrato uma solução de trabalho preparada com uma gema de ovo ressuspensa em 50 ml de água desionizada. Para realização da atividade, foi preparado uma solução contendo 15 mL da solução de trabalho, 10 mL de deoxicolato de sódio 0,03M e 1 mL de CaCl_2 0,6M para um volume final de 100 mL completado com água desionizada, e o pH corrigido para pH 8,0 com NaOH 0,5M, assim como descrito por De Haas e colaboradores (1968). Os ácidos graxos liberados enzimaticamente foram titulados com NaOH 0,1248N em pH 8,0 a temperatura ambiente. A atividade foi expressa por microequivalentes de base consumida por minuto, por mg de proteína.

4.2.3. ATIVIDADE HEMOLÍTICA INDIRETA.

A hemólise causada pela amostra foi avaliada utilizando-se eritrócitos de camundongos suplementados com gema de ovo em gel de agarose como descrito por Gutiérrez et al. (1988).

Para a preparação do gel, extraiu-se o sangue de camundongos previamente anestesiados com éter de petróleo, e os eritrócitos foram lavados por 3X com PBS sendo centrifugados por 5 minutos a 5000 rpm. Para cada gel, foi adicionado 0,25g de agarose em 25 mL de PBS e esta foi dissolvida por aquecimento. Posteriormente foi adicionado 0,005g de azida, 0,25g de CaCl_2 0,01M, 0,3 mL de gema de ovo e 0,3 mL dos eritrócitos lavados. Aliquotas de 20 μL de solução de salina contendo 10 μg de peçonha bruta foram aplicadas em poços de aproximadamente 4 mm de diâmetro construídos no gel. Os géis foram incubados a 37°C e os halos hemolíticos formados foram medidos em diferentes intervalos de tempo.

4.2.4. ATIVIDADE HEMORRÁGICA (NIKAI *et al.*, 1984)

Amostras com cerca de 10 μg da peçonha total foram dissolvidas em 50 μL de salina, e inoculadas por via intradérmica em dorso de camundongos anestesiados com éter etílico. Após três horas, os animais foram sacrificados e a pele removida evidenciando a atividade pela presença de halo hemorrágico na face interna da mesma.

4.2.4.1 DETERMINAÇÃO DA DOSE MÍNIMA HEMORRÁGICA (DMH).

O experimento foi realizado como descrito no item 4.2.4. e a dose mínima hemorrágica (DMH) foi determinada após testes envolvendo três doses de cada peçonha contendo diferentes doses de proteínas sendo utilizados três animais para cada dose. Os halos hemorrágicos foram medidos em dois ângulos retos (90°), utilizando-se um paquímetro. A DMH foi definida como a menor dose capaz de produzir um halo de 10 mm de diâmetro. Foi calculada a média aritmética para cada dose e o valor obtido foi colocado em um gráfico de diâmetro do halo hemorrágico

versus dose de proteínas e o valor de DMH definido por regressão linear.

4.2.5. TESTE DE DEGRADAÇÃO DO FIBRINO GÊNIO BOVINO

Foi realizado segundo descrito por Edgar e Prentice (1973), modificado por Oliveira (1997). Em 50 μ L de fibrinogênio bovino (1,5 mg/mL de salina) foram adicionados 5 μ g de proteínas e a solução incubada por até 60 min a 37 °C. A reação foi cessada pela adição de 30 μ L de tampão Tris HCL 0,06 M, pH 6,8, contendo glicerol a 10% (v/v), β -mercaptoetanol a 10% (v/v), SDS a 2% (m/v) e azul de bromofenol 0,001% (m/v). Posteriormente, as amostras foram aquecidas a 100°C por 3 min e submetidas à eletroforese de gel de poliacrilamida a 14% em condições desnaturantes (PAGE-SDS).

4.2.6. ATIVIDADE MIOTÓXICA

Camundongos receberam injeção intramuscular no músculo gastrocnêmio direito de 50 μ L de solução de PBS contendo 50 μ g de peçonha bruta para as espécies botrópicas e 10 μ g de proteínas para a peçonha crotálica. Após 24 horas de inoculação os animais foram anestesiados profundamente por inalação com éter e sacrificados. Os músculos foram retirados e fixados em uma mistura de etanol 95%, formol 30%, ácido acético glacial a água desionizada na proporção de 3:1:1:5 em volume durante 24 horas. Posteriormente as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de álcoois e imersas em solução infiltradora e endurecedora à temperatura ambiente. Foram realizados cortes de 2,5 μ m em micrótomo sendo estes corados com azul de toluidina a 0,25% em água destilada a 40°C. As lâminas foram então montadas e fotografadas.

4.2.7. ATIVIDADE MIOTÓXICA INDIRETA POR DOSAGEM DE CREATINA QUINASE (CK) (RODRIGUES, 1996).

Amostras contendo 50 µg de proteína foram diluídas em um volume final de 50 µL de PBS pH 7,2, e injetadas intramuscularmente no músculo gastrocnêmio direito de camundongos (25g a 30g de peso), sendo que os controles receberam somente PBS. Passados diferentes intervalos de tempo, os animais foram sacrificados, e o sangue dos camundongos coletado por punção cardíaca na presença de EDTA. Imediatamente após, o sangue foi centrifugado em baixa rotação (2000 rpm) por 10 minutos a 4°C. A atividade Creatina Quinase foi expressa em unidades/litro e determinada fotometricamente pela velocidade de formação do NADPH. Para tal procedimento foram incubados 20 µL do plasma com 1 mL do reativo dissolvido em tampão imidazol pH 6,7 contendo glicose por 1 min a 37°C (kit CK NAC Cinético da Bioclin) e realizou-se a leitura inicial a 340 nm e após 1, 2 e 3 min.

4.2.8. ATIVIDADE EDEMATOGENICA (LLORET e MORENO, 1993)

Foram realizadas injeções subplantares de peçonha bruta (10 µg/ 50 µL) diluída em salina na pata direita de camundongos. O mesmo volume de salina foi aplicado da mesma forma na pata esquerda como controle. Os edemas formados foram medidos com um paquímetro em vários intervalos de tempo após as injeções. Os resultados foram calculados pela diferença entre os valores obtidos em cada pata e expressos em porcentagem do aumento do edema da pata direita em relação à pata esquerda.

4.2.9. ATIVIDADE HIALURONIDÁSICA

4.2.9.1. TESTE DE ZIMOGRAMA (CEVALLOS *et al.*, 1992)

Foi usado o sistema de eletroforese descrito por Laemmli (1970) com uma única modificação: 1,48 mL de ácido hialurônico a uma concentração de 1,08 mg/mL, foi incorporado na matriz do gel durante a polimerização. Após a eletroforese o gel foi lavado duas vezes em 50 mL de uma solução de Triton X-100 a 5% em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 5,8, com 0,15M de NaCl por uma hora. Posteriormente o gel foi novamente lavado em 50 mL de Triton X-100 0,05% no mesmo tampão e no mesmo pH por uma hora e finalmente no mesmo tampão sem Triton X-100 na mesma condição de pH por 10 minutos, de modo que todo o SDS do gel fosse substituído por Triton X-100 oferecendo assim, condições ótimas para a atividade enzimática. Após a lavagem, o gel foi incubado a 37° C por 30 minutos, lavado duas vezes por 15 minutos em tampão Tris-HCl 0,015 M, pH 7,95 para cessar a reação, e corado com uma solução de 0,1% de Stains-all estoque em formamida pura.

4.2.9.2. TESTE TURBIDIMÉTRICO (FERRANTE, 1956, modificado por PUKRITTAYAKAMEE, *et al.*, 1988).

Para determinar a atividade hialuronidásica específica, diferentes doses de veneno bruto (2, 10, 25, 50, 100, 200 e 400 µg) foram dissolvidas em tampão acetato de sódio a 0,2M, pH 6,0, contendo NaCl a 0,15M e a esta solução foi adicionado 25µL de ácido hialurônico em um volume final de 250 µL. A mistura de reação foi incubada a 37°C por 15 minutos e a reação foi interrompida pela adição de 500µL de brometo de cetiltrimetilamônio (BCTA) a 2,5% em

solução de NaOH a 2% e a densidade óptica de cada amostra foi lida a 400 nm. A atividade de redução turbidimétrica foi expressa como a quantidade de veneno necessária para hidrolisar 50% do ácido hialurônico, e a atividade específica são as unidades de redução turbidimétrica por mg de proteínas do veneno bruto.

4.3. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE)

4.3.1. ELETROFORESE EM CONDIÇÕES DESNATURANTES (PAGE-SDS) (LAEMMLI, 1970).

Foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de agentes desnaturantes (SDS) nas concentrações de 14% para o gel de separação e 5% para o gel de empilhamento (protocolo vide anexo I), para estimativa dos pesos moleculares das proteínas contidas nas peçonhas. As amostras foram dissolvidas em água desionizada com 50% de tampão da amostra (Tris HCl 0,06 M pH 6,8, azul de bromofenol 0,001% (m/v) e glicerol 10% (v/v)), e 10% de β -mercaptoetanol (v/v), sendo posteriormente aquecidas por dois minutos em banho-maria a 100°C. Para a realização deste experimento foi utilizado 5 μ g de proteínas de amostra.

4.3.2. CONDIÇÕES NATIVAS EM pH ÁCIDO

Seguindo a técnica descrita por Reisfeld et al. (1962) com algumas modificações. O gel foi preparado a 10% (protocolo vide anexo I) e 5 μ g das amostras protéicas foram dissolvidas em 50 μ L de tampão β -alanina e ácido acético 0,35 M, pH 4,3 diluído 10 vezes e 10 % de glicerol. A fucsina básica foi utilizada como indicador de migração.

4.3.3. CONDIÇÕES NATIVAS EM pH ALCALINO

A eletroforese seguiu a técnica descrita por Laemmli (1970) e Davis (1964), com algumas modificações. O gel foi preparado a uma concentração de 10% (protocolo vide anexo I), e as amostras contendo cerca de 5 µg de proteínas foram dissolvidas em 50 µL tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,8, contendo glicerol a 10 %.

4.3.4. REVELAÇÃO E SECAÇÃO DOS GÉIS

Após corrida, os géis foram mergulhados em uma solução fixadora (metanol 50%; ácido acético 10%) por 5 minutos, sendo posteriormente corados com Coomassie Brilliant Blue R-250 0,1% (m/v), dissolvido em metanol-água-ácido acético (30:60:10 v/v). A seguir foram descorados em água-etanol-ácido acético (30:10:60 v/v) e fixados em solução de ácido acético a 7%. Posteriormente os géis foram secos em papéis celofane ligeiramente umedecidos em água.

5. RESULTADOS

5.1. ELETROFORESES:

As figuras 1, 2, e 3 mostram os perfis eletroforéticos das três peçonhas estudadas. Na figura 1, as peçonhas foram submetidas à corrida em SDS-PAGE à 14%. Nota-se uma maior semelhança entre o perfil eletroforético proteico apresentado pelas peçonhas botrópicas, assim como uma clara diferenciação entre os perfis botrópicos e o perfil crotálico. As figuras 2 e 3 representam, respectivamente, a eletroforese em condições ácidas e a eletroforese em condições básicas. O perfil das proteínas de caráter ácido foi bastante diferenciado nas três peçonhas, e o perfil das proteínas de caráter básico foi mais semelhante entre as peçonhas botrópicas, sendo que a peçonha crotálica apresentou três proteínas de caráter extremamente básico, não observados nas duas outras peçonhas (indicadas pela seta).

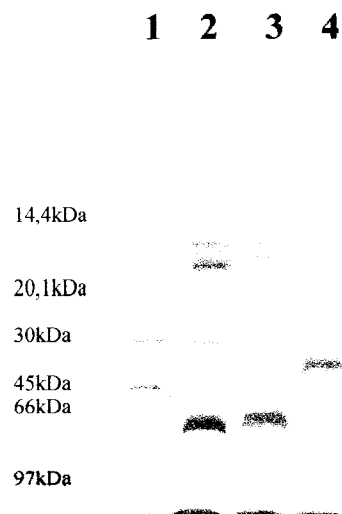


Figura 1: Eletroforese em gel de poliacrilamida à 14% na presença de agentes desnaturantes (PAGE-SDS) realizada a concentração de 14%. **1.** Padrão de massa molecular (97kDa, 66kDa, 45kDa, 30kDa; 20,1kDa- 14,4kDa) **2.** VB de *Bothrops moojeni* **3.** VB de *Bothrops neuwiedi pauloensis* **4.** VB de *Crotalus durissus* sp.



Figura 2: Eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas básicas na ausência de agentes desnaturantes realizada a concentração de 10% em tampão β -alanina pH 4,3 **1.** VB de *Bothrops moojeni* **2.** VB de *Bothrops neuwiedi pauloensis* **3.** VB de *Crotalus durissus* sp.

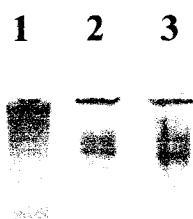
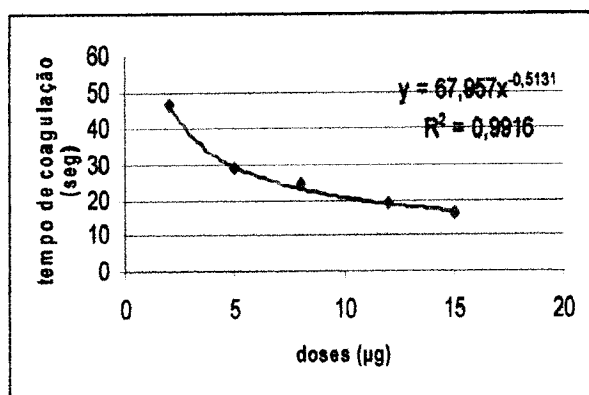


Figura 3: Eletroforese em gel de poliacrilamida à 10% sem agentes desnaturantes para proteínas ácidas em tampão Tris-glicina pH 8,3. Foi aplicado 5 μ g de proteínas das amostras para este experimento. **1.** VB de *Bothrops moojeni* **2.** VB de *Bothrops neuwiedi pauloensis* **3.** VB de *Crotalus durissus* sp.

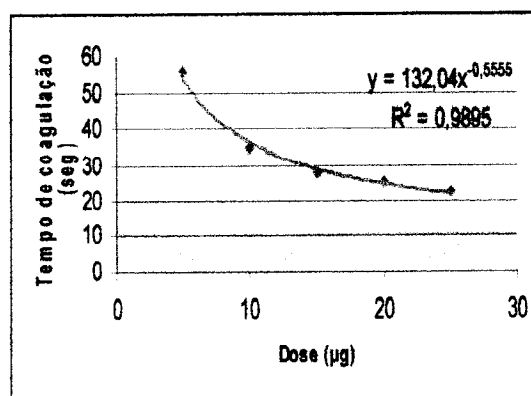
5.2. ATIVIDADE COAGULANTE:

Os testes de coagulação do plasma foram realizados em triplicata segundo o item 4.2.1. A DMC (Dose Mínima Coagulante), ou seja, a dose mínima de proteína capaz de coagular o plasma em 30 segundos foi determinada para as peçonhas brutas em questão. A peçonha de *Crotalus durissus* sp. apresentou a menor dose coagulante com 3,67 µg de proteínas, sendo a peçonha com a mais forte atividade, seguida de *Bothrops moojeni*, com uma DMC de 4,92 µg de proteínas e *Bothrops neuwiedi pauloensis* com uma DMC de 14,42 µg, como mostra a tabela 1. A figura 4 apresenta o comportamento dose dependente das peçonhas de *Bothrops moojeni* (A), *Bothrops neuwiedi pauloensis* (B) e *Crotalus durissus* sp. (C).

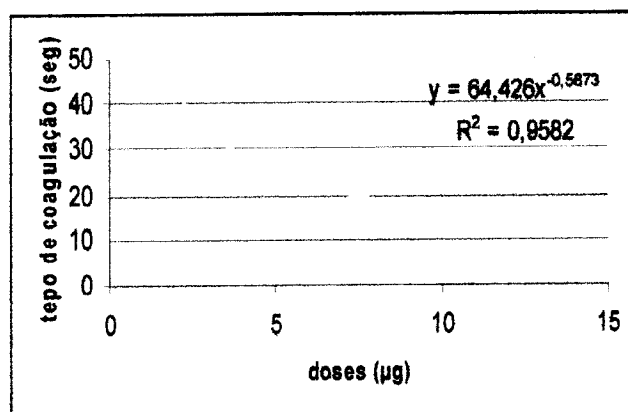
O teste estatístico t foi aplicado aos tempos correspondentes às doses de 5 µg de proteínas das três peçonhas para determinar se a atividade coagulante é significativamente diferente entre as peçonhas. O teste indicou significativa diferença entre as médias dos tempos de *Bothrops neuwiedi pauloensis* e *Bothrops moojeni*, *Bothrops neuwiedi pauloensis* e *Crotalus durissus* sp., e *Bothrops moojeni* e *Crotalus durissus* sp.



(A)



(B)



(C)

Fig 4. Atividade coagulante dose dependente. Cada ponto do gráfico representa a média aritmética de 3 ensaios. Para cada ensaio, amostras de diferentes doses de proteínas para um volume de 20µL completado com solução salina foram adicionadas a 100 µL de plasma bovino e incubados a 37°C no coagulômetro até a detecção da formação das primeiras redes de fibrina pelo aparelho. (A) *Bothrops moojeni*, (B) *Bothrops neuwiedi pauloensis* e (C) *Crotalus durissus* sp.

5.3. ATIVIDADE HEMORRÁGICA:

A atividade hemorrágica foi realizada de acordo com o item 4.2.4. e os testes foram feitos em triplicata. As peçonhas de *Bothrops moojeni* e *Bothrops neuwiedi pauloensis* apresentaram uma dose mínima hemorrágica (DMH) de 1,43 e 3,79 µg de proteínas respectivamente, indicando uma maior atividade hemorrágica para a peçonha de *Bothrops moojeni*, seguido da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis*. A peçonha de *Crotalus durissus* sp. não apresentou atividade hemorrágica quando testada para doses de até 15 µg de proteínas. A fig.5 mostra os halos hemorrágicos obtidos na aplicação de 15 µg de proteínas para *Bothrops moojeni* (A), *Bothrops neuwiedi pauloensis* (B) e a ausência de halo para *Crotalus durissus* sp. (C). A figura 6 apresenta o comportamento dose dependente para as atividades hemorrágicas das peçonhas de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (A) e *Bothrops moojeni* (B). Na tabela 1 estão expressos os valores de DMC e DMH obtidos para cada peçonha.

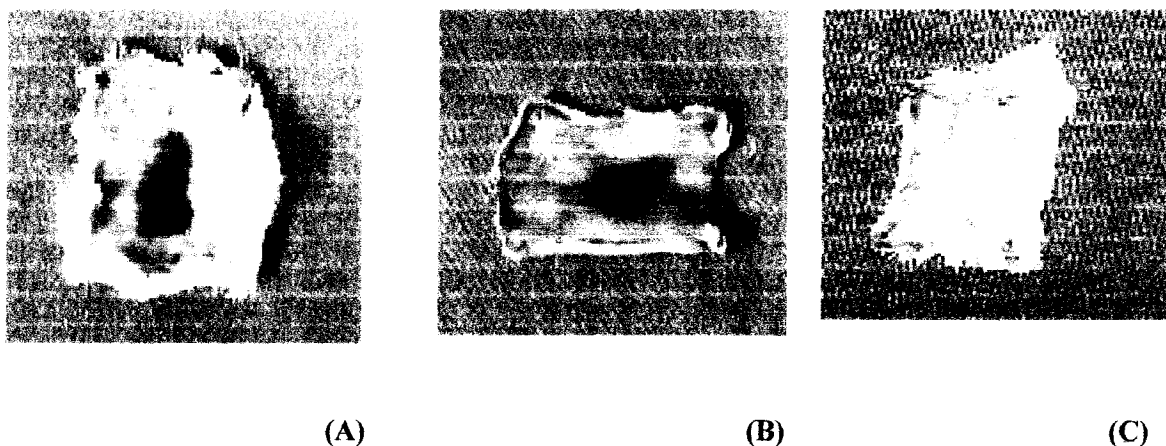
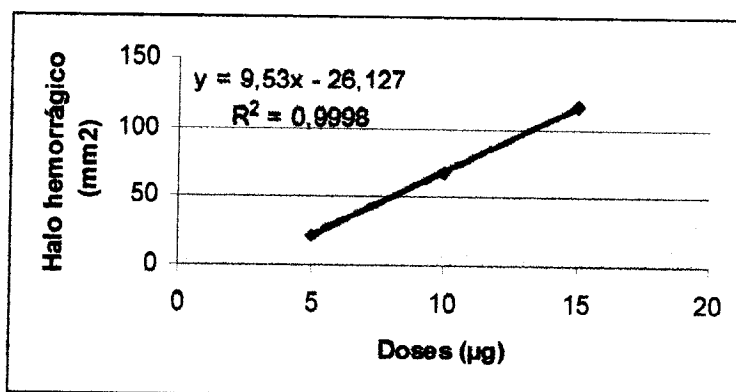
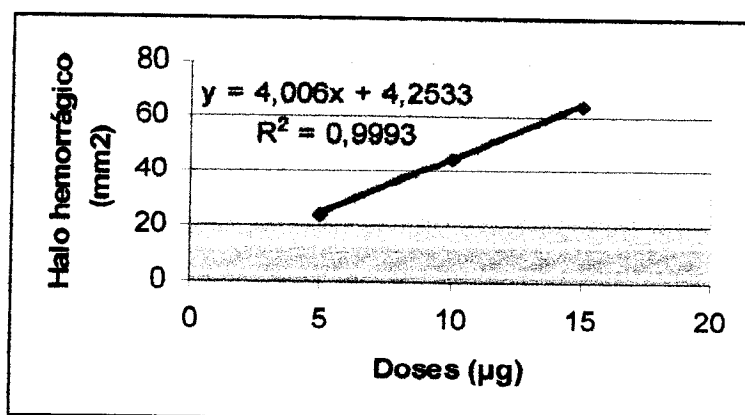


Fig 5. Hemorragia causada por venenos brutos injetados intradermicamente no dorso de camundongos swiss machos após 3 horas de inoculação. (A) *Bothrops moojeni* (B) *Bothrops neuwiedi pauloensis* (C) *Crotalus durissus* sp.



(A)



(B)

Fig 6. Atividade hemorrágica dose dependente das peçonhas de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (A) e *Bothrops moojeni* (B). Os halos hemorrágicos intradérmicos referentes a 5, 10 e 15 µg de amostra inoculada foram medidos em dois ângulos retos, e cada ponto representa a média aritmética de três ensaios realizados para cada dose.

Tabela 1. Tabela comparativa das mínimas doses coagulante (DMC) e mínimas doses hemorrágicas (DMH) das três peçonhas estudadas.

Peçonha	<i>Bothrops moojeni</i>	<i>Bothrops neuwiedi pauloensis</i>	<i>Crotalus durissus sp.</i>
Atividade			
Dose mínima Coagulante (DMC) ¹	4,92 µg	14,42 µg	3,67 µg
Dose Mínima hemorrágica(DMH) ²	1,43 µg	3,79 µg	—*

* Ausência de hemorragia.

¹ Menor dose capaz de coagular o plasma bovino em 30 segundos.

² Menor dose capaz de produzir um halo de 10 mm² de diâmetro

5.4. ATIVIDADE FIBRINOGENOLÍTICA:

A fig 7 apresenta os resultados para a atividade fibrinogenolítica de cada peçonha ensaiada, expressos por eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% na presença de agentes desnaturantes (SDS-PAGE). A peçonha de *Bothrops moojeni* (A) provocou a hidrólise total das cadeias Aα e Bβ do fibrinogênio nos primeiros 5 minutos iniciais de reação; a peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (B) também foi capaz de hidrolisar totalmente a cadeia Aα do fibrinogênio nos primeiros 5 minutos de reação, mas a cadeia Bβ foi totalmente degradada somente com 30 minutos de reação. Para a peçonha de *Crotalus durissus sp.* (C) a degradação total das cadeias Aα e Bβ só ocorreu após 60 minutos de reação. A cadeia γ não sofre hidrólise em nenhum dos casos estudados.

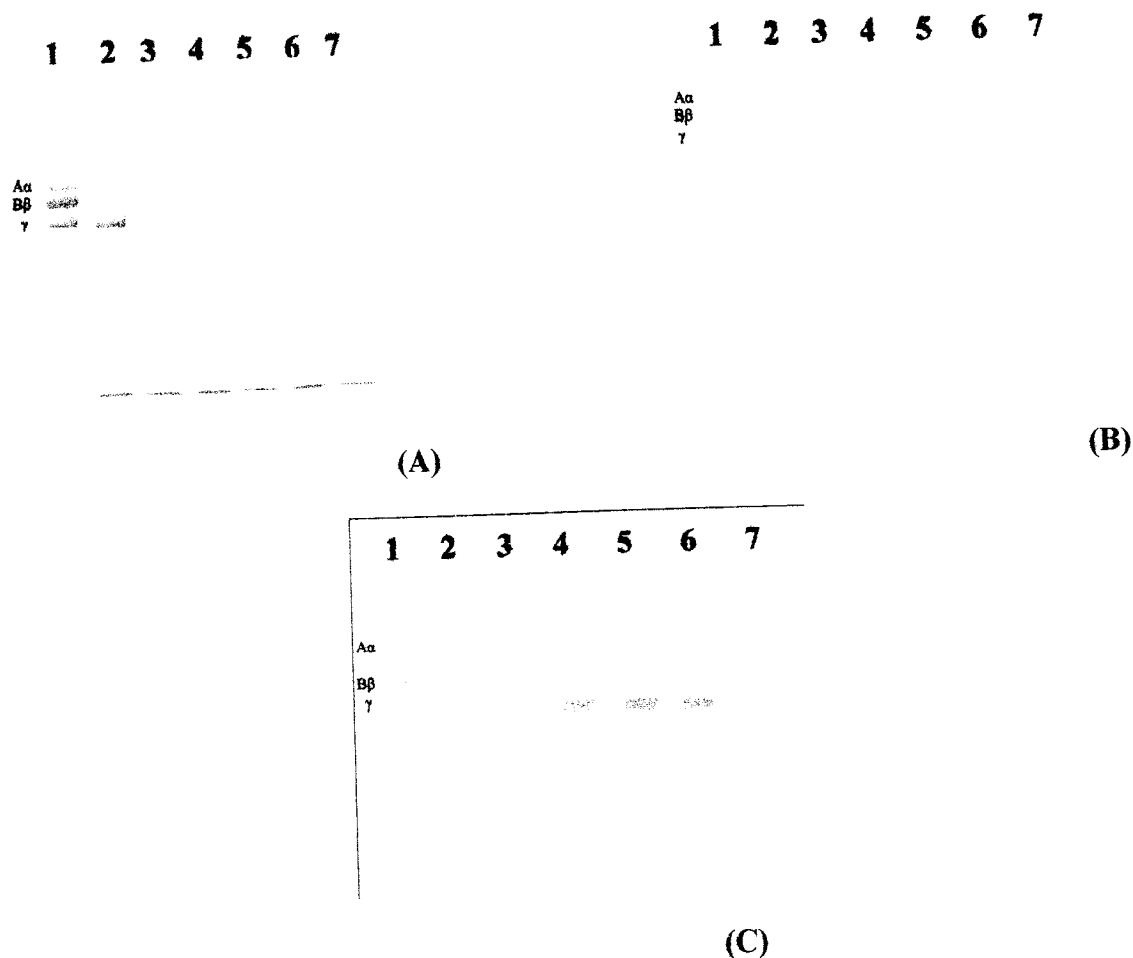


Figura 7. Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes (PAGE-SDS) à 14% dos produtos de digestão do fibrinogênio bovino pelas peçonhas brutas estudadas.

Figura A
Fibrinogênio incubado com
peçonha bruta de *Bothrops*
moojeni por:
2- 5 minutos
3- 15 minutos
4- 30 minutos
5- 45 minutos
6- 60 minutos
7- Peçonha bruta

Figura B
Fibrinogênio incubado com
peçonha bruta de *Bothrops*
neuwiedi pauloensis por:
2- 5 minutos
3- 15 minutos
4- 30 minutos
5- 45 minutos
6- 60 minutos
7- Peçonha bruta

Figura C
Fibrinogênio incubado com
peçonha bruta de *Crotalus*
durissus sp. por:
2- 5 minutos
3- 15 minutos
4- 30 minutos
5- 45 minutos
6- 60 minutos
7- Peçonha bruta

5.5. ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA:

As três peçonhas testadas apresentaram atividade fosfolipase A₂, porém a peçonha de *Bothrops moojeni* apresentou uma maior atividade de degradação de fosfolipídios com uma atividade específica de 122 unidades/mg/min, seguida de *Bothrops neuwiedi pauloensis* com uma atividade específica de 111 unidades/mg/min. A peçonha de *Crotalus durissus* sp. apresentou a menor atividade com 36,42 unidades/mg/min. A figura 8 compara a atividade fosfolipásica das três peçonhas testadas.

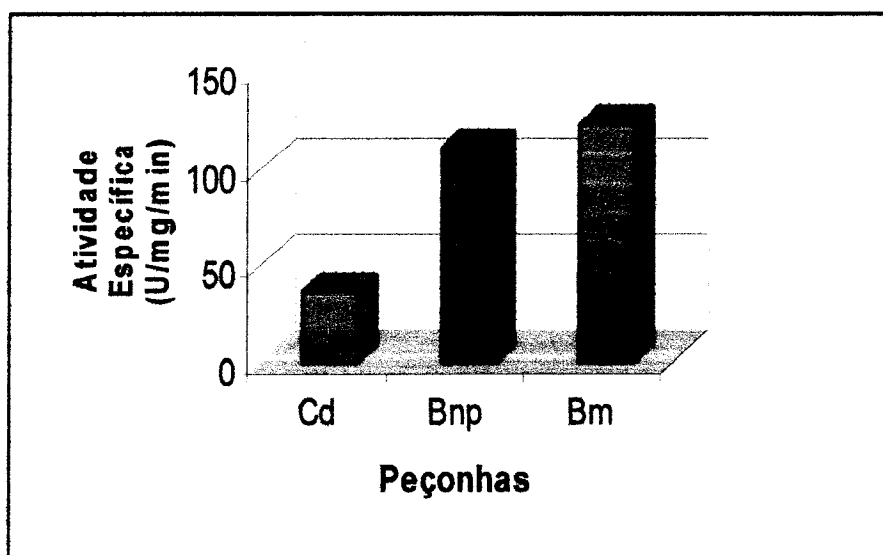


Fig 8. Atividade fosfolipásica das peçonhas de *Crotalus durissus* sp. (Cd), *Bothrops neuwiedi pauloensis* (Bnp) e *Bothrops moojeni* (Bm). Os resultados representam uma média aritmética de três ensaios. Para cada ensaio foi utilizado como substrato 15 mL de suspensão aquosa de gema de ovo contendo 1 mL de deoxicolato de sódio a 0,03M e CaCl₂ 0,6M em pH 8,0.

5.6. ATIVIDADE HEMOLÍTICA INDIRETA:

A figura 9 representa a atividade hemolítica indireta causada por amostras de 10 μ g das peçonhas de *Bothrops moojeni*, *Bothrops neuwiedi pauloensis* e *Crotalus durissus* sp. A peçonha de *Crotalus durissus* sp., apesar de apresentar baixa atividade hemolítica, manteve o halo hemolítico quase constante no decorrer do experimento. A peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* apresentou baixa atividade nos dois primeiros intervalos de tempo, porém, com 24 horas tal atividade mostrou-se intensa. A peçonha de *Bothrops moojeni* apresentou uma evolução acentuada nos diferentes intervalos de tempo, e manteve-se com a mais intensa atividade durante o teste, exceto no tempo de 3 horas de reação, cuja atividade foi semelhante à de *Crotalus durissus* sp.

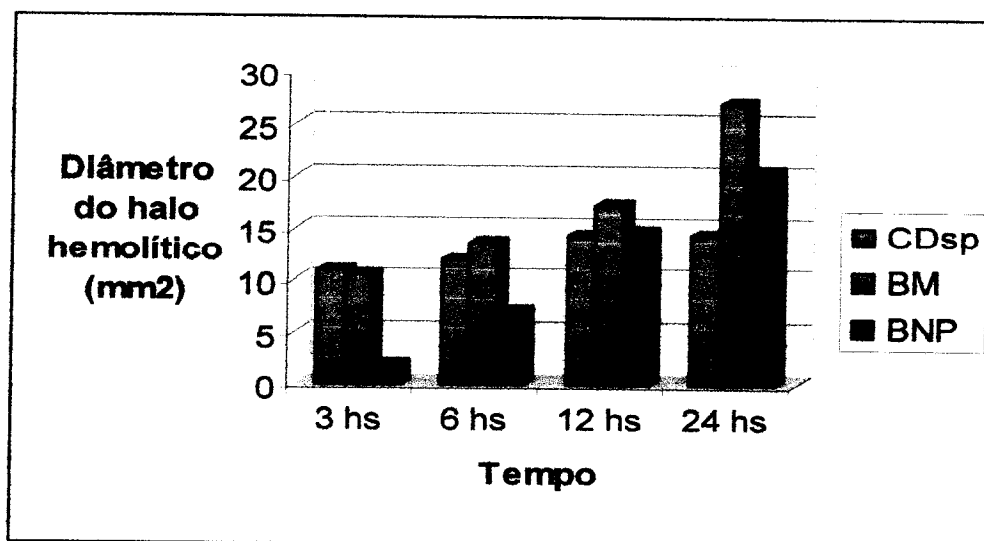


Fig 9. Atividade hemolítica indireta dos venenos brutos de *Crotalus durissus* sp (Cdsp), *Bothrops neuwiedi pauloensis* (Bnp) e *Bothrops moojeni* (Bm). A atividade foi determinada em gel de agarose contendo 0,25g de agarose, 0,005g de azida, 0,25g de CaCl₂ 0,01M, 0,3 mL de gema de ovo e 0,3 mL dos eritrócitos em 25 mL de PBS. Os resultados foram obtidos pela medida do halo hemorrágico em dois ângulos retos, e representam uma média aritmética de três ensaios.

5.7. ATIVIDADE EDEMATOGÊNICA:

Os resultados obtidos para a atividade edematogênica das peçonhas utilizadas são representados na figura 10. A peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* foi capaz de induzir o maior edema de pata, apresentando um pico de atividade após 1 h de aplicação. *Crotalus durissus* sp. e *Bothrops moojeni* apresentaram menor atividade edematogênica respectivamente, com pico de atividade em 30 minutos após a aplicação.

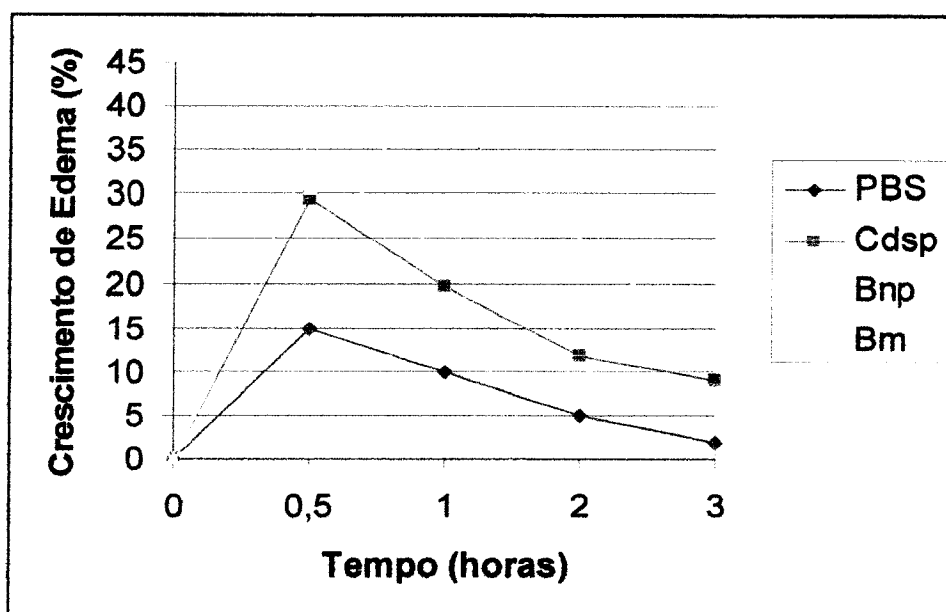
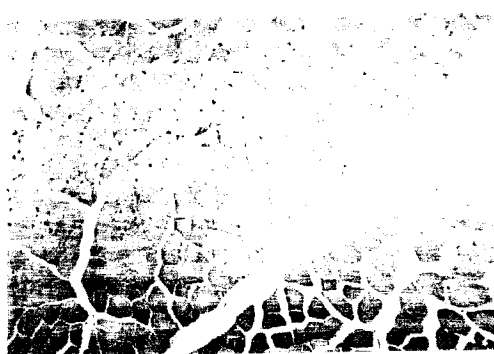


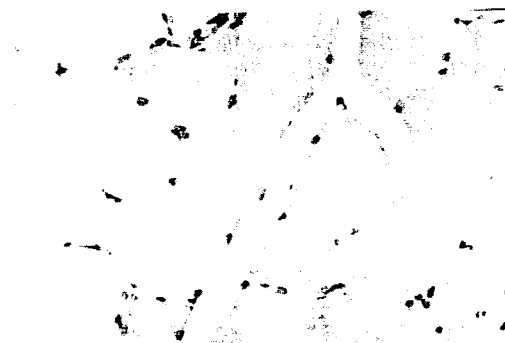
Fig 10. Atividade edematogênica realizada por injeção subplantar na pata de camundongos de 50µL de amostras contendo 10µg de proteínas das peçonhas de *Bothrops moojeni* (Bm), *B. neuwiedi pauloensis* (Bnp) e *Crotalus durissus* sp (Cdsp). Os edemas observados foram medidos nos intervalos de tempos de 30 min, 1, 2 e 3 horas.

5.8. ATIVIDADE MIOTÓXICA POR ANÁLISE MORFOLÓGICA:

As figuras 11, 12, 13 e 14 mostram os resultados obtidos para o teste de atividade miotóxica dos venenos brutos de *Bothrops neuwiedi pauloensis*, *Bothrops moojeni* e *Crotalus durissus* sp. no músculo gastrocnêmio de camundongos. As figuras 11.1 e 11.2 representam cortes transversais de músculos sadios, injetados com salina e utilizados como controle. Na figura 12 observamos os principais efeitos miotóxicos da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis*. Os músculos inoculados com tal peçonha apresentaram um quadro de edema com fibras musculares bastante afastadas e necrosadas, por não ser evidenciado núcleo periférico nas fibras musculares (figuras 12.1 e 12.2). Intensa hemorragia, caracterizada por um grande número de hemáceas presentes entre as fibras musculares também foi observada (figuras 12.3 e 12.4) assim como inflamação (figuras 12.5 e 12.6) pela presença de inúmeros neutrófilos. Os principais efeitos miotóxicos da peçonha de *Bothrops moojeni* estão representados na figura 13. Esta peçonha também causou edema muscular (figuras 13.1 e 13.2) e hemorragia (figuras 13.3 e 13.4), porém tal quadro hemorrágico parece ser mais intenso que no caso anterior. Foi observada também mais intensa inflamação nas fibras musculares com presença de necrose celular (figuras 13.5 e 13.6). Na figura 14 pode-se observar que a peçonha crotálica é responsável por um quadro inflamatório mais acentuado do que os causados pelas peçonhas botrópicas por apresentar infiltrado leucocitário, com necrose e destruição quase total de algumas fibras (Indicado pela seta) e uma quantidade visivelmente maior de neutrófilos entre as células musculares (figuras 14.1 e 14.2). Efeito edematogênico também é observado, porém apresenta-se menos intenso que nos casos anteriormente citados (figuras 14.3 e 14.4).

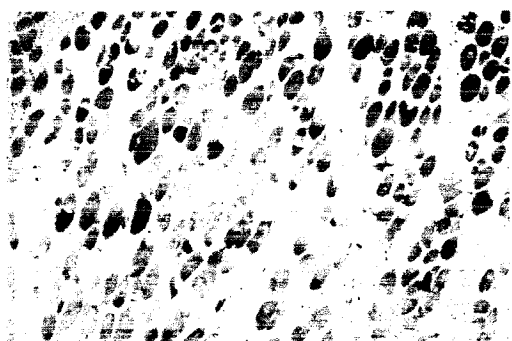


11.1



11.2

Fig 11. Corte transversal de músculo gastrocnêmio de camundongo inoculado com 50 μ L de salina e extraídos após 24 horas, como controle. 11.1. Aumento de 100X. 11.2. Aumento de 400 X.



12.1



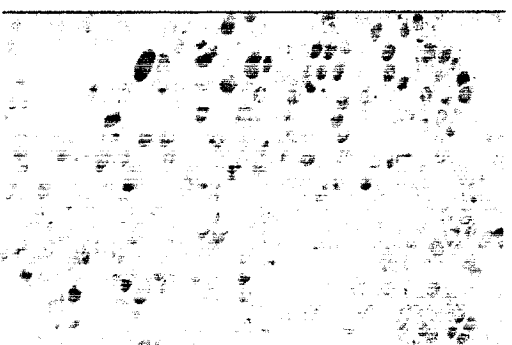
12.2



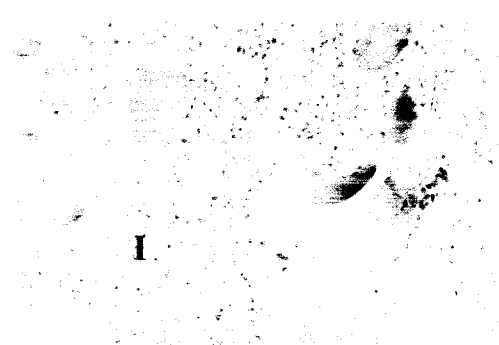
12.3



12.4



12.5



12.6

Figura 12. Corte transversal de músculo gastrocnêmio de camundongos inoculados com 50 µg de VB e extraídos após 24 horas de *Bothrops neuwiedi pauloensis*. Figuras 12.1, 12.3 e 12.4. Aumento de 100X. Figuras 12.2, 12.4 e 12.6. Aumento de 400X .

H: Hemorragia

E: Edema

I: Inflamação

N: Necrose

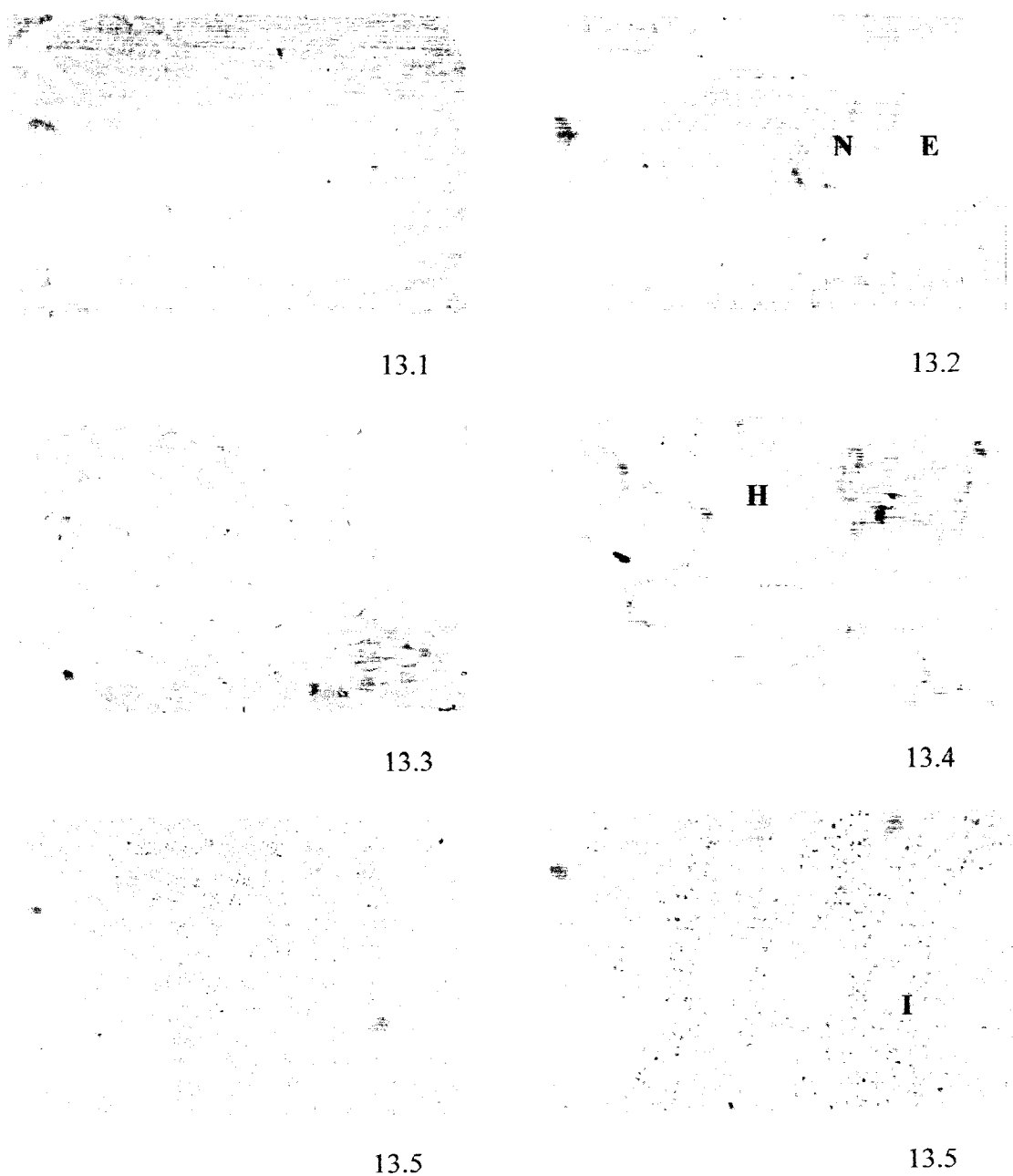


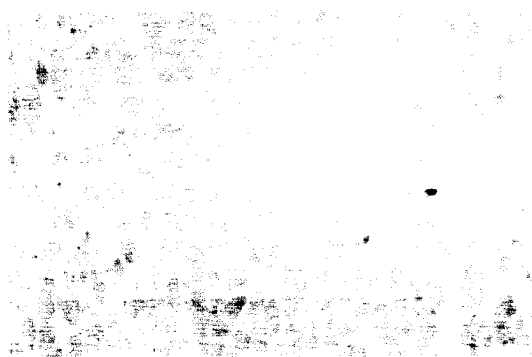
Figura 13. Cortes transversais de músculo gastrocnêmio de camundongos inoculados com 50 µg VB de *Bothrops moojeni* após 24 horas. Figuras 13.1, 13.3 e 13.5. Aumento de 100X. Figuras 13.2, 13.4 e 13.6. Aumento de 400X.

H: Hemorragia

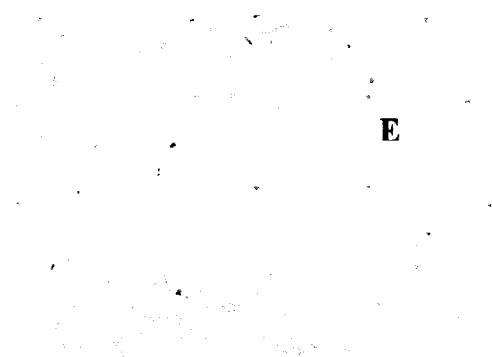
E: Edema

I: Inflamação

N: Necrose



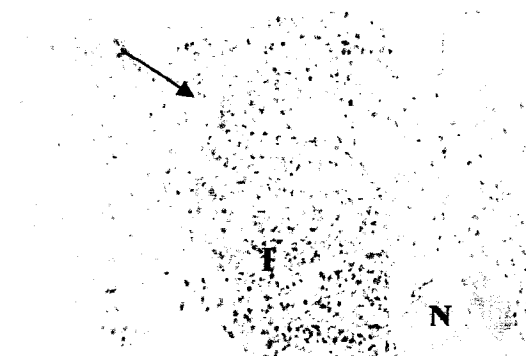
14.1



14.2



14.3



14.4

Figura 14. Cortes transversais de músculo gastrocnêmio de camundonos inoculados com 10 µg de VB de *Crotalus durissus* sp. após 24 horas. Figuras 14.1 e 14.3. Aumento de 100X. Figuras 14.2 e 14.4. Aumento de 400X.

I: Inflamação

E: Edema

N: Necrose

5.9. ATIVIDADE MIOTÓXICA INDIRETA POR DOSAGEM DE CREATINA QUINASE (CK):

A figura 15 apresenta os resultados obtidos para a dosagem de Creatina Quinase (CK) para as três peçonhas estudadas. A peçonha de *Crotalus durissus* sp. apresentou a mais intensa atividade desta enzima, que corresponde a uma alta atividade miotóxica. A peçonha de *Bothrops moojeni* apresentou menor atividade, seguida da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis*. Nos três casos testados, os venenos brutos mostraram um pico de atividade com 3 horas de inoculação.

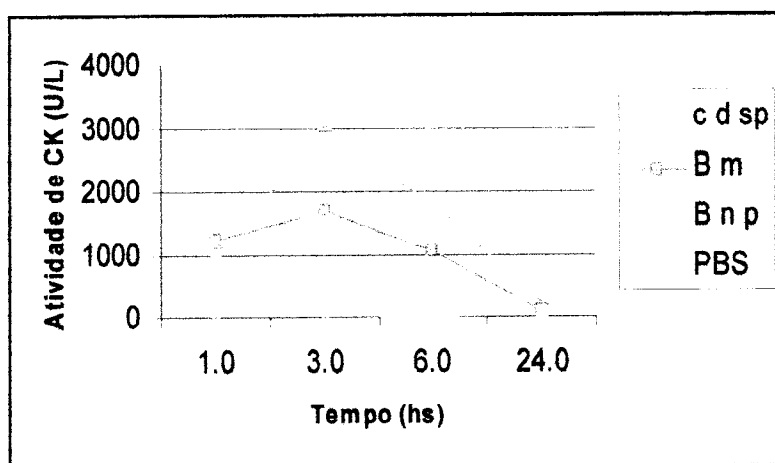
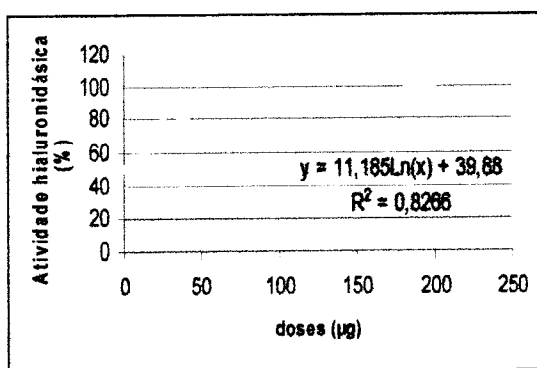


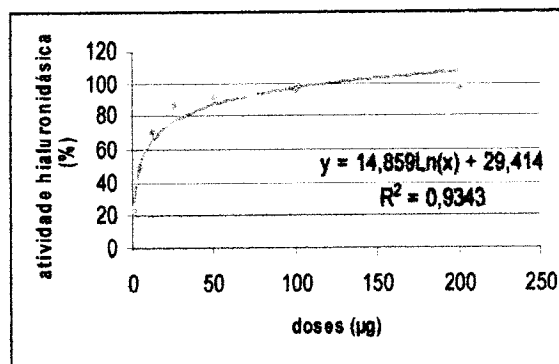
Fig 15. Atividade miotóxica por dosagem de Creatina Quinase (CK) tempo-dependente. Camundongos Swiss foram injetados com 50 µg das peçonhas botrópicas e 10 µg da peçonha crotálica no músculo gastrocnêmio e após diferentes intervalos de tempo, o sangue dos camundongos foram extraídos por punção cardíaca. Para este teste, foi utilizado o Kit de CK NAC Cinético (Bioclin) e os testes foram realizados em triplicata, sendo os resultados obtidos pela média aritmética destes. (Cdsp) *Crotalus durissus* sp. (Bm) *Bothrops moojeni* e (Bnp) *Bothrops neuwiedi pauloensis*.

5.10. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HIALURONIDÁSICA PELO MÉTODO TURBIDIMÉTRICO:

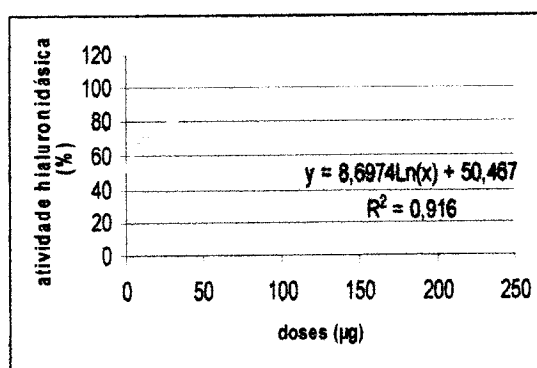
O teste hialuronidásico realizado pelo método turbidimétrico foi testado para algumas peçonhas botrópicas e crotálicas presentes no laboratório e mostrados na figura 16. Devido à falta da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis*, esta não foi testada. O teste turbidimétrico evidenciou uma forte discrepância entre as atividades dos venenos botrópicos e crotálicos. Enquanto os venenos crotálicos apresentaram uma máxima atividade hialuronidásica mesmo nas menores doses testadas (1µg) de cada peçonha (E e F), as peçonhas botrópicas mostraram um comportamento dose resposta (A, B, C e D). A tabela 2 apresenta a atividade hialuronidásica específica obtida para cada peçonha testada. Dentre as peçonhas botrópicas, as peçonhas de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops alternatus* apresentaram as maiores atividades respectivamente. As peçonhas de *Bothrops jararaca* e *Bothrops moojeni* mostraram uma atividade significativamente menos intensa.



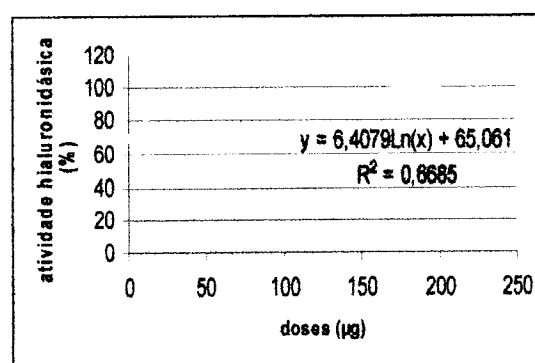
(A)



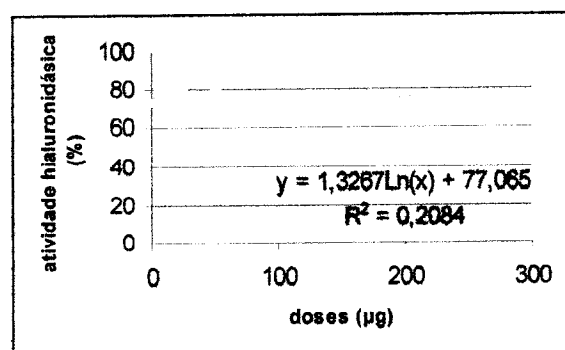
(B)



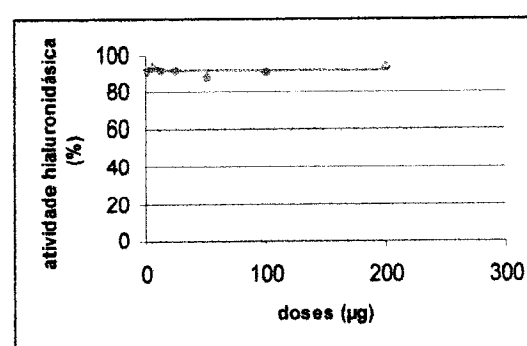
(C)



(D)



(E)



(F)

Fig 16. Atividade hialuronidásica realizada pelo método turbidimétrico. Doses de até 200 μg de veneno bruto foram dissolvidas em tampão acetato de sódio a 0,2M, pH 6,0, contendo NaCl a 0,15M e 25 μL de ácido hialurônico em um volume final de 250 μL . A mistura de reação foi incubada a 37°C por 15 minutos e a reação foi interrompida pela adição de 500 μL de brometo de cetiltrimetilamônio (BCTA) a 2,5% em solução de NaOH a 2% e a densidade óptica de cada amostra foi lida a 400 nm. (A) *Bothrops jararaca* (B) *Bothrops moojeni* (C) *Bothrops alternatus* (D) *Bothrops jararacussu* (E) *Crotalus durissus terrificus* e (F) *Crotalus durissus* sp.

Tabela 2. Atividade hialuronidásica de alguns venenos botrópicos e crotálicos pelo método turbidimétrico.

	Atividade de redução turbidimétrica (μg) ¹	Atividade específica (U/mg/15 min) ²
<i>Bothrops jararaca</i>	39,849	25,09
<i>Bothrops moojeni</i>	29,419	3,399
<i>Bothrops alternatus</i>	0,948	1054,85
<i>Bothrops jararacussu</i>	0,0953	10493,17
<i>Crotalus durissus terrificus</i>	$1,38 \times 10^{-9}$	$7,24 \times 10^{11}$
<i>Crotalus durissus</i> sp.	³ —	³ —

¹ A atividade de redução turbidimétrica foi expressa como a quantidade de veneno (μg) necessária para hidrolisar 50% do ácido hialurônico

² Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para causar uma redução turbidimétrica de 50% do ácido hialurônico no tempo de incubação de 15 minutos a 37°C e a atividade específica são as unidades de redução turbidimétrica por mg de proteínas do veneno bruto

³ Atividade não determinada.

5.11. ZIMOGRAMA DE ATIVIDADE HIALURONIDÁSICA:

O gel para atividade hialuronidásica evidenciou uma atividade significativamente mais intensa nas peçonhas crotálicas (linhas 1 e 3). Dentre as peçonhas bothrópicas, somente a atividade da peçonha de *Bothrops jararacussu* pôde ser visualizada (linha 2). A figura 17 mostra as atividades de 5 µg dos venenos testados.

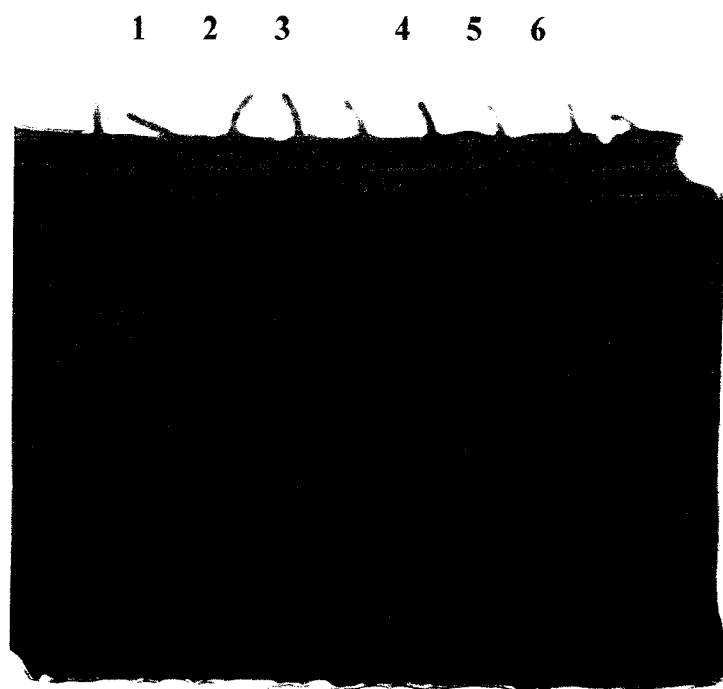


Figura 17. Atividade hialuronidásica determinada em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) a uma concentração de 13,5% contendo 1,48 mL de ácido hialurônico a 1,08 mg/mL. Após a eletroforese o gel foi lavado em tampões fosfato de sódio 0,1M pH 5,8 com concentrações decrescentes de Triton X-100, incubado por 30 minutos a 37°C, lavado duas vezes por 15 minutos em tampão Tris-HCl 0,015 M, pH 7,95 para cessar a reação, e corado com uma solução de 0,1% de Stains-all estoque em formamida pura. 1. *Crotalus durissus* sp. 2. *Bothrops jararacussu* 3. *Crotalus durissus terrificus* 4. *Bothrops jararaca* 5. *Bothrops moojeni* 6. *Bothrops alternatus*.

6. DISCUSSÃO:

Os acidentes ofídicos são de grande relevância clínica devido à alta frequência com que ocorrem, e aos elevados índices de mortalidade que acarretam na ausência de atendimento médico (CHIPPAUX, et al 1991). Nos acidentes botrópicos, a ação da peçonha no organismo humano pode resultar em necrose e hemorragia, e em casos extremos, a amputação do membro afetado. Já nos acidentes crotálicos, os efeitos locais provocados pela picada são pouco evidentes, porém este veneno apresenta intensa ação neurotóxica, miotóxica e nefrotóxica que são responsáveis pela maior frequência de óbitos nesse tipo de acidente (BARRAVIERA, 1994).

A presença e concentração de toxinas na peçonha, assim como sua respectiva atividade biológica é característica de cada espécie (CHIPPAUX et al, 1991). O presente trabalho teve como objetivo caracterizar e comparar as variações interespecíficas das peçonhas de *Bothrops neuwiedi pauloensis*, *Bothrops moojeni* e *Crotalus durissus* sp. por meio da realização de algumas atividades biológicas e enzimáticas.

As peçonhas brutas foram submetidas a eletroforeses em condições nativas e desnaturantes, sendo que o perfil eletroforético de melhor resolução foi em PAGE-SDS. Esta eletroforese evidenciou um perfil fortemente semelhante entre as peçonhas botrópicas, e desta forma podemos supor a presença de diversas isoformas e de proteínas com estrutura, função e massas moleculares altamente similares entre si; sugerindo assim uma grande semelhança e maior variedade entre os efeitos biológicos apresentados por elas, onde se destacam os efeitos sistêmicos como hemorragia de órgãos internos e incoagulabilidade sanguínea (FRANCESCHI, 1990), mas principalmente os locais como edema, inflamação e miotoxicidade. (AMARAL et al, 1986). Por outro lado, a peçonha crotálica apresenta um número reduzido de bandas protéicas com uma única banda majoritária de massa molecular entre 45 e 30 KDa. Esta provavelmente

corresponde à crotoxina, principal componente tóxico da peçonha de *Crotalus durissus* representando cerca de 50% do peso seco desta (FAURE & BON, 1987 apud MANCIN, 2001), e cujo efeito é predominantemente neurotóxico (VITAL BRASIL, 1996 apud MANCIN, 2001).

Neste trabalho, os venenos que induziram coagulação sanguínea também resultaram na clivagem do fibrinogênio plasmático. A atividade de coagulação do plasma mostrou uma ação acentuada das peçonhas de *Bothrops moojeni* e *Crotalus durissus* sp., sendo que a maior atividade foi encontrada para esta última peçonha. Segundo descrito na literatura, a peçonha de *Bothrops moojeni* apresenta alta atividade coagulante (LEITE, 1991), assim como a peçonha de *Crotalus durissus* (GENÉ et al., 1989). A peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* também foi capaz de coagular o plasma bovino *in vitro*, porém a atividade desta peçonha foi menos intensa quando comparada com as outras.

As três peçonhas estudadas apresentaram atividade fibrinogenolítica, porém a peçonha de *Bothrops moojeni* apresentou maior atividade, degradando as cadeias A α e B β logo nos primeiros cinco minutos de reação. A peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* também apresentou forte atividade fibrinogenolítica, o que evidencia que tal efeito é característico das serpentes do gênero *Bothrops*. A atividade da peçonha de *Crotalus durissus* sp. foi menor em relação à das peçonhas botrópicas. As enzimas hemorrágicas e proteolíticas presentes nas peçonhas de serpentes são responsáveis pela clivagem dos peptídeos A e B do fibrinogênio que promove uma depleção sanguínea destas moléculas responsáveis pela coagulação do sangue. Deste modo o sangue de uma pessoa acometida pela picada de uma serpente que apresente tal atividade, torna-se incoagulável (MARKLAND, 1998).

Nos testes de atividade hemorrágica, somente as serpentes botrópicas causaram hemorragia intradérmica no dorso dos camundongos, sendo que a peçonha de *Crotalus durissus* sp. não apresentou tal atividade para as doses testadas. Dentre as peçonhas botrópicas, a peçonha de *Bothrops moojeni* foi a mais hemorrágica, apresentando uma DMH de 1,43 μ g, enquanto a

peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* apresentou uma DMH de 3,79 µg. As peçonhas botrópicas mostraram uma relação diretamente proporcional entre a dose de peçonha aplicada e a área do halo hemorrágico. Este resultado foi observado também por Kondo et al. (1960) para o veneno de *Trimeresurus flavoviridis*, utilizando coelhos como animais experimentais e determinando um tempo de incubação de 24 horas.

Estes efeitos são resultantes da ação de enzimas proteolíticas denominadas hemorraginas. Estas enzimas são capazes de degradar o colágeno. Sabe-se que o colágeno tipo IV é um componente da lâmina basal que envolve os capilares, desta forma pode-se concluir que a atividade enzimática destas proteases é relevante no processo de dano capilar (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1989). Os fatores hemorrágicos degradam também o fibrinogênio, atuando principalmente nas cadeias Aα e Bβ, assim como outras metaloproteases de peçonhas de serpentes. (MANDELBAUM, 1990). A atividade hemorrágica das peçonhas não pode ser diretamente relacionada com a atividade letal, porém, fatores hemorrágicos certamente agravam os sintomas do envenenamento ofídico por uma ação combinada com outros fatores, ou seja, os distúrbios na coagulação sanguínea e hemorragias em órgãos internos podem resultar em morte da vítima. (GANS, 1978).

A atividade fosfolipase A₂ foi detectada em todas as peçonhas estudadas, sendo que esta atividade foi mais intensa nos venenos de *Bothrops moojeni* e *Bothrops neuwiedi pauloensis*, que apresentaram uma atividade específica de 122 e 111 U/mg/min respectivamente, enquanto a peçonha de *Crotalus durissus* sp. apresentou uma atividade específica com 36,42 U/mg/min.

As fosfolipases A₂ foram identificadas como fatores hemolíticos por Martin (1896 apud GANS 1978), porém, Hughes (1935 apud GANS, 1978) relatou que a atividade de hemólise dos venenos de serpentes nem sempre está relacionada com a ação das fosfolipases A₂. No entanto, outros fatores na peçonha podem agir sinergicamente com essas enzimas. Neste trabalho, os resultados para atividade hemolítica indireta das peçonhas analisadas foi corroborado pelos

neurotóxico da crotoxina surge. Evidências experimentais indicam que as lesões causadas pela crotoxina são as mesmas verificadas pelas fosfolipases A₂, embora sejam mais intensas no segundo caso. (KINI & EVANS, 1987, 1989 apud MANCIN, 2001)

Os testes de miotoxicidade, não somente deram suporte aos resultados da atividade PLA₂, como também nos forneceram outras características interessantes sobre estas peçonhas ofídicas. As peçonhas do gênero *Bothrops* provocaram intensa ação miotóxica por serem capazes de provocar forte hemorragia local, destruição das fibras musculares e por atraírem células imunes para o local da inoculação do veneno resultando em inflamação. O veneno de *Bothrops moojeni* foi o mais severo no desenvolvimento de hemorragia, seguido pelo veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis*, sendo que a peçonha crotálica não resultou em hemorragia muscular, assim como o esperado devido aos resultados anteriormente obtidos. Todas as peçonhas apresentaram intensa formação de edema, necrose das fibras e inflamação muscular, sendo que aparentemente a peçonha de *Crotalus durissus* sp. destacou-se nos últimos dois sintomas.

Homa e Tu (1971 apud GUTIÉRREZ E LOMONTE, 1989) propuseram uma classificação para a atividade de mionecrose induzida por peçonhas ofídicas, baseando-se na morfologia das fibras necróticas 24 horas após a injeção. O tipo “miolítico” foi caracterizado por fibras cujo material miofibrilar aparece agrupado e alternado por espaços vazios no citoplasma. O tipo “coagulativo” de necrose, por outro lado, foi especificado por células cujo material miofibrilar tem uma aparência mais hialina e com distribuição homogênea. O tipo “misto” apresenta tanto as características de tipo miolítico, como do tipo coagulativo. Tomando como base essa classificação, podemos caracterizar a mionecrose causada pelas peçonhas de *Bothrops neuwiedi pauloensis*, e *Bothrops moojeni* como do tipo mista, e para a peçonha de *Crotalus durissus* sp. como predominantemente coagulativa. Porém, tal classificação consiste em uma simplificação de um fenômeno patológico complexo e dinâmico. Quando os danos musculares foram analisados em diferentes intervalos de tempo após inoculação de peçonha de *Bothrops*

asper foi observado que a morfologia das fibras é alterada (GUTIÉRREZ et al., 1984). Nas primeiras três horas de inoculação, o músculo apresentou predominantemente fibras miolíticas, no entanto, após a sexta hora, a grande maioria das fibras foram caracterizadas como coagulativas. Desta forma, concluímos que a resposta muscular à injeção de peçonhas de serpentes se modifica em função do tempo.(GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1989).

O teste de miotoxicidade pelo método indireto (dosagem de CK), evidenciou uma atividade mais destacada da peçonha crotálica, seguida da peçonha de *Bothrops moojeni* e *Bothrops neuwiedi pauloensis*. Podemos supor que tal resultado dê-se a maior inflamação e necrose causada pela peçonha de *Crotalus durissus* sp.

O efeito local de formação de edema foi testado a partir da injeção subplantar da peçonha na pata direita de camundongos, e as peçonhas botrópicas mostraram mais potente atividade edematogênica. A peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* apresentou a mais intensa ação local de formação de edema, seguida da peçonha de *Bothrops moojeni* e *Crotalus durissus* sp. Porém foi observada uma diferença nos picos destas atividades, pois enquanto a peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* se mostrou com maior atividade após 1 h de aplicação, as demais peçonhas apresentaram esse pico de atividade após 30 min. Como previamente citado, este tipo de efeito local é atribuído a uma diversidade de fatores (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1989), tais como toxinas hemorrágicas, toxinas que agem diretamente sobre as células endoteliais dos capilares e vênulas, citotoxinas ou fosfolipases A₂, proteases e componentes do sistema complemento (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1989). Era esperado que a peçonha crotálica apresentasse um efeito edematogênico mais tênue em relação às peçonhas botrópicas, já que ainda não foram isoladas toxinas hemorrágicas de peçonhas de *Crotalus* brasileiras, assim como as fosfolipases A₂ presentes nessas peçonhas estão complexadas com a crotapotina, reduzindo, desta maneira a atividade miotóxica, e a citotoxina presente na peçonha corresponde à crotamina,

porém a participação desta enzima na gênese da mionecrose é duvidosa devido a sua baixa concentração na peçonha (CUPO et al., 1988 apud MANCIN, 2001).

Os resultados desta atividade são compatíveis com o estudo bibliográfico realizado, o qual descreve uma maior ação local por parte dos venenos botrópicos, enquanto a peçonha crotálica apresenta mais intensamente efeitos sistêmico e letalidade ao contrário dos efeitos locais, que geralmente mostram-se fracos ou ausentes.

Os experimentos relacionados com a atividade hialuronidásica foram realizados de forma que fossem o ponto de partida de um novo projeto de mestrado a ser realizado. As peçonhas testadas para essa atividade não correspondem às peçonhas utilizadas nos experimentos anteriores. As peçonhas de *Bothrops moojeni* e *Crotalus durissus* sp. foram mantidas, porém a peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* não foi utilizada por indisponibilidade da mesma. Outras peçonhas presentes no laboratório foram utilizadas de modo que fosse feita uma investigação sobre essa atividade nos venenos disponíveis, uma vez que tal trabalho não havia sido anteriormente realizado.

De uma forma geral, o estudo das peçonhas botrópicas resultou em um comportamento altamente discrepante do comportamento crotálico. Em baixas doses, as peçonhas do gênero *Bothrops* não atingem sua atividade hialuronidásica máxima, fato este que só acontece quando as doses são aumentadas. Por outro lado, as peçonhas do gênero *Crotalus* apresentam atividade máxima mesmo nas menores doses. Esta característica nos impossibilitou de compararmos os dois gêneros estudados, pois quando a atividade específica foi expressa, os valores referentes às peçonhas crotálicas foram extremamente altos em relação aos obtidos para os outros casos estudados, sendo que no caso de *Crotalus durissus* sp. este valor não pôde sequer ser calculado de forma confiável. Desta forma, novos experimentos serão realizados com peçonhas crotálicas, utilizando frações da menor dose para que um perfil mais detalhado da atividade de quebra do ácido hialurônico seja esclarecida.

Girish et al. (2002) e Kudo e Tu (2001) também observaram que a atividade hialuronidásica de serpentes do gênero *Crotalus* era consideravelmente alta, ao investigar esta ação em peçonhas de diversas espécies e gêneros, porém será necessário um estudo mais detalhado. Estes resultados nos auxiliarão na escolha da peçonha mais indicada para ser estudada no trabalho seguinte, assim como nos fornecer dados para realizarmos experimentos mais detalhados e de maior confiabilidade.

Desta forma, experimentos posteriores mais elaborados serão necessários para que possamos obter resultados mais conclusivos.

7. CONCLUSÃO

Conclui-se então que as peçonhas botrópicas apresentaram maior atividade na maioria dos efeitos biológicos testados, sendo que a peçonha de *Bothrops moojeni* apresentou maior atividade nos testes fibrinogenolítico, fosfolipase A₂, hemorrágico, hemolítico e miotóxico direto com exceção da atividade edematogênica, na qual a peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis* teve uma maior ação. Por outro lado, a peçonha de *Crotalus durissus* sp. apresentou menor atividade para estes experimentos realizados, exceto para as atividades coagulantes, nas quais apresentou relevante ação e no teste hialuronidásico, provavelmente por apresentar como efeito mais tóxico e acentuado a neurotoxicidade, que corresponde a uma ação sistêmica, necessitando assim de um fator de espalhamento mais efetivo para que a toxina possa atingir rapidamente seu local de atuação. Estes resultados comprovam que as peçonhas botrópicas apresentam compostos com atividades locais e hemostáticas mais intensas ao se comparar com as peçonhas crotálicas, a não ser pelo resultado obtido no teste de coagulação do plasma. No entanto, esta última é caracterizada por alta letalidade, devido ao efeito neurotóxico, que não está presente nas peçonhas botrópicas. (CHIPPAUX, 1991).

As tabelas 3 e 4 mostram os resultados de todas as atividade biológicas testadas para as três peçonhas em questão. Já a tabela 4 representa as intensidades da atividade hialuronidásicas das peçonhas disponíveis no laboratório.

Tabela 3. Resultados comparativos dos resultados das atividades biológicas obtidos para as peçonhas das três espécies estudadas.

Atividade	Coagulação	Hemorragia	Fibrinogênólise	PLA ₂	Hemólise	Formação de	Miotóxica	Miotóxica
	do plasma					Edema	(Análise	(dosagem
Peçonha							Histológica)	de CK)
<i>B. mojejani</i>	++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++
<i>B. neuwiedi</i>	+	++	++	++	++	+++	+++	+
<i>pauloensis</i>								
<i>C. durissus sp.</i>	+++	(-)	+	+	+	+	+++	+++

+++ Maior atividade ou forte atividade

++ Atividade intermediária ou atividade moderada

+ Menor atividade ou fraca atividade

(-) Ausência de atividade

Tabela 4: resultados comparativos das atividades hialuronidásicas para as peçonhas disponíveis no laboratório.

	Hialuronidase
<i>B. moojeni</i>	+
<i>B. neuwiedi pauloensis</i>	—
<i>B. alternatus</i>	+
<i>B. jararaca</i>	+
<i>B. jararacussu</i>	++
<i>Crotalus durissus terrificus</i>	+++
<i>Crotalus durissus sp.</i>	+++

+++ Maior atividade
 ++ Atividade intermediária
 + Menor atividade
 — Atividade não determinada

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, G.A. Estudos comparativos de atividades biológicas presentes nas peçonhas de algumas serpentes brasileiras: *Bothrops moojeni*, *Bothrops alternatus*, *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus sp.*(Viperidae – Crotalinae). 1995. 44f. Monografia (Especialização) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 1995.
- AMARAL, C. F. S.; REZENDE, N. A. de.; SILVA, O. A. da.; RIBEIRO, M. M. F.; MAGALHÃES, R. A.; REIS, J. dos.; CARNEIRO, G.; CASTRO, J.R.S. Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos bothrópico e crotálico. Análise de 63 casos. **Ver. Int. Méd. Trop.**, v. 28, n. 4, p. 220-227, 1986.
- ASSAKURA, M. T.; FURTADO, M. F.; MANDELBAUM, F. R. Biochemical and Biological differentiation of the lancehead vipers (*Bothrops marajoensis* and *Bothrops moojeni*). **Comp. Biochem. Physiol.** v. 102B, n. 4, p. 727-732, 1992.
- BARRAVIERA, B.. (coordenador). **Venenos animais: uma visão integrada**, 1ª edição. Rio de Janeiro: Ed. De Publicações Científicas. 411p., 1994.
- BJARNASON, J. B.; FOX, J. W.; Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmac. Theor.**, v.62, p.325-372, 1994.
- CEVALLOS, M. A.; NAVARRO-DUQUE, C.; VARELA-JULIA, M.; ALAGON, A. C. Molecular mass determination and assay of venom hyaluronidases by sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel eletrophoresis. **Toxicon.**, v.30, n.8, p.925-930, 1992.
- CHIPPAUX, J. P.; WILLINS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, v. 39, n. 11, p. 1279-1303, 1991.
- CRAMER, J. A.;BAILEY, L. C.;BAILEY, C. A.; MILLER, R. T. Kinetic and mechanistic studies with bovine testicular hyaluronidase. **Biochem. Biophys. Acta.** 1200, p.315-321. 1994.

DAVIS, B. J. Disk eletroforesis II, method and application to serunm proteins. **Ann. NY. Acad. Sci.**, v. 121, p. 404, 1964.

DE HAAS, G. H., et al. Purification and properties of phospholipase A from porcine pâncreas. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 24, p. 103-117, 1968.

EDGAR, W.; PRENTICE, C. R. M. The proteolytic action of ancred on human fibrinogen and it's polipeptide chains. **Tromb. Res.** v. 2, p. 85-89, 1973.

FRANCESCHI, J. P. Systemic activities of *Bothropic* venoms. **Mem. Inst. Butantan.**, v.52, p. 41-42, 1990.

FERRANTE, N. D. Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and hyaluronidase activity. **J. Biol. Chem.** V. 220, p. 303, 1956.

FURTADO, M. F. D.; SANTOS, A. M.; KAMIGUTI, A. S. Age-related biological activiy of south american rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom. **J. venom. Anim. Toxin. Incl. Trop. Dis.**, v. 9, n. 2, p. 186-201, 2003.

GANS, C. **Physiology of the Reptília.** Londres: Academy Press, 1978. v. 12.

GENÉ, J. A.; ROY, A.; ROJAS, G.; GUTIÉRREZ, J. M.; CERDAS, L. Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of costa Rican Crotalinae sanke venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom, **Toxicon**,v.27, n.8, p. 841-848, 1989.

GIRISH, K. S.; JAGADEESHA, D. K.; RAJEEV, K. B.; KEMPARAJU, K. Snake venom hyaluronidase: An evidence for isoforms and extracellular matrix degradation. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 240, p. 105-110, 2002.

GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L.; ODELL, G. V. Pathogenesis of myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin of *Bothrops asper*. **Exp. Molec. Pathol.**, v.40, p. 367-379, 1984.

- GUTIÉRREZ, J. M. Local pathological effects induced by Bothrops snake venoms. **Mem. Inst. Butantan**, v. 52, p. 37-38, 1990.
- GUTIÉRREZ, J. M.; AVILA, C.; ROJAS, E.; CERDAS, L. An alternative *in vitro* method for testing the potency of the polyvalente antivenom produced in Costa Rica. **Toxicon**, v.26, p.411-413, 1988.
- GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B. Local tissue damage induced by Bothrops snake venom. A review. **Mem. Inst. Butantan**, v. 51, p. 211-223, 1989.
- HATI, R.; MITRA, P.; SARKER, S.; BHATTACHARYYA, K. K. Snake venoms hemorrhagins **Clinical Review in Toxicology**. V.29, n. 1, p. 1-19, 1999.
- HAWGOOD, B. J. Crotoxin, the phospholipase A₂ neurotoxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Mem. Inst. Butantan**, v. 52, p. 21-22, 1990.
- HOMSI-BRANDEBURGO, M. I; QUEIROZ, L. S; SANTO-NETO, H; RODRIGUES-SIMIONI, L; GIGLIO, J.R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon** v. 26, p. 615-627. 1988.
- ITZHAKI, R. F.; GILL, D. M. A microbiuret method for estimating proteins. **Analytical Biochemistry**, v. 9, p. 401-410, 1964.
- KINI, R. M.; EVANS, H. J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂. **Toxicon**, v. 27., n. 6, p. 613-635, 1989.
- KINI, R. M.; EVANS, H. J. Effects of snake venom proteins on blood platelets. **Toxicon**, v.28, p.1387-1422, 1990.
- KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. **Toxicon**, v.42, n.8, p. 827-840, 2003.

- KONDO, H.; KONDO, S.; IKESAWA, H.; MURATA, R.; OHSAKA, A. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. **Jpn. J. Med. Sci. & Biol.** V.13, p.43-51, 1960.
- KREIL, G. Hyaluronidase – a group of neglected enzymes. **Protein Sci.** v.9, p. 1666-1669. 1995.
- KUDO, K.; TU, A.T. Characterization of hualuronidase isolated from Agkistrodon contortrix contortrix (Southern copperhead) venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.386., n.2, p.154-162, 2001.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins, during the annembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-689, 1970.
- LEITE, L. C. C.; FURTADO, M. F. D.; CORREIA, T. C.; RAW, I. Characterization of the snake venoms from seven Brazilian species of Bothrops by FPLC Anion-Exchange Chromatography. **Comp. Biochem. Physiol.** v.102b, p. 515-520, 1991.
- LLORET, S.; MORENO, J. J. The edema formation and degranulation of mast ceels by phospholipasse A₂ purified from porcine pancreas and snake venom. **Toxicon**, v. 31, p. 949-956, 1993.
- MANCIN, C. M. **Aspectos estruturais e funcionais da crotapotina nativa e quimicamente modificada.** 2001. 165 f. Tese (Doutorado)- Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2001.
- MANDELBAUM, F. R. Snake venom hemorrhagins. **Mem. Inst. Butantan**, v. 52, p. 35-36, 1990.
- MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v.36, n. 12, p. 1749-1800, 1998.

MEYER, K. Hyaluronidases. In: BOYER, P. D.(Ed.) **The Enzymes**. New York: Academic Press 1971.v.V, p. 307-320.

MOLLIER, P.; CHWETZOFF, S.; MÉNEZ, A. A monoclonal antibody rescognizing a conserved epítoto in a group of phospholipase A₂. **Mol. Immunology**, v. 27, p. 7-15, 1990.

NIKAI, T.; MORI, N.; KISHIMA, M.; *et al.* Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin from the venom of *Crotalus atrox*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 231, p. 309-311, 1984.

OLIVEIRA, F. O. **Purificação e caracterização química parciais de uma enzima proteolítica do veneno de *Bothrops moojeni*(Caissara)**. 1997, 91 f., Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 1997.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Rev. Assoc. Méd. Bras.** v. 47, n. 1, p. 24-29, 2001.

OUYANG, C.; CHE-MING, T.; TUR-FU, H. Characterization of snake venom components acting on blood coagulation and platelet function. **Toxicon**, v.30, n.9, p. 945-966, 1992.

PINHO, F. M. O.; OLIVEIRA, E. S.; FALEIROS, F. Acidente ofídico no estado de Goiás. **Rev. Assoc. Méd. Bras.**, v. 50, n. 1, p. 93-96, 2004.

PUKRITTAYAKAMEE, s.; WARREL, D. A.; DESAKORN, V.; McMICHAEL, A. J.; WHITE, N. J.; BUNNAG, D. The hyaluronidase activities of some Sauthest Asian snake venoms. **Toxicon**, v.26, p.629-637, 1988.

REISFELD, R. A.; LEWIS, V. L.; WILLIWMS, D. E. Disk eletrophoreses of basic proteins and peptides on polyacrilamide gels. **Nature**, v.195, p. 281-283, 1962.

RODRIGUES, V. M. **Isolamento e caracterização química parciais de duas miotoxinas do veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (jararaca pintada)**. 1996, 96 f. Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 1996.

RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; MANCIN, A. C.; FONTES, M. R. M., HONSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R. Geografic variations in the composition of miotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venoms: Biochemical characterization and biological activity. **Com. Biochem. Physiol. [A]**, v. 121 p. 215-222, 1998.

SANO-MARTINS, I. S. Hematological disturbances induced by *Bothrops* venom. **Mem. Inst. Butantan**, v. 52, p. 39-40, 1990.

SANO-MARTINS, I. S.; FAN, H. W.; CASTRO, S. C. B.; TOMY, S. C.; *et al.* Reliability of the simple 20 minute whole blood clotting test (WBCT20) as an indicator of low plasma fibrinogen concentration in patients envenomed by *Bothrops* snake. **Toxicon**, v. 32, n. 9, p. 1045-1050, 1994.

STORER, T. I.; *et al.* **Zoologia geral**. 6. ed. Revista e aumentada. São Paulo: Companhia Editora Nacional (Biblioteca Universitária, série 3, Ciências Puras; v. 8). 2002, 816 p.

TAKAGAKI, K.; NAKAMURA, T.; IZUMI, J.; SAITOH, H.; ENDO, M.; KOJIMA, K.; KATO, L.; MAJIMA, M. Characterization of hydrolisis and transglycosilation by testicular hyaluronidase using ion-spray mass sopectroscopy. **Biochemistry**, v. 33, p. 6503-6507, 1994.

TU, A. T.; HENDON, R. R. Characterization of lizard venom hyaluronidase and evidence for its action as a spreading factor. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.73B, p.377-383, 1983.

XU, X.; WANG, X.; XI, X.; LIU, J.; HUANG, J.; LU, Z. Purification and partial characterization of hyaluronidase from five pace snake (*Angkistrodon acutus*) venom. **Toxicon**. v. 20, p.973-981., 1982.

ANEXO I

1. PROTOCOLO DE PREPARAÇÃO DOS GÉIS DE POLIACRILAMIDA PARA ELETROFORESE COM AGENTES DESNATURANTES (PAGE-SDS).

Soluções Estoques	Gel de Separação (µL)	Gel de Empilhamento (µL)
Tris-HCl 2M pH 8,8	1.170	-
Tris-HCl 2M pH 6,8	-	167
EDTA 200mM	63	27
Acrilamida:bis (30:0,8)	2.920	425
Água desionizada	2.015	1.990
TEMED	7,5	2,5
Persulfato de Amônio (10%)	37,5	18

2. PROTOCOLO DE PREPARAÇÃO DO GEL DE POLIACRILAMIDA PARA ELETROFORESE EM CONDIÇÕES NATIVAS PARA PROTEÍNAS ÁCIDAS (PAGE-ÁCIDA)

Soluções Estoques	Volume (µL)
Tris-HCl 2 M pH 8,8	1175
EDTA mM	63
Acrilamida-Bis (30:0,8)	2092
Água desionizada	2015
TEMED	7,5
Persulfato de amônio (10%)	38

3. PROTOCOLO DE PREPARAÇÃO DO GEL DE POLIACRILAMIDA PARA ELETROFORESE EM CONDIÇÕES NATIVAS PARA PROTEÍNAS BÁSICAS (PAGE-BÁSICA)

Soluções Estoques	Volume (µL)
Solução A*	775
Solução C**	2100
Água desionizada	3375
TEMED	20
Persulfato de amônio (10%)	50

*Composição: KOH 1M (2,85g em 50 ml de água desionizada)

** Composição: 28 g de acrilamida e 0,8 g de bis-acrilamida, diluído com água desionizada para 100 ml.