

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CARACTERIZAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS PRESENTES NA
PEÇONHA DE *Bothrops jararacussu* LACERDA, 1884 (VIPERIDAE-
CROTALINAE): PURIFICAÇÃO PARCIAL DE PROTEÍNAS BIOLOGICAMENTE
ATIVAS.

ANDREIMAR MARTINS SOARES

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

Uberlândia - MG

Dezembro / 1994

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CARACTERIZAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS PRESENTES NA
PEÇONHA DE *Bothrops jararacussu* LACERDA, 1884 (VIPERIDAE-
CROTALINAE): PURIFICAÇÃO PARCIAL DE PROTEÍNAS BIOLOGICAMENTE
ATIVAS.

ANDREIMAR MARTINS SOARES

MARIA INES HOMSI BRANDEBURGO

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

Uberlândia - MG
Dezembro / 1994

**CARACTERIZAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMATICAS PRESENTES NA
PEÇONHA DE *Bothrops jararacussu* LACERDA, 1884 (VIPERIDAE-
CROTALINAE): PURIFICAÇÃO PARCIAL DE PROTEÍNAS BIOLOGICAMENTE
ATIVAS.**

Aprovada pela comissão examinadora em 10 / 12 / 94

Maria Inês Honsi Brandeburgo
Orientador

Amélia Hamaguchi
1º Conselheiro

Carlos Alberto de Oliveira
2º Conselheiro

Uberlândia - MG

Dezembro / 1994

Dedico este trabalho,

à Deus, que nos ampara em seus braços todos os dias, orientando a nossa vida com mais amor e humildade

à minha família, pelo apoio e compreensão nos momento mais difíceis, com carinho, respeito e gratidão

à Maria Inês Homsí Brandeburgo pela orientação precisa, mais acima de tudo ... amiga

"Livre é o estado daquele que tem Liberdade...
...Liberdade é uma palavra que o sonho humano alimenta,
e que não há ninguém que explique e ninguém que não
entenda."

Agradecimentos,

Aos conselheiros, Amélia e Carlos, pela colaboração na realização deste trabalho.

Aos professores Fernando A. Bauab, Vera Lúcia de Campos Brites e Nilson P. Silva, pela participação e incentivo a este trabalho.

Aos membros do nosso grupo de pesquisa, Veridiana, Fábio, Márcia, Gislaine e Luciana, pelo apoio, crescimento em conjunto e sincera amizade.

A Tutora e ao grupo PET-BIOLOGIA, pela contribuição na minha formação profissional e pessoal.

Aos amigos Giovani, Keli e Marta pelo convívio e compreensão.

Ao Setor do Banco de Sangue/Fundação Hemominas-UFU, em particular a John P. Nunes, pelo auxílio e troca de aprendizagem.

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

A todos os professores dos Departamentos de Biociências e Ciências Fisiológicas, pelo conhecimento transmitido.

E a todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para a concretização deste trabalho

... obrigado.

SUMARIO

Resumo.....	iv
1. Introdução.....	1
2. Materiais e Métodos.....	19
2.1. Obtenção da peçonha.....	20
2.2. Ensaio Biológico.....	20
2.3. Materiais para cromatografia e eletroforese.....	20
2.4. Preparação e conservação das resinas para cromatografia.....	21
2.5. Filtração da peçonha total de <i>Bothrops jararacussu</i> em gel de Sephadex G-75.....	21
2.6. Cromatografia em resinas de troca iônica.....	22
2.6.1. Cromatografia da fração J1 em Q-Sepharose.....	22
2.6.2. Cromatografia das frações J2 e J3 em SP Sephadex C-25.....	23
2.7. Determinação quantitativa de proteínas.....	24
2.8. Atividades Enzimáticas "in vitro" e "in vivo".....	24
2.8.1. Agregação plaquetária.....	24
2.8.2. Atividade Anticoagulante.....	25
2.8.3. Atividade Coagulante.....	25
2.8.4. Atividade Fosfolipásica (PLA2).....	26
2.8.5. Atividade Hemolítica Direta.....	27
2.8.6. Atividade Hemorrágica.....	27
2.8.6.1. Determinação da dose mínima hemorrágica (DMH).....	28
2.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE).....	28
2.9.1. PAGE em condições desnaturantes (SDS).....	28
2.9.2. Critérios de pureza.....	29
2.9.2.1. PAGE em pH ácido.....	30

2.9.2.2. PAGE em pH alcalino.....	31
2.9.3. Processo de revelação e secagem dos géis.....	32
3. Resultados.....	33
3.1. Primeiro passo para a purificação de proteínas da peçonha de <i>B. jararacussu</i>	34
3.2. Segundo passo para purificação de proteínas.....	45
3.3. Fluxograma da purificação de componentes biologicamente ativos da peçonha de <i>B. jararacussu</i>	54
4. Discussão e Conclusões.....	55
5. Referências Bibliográficas.....	65

RESUMO

As serpentes ou ofídios são répteis desprovidos de membros, que podem ou não ser peçonhentos, com ampla distribuição mundial. Na fauna brasileira ocorrem nove das 11 famílias de serpentes do mundo, dentre as quais, somente as Elapidae e Viperidae são constituídas por espécies peçonhentas. O envenenamento ocasionado por serpentes do gênero *Bothrops* (Viperidae-Crotalinae) caracteriza-se por induzir estado de choque, coagular o plasma sangüíneo, produzir hemorragias e pronunciado efeito local com dor e necrose. Essas alterações clínico-laboratoriais são devidas a ações sinérgicas ou aditivas das diferentes toxinas e enzimas como fosfolipases, miotoxinas e hemorraginas presentes nas peçonhas de serpentes. Assim sendo, este trabalho propõe a determinação das atividades biológicas da peçonha de Jararacuçu e a purificação parcial dos seus componentes ativos. Inicialmente foram realizados ensaios enzimáticos com a peçonha total de Juçu, evidenciando-se a presença das atividades coagulante, fosfolipásica e hemorrágica, e ausência de agregação plaquetária, atividade anticoagulante e hemolítica direta. Foi determinada a dose mínima hemorrágica para a peçonha total, sendo de 53,0 µg de amostra a dose necessária para se produzir um halo hemorrágico de 10 mm². Cerca de 90,1mg desta peçonha foram fracionadas em resina de Sephadex G-75, resultando em um perfil cromatográfico de quatro frações em absorbância de 280 nm e denominadas de J1 a J4. A análise quantitativa de proteínas demonstrou uma recuperação total de 97,0%, sendo 6,0% J1, 31,0% J2, 49,0% J3 e 11,0% J4. A peçonha total de Jararacuçu e suas frações foram monitoradas por eletroforeses em gel de poliacrilamida, observando-se várias

bandas protéicas, evidenciando que as amostras ainda não se encontram puras. Todas as frações obtidas da filtração em Sephadex G-75 induziram a adesão plaquetária espontânea em plasma humano. Os efeitos coagulante e hemorrágico foram detectados somente na fração J1, que foi submetida a um novo fracionamento em Q-Sepharose, obtendo-se três subfrações com uma recuperação de 84,0% em proteínas e a atividade coagulante restrita ao primeiro pico. A atividade hemorrágica foi verificada nas subfrações J1QI e J1QII; sendo a dose mínima hemorrágica para fração J1 de 24,8 µg e para J1QI de 7,14 µg, demonstrando uma purificação parcial das hemorraginas presentes na peçonha de Jararacuçu. A atividade fosfolipásica (PLA2) foi evidenciada nas frações J2 e J3 que apresentaram uma atividade PLA2 específica de 58 e 14 U/mg/min, respectivamente. A fração J2 foi cromatografada em resina de troca iônica SP Sephadex C-25, resultando em sete subfrações. A atividade fosfolipásica restringiu-se à primeira e segunda subfrações, representando uma recuperação de 95,0% em atividade e apresentando um fator de purificação de cerca de três vezes. A fração J3 foi subfracionada em gel de SP-Sephadex C-25, que resultou em cinco subfrações com uma recuperação de 75,0% em proteínas e de 50,0% em atividade PLA2. As duas subfrações com atividade PLA2 representam 8,0% e foram purificadas cerca de duas vezes, em relação à peçonha de Jararacuçu. Estas várias subfrações apresentando atividade fosfolipásica sugerem a presença de isoformas dessa enzima em uma mesma peçonha animal.

1 INTRODUÇÃO

No reino Animalia, em diversos grupos zoológicos, encontramos inúmeros exemplos de ataque, defesa e resposta comportamental baseada em produtos químicos sintetizados pelos organismos.

Dentre estes produtos, os venenos e as peçonhas além de exercerem importante papel na ecologia química, são extremamente relevantes nas áreas médica e médica-veterinária quando comprometem funções vitais humana e dos animais de interesse econômico.

Segundo FREYVOGEL e PERRET (1973 apud FREITAS, 1980), venenos são produtos metabólicos produzidos ou estocados em órgãos que, em condições naturais, afetam o organismo quando ingeridos e podem atuar de modo artificial, por via parenteral. E o termo "peçonha" é empregado para substâncias produzidas em glândulas especializadas associadas a ductos excretores e possuindo estruturas inoculadoras; geralmente atuam por via parenteral e podem ser destruídas quando ingeridas.

As toxinas provenientes dos seres vivos são empregadas na defesa química, podendo variar em sua composição química, sítio e modo de ação e, portanto, classificadas de formas distintas, como é o caso de venenos e peçonhas (FREITAS, 1991).

A confusão entre veneno e peçonha parece nascer da leitura desatenta de livros franceses ou ingleses respectivamente, traduzindo-se por mera analogia eufônica "venin" e "venom" por veneno e não por peçonha, como seria correto. Tanto em francês como em inglês "poison" é que significa veneno (MELLO-LEITÃO, 1948).

Alguns autores, não atribuem diferenças significativas entre os termos "veneno" e "peçonha", sendo empregados indistintamente a nível farmacológico, médico e bioquímico. Mas, sob o ponto de vista biológico, empregado neste trabalho, a peçonha será considerada como uma secreção proveniente de glândulas especializadas e associadas a estruturas inoculadoras.

No grupo dos vertebrados, os répteis ocupam lugar de destaque com ampla distribuição geográfica, habitando continentes e mares. No que se refere as serpentes, que no Brasil são animais comumente chamados "cobra", são inúmeras as espécies peçonhentas embora o maior número corresponda a não peçonhentas.

Da mesma forma que, em sua história evolutiva, desenvolveu-se no homem sobretudo o cérebro, nas serpentes peçonhentas, em milhares de anos, aperfeiçoou-se o sistema inoculador de peçonha. Com o intuito de imobilizar o animal que lhe servirá de alimento, a serpente, ao picar a presa injeta-lhe a dose suficiente para matá-la em poucos segundos, ao mesmo tempo que inicia a sua digestão, e devorá-la sem encontrar resistência. Desta forma é economizada uma preciosa energia para um animal ectotérmico que tem, salvo em casos especiais, a temperatura do meio ambiente, ajudando a limitar seus movimentos ao necessário à defesa, alimentação e reprodução (JARED e FURTADO, 1988).

As serpentes peçonhentas, geralmente, não são agressivas, picando apenas quando molestadas, numa atitude mais de defesa do que de ataque. Numa fração de segundo, ela pica, comprime os músculos que envolvem as glândulas e a peçonha sai, por compressão, pelos canais das presas, penetrando na vítima. Estes canais terminam antes da ponta

do dente, assim, se a picada atingir um osso ou outra parte consistente do corpo da presa, os orifícios dos canais não ficarão obstruídos e a peçonha será injetada (JARED e FURTADO, 1988).

O processo evolutivo, segundo GANS (1978), das toxinas da peçonha de serpentes, envolve três passos:

1. Iniciou-se com uma secreção para lubrificar alimentos, condicionar membranas bucais e facilitar a limpeza dos dentes.
2. Algumas enzimas na secreção lubrificante forneceram uma pré-adaptação para a elaboração de proteínas e polipeptídeos tóxicos, atuantes na imobilização de presas.
3. As secreções tornaram-se mais complexas e aumentaram de volume, facilitando a quebra interna do bolo alimentar, assim como a defesa contra predadores.

As peçonhas de serpentes são, provavelmente, as mais complexas de todos os venenos, contendo vários componentes diferentes. Mais de 90% de seu peso seco é constituído por proteínas, compreendendo grande variedade de enzimas e toxinas não enzimáticas. As frações não protéicas são representadas por carboidratos, lipídeos e compostos de baixo peso molecular como nucleosídeos e diversos íons (FRANÇA e FAN, 1992).

A natureza e as propriedades biológicas dos componentes da peçonha são típicos da espécie animal de onde provieram, enquanto a concentração de cada um deles, intraespecificamente, pode variar com a região geográfica, a idade, o sexo, os hábitos, as mudanças das estações e o tempo decorrido entre uma extração e a imediatamente anterior (FURTADO, 1991; FERREIRA et al, 1992).

Além disso, a reunião de enzimas, substratos eventuais e inibidores em proporções variáveis segundo as condições de coleta antecipa proteólises e inibições enzimáticas numa série desordenada de eventos. Assim, não se pode esperar que as misturas de peçonha obtidas pela reunião das amostras de várias coletas sejam homogêneas (FURTADO, 1991). Em função da variância destes fatores foram observadas diferenças significativas em algumas propriedades, tais como a letalidade, atividades enzimáticas, efeitos locais, padrões eletroforéticos e reações imunológicas (MILTON, 1975; GUTIÉRREZ e CHAVES, 1980).

Na fauna brasileira ocorrem representantes de nove das 11 famílias de serpentes do mundo, dentre as quais, somente as Elapidae e Viperidae são constituídas por espécies peçonhentas.

No Brasil, a família Elapidae é conhecida popularmente por corais verdadeiras sendo representadas pelas *Micrurus*, enquanto que a família Viperidae, subfamília Crotalinae compreendem as *Bothrops* (jararaca, jararacuçu, cotiara, etc), *Crotalus* (cascavél) e *Lachesis* (surucucu).

As serpentes da família Viperidae encontram-se distribuídas principalmente na América do Sul, e possuem um "aparelho inoculador" mais eficiente em termos de velocidade e quantidade de peçonha injetada (dentição solenóglifa).

As serpentes do gênero *Bothrops* são encontradas em todo o território nacional, sendo responsáveis pela maioria dos acidentes ofídicos (ROSENFELD, 1971; FERREIRA et al., 1992; RIBEIRO et al., 1993). Segundo os dados do Ministério da Saúde (1990), dos acidentes por serpentes notificados no período de junho de 1986 a dezembro de 1989, 64,78% foram atribuídos as serpentes botrópicas, com letalidade em torno

de 0,6% nos casos tratados.

O envenenamento botrópico caracteriza-se por induzir estado de choque, exercer atividade proteolítica, coagular o plasma sanguíneo, promover alterações cardiovasculares, liberar substâncias farmacologicamente ativas, produzir hemorragias e pronunciado efeito local com necrose tecidual, ocasionando perda de tecido, o que pode levar a uma necessidade de amputação da região afetada (VITAL BRAZIL, 1982; MEBS e OWNBY, 1990).

Essas alterações clínico-laboratoriais, observadas tanto em acidentes humanos como experimentalmente, são devidas a efeitos aditivos ou sinérgicos das diferentes toxinas e enzimas como fosfolipases, hemorraginas e miotoxinas presentes nas peçonhas (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1989; SANCHEZ et al., 1992). As principais toxinas presentes em peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* não são distribuídas igualmente entre as diferentes espécies (FERREIRA et al., 1992).

A hipotensão e o choque são manifestações raras, porém graves do envenenamento por serpentes viperídeas. Em estudos experimentais realizados em cães, a injeção de peçonha botrópica promove imediata queda dos níveis pressóricos e do débito cardíaco, sem alterar a frequência cardíaca (SILVEIRA et al., 1990).

O edema local é uma manifestação típica induzida pela peçonha botrópica. Este efeito, provavelmente, é causado pela combinação de uma variedade de elementos: (1) toxinas hemorrágicas, que rompem a microvasculatura induzindo extravazamento; (2) toxinas que agem diretamente sobre células endoteliais de capilares e vênulas, aumentando sua permeabilidade; (3) citotoxinas ou fosfolipases que induzem

a liberação de compostos farmacologicamente ativos; (4) fosfolipases A2 que liberam ácido araquidônico de fosfolipídeos de membranas celulares, iniciando a síntese de prostaglandinas; (5) proteases que agem sobre o cininogênio do plasma, liberando cininas, que também podem ser ativadas pelo fator XII da coagulação liberado por lesão da microvasculatura; (6) componentes do sistema complemento que participam nas reações inflamatórias (OWNBY, 1982; ROBBINS et al., 1987; GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1989).

Em alguns casos, o edema muito intenso é responsável pelo aumento da pressão hidrostática intersticial em compartimentos musculares, devido à interrupção da circulação arterial, resultando na síndrome compartimental (GUTIÉRREZ, 1990).

A peçonha botrópica possui a capacidade de ativar os fatores da coagulação sanguínea, ocasionando consumo de fibrinogênio e formação da rede de fibrina intravascular; por outro lado, podem causar hemorragia devido a presença de hemorraginas ou fatores hemorrágicos, que são metaloproteases contendo zinco, sendo que muitas possuem cálcio além do zinco.

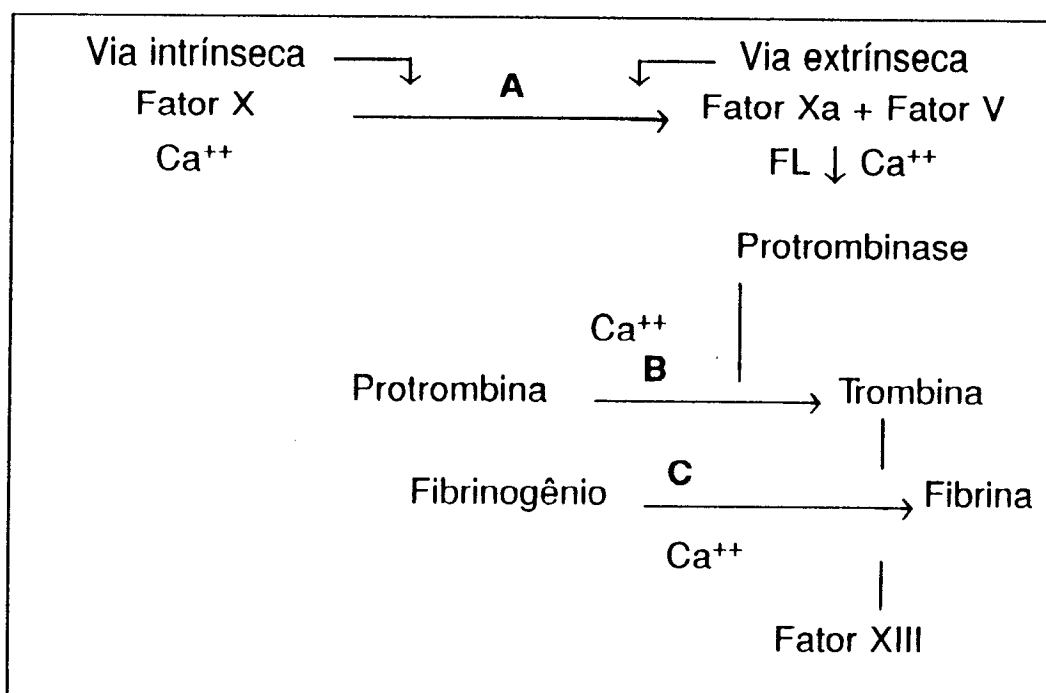
As espécies botrópicas se destacam pela elevada atividade coagulante de suas peçonhas devido principalmente à presença de enzimas que atuam de modo semelhante a trombina. As espécies que apresentam menor atividade coagulante são *B. itapetiningae* e *B. jararacussu* (CHEYMOL et al, 1969).

Segundo TU (1977), os mecanismos pelos quais as peçonhas podem induzir a coagulação sanguínea são: (a) produzir atividade semelhante à tromboplastina; (b) possuir um ativador do fator X; (c) ativar o fator V; (d) ativar a protrombina; (e) possuir atividade semelhante a trombina.

Foram isolados alguns fatores coagulantes de peçonhas botrópicas como uma enzima coagulante de *B. jararaca* (FICHMAN e HENRIQUES, 1962), a batroxobina de *B. atrox* (SEEGERS e OUYNG, 1979) e um fator coagulante de *B. insularis* (SELISTRE, 1985).

HILL-EUBANKS et al (1989) isolaram uma serina protease da peçonha de *B. jararacussu*, com atividade semelhante à trombina ("thrombin-like") que catalisa a clivagem da cadeia pesada do fator VIII da coagulação sanguínea de suínos.

Esquemáticamente, FRANÇA e FAN (1992), apresentaram três pontos principais de ativação da peçonha botrópica sobre a cascata de coagulação (Figura 01).



Esquema 1 — Cascata da coagulação sangüínea com especificação dos locais de atuação do veneno botrópico (A, B, C).

Muitos fatores hemorrágicos (HF) isolados de peçonhas (TABELA I) degradam o colágeno, e é sabido que o colágeno tipo IV é um componente da lâmina basal, que circunda as células endoteliais nos capilares. Provavelmente, as hemorraginas, destruiriam enzimaticamente a membrana basal com subsequente perda da integridade vascular (OHSAKA, 1979). O rompimento da membrana basal se daria a nível das junções entre as células endoteliais formando aberturas, ou poros, onde se daria o extravazamento de eritrócitos e outros componentes do sangue (MANDELBAUM, 1990).

A intensidade da atividade hemorrágica provocada por estas peçonhas, pode também, estar relacionada com sua atividade proteolítica, uma vez que este efeito parece causar lesões nos capilares devido a uma ação direta destas enzimas. Experimentalmente, o progresso da hemorragia é rápido e lesões ocorrem em apenas alguns minutos dependendo da via de administração da peçonha. As injeções intradérmica, subcutânea e intramuscular produzem hemorragias localizadas, enquanto que inoculações intraperitoneal e intravenosa podem causar lesões hemorrágicas sistêmicas em múltiplos órgãos distantes do local de aplicação (MARSH, 1994).

TABELA 1. RELAÇÃO DE FATORES HEMORRÁGICOS DE PEÇONHAS DE SERPENTES BOTRÓPICAS.

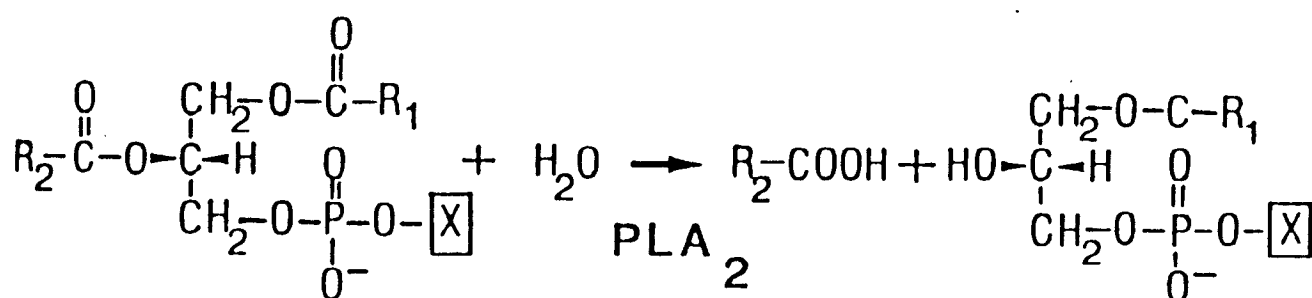
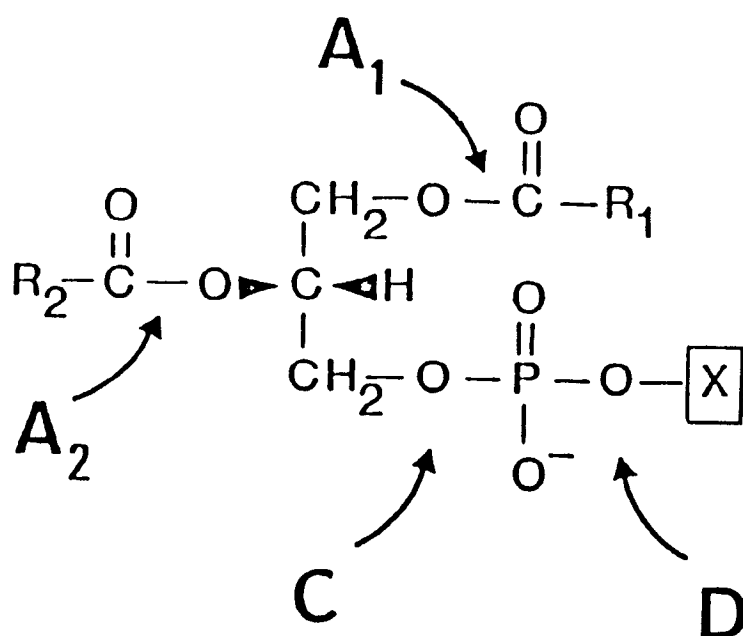
SERPENTES	HEMORRAGINAS	PM aprox. (D)	REFERÊNCIAS*
<i>Bothrops asper</i>	BH1	64.000	1
	BH2	26.000	
	BH3	55.000	
<i>B. insularis</i>	SIII-SpIII-3	26.000	2
	SIII-SpIII-4	28.900	
	SIII-SpIII-5	26.000	
<i>B. jararaca</i>	Bothropasin	48.000	3
	HF2	50.000	
<i>B. moojeni</i>	Protease A	20.400	4
<i>B. neuwiedi</i>	NHFa	46.000	5
	NHFb	58.000	

* 1. BORKOW et al. (1993).
2. ARAÚJO (1988).
3. ASSAKURA et al. (1986).
4. ASSAKURA et al. (1985).
5. MANDELBAUM et al. (1984).

As fosfolipases A2 (PLA2) são enzimas que catalisam a hidrólise da ligação 2-acil éster de 3-n-fosfolipídeo, liberando ácidos graxos livres e lisofosfatídeos (Figura 02). As PLA2s requerem cálcio para estabilização de uma conformação essencial para a função catalítica, e estão presentes em uma ampla variedade de venenos e tecidos de mamíferos. Nas peçonhas de serpentes botrópicas, essas enzimas exercem várias atividades biológicas tais como: miotoxicidade, indução e/ou inibição de agregação plaquetária, efeitos hemolítico, edematogênico e anticoagulante (KINI e EVANS, 1989), e é comum a peçonha de serpentes da mesma espécie conter várias isoformas de fosfolipases A2 (VALIENTE et al., 1992).

FIGURA 2

SÍTIOS DE AÇÃO DAS DIFERENTES FOSFOLIPASES E REAÇÃO
CATALIZADA PELA FOSFOLIPASE A₂.



R₁ e R₂ representam as cadeias alifáticas dos ácidos graxos. X é o grupo polar que em geral é uma colina, uma etanolina, uma serina, um glicerol ou um inositol.

Segundo MEBS e OWNBY (1990), miotoxicidade é definida como uma ação específica dos componentes da peçonha no músculo esquelético, afetando somente fibras musculares sendo que outros tecidos como o conjuntivo e o nervoso permanecem essencialmente intactos. O resultado da ação miotóxica é a mionecrose.

A necrose muscular ou mionecrose pode ser devida à ação direta de miotoxinas ou fosfolipases miotóxicas sobre as membranas plasmáticas de células musculares, ou indireta, como consequência de degenerações vasculares e isquemia, causadas por hemorraginas. As miotoxinas agiriam ao nível da membrana sarcoplasmática, induzindo uma desorganização dos componentes fosfolipídicos que permitiriam a saída de moléculas intracelulares como a creatina e a creatina-cinase (GUTIÉRREZ et al., 1986). Este desarranjo dos componentes fosfolipídicos pode levar a severas alterações na integridade estrutural e funcional da membrana plasmática, com subsequente influxo de íons cálcio, causando a contração de sarcômeros (HARRIS, 1984), ativação de proteases dependentes de cálcio (DUNCAN, 1978), fosfolipases A2 endógenas (TRUMP et al., 1981) e envenenamento das mitocôndrias (GOPALAKRSHNAKONE et al., 1984). A somatória de todas estas alterações moleculares poderia então levar à morte celular.

O efeito miotóxico local predomina na peçonha de serpentes do gênero *Bothrops* enquanto a miotoxicidade sistêmica ocorre nos envenenamentos por *Crotalus*.

Dentre as miotoxinas isoladas de serpentes botrópicas (Tabela II) parece estar surgindo uma nova classe dessas toxinas, que não apresentam atividade PLA2, mas que poderiam ser classificadas como miotoxinas que possuem estrutura de

fosfolipases (HOMSI-BRANDEBURGO, 1987; MESQUITA, 1994).

TABELA II. RELAÇÃO DE MIOTOXINAS DE SERPENTES DO GÊNERO *Bothrops* QUE APRESENTAM OU NÃO ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA (PLA2).

SERPENTES	MIOTOXINAS COM ATIV. PLA2	PM aprox. (D)	REFERÊNCIAS*
<i>B. asper</i>	Miotoxina I	10.700	1
	Miotoxina III	16.000	2
<i>B. atrox</i>	Miotox. de <i>B. atrox</i>	13.500	3
<i>B. godmani</i>	Miotoxina I	14.300	4
<i>B. insularis</i>	Miotox. de <i>B. insularis</i>	15.000	5
<i>B. jararacussu</i>	Bothropstoxina II	15.700	6
<i>B. pirajai</i>	Miotoxina SIV-SP3	14.400	7
MIOTOXINAS SEM ATIV. PLA2			
<i>B. asper</i>	Miotoxina II	13.000	8
<i>B. godmani</i>	Miotoxina II	13.400	9
<i>B. jararacussu</i>	Bothropstoxina I	13.700	6
<i>B. moojeni</i>	Miotoxina I	13.500	3
	Miotoxina II	13.500	
<i>B. nummifer</i>	Miotox. de <i>B. nummifer</i>	16.000	10
<i>B. pirajai</i>	Miotoxina SIV-SP4	14.800	7
	Miotoxina SIV-SP5	15.500	

* 1. GUTIÉRREZ et al (1984).
2. LOMONTE e GUTIÉRREZ (1989).
3. LOMONTE et al (1990).
4. DIAZ et al (1992).
5. SELISTRE et al (1990).
6. HOMSI-BRANDEBURGO et al (1988).
7. MESQUITA (1994).
8. KAISER et al (1990).
9. DIAZ et al (1990).
10. GUTIÉRREZ et al (1986).

Das espécies de *Bothrops* sul americanas, a *Bothrops jararacussu* Lacerda, 1884 com distribuição geográfica desde o sul do estado da Bahia até o nordeste da Argentina (CAMPBELL e LAMAR, 1989; LEINZ, 1989; GRANTSAU, 1991), pode atingir cerca de dois metros de comprimento, sendo conhecida por "patrona" e "jararacuçu" (Figura 03).

RUSSEL (1979) observou que as picadas causadas por *B. jararacussu* produzem edema e mudanças teciduais locais semelhantes às causadas pela peçonha das espécies *Crotalus* norte americanas.

QUEIROZ et al. (1984) estudaram os efeitos locais da peçonha de jararacuçu, após injeção (80 ug) em músculo tibial anterior de camundongo, e verificaram que a peçonha produz necrose da fibra muscular seguida de alterações vasculares e trombose.

Foram isoladas duas miotoxinas de caráter básico da peçonha de *B. jararacussu* (HOMSI-BRANDEBURGO et al., 1988), denominadas de Bothropstoxinas (BthTX) I e II. A BthTX-I é uma proteína monomérica cuja estrutura primária, embora esta toxina não apresente atividade fosfolipásica, revela alto grau de homologia com fosfolipases e também com outras miotoxinas. A BthTX-II apresenta atividade fosfolipásica residual com peso molecular próximo de 15.700 D (HOMSI-BRANDEBURGO, 1987).

Figura 03- Serpente *Bothrops jararacussu* nativa do território Sul americano (Cortesia de Fernando Antônio Bauab, pesquisador do Laboratório de Herpetologia e Animais peçonhentos, Faculdade de Medicina de Catanduva - SP)

A Bothropstoxina I, de peso molecular de 13.700 D, desprovida de atividades fosfolipásica, hemolítica e proteolítica, segundo HELUANY et al (1992) inibe a contração muscular, direta e indiretamente, sem interrupção da estimulação do nervo motor de preparações frênico-diafragma de camundongos

Foi verificado por MELO et al (1993) a formação de um complexo inativo entre a Bothropstoxina I e a heparina, demonstrando que este complexo entre uma miotoxina básica da peçonha de serpente e um poliânion neutraliza o efeito miotóxico.

Devido à enorme complexidade dos efeitos deletérios ocasionados pelo envenenamento botrópico, o presente trabalho teve como finalidade a purificação e a caracterização enzimática parciais das proteínas biologicamente ativas da peçonha de serpente *Bothrops jararacussu* Lacerda (1884), na tentativa de contribuir para a melhor compreensão do complexo mecanismo de ação dos componentes destas peçonhas sobre os organismos vivos a níveis moleculares e fisiológicos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Obtenção da peçonha

Gentilmente doada pelo prof. Dr. Augusto S. Abe, do Departamento de Biologia da UNESP de Rio Claro.

Após a coleta a peçonha de *Bothrops jararacussu* foi imediatamente dessecada a vácuo em temperatura ambiente e conservado a 4°C.

2.2. Ensaios Biológicos

O plasma sanguíneo e eritrócitos humanos foram doados pelo setor do Banco de Sangue, Fundação Hemominas-Universidade Federal de Uberlândia.

Os camundongos utilizados foram procedentes do biotério da empresa Valeé Nordeste S/A (Uberlândia-MG).

2.3. Materiais para cromatografia e eletroforese

- Sephadex G-75, SP Sephadex C-25 e Q-Sepharose da Pharmacia, Suécia;

- Acrilamida, Bis-acrilamida (N', N'-metilenobisacrilamida), TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilenodiamino), SDS (Dodecil Sulfato de Sódio), Coomassie Brilliant Blue G-250, EDTA (Ácido Etilenodiaminotetracético), B-mercaptoetanol, PSA (Persulfato de Amônio), padrões de peso molecular (Dalton Mark e SDS-6H) procedentes da Sigma Chem. Co., USA.

Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.4. Preparação e conservação das resinas para cromatografia

A princípio a resina foi preparada segundo a indicação do fabricante. Após utilizando-se de um sistema a vácuo e funil de placa sinterizada, as resinas foram recicladas, separadamente, em 350 ml de NaOH 0,1N, abaixando-se o pH das mesmas para sete com exaustivas lavagens com água destilada; repetiu-se a operação com 350 ml de HCl 0,1N, ressuspensando o pH novamente para sete da mesma forma. Finalmente, as resinas foram suspensas em seus respectivos tampões de eluição.

Realizadas as cromatografias, as resinas foram conservadas acrescentando-se azida sódica (1:1000 v/v) no tampão de eluição.

2.5. Filtração da peçonha total de *B. jararacussu* em gel de Sephadex G-75

Cerca de 113,0 mg da peçonha total de Jararacuçu (Juçu) foram dissolvidos em 2,5 ml de tampão bicarbonato de amônio (NH_4HCO_3) 0,05M pH:7,4. Após centrifugação de 1.000 g/10min, uma alíquota do sobrenadante foi retirada para testes enzimáticos e o restante (90,14 mg) foi aplicado a

uma coluna de Sephadex G-75 de 1,3 X 90,0 cm, equilibrada previamente com mesmo tampão. Foram coletadas frações de 5,0 ml num fluxo de 32,0 ml/hora em um coletor BIO-RAD MODEL 2110 a temperatura ambiente. Para cada fração foi feita a leitura de absorbância (ABS) em 280 nm em um espectrofotômetro HITACHI U-2000. O gráfico foi traçado e as frações reunidas foram liofilizadas.

2.6. Cromatografia em resinas de troca iônica

As eluições foram feitas a temperatura ambiente, inicialmente com os tampões de menor concentração, respectivos para cada fração. A seguir iniciou-se um gradiente contínuo de concentração, ligando-se um funil de separação situado em um nível superior contendo o tampão de 1,0M, a um erlemeyer, contendo 150,0 ml do tampão inicial a volume e agitação constantes e diretamente conectado à coluna. Posteriormente o tampão do funil foi substituído pelos tampões de 2,0 e 3,0M.

2.6.1. Cromatografia da fração J₁ de Juçu em gel de Q-Sepharose

Aproximadamente 16,0 mg da fração J₁ liofilizada foram suspensos em 2,3 ml de tampão NH_4HCO_3 0,05M pH:8,0 e apenas 14,0 mg desta solução foi aplicada a uma coluna de Q-Sepharose de 1,3 X 37,0 cm previamente equilibrada com o mesmo tampão da amostra. A eluição foi realizada a temperatura ambiente, inicialmente com o tampão NH_4HCO_3

0,05M pH:8,0, com frações de 3,5 ml em um fluxo de 20,0 ml/hora no mesmo coletor do item 2.5. A seguir iniciou-se um gradiente contínuo de concentração como descrito no item 2.6.

Leituras de ABS das frações foram feitas em 280 nm, o gráfico foi construído, as frações obtidas foram liofilizadas.

2.6.2. Cromatografia das frações J₂ e J₃ de Juçu em resina de SP Sephadex C-25

Uma coluna de 1,3 X 37,0 cm foi preenchida com o gel preparado em tampão acetato de amônio (NH₄Ac) 0,05M pH:6,0 até o equilíbrio do pH e da força iônica, na temperatura ambiente.

As condições de experimento como quantidade de proteínas, fluxo e volume de eluição foram distintas para cada fração (J₂ e J₃) como demonstrado em resultados.

As eluições de ambas as frações foram iniciadas com o tampão NH₄Ac 0,1M pH:6,0 e em seguida realizou-se um gradiente de concentração de 1,0 a 3,0M. Leituras de absorvância foram feitas em 280 nm, traçados os gráficos, as frações obtidas foram liofilizadas. O gradiente de concentração foi estabelecido conforme o item 2.6.

2.7. Determinação Quantitativa de Proteínas

As dosagens de proteínas em soluções contendo de 0,1 a 2,0 mg/ 2,0 ml foram realizadas pelo método do Microbiureto conforme descrito por ITZHAKI e GILL (1964). A curva padrão foi construída com soroalbumina bovina (BSA), considerando-se o seu coeficiente de extinção em 278 nm = 0,666 (DOTY e GEIDUSCHEC, 1953).

2.8. Atividades enzimáticas "in vitro" e "in vivo"

2.8.1. Agregação Plaquetária

Cerca de 10,0 ml de sangue humano citratado colhido em tubo plástico foi centrifugado a 70 g por 10 minutos. O plasma obtido, plasma rico plaquetas (PRP), foi dividido em dois tubos, e um deles foi novamente centrifugado a 4500 g por 15 minutos para se obter o plasma pobre em plaquetas (PPP).

A contagem de plaquetas do PRP foi realizada em aparelho COULTER T-890 e a cada 200 µl de plasma teste (PRP) era feito uma diluição com o PPP, para um volume final de 400 µl de solução teste, a fim de se obter uma concentração de plaquetas em torno de 150 a 200 $\times 10^3$ plaquetas/mm³.

Para o teste de agregação plaquetária espontânea, sem a adição de agregantes, utilizou-se o Agregômetro Zenite Z-1000, calibrando-se o aparelho com 400 µl de PPP. O ensaio foi feito acrescentando-se cerca de 10 µg de proteínas em 400 µl de plasma corrigido em plaquetas, homogeneizado com

uma esfera de chumbo. O aparelho traçou o gráfico da curva percentual de agregação em função do tempo (cinco minutos de reação).

2.8.2. Atividade Anticoagulante

O possível efeito das toxinas sobre o tempo de recalcificação do plasma foi estudado utilizando-se plasma humano citratado e segundo a técnica descrita por ALVARADO e GUTIÉRREZ (1988).

Para este ensaio incubou-se por dez minutos a 37°C, a solução contendo salina ou amostras da peçonha de Juçu (20 µg) em 100 µl de plasma. Em seguida, adicionou-se 20 µl de CaCl₂ 0,25M, cronometrando-se o tempo. Considera-se como tempo de recalcificação o momento em que aparecem as primeiras malhas de fibrina e como incoagulável o plasma que não coagula em até 45 minutos.

2.8.3. Atividade Coagulante

Para este ensaio os plasmas rico e pobre em plaquetas foram preparados como descrito no item 2.8.1.

Amostras contendo cerca de 10 µg de proteínas foram diluídas em solução salina (NaCl 0,9%) e 10µl desta solução foram aplicadas em 100 µl do plasma humano rico ou pobre em plaquetas, incubados em banho-maria a 37°C.

Esta atividade é caracterizada pelo imediato aparecimento da rede de fibrina em comparação com o tempo de coagulação do controle (NaCl 0,9% e CaCl_2 0,25M).

2.8.4. Atividade Fosfolipásica (PLA_2)

Foi determinada por titulação potenciométrica segundo o método descrito por DE HAAS et al (1968). Como substrato foi utilizada uma emulsão de gema de ovo em presença de desoxicolato de sódio 0,03M e CaCl_2 0,6M na proporção, respectiva, de 1,5:1,0:0,1 ml para 10,0 ml de substrato.

A quantidade de amostra ensaiada foi de 15 a 30 μl para a determinação da atividade ao longo do perfil cromatográfico, e de 10 a 20 μg para a atividade PLA_2 específica da peçonha total e suas frações.

Os ácidos graxos liberados enzimaticamente foram titulados com NaOH 0,0935N em pH:8,0 em temperatura ambiente. A atividade PLA_2 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.

2.8.5. Atividade Hemolítica Direta

Esta atividade foi estimada utilizando-se somente eritrócitos lavados conforme GUTIÉRREZ et al (1984). Para o preparo da suspensão de eritrócitos utilizou-se sangue humano citratado colhido por punção venosa. Após a separação do plasma por centrifugação, as hemácias foram lavadas por três vezes com soro fisiológico tamponado com fosfato de sódio 0,01M pH:7,4 (PBS), a 1800 g/10 min e suspensas em PBS a 2,5% (v/v). Para o ensaio cerca de 10 a 20 µg das amostras eram adicionadas em 0,6 ml de suspensão de eritrócitos, completando-se o volume para 3,0 ml com PBS. Para o controle foi preparado um branco que não continha amostra (0% hemólise) e um hemolisado total (100%) colocando-se água destilada no lugar do tampão. Após 30 minutos a 37°C, os tubos foram centrifugados por cinco min em centrífuga de mesa e as absorbâncias dos sobrenadantes foram lidas a 540 nm.

2.8.6. Atividade Hemorrágica

Este ensaio foi realizado segundo método descrito por NIKAI et al (1984). As amostras com cerca de 30 a 100 µg da peçonha total e frações foram diluídas em 100 µl de salina (NaCl 0,9%) e inoculadas por via subcutânea em dorso de camundongos machos ligeiramente anestesiados com éter. Após cinco horas de aplicação, os animais foram sacrificados, as peles removidas e a presença de halos hemorrágicos era indicativo desta atividade.

2.8.6.1. Determinação da Dose Mínima Hemorrágica (DMH)

Atividade realizada como descrito no item anterior. As amostras (30, 50, 70 e 100 µg) foram aplicadas em cerca de dois a três camundongos para cada concentração, sendo os halos hemorrágicos medidos em dois ângulos retos (90°) por meio de um paquímetro. É definido como DMH a mínima concentração de proteínas necessária para produzir um halo com cerca de 10 mm² de diâmetro.

2.9. Eletroforeses em gel de poliacrilamida (PAGE)

2.9.1. PAGE em condições desnaturantes (SDS)

Para se estimar os pesos moleculares das frações foram realizadas eletroforeses em gel de poliacrilamida (PAGE) na presença de agentes desnaturantes (SDS), em gradiente de 12 a 18% em acrilamida.

GEL DE EMPILHAMENTO

SOLUÇÕES ESTOQUE	VOLUME (µl)
Água desionizada	1500,0
Tris-HCl 2,0M pH 6,8	125,0
Acrilamida:bis (30:0,8)	325,0
EDTA 200 mM	20,0
TEMED	2,5
PSA 10,0%	17,5

GEL DE SEPARAÇÃO A 12,0%

SOLUÇÕES ESTOQUE	VOLUME (µl)
Água desionizada	2437,5
Tris-HCl 2,0M pH 8,8	1175,0
Acrilamida:bis (30:0,8)	2500,0
EDTA 200 mM	62,5
TEMED	7,5
PSA 10,0%	37,5

GEL DE SEPARAÇÃO A 18,0%

SOLUÇÕES ESTOQUE	VOLUME (µl)
Água desionizada	1187,5
Tris-HCl 2,0M pH 8,8	1175,0
Acrilamida:bis (30:0,8)	3750,0
EDTA 200 mM	62,5
TEMED	7,5
PSA 10,0%	37,5

2.9.2. Critérios de pureza: condições nativas

Para se monitorar as proteínas quanto ao seu grau de pureza foram realizadas eletroforeses em condições não desnaturantes tanto para proteínas de caráter básico quanto ácido.

2.9.2.1. PAGE em pH ^{ALCALINO} (ácido segundo REISFELD, 1962.)

GEL DE EMPILHAMENTO A 5,0%

SOLUÇÕES ESTOQUE	VOLUME (μl)
Água desionizada	2060,0
Tris-HCl 1,5M pH 6,8	400,0
Acrilamida:bis (30:0,8)	490,0
TEMED	2,0
PSA 10,0%	50,0

GEL DE SEPARAÇÃO A 12,0%

SOLUÇÕES ESTOQUE	VOLUME (μl)
Água desionizada	3600,0
Tris-HCl 1,5M pH 8,8	1065,0
Acrilamida:bis (30:0,8)	3200,0
TEMED	5,0
PSA 10,0%	130,0

A solução do eletrodo superior e inferior é constituída do tampão Tris-Glicina pH 8,3 (0,05M de Tris e 0,038M de glicina). O indicador utilizado para acompanhar a corrida é o Azul de bromofenol, sendo a corrente constante de 20 mA.

As amostras contendo cerca de 30,0 μg de proteínas eram dissolvidas em água desionizada contendo 10,0% de glicerol.

2.9.2.2 PAGE em pH (alcalino) *Ácido SEGUNDO REISFELD, 1962.*

GEL DE EMPILHAMENTO A 2,5%

SOLUÇÕES ESTOQUE	VOLUME (μ l)
Água desionizada	2000,0
Acetato de potássio 1,0N pH 6,8	400,0
Acrilamida:bis (1:0,25)	800,0
TEMED	5,0
PSA (10,0 mg/0,1 ml)	75,0

GEL DE SEPARAÇÃO A 15,0%

SOLUÇÕES ESTOQUE	VOLUME (μ l)
Água desionizada	750,0
Acetato de potássio 1,0N pH 4,3	750,0
Acrilamida:bis (30:0,2)	1500,0
TEMED	50,0
PSA (2,8 mg/ 1,0 ml)	3000,0

A solução do eletrodo era constituída de B-alanina e ácido acético pH 4,3 0,35M, sendo diluída dez vezes no momento de uso.

As amostras foram preparadas conforme descrito no item 2.9.1. O indicador utilizado para acompanhar a corrida era a fucsina, com uma corrente constante de 20 mA.

2.9.3. Processo de revelação e secagem dos géis

Após a eletroforese, os géis foram corados por aproximadamente dez minutos em Coomassie Brilliant Blue G-250 0,1% (p/v) dissolvido em água - metanol - ácido acético (40: 50: 10 v/v) e descorados com água - etanol - ácido acético (60: 30: 10 v/v). Em seguida foram deixados em uma solução de ácido acético a 7,0% por aproximadamente 60 minutos.

Os géis foram secos em papéis celofanes previamente umedecidos com água destilada.

3. RESULTADOS

3.1. Primeiro passo para a purificação de proteínas da peçonha de *Bothrops jararacussu*.

A primeira etapa do fracionamento dos constituintes da peçonha total de Jararacuçu foi a filtração em gel de Sephadex G-75 realizada como descrito no item 2.5. O perfil cromatográfico e a atividade fosfolipásica são mostrados na FIGURA 01, evidenciando-se quatro frações designadas de J1 a J4, que foram reunidas e liofilizadas.

Foi traçada uma curva padrão com a soroalbumina bovina pelo método do Microbiureto, possibilitando determinar as concentrações protéicas das amostras por interpolação dos valores de absorbância nesta reta. O rendimento das amostras e a atividade fosfolipásica específica são expressos na TABELA I, demonstrando que as frações dois e três correspondem a cerca de 80,0% da peçonha total e detêm toda a atividade fosfolipásica.

Os efeitos coagulante, hemorrágico e fosfolipásico causados pelas toxinas foram evidenciados na peçonha total de Jararacuçu, sendo esta desprovida de agregação plaquetária. Após o fracionamento desta peçonha, as atividades hemostáticas como coagulação (FIGURA 02-A) e hemorragia (FIGURA 02-B) estavam presentes apenas na fração J1.

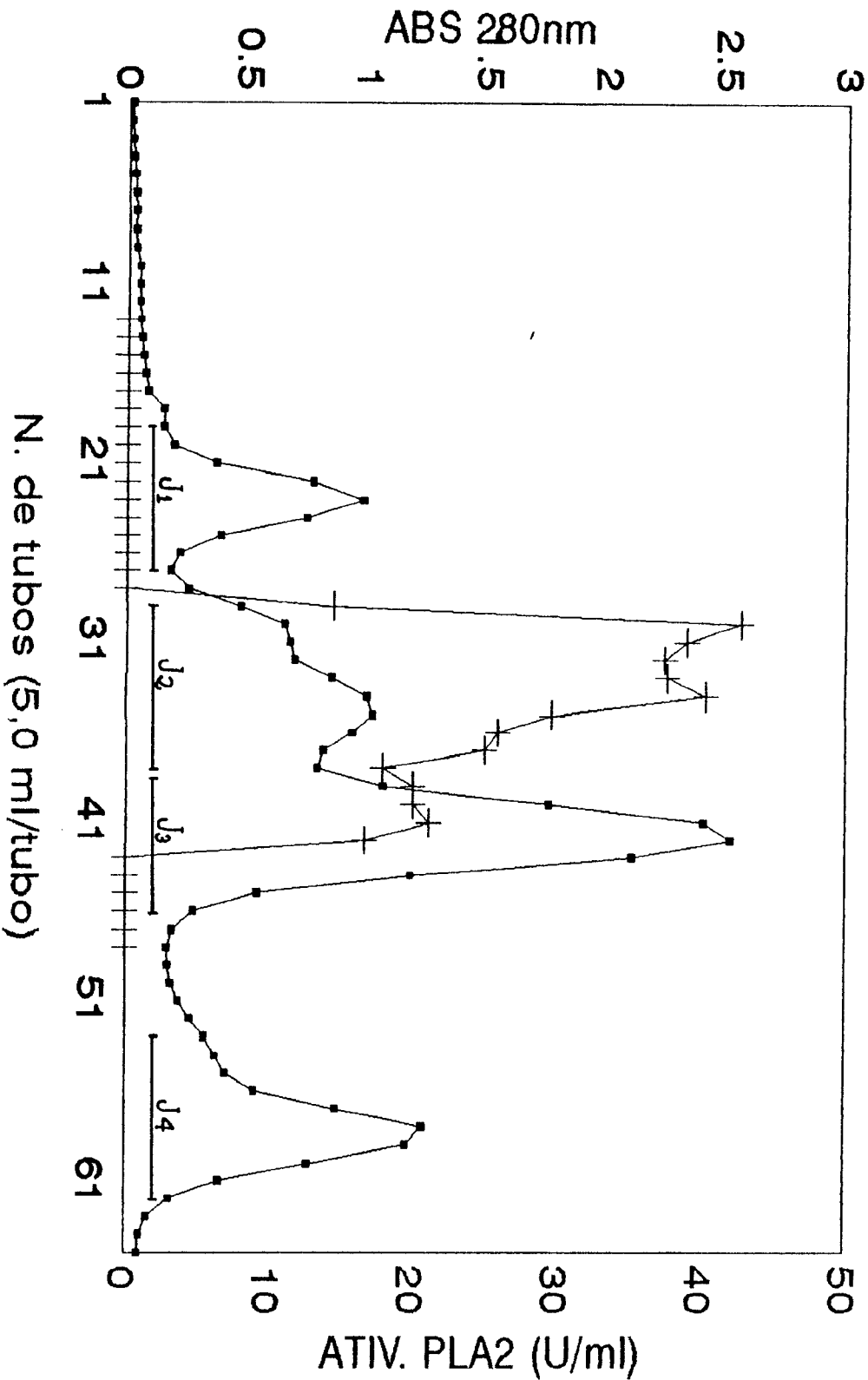


Figura 01. Fracionamento de 90,14 mg da peçonha de Bothrops jararacussu em Sephadex G-75. Condições: Coluna de 90,0 X 1,3 cm, tampão bicarbonato de amônio 0,05M pH 7,4, fluxo de 32,0 ml/hora e temperatura ambiente.

→ ABS 280 nm + Atividade PLA2

TABELA I - Rendimento das frações da peçonha de *Bothrops jararacussu* obtidas por filtração em Sephadex G-75 e atividade fosfolipásica específica (ensaio potenciométrico).

Amostras	Proteínas*		Atividade Fosfolipásica (PLA2)**			
	mg (totais)	% (recup.)	U (totais)	recup. ativ.	A.E. (U/mg)	fat.pur.
Peç. total	90,14	100,0	2.523	100,0	28,0	1,0
J1	4,92	5,5	-	-	-	-
J2	27,60	30,8	1.604	63,5	58,1	2,1
J3	44,52	49,4	623	24,7	14,0	0,5
J4	10,70	11,9	-	-	-	-
Total	87,74	97,6	2.227	88,2		

* Quantificação pelo método do Microbiureto

** Média de três ensaios

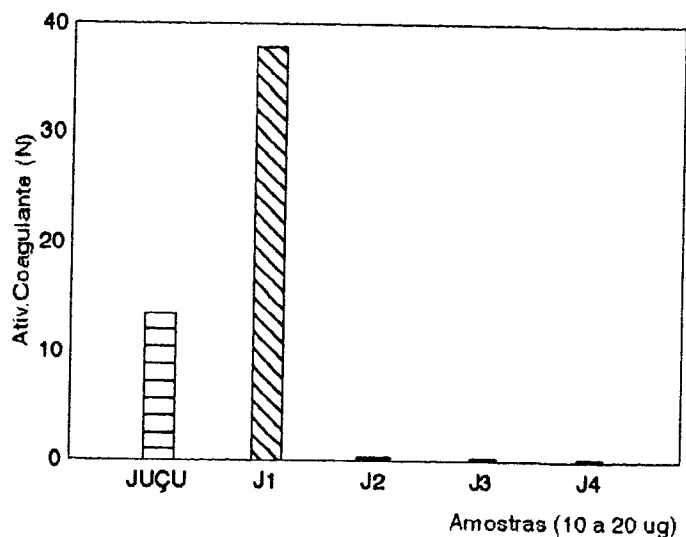


Figura 02-A. Atividade coagulante (PPP) realizada com cerca de 10 a 20 ug de proteínas da peçonha total de Jararacuçu e suas frações obtidas da filtração em Sephadex G-75. O plasma era incubado a 37oC e a partir do instante em que se aplicava as amostras, marcava-se o tempo de coagulação em comparação com um controle contendo CaCl2 0,25M, cujo tempo de coagulação foi de nove minutos.
N é o número de vezes que a amostra aumenta a velocidade de coagulação em relação ao controle.

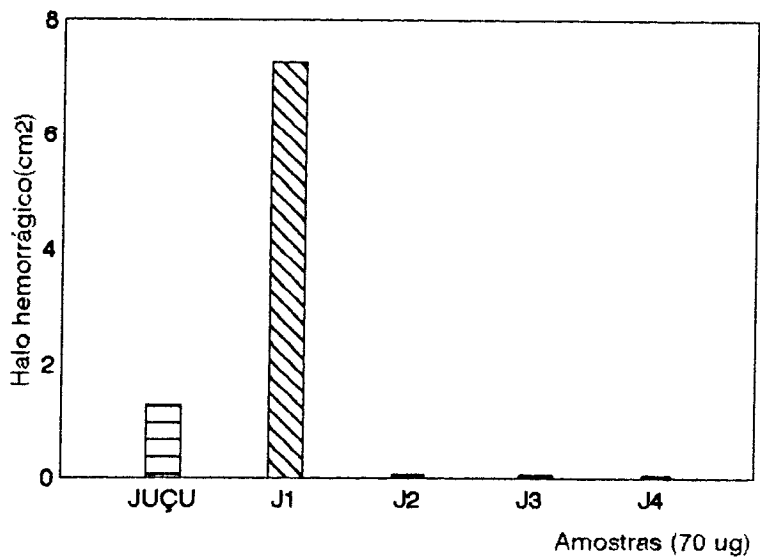
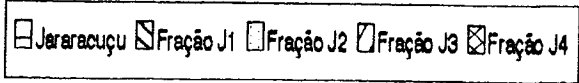


Figura 02-B. Atividade hemorrágica realizada com cerca de 70,0 ug de proteínas da peçonha total de Jararacuçu e suas frações obtidas da filtração em Sephadex G-75. As amostras são dissolvidas em 0,1 ml de solução salina e injetadas subcutaneamente no dorso de camundongos. Posteriormente verificou-se a presença de halos hemorrágicos em comparação com um controle contendo somente salina.



Todas as frações induziram agregação plaquetária espontânea (FIGURA 03). No entanto, a fração J1 induziu esta atividade com apenas 5,0 μ g de proteínas, atingindo 100,0% de agregação; e as frações J2 e J3 com o dobro em proteínas induziram cerca de 25,0%. Convém ressaltar que para a fração J4 utilizou-se 5,0 μ l de amostra, não tendo sido quantificada para este ensaio. Esta última fração da peçonha de Jararacuçu (J4) não apresentou nenhuma outra atividade enzimática testada.

A atividade fosfolipásica apresentou-se somente nas frações J2 e J3, como mostrado na FIGURA 04, observando-se que para a mesma quantidade de proteínas (10,0 μ g) das amostras testadas, a fração J2 deteve uma atividade fosfolipásica específica mais elevada. E as frações J1 e J4 mesmo com o dobro de proteínas não apresentaram esta atividade.

A TABELA II mostra a atividade coagulante sobre o plasma humano pobre e rico em plaquetas para a peçonha total de Jararacuçu e as frações, demonstrando que somente a fração J1 apresenta atividade coagulante; mas, foi observado, para estas amostras, um teste mais sensível no plasma pobre em plaquetas. Utilizou-se o dobro de amostra para as frações J2, J3 e J4 e mesmo assim elas não causaram coagulação do plasma sanguíneo.

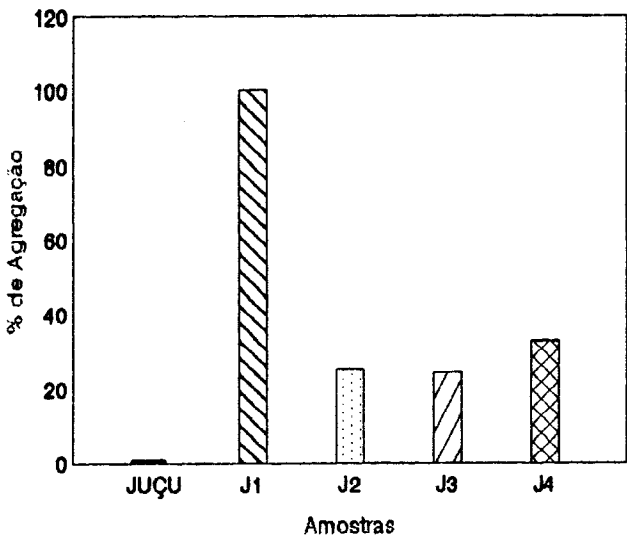


Figura 03. Agregação plaquetária espontânea realizada com cerca de 5,0 a 10,0 ug de proteínas da peçonha total de Jararacuçu e suas frações. Aplicava-se estas amostras em 0,4 ml de plasma corrigido e o aparelho traçava o gráfico de adesão plaquetária em função do tempo. Ao controle aplicava-se o mesmo volume de água ou tampão solvente das amostras, resultando em 0,0% de agregação.

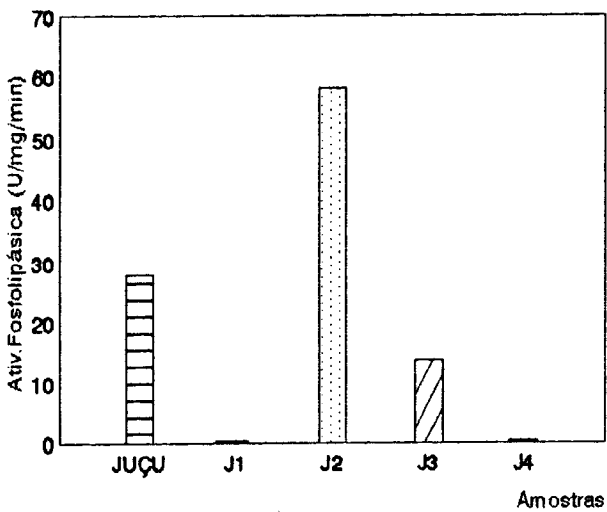
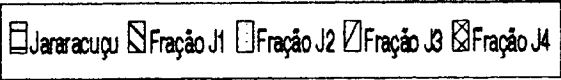


Figura 04. Atividade fosfolipásica sobre a gema de ovo realizada com cerca de 10,0 ug de proteínas da peçonha total e suas frações. As amostras eram aplicadas no substrato de reação pH 8,0 e titulada com NaOH 0,0935N por três minutos a temperatura ambiente.



TABELA II - Atividade coagulante sobre o plasma humano rico e pobre em plaquetas da peçonha total de *Bothrops jararacussu* e frações obtidas da filtração em Sephadex G-75, a 37°C.

Amostras	Tempo de coagulação (segundos)*	
	plasma rico	plasma pobre
Controle	252,0	560,0
Peç. total	38,2	31,8
J1	18,8	17,7
J2	-	-
J3	-	-
J4	-	-

*** Média de três ensaios**

A hemorragia provocada pelos componentes tanto da peçonha total de Jararacuçu quanto da fração J1 são apresentados na FIGURA 05 (A, B e C) e a dose mínima hemorrágica causada por estas mesmas amostras foi determinada conforme descrito no item 2.8.6, sendo de 53,0 µg para a peçonha total e de 24,8 µg para a fração J1 (FIGURA 06-A e B). Cerca de 100 µg de proteínas das frações J2, J3 e J4 foram utilizadas para este ensaio, demonstrando um resultado negativo, ou seja, não provocaram hemorragia.

Os ensaios anticoagulante e hemolítico direto não foram detectados na peçonha de Jararacuçu e em nenhuma das frações obtidas da filtração em Sephadex G-75.

Para se monitorar as proteínas foram realizadas eletroforeses conforme descrito no item 2.8.7, nas condições nativas em pH ácido (FIGURA 07-A) e em pH alcalino (FIGURA 07-B), e nas condições desnaturantes com SDS (FIGURA 07-C).

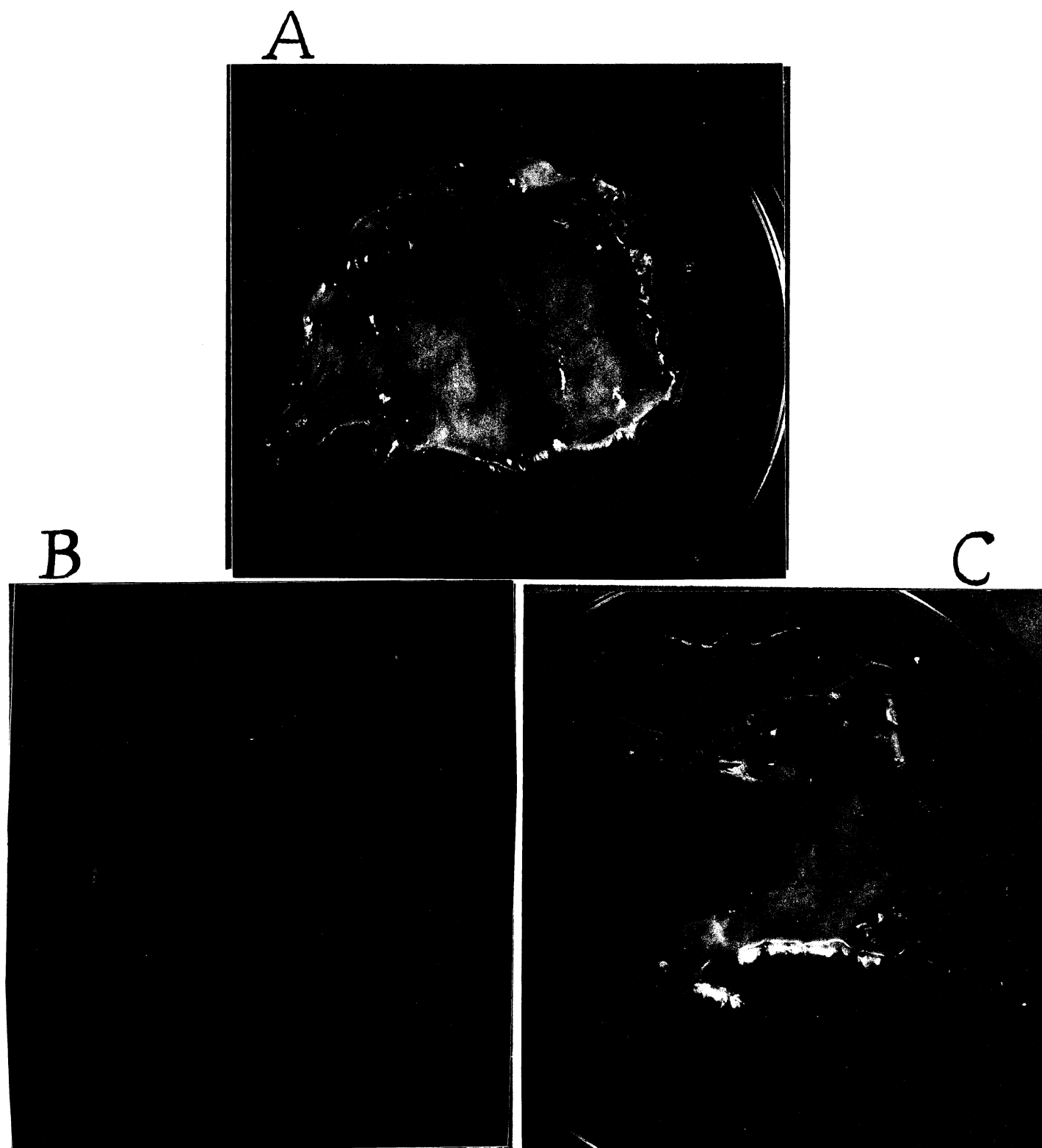


Figura 05. Atividade Hemorrágica da peçonha total e fração J1 obtida da filtração em Sephadex G-75. Amostras de 100 μ g de proteínas foram diluídas em 0,1 ml de salina e injetadas por via subcutânea no dorso de camundongos previamente anestesiados. Posteriormente eram sacrificados e verificava-se a presença de hemorragia em comparação com um controle contendo somente salina.

Amostras: A. Controle B. Peçonha de Juçu C. Fração J1

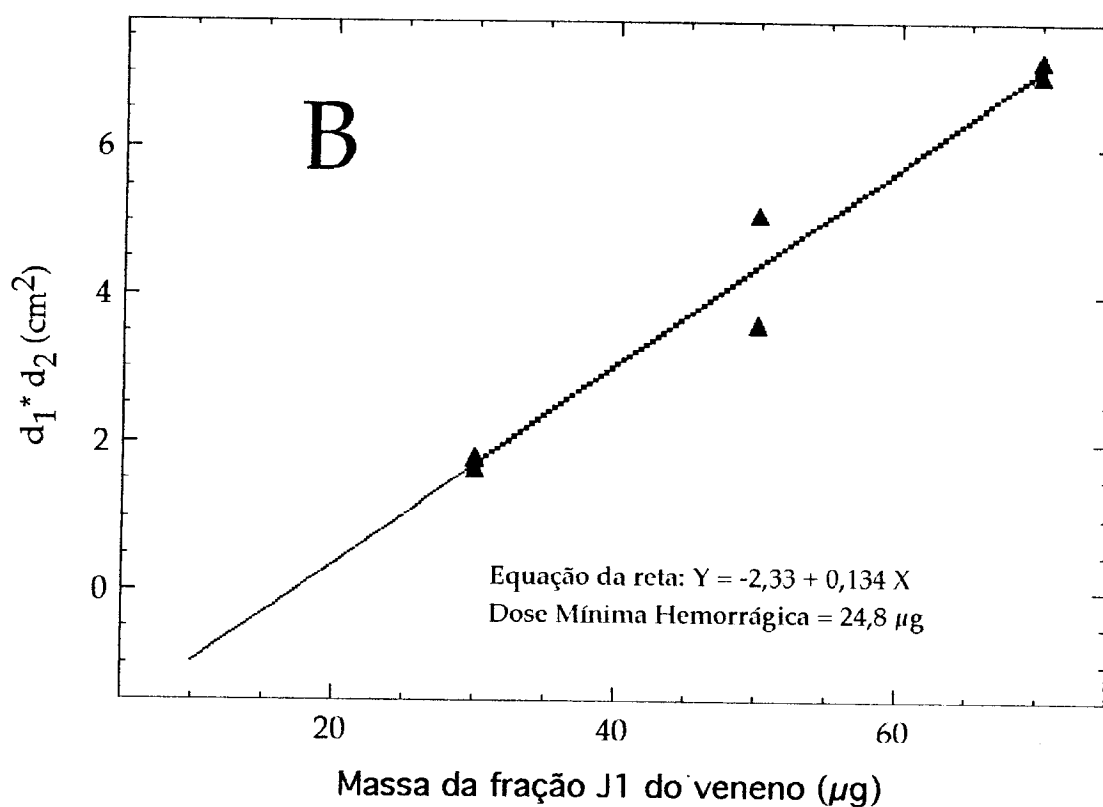
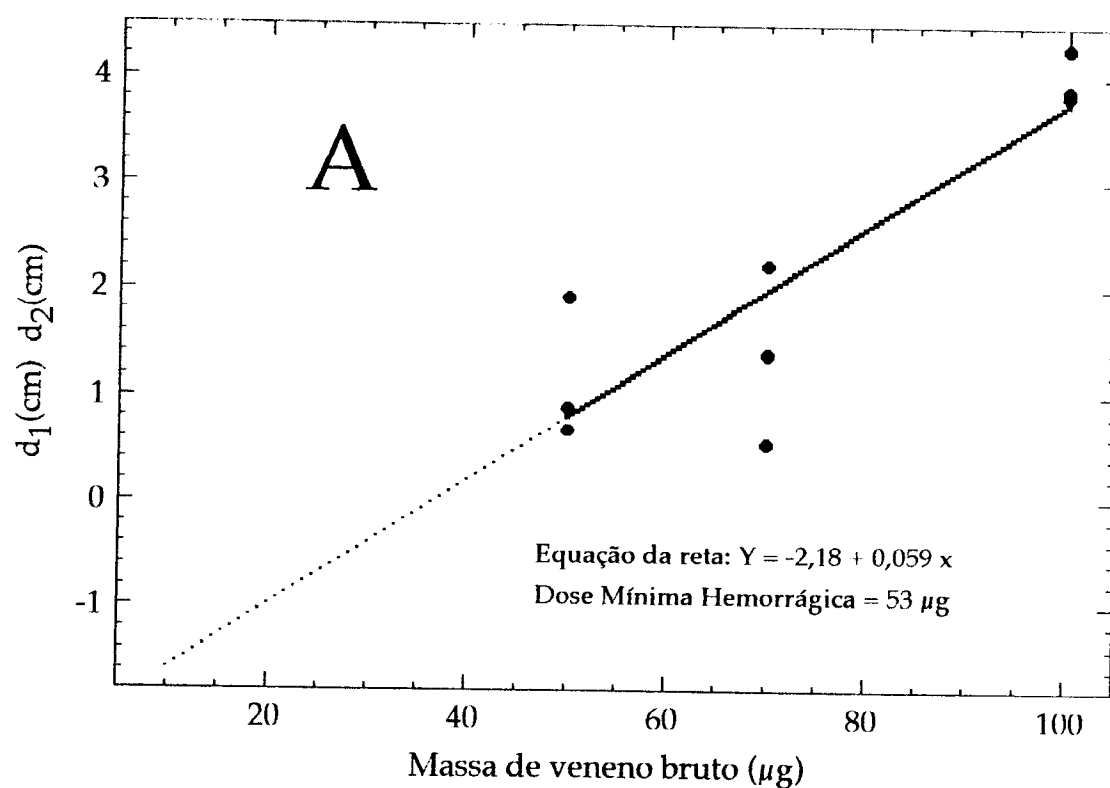


Figura 06 - Determinação da Dose Mínima Hemorrágica da peçonha total de *B. jararacussu* (A) e da fração J1 (B). O ensaio foi realizado utilizando-se de 30 a 100 μg de proteínas dissolvidas em 0,1 ml de solução salina fisiológica e injetadas por via subcutânea no dorso de camundongos. A Dose Mínima Hemorrágica é a dose mínima necessária para produzir um halo hemorrágico de 10 mm^2 .

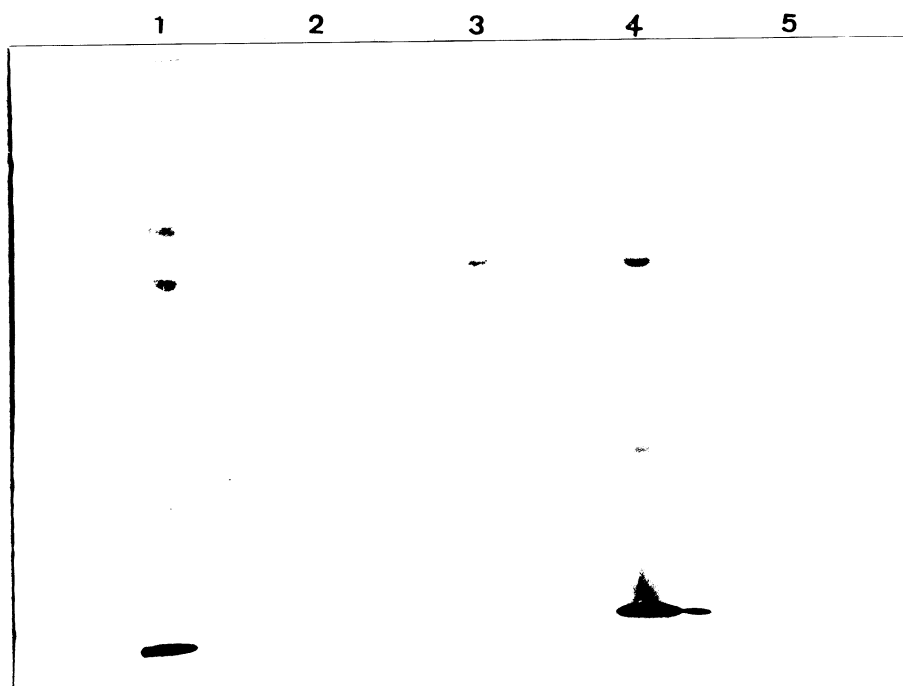


Fig.07-A. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 15,0%, sem agentes desnaturantes, tampão B-alanina pH 4,5, 20 mA, corrente constante, por duas horas. Amostras: 1- peçonha de Juçu, 2- J1, 3- J2, 4- J3 e 5- J4.

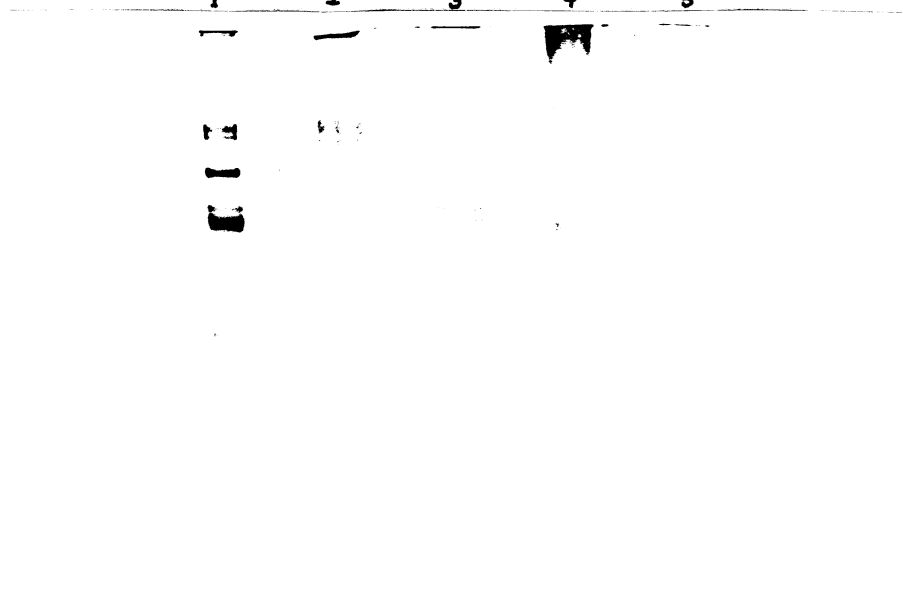
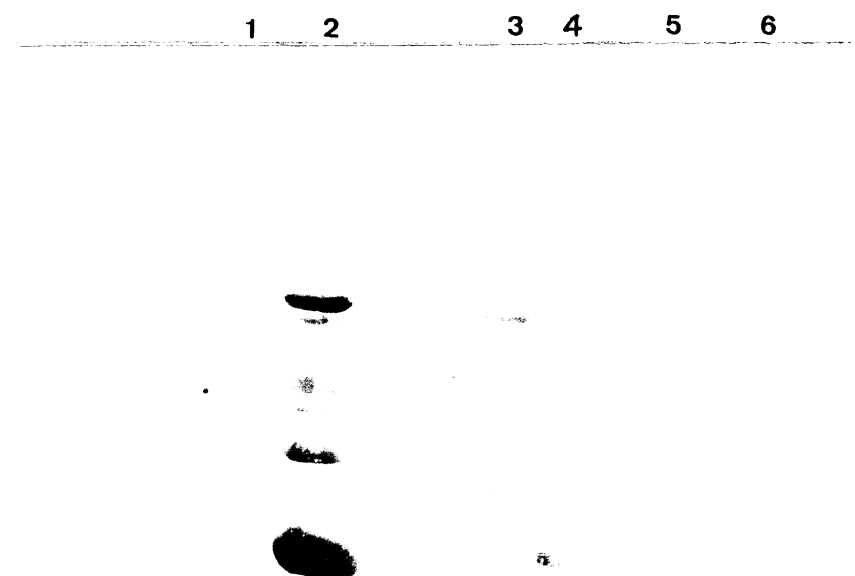


Fig.07-B. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,0%, sem agentes desnaturantes, tampão Tris-glicina pH 8,3, 20 mA, corrente constante, por uma hora. Amostras: 1- peçonha de Juçu, 2- J1, 3- J2, 4- J3 e 5- J4.



3.2. Segundo passo de purificação das proteínas

A fração J1 foi cromatografada em Q-Sepharose conforme descrito no item 2.6.1. Deste novo fracionamento obteve-se três subfrações, J1QI, J1QII e J1QIII, mostrada na FIGURA 08 juntamente com a atividade coagulante sobre o plasma pobre em plaquetas.

A atividade coagulante foi detectada somente na primeira subfração, que corresponde a cerca de 45,0% da fração J1 (TABELA III). A atividade hemorrágica foi verificada nas subfrações J1QI e J1QII (FIGURA 09), sendo que a dose mínima hemorrágica provocada pela subfração J1QI foi de 7,14 µg de amostra (FIGURA 10).

As frações J2 e J3, obtidas da filtração em Sephadex G-75, foram submetidas a cromatografia em SP Sephadex C-25 (item 2.6.2), resultando, do fracionamento de J2, sete subfrações, J2CI a J2CVII, das quais somente as duas primeiras apresentaram atividade fosfolipásica, como mostra a FIGURA 11.

Para J3 obteve-se cinco subfrações assim denominadas: J3SPI, J3SPII, J3SPIII, J3SPIV e J3SPV, sendo que apenas a primeira e a terceira subfrações apresentaram atividade fosfolipásica (FIGURA 12).

As TABELAS IV e V mostram o rendimento de todas as subfrações obtidas de cromatografias de troca iônica das frações J2 e J3 e suas respectivas atividades enzimáticas.

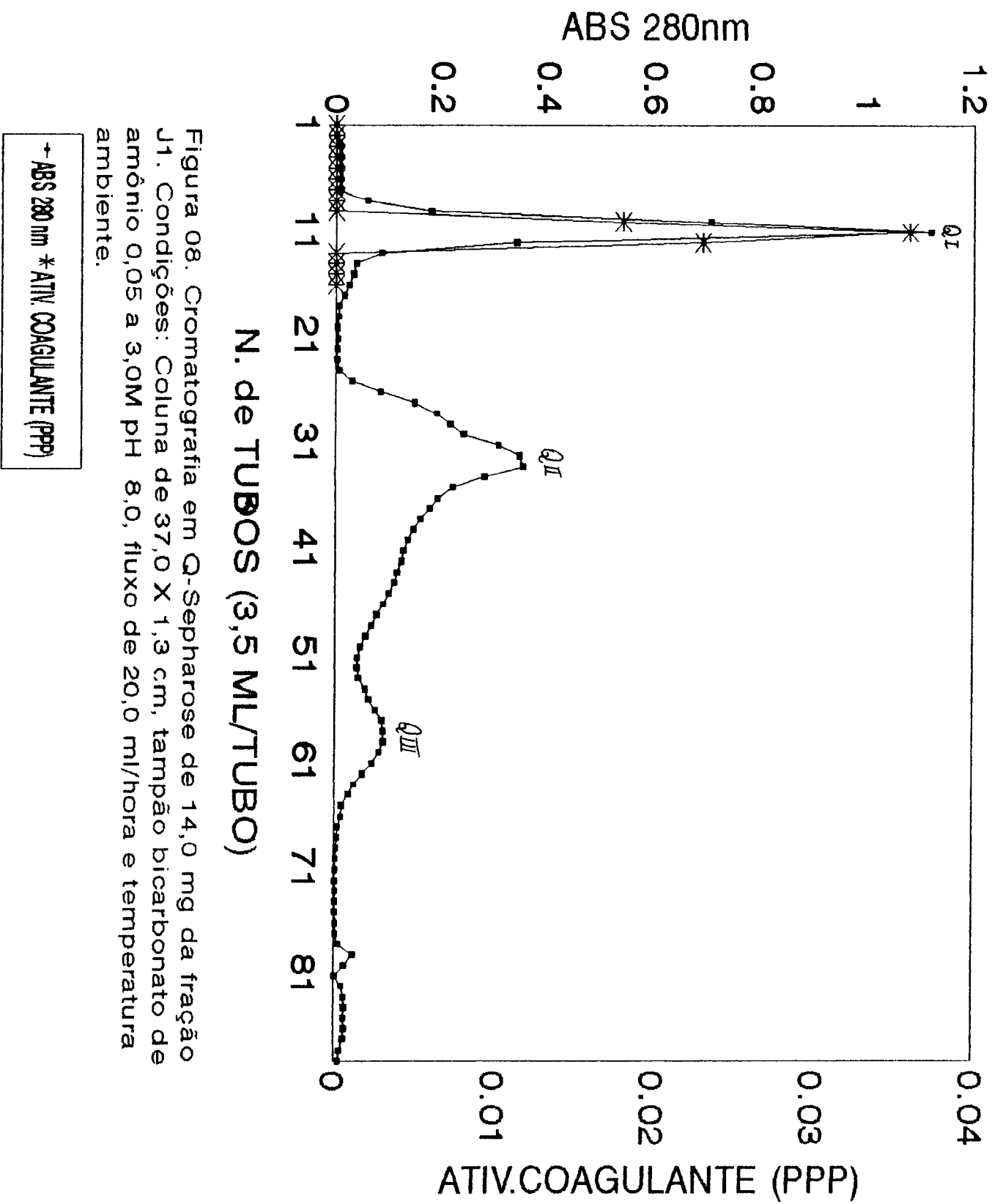


Figura 08. Cromatografia em Q-Sepharose de 14,0 mg da fração J1. Condições: Coluna de 37,0 X 1,3 cm, tampão bicarbonato de amônio 0,05 a 3,0M pH 8,0, fluxo de 20,0 ml/hora e temperatura ambiente.

TABELA III - Subfracionamento de J1 e atividade coagulante sobre o plasma humano pobre e rico em plaquetas a 37°C (10 µg de amostra).

Amostras	Proteínas		Atividade Coagulante*	
	mg (totais)	% (recup.)	tempo de coagulação (seg.) PPP	PRP
Controle	-	-	560,0	250,0
J1	14,0	100,0	17,7	18,8
J1QI	6,2	44,5	19,3	24,8
J1QII	5,5	39,5	-	-
J1QIII	0,2	1,4	-	-
Total	11,9	85,4		

*** Média de três ensaios**

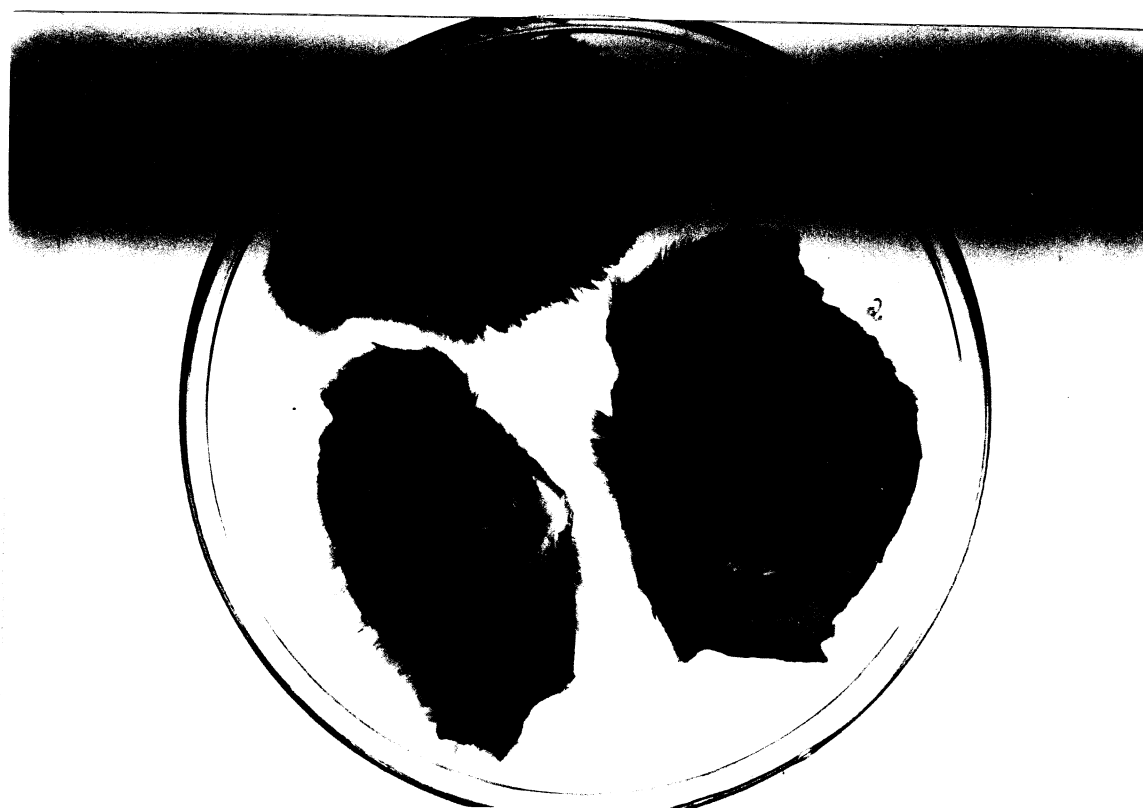


Figura 09. Atividade Hemorrágica das subfrações de J1 obtidas ca cromatografia em Q Sepharose. Amostras de 100 µg de proteínas foram diluídas em 0,1 ml de salina e injetadas subcutaneamente no dorso de camundongos.

Amostras: 1. Controle 2. Fração J1QI 3. Fração J1QH

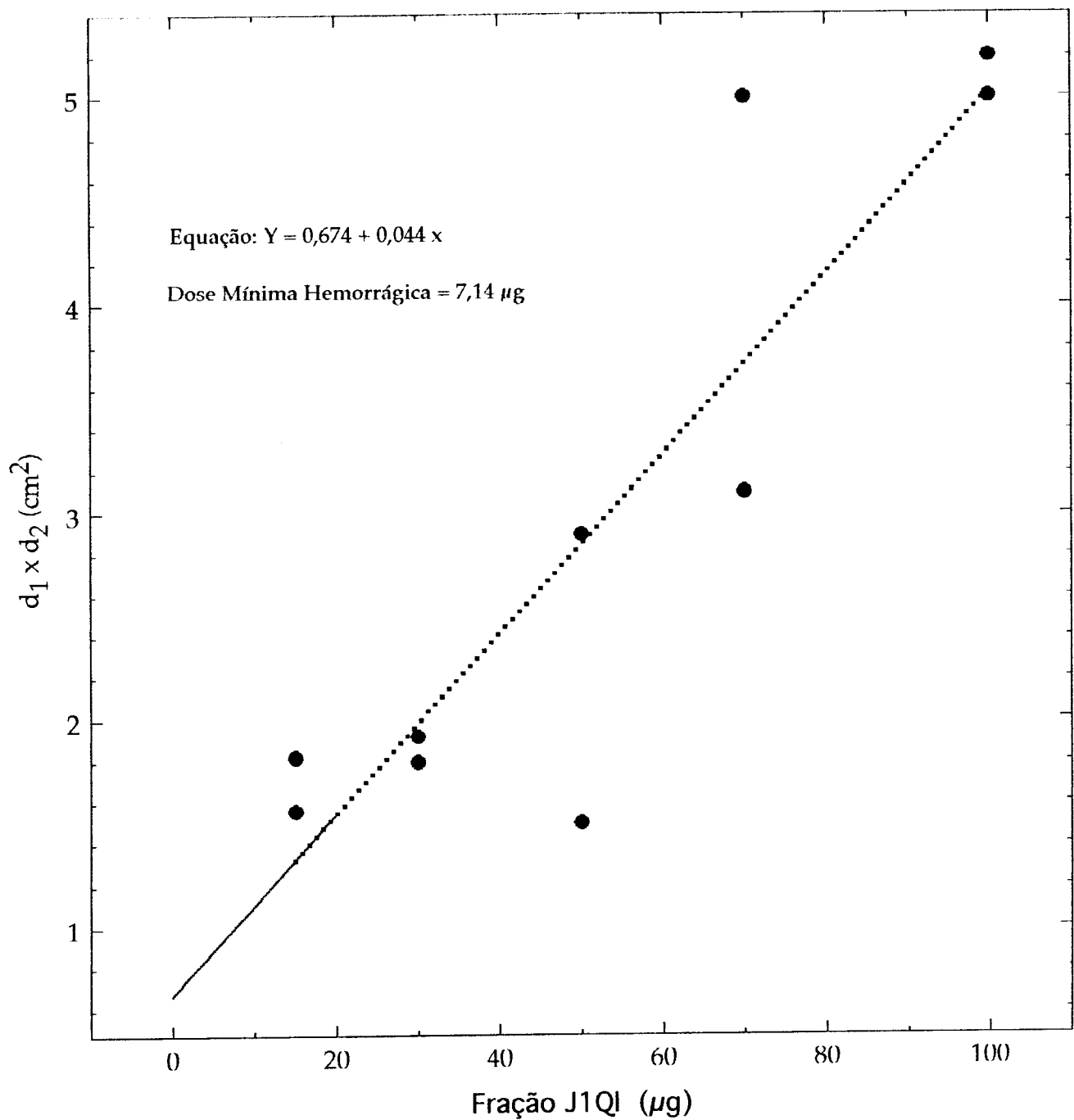


Figura 10 - Determinação da Dose Mínima Hemorrágica da subfração J1QI obtida da peçonha de *B. jararacussu* por cromatografia em Q-Sepharose. O ensaio foi realizado utilizando-se de 15 a 70 μg de proteínas dissolvidas em 0,1 ml de solução salina fisiológica e injetadas por via subcutânea no dorso de camundongos. A Dose Mínima Hemorrágica é a dose mínima necessária para produzir um halo hemorrágico de 10 mm^2 .

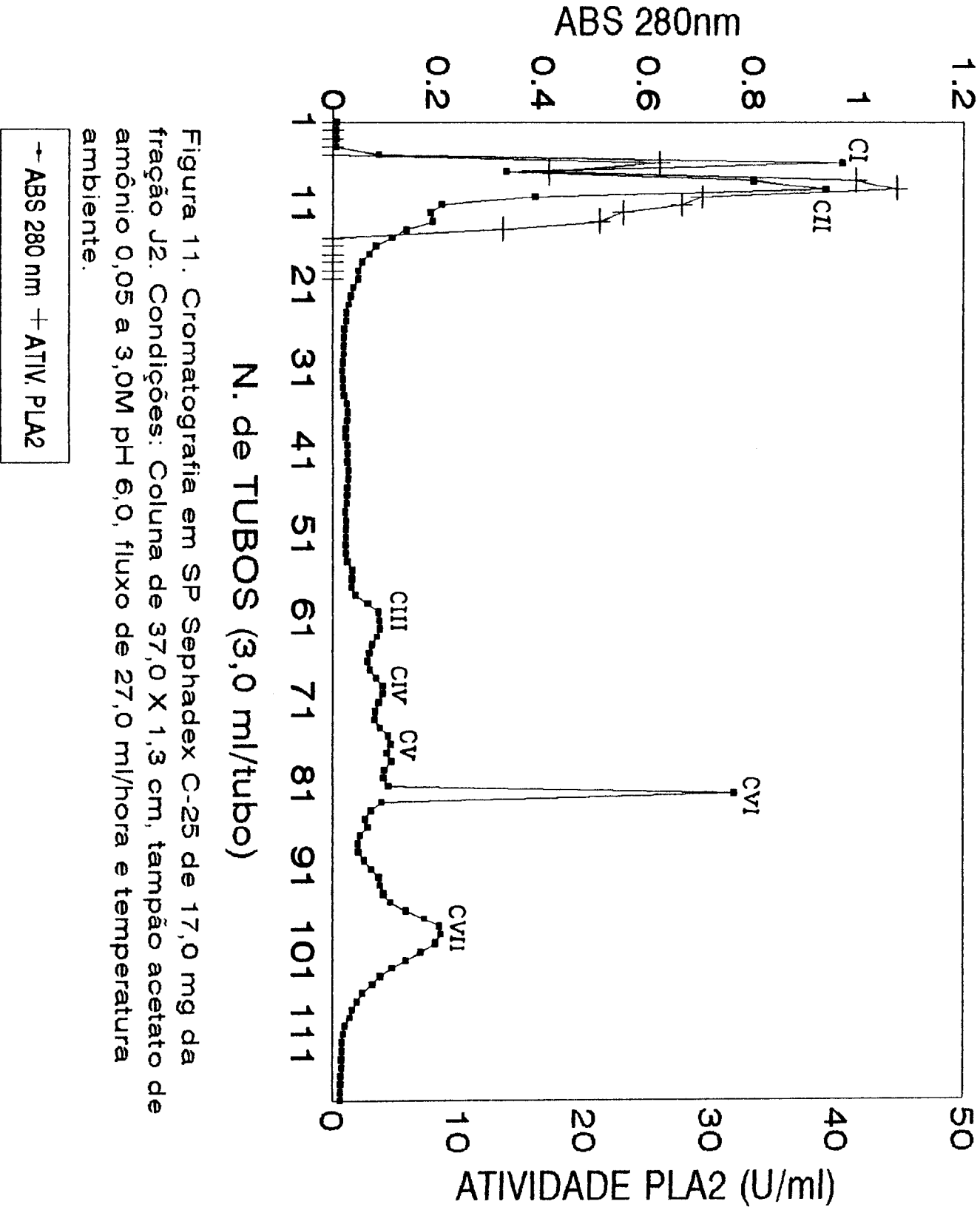


Figura 11. Cromatografia em SP Sephadex C-25 de 17,0 mg da fração J2. Condições: Coluna de 37,0 X 1,3 cm, tampão acetato de amônio 0,05 a 3,0M pH 6,0, fluxo de 27,0 ml/hora e temperatura ambiente.

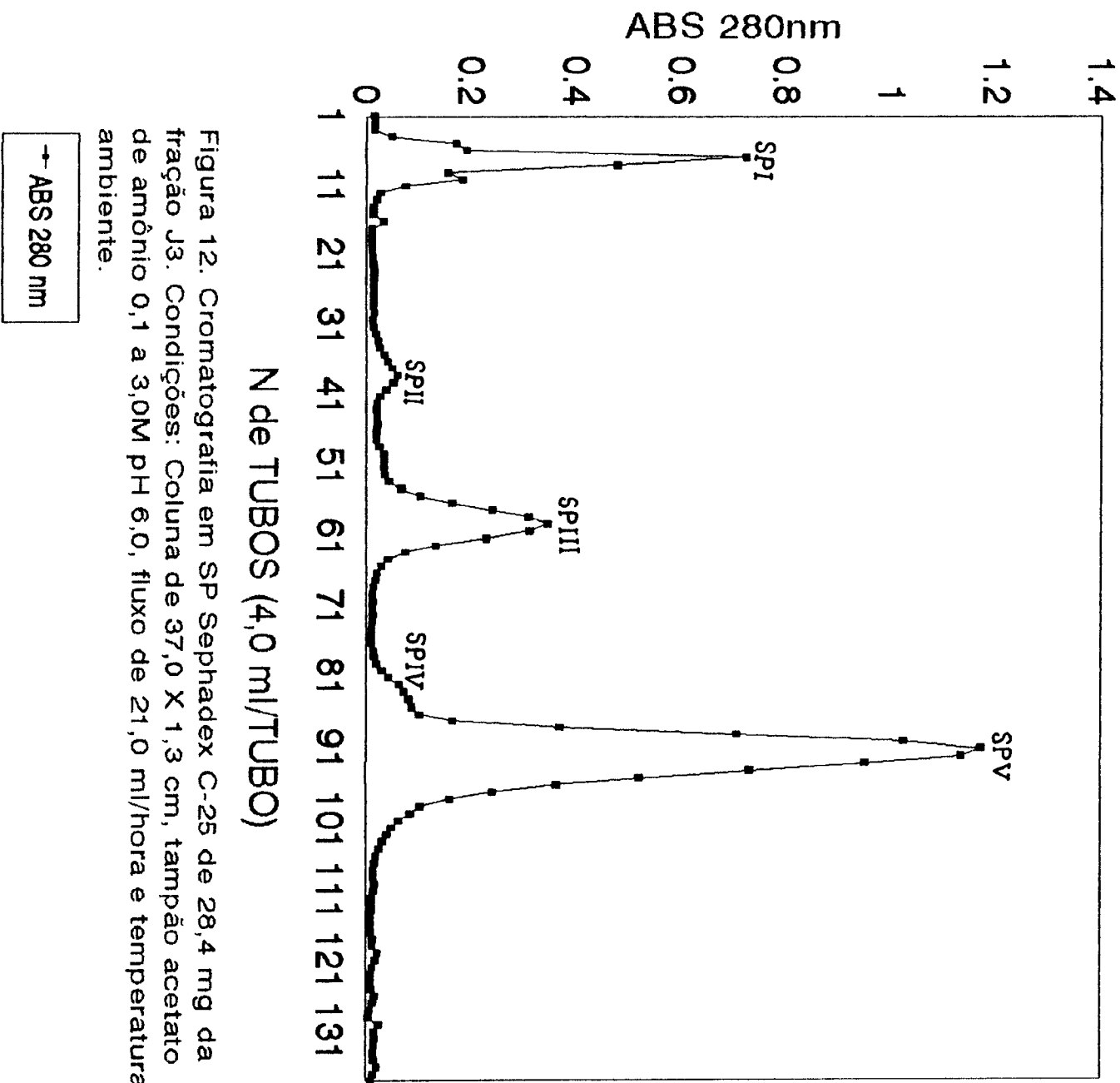


Figura 12. Cromatografia em SP Sephadex C-25 de 28,4 mg da fração J3. Condições: Coluna de 37,0 X 1,3 cm, tampão acetato de amônio 0,1 a 3,0M pH 6,0, fluxo de 21,0 ml/hora e temperatura ambiente.

TABELA IV. Subfracionamento de J2 e atividade fosfolipásica específica (ensaio potenciométrico).

Amostras	Proteínas		Atividade Fosfolipásica (PLA2)*			
	mg (totais)	% (recup.)	U (totais)	recup. ativ.	A.E. (U/mg)	fat.pur.
J2	17,0	100,0	988	100,0	58,1	1,0
J2CI	0,9	5,4	146	14,8	158,4	2,7
J2CII	4,3	25,4	791	80,1	184,0	3,2
J2CIII	0,7	4,2	-	-	-	-
J2CIV	0,5	2,6	-	-	-	-
J2CV	0,8	4,7	-	-	-	-
J2CVI	0,5	2,9	-	-	-	-
J2CVII	2,3	13,3	-	-	-	-
Total	10,7	59,2	937	94,8		

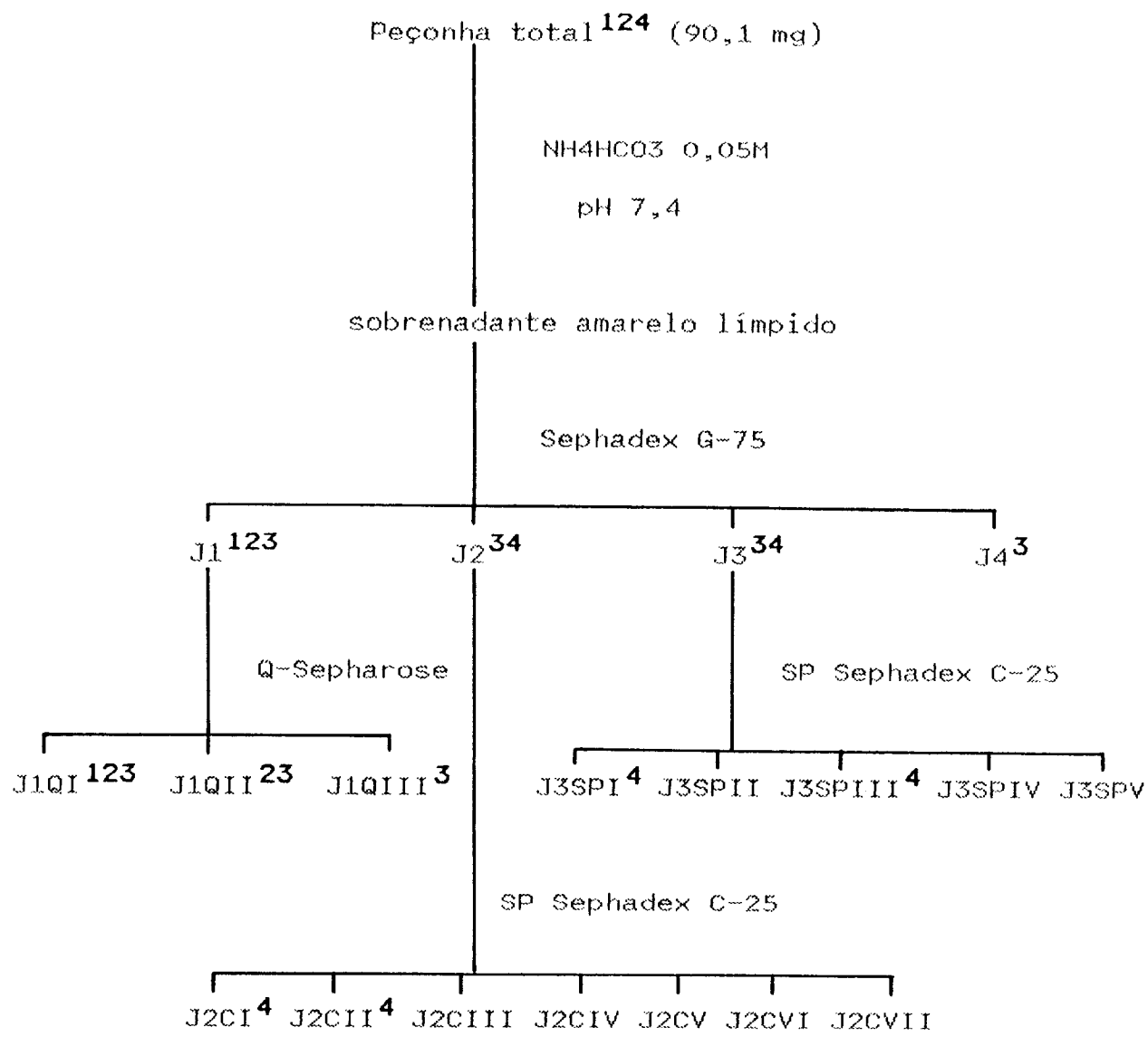
* Média de três ensaios

TABELA V. Subfracionamento de J3 e atividade fosfolipásica específica (ensaio potenciométrico).

Amostras	Proteínas		Atividade fosfolipásica (PLA2)*			
	mg (totais)	% (recup.)	U (totais)	recup. ativ.	A.E. (U/mg)	fat.pur.
J3	28,4	100,0	398	100,0	14,0	1,0
J3SPI	1,0	3,5	61	15,4	61,0	4,4
J3SPII	-	-	-	-	-	-
J3SPIII	3,6	12,7	128	32,3	35,6	2,5
J3SPIV	0,4	1,4	-	-	-	-
J3SPV	16,2	57,1	-	-	-	-
Total	21,2	74,7	189	47,7		

* Média de três ensaios

3.3. Fluxograma da purificação parcial dos componentes biologicamente ativos da peçonha de *B. jararacussu*.



- 1 Atividade coagulante
- 2 Atividade Hemorrágica
- 3 Indução de agregação plaquetária
- 4 Atividade Fosfolipásica

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Dentre os animais terrestres peçonhentos, os mais importantes pela frequência e consequência dos acidentes, são as aranhas, escorpiões e serpentes. Estes animais podem causar efeitos deletérios sobre os seres humanos, levando, geralmente, a um sério quadro clínico que pode ocasionar a morte dos indivíduos não tratados devidamente.

Estes efeitos podem ser produzidos, pela peçonha ofídica, quer indiretamente, através da liberação de substâncias farmacologicamente ativas, quer diretamente, através de ações nas membranas celulares. Seus princípios ativos são proteínas de estrutura, ponto isoelétrico e peso molecular muito variável (VITAL BRAZIL, 1982).

Sabe-se que as serpentes peçonhentas do gênero *Bothrops* apresentam uma alta incidência de acidentes no Brasil (ROSENFELD, 1971; RIBEIRO et al, 1993) e uma baixa letalidade, sendo as vítimas, normalmente, atingidas nos membros inferiores, cerca de 70,0% das picadas ocorrem do joelho para baixo (ROSENFELD, 1978).

O envenenamento por estas serpentes pode causar um grave quadro local com hemorragia e degeneração dos tecidos, podendo levar a amputação do membro atingido. Esses acidentes devem ser tratados com soros antiofídicos, embora nem sempre os efeitos sejam revertidos, devido provavelmente, ao intervalo de tempo entre o acidente e o tratamento e/ou a quantidade de anticorpos presentes nos soros.

Quando a quantidade inoculada de peçonha botrópica for muito alta, podem sobrevir hemorragias extensas, epístaxe, gastrorragias, entre outros, o que ocorre mais frequentemente nas picadas por *Bothrops jararacussu*, capaz de inocular grandes quantidades de peçonha (ROSENFELD, 1978).

Assim sendo, este trabalho propõe a separação dos componentes ativos da peçonha de *B. jararacussu* e a determinação de algumas

atividades enzimáticas responsáveis pela sintomatologia do envenenamento botrópico.

As atividades enzimáticas detectadas na peçonha de Jararacuçu, foram a coagulante, hemorrágica e fosfolipásica (PLA2), estando desprovida das atividades hemolítica direta, anticoagulante e indução de agregação plaquetária espontânea.

Esta peçonha demonstrou ser pouco coagulante e hemorrágica quando comparada a outras peçonhas botrópicas como *B. alternatus* (Urutu), *B. moojeni* (Caissaca) e *B. neuwiedi pauloensis* (Jararaca pintada) (Resultados obtidos em nosso laboratório e não apresentados neste trabalho).

Encontra-se na literatura que as peçonhas da maioria das espécies de *Bothrops* como *B. jararaca*, principalmente exemplares jovens (ROSENFELD et al, 1959), *B. moojeni*, *B. neuwiedi*, *B. cotiara* e *B. alternatus* são fortemente coagulantes, em contraste com as de *B. jararacussu* e *B. itapetiningae* que apresentam menor atividade (VITAL BRAZIL, 1982).

Outro resultado que ressalta a informação anterior, é que a dose mínima hemorrágica da peçonha de Jararacuçu foi de 53,0 µg, enquanto a de Jararaca pintada foi de 17,0 µg (VERIDIANA DE MELO RODRIGUES, comunicação pessoal).

Quanto à atividade fosfolipásica, a peçonha de Jararacuçu, apresentou-se mais ativa do que a peçonha de Urutu, e menos ativa do que as de Jararaca pintada, Caissaca e abelha *Apis mellifera*. A atividade fosfolipásica específica de *Apis* é 175 U/ mg/ min (FÁBIO DE OLIVEIRA, comunicação pessoal) enquanto que a Jararacuçu é 28 U/ mg/ min, demonstrando que as fosfolipases da peçonha de abelhas são mais ativas que as de serpentes. A fosfolipase da peçonha de abelhas é a mais ativa das fosfolipases conhecida (SHIPOLINI et al, 1971).

A primeira etapa do fracionamento da peçonha de Jararacuçu, em

gel de Sephadex G-75 foi realizada com tampão bicarbonato de amônio 0,05M, que mostrou-se adequado, por ser um sal volátil, facilmente eliminado no processo de liofilização.

A liofilização foi o método utilizado para conservar as amostras, pelo fato de associar, durante o processo de secagem, congelação e vácuo, condições que presumivelmente preservariam melhor a configuração molecular das proteínas (FURTADO et al, 1991).

A escolha da resina para o fracionamento baseou-se no princípio da técnica de cromatografia de filtração ou exclusão molecular, onde a amostra é aplicada em cima de uma coluna constituída de moléculas porosas feitas de um polímero insolúvel mas altamente hidratado. As proteínas de alto peso molecular fluem mais rapidamente por essa coluna do que as de baixo peso que penetram nos poros da resina percorrendo um caminho mais longo, e portanto, emergem por último porque há um maior volume acessível a elas (STRYER, 1992). Para fracionar proteínas com peso molecular acima de 10.000 deve-se usar géis que absorvem 7,5 a 20,0 g de água, ou seja, entre Sephadex G-75 e Sephadex G-200 (COLLINS et al, 1993).

Na tentativa de se obter um maior rendimento e separação das proteínas da peçonha de Jararacuçu, no segundo fracionamento efetuado, foram modificadas somente as condições experimentais como fluxo de eluição e volume das frações coletadas.

O perfil cromatográfico obtido mostra quatro frações denominadas de J1, J2, J3 e J4 (FIGURA 01), das quais as frações J2 e J3, que representam cerca de 80,0% da peçonha total, foram as únicas que apresentaram atividade fosfolipásica (TABELA I). HOMSI-BRANDEBURGO (1987) também obteve quatro frações da filtração da peçonha de *B. jararacussu* em gel de Sephadex G-75 equilibrada com tampão formato de amônio 0,05M pH 3,5 no entanto, apenas a fração

SIII, equivalente a J3, encerrou toda a atividade fosfolipásica. Isto pode ser devido aos seguintes fatores: primeiro, a amostra de peçonha utilizada neste trabalho advem de outro lote de serpentes Jararacuçu, e como se sabe, a composição e a concentração dos componentes da peçonha podem apresentar variabilidade intraespecífica, sendo típicos da espécie animal de origem, podendo acarretar diferenças significativas em algumas atividades enzimáticas e no perfil eletroforético (FURTADO et al, 1991; MOURA DA SILVA, 1992). E, é possível também que, a diferença de pH e de íons do tampão de eluição, possa ter provocado um deslocamento da maioria das fosfolipases A2 para a fração J2, como mostra a TABELA I.

As atividades hemostáticas foram observadas na fração J1, que representa 6,0% da peçonha total, e apresentou uma dose mínima hemorrágica de 24,8 µg. Esta fração apresentou um tempo médio de coagulação menor que a peçonha e induziu 100,0% de agregação plaquetária espontânea, evidenciando que os fatores coagulantes e hemorrágicos foram parcialmente isolados, por se apresentarem mais ativos do que na peçonha total de Jararacuçu.

Os efeitos das peçonhas de serpentes sobre a coagulação sanguínea e a homeostase despertaram, desde o século passado, o interesse de pesquisadores. Os componentes das peçonhas ofídicas que afetam estes sistemas podem ser agrupados nas seguintes categorias, segundo OUYANG et al (1992): 1) ativadores do fibrinogênio, 2) enzimas fibrino(geno)líticas, 3) ativadores da liberação do plasminogênio, 4) ativadores de protrombina, 5) inibidores do complexo da protrombinase, 6) ativadores do fator X, 7) ativadores do fator V, 8) ativadores da proteína C, 9) indução de agregação plaquetária por meio ou não da atividade coagulante, 10) inibição da agregação plaquetária e 11) indução de agregação dependente do fator de von Willebrand.

A atividade coagulante sobre o plasma pobre e/ou rico em plaquetas encontrada na peçonha e na fração J1, está de acordo com estudos realizados em peçonhas botrópicas (SELISTRE, 1985), porém, já foi descrito que, algumas peçonhas como a de *Bothrops lanceolatus* não apresentam atividade coagulante sobre o plasma, mas apenas sobre o fibrinogênio (LÔBO DE ARAÚJO, 1990).

As plaquetas são importantes mediadores na coagulação sanguínea, pois quando estimuladas elas aderem aos vasos sanguíneos e a seguir uma às outras de modo a formar um "tampão" que pode parar sangramentos menores. Dessa forma, a concentração dessas células está diretamente relacionada à mensuração dos processos coaguláveis (VOET, 1990). Portanto, os ensaios para detectar os componentes coagulantes são melhores evidenciados com o plasma pobre em plaquetas, como mostra a TABELA II.

A ação coagulante pode ou não estar relacionada com a atividade hemorrágica. Assim, OWNBY et al (1978) descreveram que os fatores hemorrágicos isolados da peçonha de *Crotalus atrox* provocam danos capilares e agregação plaquetária, e OSHAKA (1979) sugeriu um efeito inibitório sobre a agregação e formação de trombos para as hemorraginas de *Trimeressurus flavoviridis*. Foi observado por SELISTRE (1988) que algumas frações hemorrágicas da peçonha de *Bothrops insularis* prolongaram sensivelmente o tempo de coagulação do plasma em comparação a um controle.

Esses resultados sugerem que diferentes peçonhas, embora produzindo um mesmo efeito hemorrágico, podem variar quanto ao seu mecanismo de ação. De uma maneira geral, as toxinas hemorrágicas isoladas descritas na literatura, possuem algum tipo de atividade proteolítica que deve promover a destruição enzimática da membrana basal vascular, podendo este quadro ser agravado pela incoagulabilidade sanguínea causada pela ação de outros componentes

da peçonha sobre os fatores da coagulação.

LÔBO DE ARAÚJO (1990) demonstrou que a peçonha de *Bothrops lanceolatus* não apresentou atividade agregante de plaquetas quando ensaiada em plasma, encontrando-se o mesmo resultado para uma fração fosfolipásica. Foi constatado que a peçonha de *Bothrops jararacussu* não induziu a agregação plaquetária, no entanto, a fração J1 induziu agregação espontânea. A ausência desta atividade agregante na peçonha e presença nas suas frações, pode ser devida ao fato de que, na peçonha total há uma mistura complexa de proteínas que podem estar atuando de maneira contrária, e à medida que as proteínas são purificadas, estes componentes são separados e suas ações se tornam mais evidentes.

A fração J4, que apresentou somente agregação plaquetária, representa 12,0% da peçonha total e deve possuir os componentes de menor peso molecular, por ter sido a última a ser eluída na filtração em gel de Sephadex G-75. Possivelmente, esta fração deve ser constituída de peptídeos biologicamente ativos do processo inflamatório, sendo liberadores de substâncias farmacologicamente ativas como histamina e bradicinina (HOMSI-BRANDEBURGO, 1987).

O perfil eletroforético mostrado na FIGURA 07-A, B e C, demonstra que as frações ainda não se encontram puras, já que vários componentes são observados por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença e ausência de agentes desnaturantes.

As frações J1, J2 e J3 foram submetidas a novas cromatografias em resinas de troca iônica, que separam as proteínas principalmente de acordo com sua carga resultante, onde, a fase estacionária (resina) é altamente carregada, sendo que solutos (proteínas) com cargas de sinais contrários a esta são seletivamente adsorvidos da fase móvel (tampão). Os solutos adsorvidos podem ser subsequentemente eluídos, por deslocamentos com outros íons, com o mesmo tipo de carga, porém com maior força de interação com a fase

estacionária (COLLINS et al, 1993).

A fração J1 cromatografada em Q-Sepharose, originou três subfrações, J1QI, J1QII e J1QIII, com um rendimento protéico de 84,0%, sendo que a subfração J1QI representa cerca de 45,0% da fração J1 e apresentou as atividades coagulante e hemorrágica, enquanto que a subfração J1QII apresentou somente atividade hemorrágica.

O tempo de coagulação da fração J1QI demonstrou ser maior do que o tempo para a fração J1 e menor do que para a peçonha total. A hemorragia também foi mais acentuada para J1QI, cuja dose mínima hemorrágica foi de 7,14 µg; é possível que esta subfração possua uma maior concentração de hemorraginas que podem estar interferindo no efeito coagulante.

A fração J2 quando submetida a cromatografia de troca iônica em SP Sephadex C-25 apresentou sete subfrações, J2CI a J2CVII, com um rendimento de aproximadamente 59,0% e uma recuperação da atividade fosfolipásica de 95,0%. As fosfolipases A2 restringiram-se às subfrações J2CI e J2CII, sendo que esta última apresentou a maior atividade fosfolipásica específica, com uma purificação parcial de três vezes.

O subfracionamento de J3 em SP Sephadex C-25 originou cinco subfrações, J3SPI, J3SPII, J3SPIII, J3SPIV e J3SPV, com 75,0% de recuperação em proteínas. A atividade fosfolipásica apresentou-se nas subfrações J3SPI e J3SPIII, sendo que a primeira foi purificada cerca de quatro vezes e possui uma atividade fosfolipásica mais elevada. A subfração J3SPII não apresentou rendimento, possivelmente devido à baixa concentração de proteínas na amostra, não sendo sensível à técnica de dosagem pelo Microbiureto.

Estas fosfolipases A2 são responsáveis pela maioria dos efeitos observados no envenenamento ofídico, podendo causar morte do tecido muscular, edema, ações coagulante, anticoagulante e

agregante (GUTIÉRREZ et al, 1986; KINI e EVANS, 1989). Várias fosfolipases ofídicas produzem necrose local de fibras musculares quando injetadas por via intramuscular. Algumas fosfolipases A2 despolarizam, tal como as cardiotoxinas, a membrana das fibras musculares em preparações isoladas e provocam contratura do músculo. Estão neste caso uma fosfolipase básica de *Naja nigricollis* (LEE et al, 1977) e uma miotoxina com estrutura de fosfolipase A2 isolada por HOMSI-BRANDEBURGO et al (1988).

A presença de várias isoformas de uma mesma enzima ocorrendo em uma única peçonha é frequente e bastante descrita na literatura (DURKIN et al, 1981; VALIENTE et al, 1992), sugerindo desta maneira que as subfrações J2CI, J2CII, J3SPI e J3SPIII sejam isoformas de fosfolipases A2 presentes na peçonha de *Bothrops jararacussu*.

Ainda são desconhecidas as causas moleculares para esta diversidade de proteínas, mas múltiplas formas de enzimas podem representar diferentes produtos gênicos, o que poderia resultar em variações de peso molecular e carga líquida (DUBORDIEU et al, 1987).

A pesquisa na área de Bioquímica de toxinas animais tem se mostrado altamente produtiva. O isolamento e a caracterização dos componentes das peçonhas de serpentes possibilitam a utilização dos mesmos em grande número de pesquisas correlacionadas. Assim, o conhecimento do modo de ação dos diferentes componentes dessas peçonhas poderá permitir o desenvolvimento de um tratamento clínico mais adequado.

Diante desta importância biológica e médica, os acidentes com animais peçonhentos, necessitam, cada vez mais, de informações técnicas e especializadas que venham ampliar e possibilitar o acesso ao estudo universal dos animais peçonhentos, da sua peçonha e dos seus efeitos nos organismos vivos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVARADO, J. B. and GUTIÉRREZ, J. M. (1988). Anticoagulant effect of myotoxic phospholipase A2 isolated from the venom snake *Bothrops asper* (Viperidae). **Biol. Trop.**, **36** (2b): 563 - 565.
- ASSAKURA, M.T., REICHL, A.P., ASPERTI, M.C.A. and MANDELBAUM, F.R. (1985). Isolation of the major proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops moojeni* (caissaca). **Toxicon**, **23**: 691 - 706.
- ASSAKURA, M.T., REICHL, A.P. and MANDELBAUM, F.R. (1986). Comparison of immunological, biochemical and biophysical properties of three hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops jararaca* (jararaca). **Toxicon**, **24** (9): 943 - 946.
- LÔBO DE ARAÚJO, A. (1990). Isolamento e caracterização da fosfolipase presente no veneno de *Bothrops lanceolatus*. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.
- BRASIL. Ministério da Saúde (1990). Fundação nacional de saúde - Informações sobre o programa nacional de ofidismo. Brasília.
- BORKOW, G., GUTIÉRREZ, J.M. and OVADIA, M. (1993). Isolation and characterization of synergistic hemorrhagins from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**, **31**: 114 - 115.

- CAMPBELL, J.A. and LAMAR, W.W. (1989). **The venomous reptiles of Latin America**. Comstock Pub. Assoc., London, 205 - 207.
- CHEYMOL, J., BOURILLET, F., ROCK-ARVEILLER, M. and TOAN, T. (1969). Effects neuromusculaires des venims des deux varietés de *Crotalus durissus terrificus*. **Arch. Internat. Pharmacol. et Therap.**, 179: 40 - 45.
- COLLINS, C.H., BRAGA, G.L. and BONATO, P.S., coord. (1990). **Introdução a métodos cromatográficos**. 4a ed. UNICAMP, Campinas, 71 - 115.
- DE HAAS, G. H., POSTEMA, N. M., et alii (1968). Purification and properties of phospholipase a from porcine pancreas. **Biochem. Biophys. Acta**, 159: 103.
- DIAZ, C., GUTIÉRREZ, J.M. and LOMONTE, B. (1992). Isolation and characterization of basic myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops godmani* (Godman's pit viper) snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, 298 (1): 135 - 142.
- DOTY, P. and GEIDUSCHEC, E. P. (1953). In: **The proteins**. (NEURATH, H. and BAILEY, K.) I-A.
- DUBORDIEU, D.J., KAWAGUCHI, H. and SHIER, W.T. (1987). Molecular weight variations in the diversity of phospholipase A2 forms in reptile venoms. **Toxicon**, 25: 333.

- DUNCAN, C. J. (1978). Role of intracellular calcium in promoting muscle damage: a strategy for controlling the dystrophic conditions. **Experientia**, **34**: 1531.
- DURKIN, J.P., PICKWELL, G.V., TROTTER, J.T. and SHIER, W.T. (1981). Phospholipase A2 eletroctrophoretic variants in reptile venoms. **Toxicon**, **19**: 535.
- FERREIRA, M. L., MOURA-DA-SILVA, A. M., FRANÇA, F. O. S., CARDOSO, J. L. and MOTA, I. (1992). Toxic 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.
- FRANÇA, F.O.S. and FAN, H.W. (1992). In: **Plantas venenosas e animais peçonhentos.**(SCHVARTSMAN, S.). 2a ed., Sarvier, São Paulo.
- FREITAS, J.C. (1980). Compostos biologicamente ativos em invertebrados marinhos. **Bolm. Inst. Oceanogr.**, **29** (2): 177 - 181.
- FREITAS, J. C. (1991). Nomenclatura em toxinologia. Relações com a comunicação química entre os organismos e propriedades biológicas das toxinas. **Mem. Inst. Butantan**, **53** (2): 191 - 195.

- FURTADO, M. F. D., COLLETO, G.M.D.D., DIAS DA SILVA, W. (1991). Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos. **Mem. Inst. Butantan, 53 (2):** 149 - 151.
- GANS, C. (1978). **Biology of the reptilia**. London Academic Press.
- GOPALAKRISHNAKONE, P., DEMPSTER, D.W., HAWGOOD, B.J. and ELDER, H.Y. (1984). Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A2 complex. **Toxicon, 22:** 85.
- GUTIÉRREZ, J. M. and CHAVES, F. (1980). Efector, proteolítico, hemorrágico y myonecrótico de los venenos de serpientes costarricenses de los gêneros *Bothrops*, *Crotalus* y *Lachesis*. **Toxicon, 18:** 315 - 321.
- GUTIÉRREZ, J. M., OWNBY, C. L. and ODELL, G. V. (1984). Isolation of a myotoxin from *Bothrops asper* venom: partial characterization and action on skeletal muscle. **Toxicon, 22:** 115.
- GUTIÉRREZ, J. M., LOMONTE, B. and CERDAS, S. L. (1986). Isolation and partial characterization of a myotoxin from the venom of the snake *Bothrops munnifer*. **Toxicon, 24:** 885-894
- GUTIÉRREZ, J. M. and LOMONTE, B. (1989). Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. **Mem. Inst. Butantan, 51:** 211 - 233.

- GUTIÉRREZ, J.M. (1990). Local pathological effects induced by *Bothrops* snake venoms. **Mem. Inst. Butantan**, 52 (supl.): 37 - 38.
- GRANTSAU, R. (1991). **As cobras venenosas do Brasil**. Bandeirante, São Bernardo do Campo, 37 - 38.
- HARRIS, J. B. (1984). Polypeptides from snake venoms which act on nerve and muscle. In: **Progress in Medicinal Chemistry** (ELLIS, G. P., WEST, G. B.), Elsevier Science Publishers, B. V..
- HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. (1987). Fracionamento do veneno de *Bothrops jararacussu*: caracterização química parcial de componentes ativos e estudos dos efeitos farmacológicos e anatomopatológicos da Bothropstoxina. **Tese de doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo**.
- HOMSI-BRANDEBURGO, M. I., QUEIROZ, L. S., SANTO-NETO, H., SIMIONI, L. R. and GIGLIO, J. R. (1988). Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**, 26 (7): 605 - 627.
- HELUANY, N.F., HOMSI-BRANDEBURGO, M.I., GIGLIO, J.R., PRADO-FRANCHESCHI, J. and RODRIGUES-SIMIONI, L. (1992). Effects induced by *Bothrops jararacussu* snake venom on mouse and chick muscle preparations. **Toxicon**, 30: 1203.

- HILL-EUBANKS, D.C., PARKER, C.G. and LOLLAR, P. (1989). Differential proteolytic activation of factor VIII-von Willebrand factor complex by thrombin. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, **86** (17): 6508 - 6512.
- ITZHAKI, R. F. and GILL, D. M. (1964). A microbiuret method for stimating proteins. **Anal Biochem.**, **9**: 401.
- JARED, C. e FURTADO, M.F. (1988). As serpentes. **Rev. Soc. Bras. Prog. Ciência**, **42** (7): 28 - 32.
- KAISER, I.I., GUTIÉRREZ, J.M., PLUMMER, D., AIRD, S.D. and ODELL, G.V. (1990). The amino acid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of *Bothrops asper*. **Arch. Biochem. Biophys.**, **278** (2): 319 - 325.
- KINI, R. M. and EVANS, H. J. (1989). A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A2. **Toxicon**, **27** (6): 613 - 635.
- LEINZ, F. F., et alii (1989). Sobrevivência de *Bothrops jararacussu* mantidas em cativeiro. **Mem. Inst. Butantan**, **51** (1): 33 - 38.
- LEE, C.Y. (1977). Cardiotoxin-like action of a basic phospholipase A isolated from *Naja nigricolis* venom. **Toxicon**, **15**: 355.

- LÓBO DE ARAÚJO, A. (1990). Isolamento e caracterização da fosfolipase presente no veneno de *Bothrops lanceolatus*. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.
- LOMONTE, B. and GUTIÉRREZ, J.M. (1989). A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). **Toxin**, 27 (7): 725 - 733.
- LOMONTE, B., GUTIÉRREZ, J.M., FURTADO, M.F., OTERO, R., ROSSO, J.P., VARGAS, O., CARMONA, E. and ROVIRA, M. (1990). Isolation os basic myotoxins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* snake venoms. **Toxicon**, 28 (10): 1137 - 1146.
- MANDELBAUM, F.R., ASSAKURA, M.T. and REICHL, A.P. (1984). Characterization of two hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops neuwiedi* (jararaca pintada). **Toxicon**, 22: 193.
- MANDELBAUM, F.R. (1990). Snake venom hemorrhagins. **Mem. Inst. Butantan**, 52 (supl.): 35 - 36.
- MARSH, N. (1994). Inventory of haemorrhagic factors from snake venoms. **Thromb. and Haemost.**, 71 (6): 793 - 797.
- MEBS, D. and OWNBY, C. L. (1990). Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. **Pharm. Ther.**, 48: 223 - 236.

- MELLO-LEITÃO, A.C.G. (1948). Animais peçonhentos. **Serviço de informação agrícola, Ministério da Agricultura**, Rio de Janeiro.
- MELO, P.A., HOMSI-BRANDEBURGO, M.I., GIGLIO, J.R. and SUAREZ-KURTZ, G. (1993). Antagonism of the myotoxic effects of *Bothrops jararacussu* venom and Bothropstoxin by polyanions. **Toxicon**, **31 (3)**: 285 - 291.
- MESQUITA, L.C.M. (1994). Isolamento e caracterização química parcial de toxinas miotóxicas do veneno de *Bothrops pirajai*. **Tese de doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo**.
- MILTON, S. A. (1975) A note on the venom of an aged rattlesnake. **Toxicon**, **13**: 73 - 74.
- MOURA DA SILVA, A.M. (1992). Caracterização de venenos de serpentes por eletroforese em poliacrilamida. **Bol. Biotecnol.**, **3**: 3 - 7.
- NIKAI, T., MORI, N., KISHIDA, M., SUGIHARA, H. and TU, A. T. (1984). Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin from the venom of *Crotalus atrox*. **Arch. Biochem. Biophys.**, 231 - 309.
- OHSAKA, A. (1979). Hemorrhagic, necrotizing and edemaforming effects of snake venoms. In: **Snake Venoms**. (LEE, C. Y.), Springer-Verlag Berlin.

- OUYANG, C., TENG, C.M. and HUANG, T.F. (1992). Characterization of snake venom components acting on blood coagulation and platelet function. **Toxicon**, 30 (9): 945 - 966.
- OWNBY, C.L., BJARNASON, J. and TU, A.T. (1978). Haemorrhagic toxins from rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. Electron microscopic analysis of muscle damage. **Am. J. Path.**, 85: 149.
- OWNBY, C. Z. (1982). Pathology of rattlesnake envenenation. In: **Rattlesnake venoms, their action and treatment**. (TU, A. T.), Marcel Dekker, New York.
- QUEIROZ, L. S., SANTO-NETO, H., SIMIONI, L. R., FRANCESCHI, J. P. (1984). Muscle necrosis and regeneration after envenenation by *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon**, 22: 339.
- REISFELD, R.A., LEWIS, J. and WILLIAMS, D.A. (1962). Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrilamida gel. **Nature**, 4838: 281.
- RIBEIRO, L.A., PIRES DE CAMPOS, V.A.F., ALBUQUERQUE, M.J. e TAKAOKA, N.Y. (1993). Acidente ofídico no Estado de São Paulo. **Rev. Ass. Med. Brasil**, 39 (1): 4 - 7.
- ROSENFELD, G., HAMPE, O.G. and KELEN, E.M.A. (1959). Coagulant and fibrinolytic activity of animal venoms: determination of coagulant and fibrinolytic index of different species. **Mem. Inst. Butantan**, 29: 143.

- ROSENFELD, G. (1971). Simptomatology, pathology and treatment of snakes bites in South America. In: **Venomous animals and their venoms**. (BUCHERL, W. BUCKLEY, E. and DEULOFEV, V.) New York Academic.
- ROSENFELD, G. (1978). Acidentes por animais peçonhentos. In: **Doenças infecciosas e parasitárias**. (VERONESI, R.), Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro.
- ROBBINS, S. L., COTRAN, R. S. and KUMAR, U. (1987). Patologia estrutural y funcional. **Nueva editorial interamericana**.
- RUSSEL, F.E. (1979). The clinical problem of Crotalid snake venom poisoning. In: **Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology**. (LEE, C.Y.), Springer-Verlag Berlin.
- SANCHEZ, E. F., FREITAS, T. V., FERREIRA-ALVES, D. L., VELARDE, D. T., DINIZ, M. R., CORDEIRO, M. N., AGOSTINI-COTTA, G. and DINIZ, C. R. (1992). Biological activities of venoms from South American snakes. **Toxicon**, 30 (1): 95 - 103.
- SEEGERS, W.H. and OUYANG, C. (1979). Snake venoms and blood coagulation. In: **Handbook of Experimental Pharmacology**. (LEE, C.Y.), Springer-Verlag Berlin.

- SELISTRE, H.S. (1985). Isolamento e caracterização química parcial de um fator coagulante do veneno de *Bothrops insularis*. **Dissertação de mestrado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**, Universidade de São Paulo.
- SELISTRE, H. S. (1988). Fracionamento do veneno de *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa): caracterização parcial e estudo de toxinas com atividade hemorrágica, mionecrótica e edematogênica. **Tese de doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**, Universidade de São Paulo.
- SELISTRE, H. S., QUEIROZ, L. S., CUNHA, O. A. B., SOUZA, G. E. P. and GIGLIO, J. R. (1990). Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema-inducing toxin from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. **Toxicon**, 28 (3): 261 - 273.
- SILVEIRA, P. V. P., SANTOS, E. P., RESENDE, E. S. (1990). Alterações hemodinâmicas induzidas no cão por injeção de veneno de *Bothrops moojeni*. In: **Semana científica do curso de Medicina**. Univ. Fed. de Uberlândia, 1991.
- SHIPOLINI, R.A., CALLEWAERT, G.L., COTTERELL, R.C., DOONAN, S., VERNON, C.A. and BANKS, B.E.C. (1971). Phospholipase A from bee venoms. **Europ. Journ. of Biochem.**, 20: 459.
- STRYER, L. (1988). **Biochemistry**. 3a ed. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro.

TRUMP, B. F., BEREZESKY, I. K., OSERNIO-VARGAS, A. R. (1981). All death the disease process. The role of calcium. In: **Chapman death in biology and pathology** (BOWER, I. D., LOCKSHIN, R. A.). Chapman and hall, London.

TU, A.T. (1977). Blood coagulation. In: **Venoms Chemistry and Molecular Biology**. John Wiley e Sons.

VALIENTE, C., MORENO, E., SITTENFELD, A., LOMONTE, B. and GUTIÉRREZ, J. M. (1992). An electrophoretic study on phospholipase A2 isoenzymes in the venoms of Central American Crotaline snakes. **Toxicon**, 30 (8): 815 - 823.

VITAL BRAZIL, O. (1982). Peçonhas. In: **Farmacodinâmica**. (CORBETT, C. E.), Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro.

VOET, D., VOET, J.G. (1990). **Biochemistry**. John Wiley e Sons.