

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

DISTRIBUIÇÃO INTRAESPECÍFICA DE ENZIMAS
FOSFOLIPASE A₂ E MIOTOXINAS EM PEÇONHAS DE
SERPENTES IRMÃS DA ESPÉCIE *Bothrops moojeni*
(Viperidae, Crotalinae)

Rodrigo Magrin de Andrade

Prof^ª Dr^ª Maria Inês Homsí Brandeburgo

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

Uberlândia - MG
Dezembro - 2000

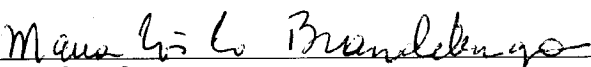
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

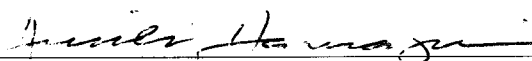
DISTRIBUIÇÃO INTRAESPECÍFICA DE ENZIMAS
FOSFOLIPASE A₂ E MIOTOXINAS EM PEÇONHAS DE
SERPENTES IRMÃS DA ESPÉCIE *Bothrops moojeni*
(Viperidae, Crotalinae)

Rodrigo Magrin de Andrade

Aprovada pela Banca Examinadora em 12/12/00.

Nota 100.


Prof^ª Dr^ª Maria Inês Homs Brandeburgo


Prof^ª Dr^ª Amélia Hamaguchi

Prof. Msc. Fábio Oliveira

Uberlândia, 12 de dezembro de 2000.

Dedico este trabalho:

Aos meus avós (in memoriam),

Juca, Emalda, Milco e Maria,

que foram para mim exemplo de vida e fonte de inspiração.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tudo que tem me propiciado, me guiando pelos difíceis caminhos da vida.

Aos meus pais, José Pedro e Veralúcia, pelo amor, carinho e afeto. Que renunciando aos seus sonhos, me deram a oportunidade de estar concluindo mais essa etapa.

Aos meus irmãos Fabrício e Tiago, pela amizade e convivência, ainda que muitas vezes difícil, mas enriquecedora.

A todos meus tios, tias e primos que sempre me acompanharam e incentivaram durante toda minha vida.

A minha namorada, Lucimara, pelo companheirismo, amizade e principalmente paciência.

A professora e amiga, Maria Inês Homs-Brandeburgo, pela orientação, dedicação e incentivo à pesquisa durante minha vida acadêmica

Aos professores Amélia Hamaguchi e Fábio Oliveira, pela co-orientação e ajuda pessoal nos momentos de dúvida. E a todos professores e funcionários do Curso de Ciências Biológicas.

A todos meus colegas do laboratório, em especial, Luiz Fernando e Gilvan, que tanto contribuíram para realização deste trabalho.

Às minhas amigas da 45.ª Turma do Curso de Ciências Biológicas, Juliana Meola, Karine, Yara e Tânia. E a toda comissão da “Diretoria”, Willian, Sílvio, Cleber, Christian e Fredston, pelos bons momentos de descontração.

Aos funcionários do INGEB, Tianinha, Marlene, Dona Nenzinha, Cida, Cleuber e Sr. Vilmar que tanto nos ajudam em nosso cotidiano.

A professora Vera Lúcia de Campos Brites, por gentilmente ter cedido as peçonhas.

Ao professor Milton Vieira, pelo empréstimo da resina CM-Sepharose Fast Flow.

E a todos que conviveram comigo durante esses anos, e de alguma forma contribuíram para minha realização profissional e pessoal.

LISTA DE ABREVIATURAS

PAGE – Eletroforese em gel de Poliacrilamida

SDS – Dodecil sulfato de sódio

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

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

Bis-acrilamida – N, N' metileno-bis-acrilamida

Tris – tris (hidroximetil) aminometano

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético, sal dissódico

PBS – Tampão fosfato, em salina

UV – Luz ultravioleta

rpm – rotações por minuto

CK – Creatina kinase

NH₄HCO₃ – Tampão bicarbonato de amônio

PLA₂ – Fosfolipase A₂

MER – Mobilidade eletroforética relativa

PM – Peso molecular

CM – grupo carboximetil

CuSO₄. 5H₂O – Sulfato de cobre penta hidratado

KOH – Hidróxido de potássio

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

mA – miliâmperes

nm - nanômetros

RESUMO

Os acidentes ofídicos quando não são fatais causam várias complicações às vítimas, resultando geralmente em seqüelas permanentes. No Brasil o gênero *Bothrops* é responsável pela maioria destes acidentes, sendo que a administração do soro antiofídico é a forma mais eficaz de tratamento. Este trabalho teve como objetivos fracionar um “pool” de peçonhas de *Bothrops moojeni*, analisar a atividade fosfolipásica (PLA₂) e miotóxica das frações isoladas, e correlacionar por eletroforeses em gel de poliacrilamida (PAGE), a presença ou ausência destas toxinas em peçonhas de serpentes irmãs, nascidas e criadas sob mesmas condições no Setor de Répteis (UFU). O “pool” de peçonhas foi fracionado em CM-Sepharose Fast Flow, e eluído no tampão bicarbonato de amônio (NH₄HCO₃) 0,05 M pH 8, estabelecendo-se um gradiente convexo de concentração (0,05 a 0,5 M). Foram obtidas nove frações, designadas MIIa, MIIb, MIIc, MIIId, MIIe, MIIIf, MIIg, MIIh e MIIi, respectivamente. A atividade PLA₂ das amostras foi determinada por titulação potenciométrica, usando como substrato uma emulsão aquosa de gema de ovo. A atividade miotóxica foi determinada pela atividade da enzima creatina kinase, utilizando-se o kit CK NAC activated 335. As frações MIIa e MIIi apresentaram intensa atividade fosfolipásica, sendo que em PAGE-SDS observa-se uma forte banda protéica em MIIi, com peso molecular de aproximadamente 14.000. Esta provavelmente corresponde à enzima PLA₂ de caráter básico. Comparando o perfil eletroforético das peçonhas de irmãs que tem elevada atividade PLA₂ com o da fração MIIi em PAGE pH 4,5, observa-se a presença de uma banda muito intensa e de mesma mobilidade eletroforética. Já as irmãs com baixa atividade PLA₂, praticamente não apresentam esta banda. A atividade CK foi detectada nas frações MIIe e MIIi e em PAGE-SDS ambas apresentam uma banda principal de maior mobilidade eletroforética, com peso molecular em torno de 13.000. Nestas frações provavelmente estão as miotoxinas (I e II) isoladas desta peçonha. As peçonhas das irmãs quando comparadas com frações MIIe e MIIi em PAGE pH 4,5, não apresentam diferenças significativas na expressão destas isoformas. Assim, a análise eletroforética comparativa nos possibilita concluir que em relação à composição em miotoxinas, as irmãs não apresentam uma variabilidade significativa, mas apresentam em relação à PLA₂ básica, sugerindo diferenças na expressão gênica destas isoformas. Propomos a seleção de espécimes para produção de antisoros, com base em critérios bioquímicos e na toxicidade das amostras, já que esta variação entre as diferentes peçonhas, pode limitar a capacidade de neutralização dos antisoros produzidos. Palavras-chave: peçonhas, variabilidade, *Bothrops moojeni* irmãs.

SUMÁRIO

1 – Introdução	1
2 – Objetivos	6
3 – Material e Métodos	7
3.1 – Material	7
3.2 – Métodos	7
3.2.1 – Preparação da Amostra	7
3.2.2 – Preparação de Resina	8
3.2.3 – Fracionamento da peçonha de <i>Bothrops moojeni</i> em CM - Sepharose Fast Flow	8
3.2.4 – Dosagem de Proteínas	8
3.2.5 – Determinação das Atividades Biológicas	9
3.2.5.1 – Atividade Fosfolipásica	9
3.2.5.2 – Atividade Miotóxica	9
3.2.6 – Eletroforeses em Géis de Poliacrilamida	10
3.2.6.1 – Preparação dos Géis	10
3.2.6.2 – Condições Desnaturantes	10
3.2.6.3 – Condições Nativas em pH Ácido	11
4 – Resultados	14
4.1 – Cromatografia de Troca Iônica em CM - Sepharose Fast Flow	13
4.2 – Atividade Fosfolipásica	15
4.3 – Atividade Miotóxica	16
4.4 – Eletroforeses em géis de poliacrilamida	17
4.5 – Determinação do peso molecular dos constituintes das frações	20
5 – Discussão e Conclusão	22
6 – Referências Bibliográficas	26

1 – INTRODUÇÃO

Durante muito tempo as serpentes foram vistas como objeto de medo e superstição para a humanidade. Alguns povos primitivos as veneravam e adoravam, sendo que sua peçonha era utilizada na preparação de flechas para a caça e guerra (STORER *et al.*, 1991). A própria bíblia, em seu simbolismo, utilizou a serpente como veículo do mal (NASCIMENTO *et al.*, 1994). Várias crenças erradas sobre as serpentes ainda persistem em todo o mundo, apesar do atual conhecimento sobre sua estrutura e biologia.

O seu desenvolvimento ocorreu de forma paralela na escala evolutiva dos vertebrados, o corpo longo e flexível, a ausência de patas, várias modificações morfológicas, e o aprimoramento de métodos para encontrar, capturar, subjugar e deglutir suas presas, proporcionaram a esse grupo uma grande distribuição territorial, além de ocuparem um lugar importante na natureza, como animais predadores (STORER *et al.*, 1991).

O termo peçonhenta, atualmente é usado para conceituar animais que possuam uma glândula especializada na produção de toxinas, utilizadas tanto na alimentação como para sua própria proteção. Algumas serpentes desenvolveram a capacidade de inocular uma quantidade letal de peçonha em suas presas, sendo comum a ocorrência de casos de envenenamentos em pessoas. Este é considerado um dos principais problemas de saúde pública do Brasil, já que em nosso território temos a prevalência de um grande número de espécies de serpentes peçonhentas, encontrando-se os gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis* da família Viperidae, e *Micrurus* representante da família Elapidae.

Anualmente são registrados cerca de 20.000 casos de acidentes ofídicos no território brasileiro, sendo que 0,5% destes são fatais (MINISTÉRIO da SAÚDE, 1990 citado por MARIA *et al.*, 1998). Dentre todos, o gênero *Bothrops* desperta um maior interesse, pois este é responsável pela maioria destes casos, causando várias complicações à população (ROSENFELD, 1971; FERREIRA *et al.*, 1992 e RIBEIRO, 1993 citado por RODRIGUES, 1996). Em Uberlândia e região a maioria dos casos de envenenamento, registrados no Hospital de Clínica da UFU, entre 1984 e 1991, foram pela espécie *Bothrops moojeni* (NISHIOKA & SILVEIRA, 1992).

Entre os fluidos secretados pelos vertebrados, as peçonhas de serpentes provavelmente são as mais concentradas, pois são constituídas de complexas formas protéicas (toxinas, enzimas e peptídeos biologicamente ativos) que representam de 90% a 95% do seu peso seco. Esses componentes causam vários efeitos fisiológicos (neurotóxico (pré/pós-sináptico), cardiotoxíco, edematogênico, miotóxico, coagulante, hemostático, hemorrágico, nefrotóxico e

hepatotóxico) (CHIPPAUX *et al.*, 1991), sendo que podem atuar conjuntamente e são responsáveis pelos principais efeitos lesivos sistêmicos (como ações coagulante e hemorrágica) e locais (como mionecrose e edema) (MOURA-da-SILVA *et al.*, 1991).

A toxicidade das peçonhas deve-se à presença de enzimas e proteínas, e sua ação letal é atribuída principalmente às neurotoxinas (BARRAVIEIRA, 1994), sendo que suas características e toxicidades são extremamente diferentes. As peçonhas do gênero *Bothrops* caracterizam-se principalmente pela atividade proteolítica, causando principalmente dor, edema, hemorragia e necrose local (BARRAVIEIRA, 1994).

A ação hemorrágica das peçonhas, se deve principalmente à presença de enzimas denominadas, hemorraginas, que são caracterizadas como metaloproteinases, pois necessitam de íons metálicos (zinco, cálcio, magnésio) para desempenharem sua função.

Muitas vezes essas enzimas agem sinergicamente, como descrito por BORKOW *et al.*, em 1993, sendo que três fatores hemorrágicos (BaH₁, BH₂ e BH₃) isolados do veneno de *Bothrops asper* possuíam 55% da atividade hemorrágica do veneno bruto, mas quando eram separados perdiam metade de sua atividade. O fator BaH₁, isolado por GUTIÉRREZ *et al.*, em 1995, induzia uma severa hemorragia minutos após a injeção, causando necrose das fibras musculares, com evidente desorganização do material miofibrilar. A nível miofibrilar ultraestrutural, as células perdiam sua organização regular, as linhas Z desapareciam e os sarcômeros se desordenavam, embora não houvesse uma evidente aglomeração ou hipercontração do miofilamento.

Analizando as peçonhas de serpentes das espécies *Bothrops atrox* e *Bothrops jararaca* OHSAKA *et al.* (1966) demonstraram haver uma pequena correlação entre suas atividade hemorrágica e proteolítica.

SERRANO *et al.* (1993) isolaram a metaloproteinase básica, denominada MPB, do veneno de *Bothrops moojeni*, esta enzima atua sobre a caseína, não é hemorrágica, mas apresenta traços de atividade sobre a coagulação sanguínea.

ASSAKURA *et al.* (1985) purificaram a moojeni protease A da peçonha da serpente *Bothrops moojeni*, esta enzima proteolítica, hidroliza colágeno do tipo I, fibrinogênio, e oxida a cadeia β da insulina (REICHL & MANDELBAUM, 1993), sendo que sua atividade é intensificada na presença de íons Ca²⁺ e Mg²⁺.

Peçonhas de várias serpentes, possuem um grupo de enzimas denominadas, "thrombin-like", que atuam diretamente na cascata da coagulação sanguínea, promovendo a ativação de fatores sanguíneos. Muitas dessas enzimas tem sido identificadas e utilizadas na terapia de pacientes trombóticos. A batroxobina, uma enzima coagulante, isolada do veneno de *Bothrops*

moojeni, é uma das que merecem destaque, pois induz a desfibrinogenação sanguínea, favorecendo a circulação (BELL, 1997).

Em venenos botrópicos, os componentes "thrombin-like" e ativador do fator-X nem sempre estão associados, o efeito coagulante pode estar relacionado somente a um dos componentes (NAHAS *et al.*, 1979).

As fosfolipases A₂ (PLA₂ EC 3.1.1.4) são enzimas esterolíticas que catalisam a hidrólise do grupo 2 acil de sn-3 fosfoglicerídeos (SLOTBOOM *et al.*, 1982; DENNIS, 1983 citado por LÔBO DE ARAÚJO *et al.*, 1994), liberando ácido araquidônico, um precursor de outros eicosanóides, que estão envolvidos no desencadeamento de reações inflamatórias (KUDO *et al.*, 1993). Em peçonhas botrópicas, estas enzimas podem ser os componentes responsáveis pela necrose local e por outros efeitos deletérios da peçonha, podendo ocasionar perda permanente de tecido, inabilidade e amputação no local da picada.

O cálcio é um cofator essencial para a catálise, e a substituição por outro íon bivalente como o bário ou cádmio resulta em uma significativa redução de atividade (YU *et al.*, 1993).

Estas enzimas são amplamente distribuídas na natureza e tradicionalmente classificadas em intracelulares ou extracelulares. As PLA₂s intracelulares são encontradas associadas à membranas e estão envolvidas no metabolismo de fosfolípidios, transdução de sinal e várias outras funções celulares essenciais. As PLA₂s extracelulares são abundantes em sucos pancreáticos de mamíferos e nas peçonhas de serpentes e insetos (como abelhas) (ARNI & WARD, 1996). São divididas nas classes I, II e III, com base na sua seqüência de aminoácidos e na posição da ligação de dissulfeto (RENETSEDER *et al.*, 1985).

Independente de sua função catalítica primária, as PLA₂ de serpentes muitas vezes apresentam atividades farmacológicas adicionais. Miotóxica (MEBS, 1986; GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1995), hemolítica indireta (CONDREA *et al.*, 1981), edematogênica (LLORET & MORENO, 1993), hipotensiva (HUANG, 1984), neurotóxica pré-sináptica (CHANG *et al.*, 1977) e pós-sináptica (BON *et al.*, 1979), cardiotoxica (FLECHER *et al.*, 1981), agregação plaquetária (YUAN *et al.*, 1993; GERRARD *et al.*, 1993) e convulsiva (FLECHER *et al.*, 1980); o relato dessas atividades implica na ação das PLA₂s em vários efeitos farmacológicos observados nos envenenamentos por serpentes.

Com o intuito de se conhecer o mecanismo de ação e as patogêneses das mionecroses, várias miotoxinas da peçonha de serpentes do gênero *Bothrops* vem sendo isoladas e caracterizadas por diversos métodos cromatográficos, sendo que todas pertencem ao grupo II das fosfolipases A₂ básicas (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1995). As PLA₂s miotóxicas destas peçonhas podem ser divididas em dois grandes grupos: aquelas com atividade enzimática

sobre substratos artificiais, (PLA₂s miotóxicas Asp 49), e aquelas sem atividade catalítica, (PLA₂s miotóxicas Lys 49) (HOMSI-BRANDEBURGO *et al.*, 1988; GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1995).

As miotoxinas das peçonhas de serpentes podem ser categorizadas em três classes: pequenos polipeptídeos básicos como as miotoxinas α e a crotamina; as cardiotoxinas das peçonhas do gênero *Naja* e toxinas fosfolipase A₂ como a crotoxina e a notexina. Todas as três classes induzem despolarização e contração de células do músculo esquelético. Entretanto, as mionecroses induzidas pelos pequenos polipeptídeos são diferentes daquelas induzidas pelas cardiotoxinas e PLA₂s, pois estas causam a rápida lise do sarcolema, enquanto que no anterior esta lise não é aparente (OWNBY, 1998).

A composição química destas proteínas tóxicas entre as peçonhas é muito diversa e reflete grandes alterações em efeitos específicos e na toxicidade das mesmas.

Existem também estudos demonstrando que as peçonhas de serpentes individuais apresentam diferenças no conteúdo de toxinas específicas e mais que uma isoforma pode estar presente numa única amostra (MONTEIRO *et al.*, 1997; MONTEIRO *et al.*, 1998), resultando em uma variabilidade clínica de envenenamentos, causando dificuldade na seleção de espécimes para produção de soros antiofídicos.

A variabilidade das peçonhas pode ser observada em vários níveis: interfamília, intergêneros, interespecies, intersubspecies e intraespecies, sendo um fato conhecido e atribuído a condições geográficas, dieta, temperatura, idade e outros fatores (CHIPPAUX *et al.*, 1991; LOMONTE & CARMONA, 1992).

Trabalhando com a peçonha de diferentes espécies e subespécies do gênero *Bothrops*, extraídas de serpentes fêmeas e de seus respectivos descendentes recém-nascidos, FURTADO *et al.* (1991), relacionaram a produção de peçonha ao tamanho da serpente e demonstraram haver variação no conteúdo protéico, na toxicidade e nas atividades fibrinogenolítica/amidolítica/ “thrombin-like”.

A comparação entre peçonhas de serpentes da América Central (Crotalinae), demonstrou haver uma variabilidade interespecífica no número e no ponto isoelétrico de enzimas fosfolipásicas, indicando ser isoenzimas, já que todas apresentaram atividade hemolítica em géis contendo, agarose-eritrócitos-gema de ovo. Nesse mesmo estudo, ainda se observou variabilidade interindividual nas peçonhas da espécie *Bothrops asper*, onde duas isoenzimas fosfolipase A₂ se encontravam presentes em algumas peçonhas e ausentes em outras (VALIENTE *et al.*, 1992). MOURA-da-SILVA *et al.* (1991), também evidenciaram

variações nos níveis de miotoxinas e na atividade fosfolipásica, na peçonha de nove serpentes do gênero *Bothrops*.

Em peçonhas de serpentes da espécie *Bothrops jararaca* foram isoladas várias isoformas de bothrojaracin (BJC), um potente inibidor específico da trombina, além de se observar uma considerável variação na produção da mesma e em outras atividades importantes da peçonha como PLA₂s e proteinases. Esta análise foi realizada no final de dez meses, onde todas as serpentes eram fêmeas e foram mantidas sob condições invariáveis de sazonalidade, com temperatura constante e fotoperiodismo (MONTEIRO *et al.*, 1998).

LOMONTE *et al.* (1990) isolaram três miotoxinas, uma de *Bothrops atrox* e duas de *Bothrops moojeni*. Todas as proteínas eram de caráter básico, apresentando peso molecular de aproximadamente 13.500 e composição de aminoácidos semelhantes. Estas miotoxinas induziam à uma drástica micronecrose muscular, porém somente a miotoxina de *Bothrops atrox* apresentava atividades fosfolipásica e anticoagulante.

Analizando peçonhas de serpentes da espécie *Bothrops atrox*, proveniente de distintas regiões da Amazônia, CANIVATO *et al.* (1998) demonstraram haver uma considerável diferença na atividade "thrombin-like" das peçonhas, sendo que esta diferença foi visível em PAGE-SDS.

Os halos hemorrágicos produzidos pela peçonha de várias espécies de *Bothrops* capturadas na Argentina, apresentaram diferentes intensidades de cor, embora não fosse observado significativas variações na medição dos diâmetros médios e no valor dos halos obtidos. Porém, importantes diferenças foram encontradas na determinação da quantidade de hemoglobina extraída, havendo similaridade com tamanho do halo produzido pelas diferentes peçonhas (DE ROOT *et al.*, 2000).

A análise e identificação destes componentes individuais das peçonhas de serpentes da mesma espécie pode ser importante para obter antígenos espécie-específicos utilizados em imunodiagnósticos, na seleção das melhores peçonhas para produzir antisoros e também para um melhor entendimento das patologias resultantes de envenenamentos por espécies muito próximas ou de mesma espécie (MOURA-da-SILVA *et al.*, 1991).

Estas variações auxiliam vários zoologistas a caracterizar filogeneticamente as serpentes em espécies e subespécies (GLENN & STRAIGHT, 1978), além de proporcionar um maior conhecimento sobre a química das peçonhas.

2 - OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos fracionar um "pool" (VB) de peçonhas de *Bothrops moojeni*, analisar as atividades PLA₂ e miotóxica das frações isoladas e correlacionar por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), a presença ou ausência destas toxinas em peçonhas individuais de serpentes irmãs, nascidas e criadas em cativeiro sob mesmas condições.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Material

- As peçonhas das serpentes (S-1 a S-12) foram cedidas pela Prof^a. Msc. Vera Lúcia de Campos Brites, do Setor de Répteis da UFU, sendo posteriormente liofilizadas e armazenadas a - 20° C.
- Os animais para experimentação (camundongos da raça Swiss) foram cedidos pela Pentapharm ou pelo Instituto Vallée, sendo mantidos no Biotério do Laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais da UFU.
- Foi utilizada a resina catiônica CM-Sepharose Fast Flow (Pharmacia Fine Chemicals), que possui um grupamento carboximetil (CH_3COO^-) ligado a uma matriz insolúvel de agarose.
- Reagentes: Acrilamida, Bis-Acrilamida, TEMED, SDS, Coomassie Brilliant Blue R-250, EDTA, Soroalbumina Bovina, Trizma Base, Azul de Bromo Fenol, Fucsina Básica, β -mercaptoetanol, Persulfato de Amônio, PBS, EDTA, Padrão de peso molecular (Dalton Mark VII-L) produtos da Sigma Chem. Co. USA, kit CK NAC activated 335 da Randox.
- Os demais reagentes como: HCl, NaCl, NaOH, NH_4OH , Álcool etílico e metílico foram utilizados em grau analítico.

3.2 - Métodos

3.2.1 - Preparação da Amostra

Cerca de 200 mg do VB de peçonhas foi ressuspenso em 2,5 ml de tampão bicarbonato de amônio 0,05 M em pH 8 e centrifugados a alta rotação (10000 rpm) por 10 minutos à 28°C. Da solução sobrenadante resultante foram retirados 50 μl para dosagem de proteínas e realização de atividades biológicas. O restante dessa solução foi aplicado na coluna de cromatografia.

3.2.2 - Preparação da Resina

Recuperada pelo sistema a vácuo e funil de placa sinterizada, utilizando-se o seguinte procedimento:

- 1.º passo: 5 volumes de NaCl 2 M
- 2.º passo: 10 volumes de Azida Sódica 1mM
- 3.º passo: 5 volumes de Borato de Sódio 5 mM pH 10
- 4.º passo: idem 2.º
- 5.º passo: 5 volumes de Tampão Acetato de Sódio 5 mM pH 5
- 6.º passo: idem 2.º
- 7.º passo: idem 3.º

E finalmente após o tratamento, a resina foi empacotada em uma coluna de vidro (30 cm de altura x 1,5 cm de diâmetro) e equilibrada no tampão bicarbonato de amônio 0,05 M em pH 8.

3.2.3 - Fracionamento da peçonha de *Bothrops moojeni* em CM - Sepharose Fast Flow

Realizada segundo a técnica descrita por SOARES *et al.* (1998a), onde se estabelece um gradiente convexo de concentração (0,05 a 0,5 M) em pH 8 e temperatura ambiente (28°C). Foram coletadas frações de 3 ml/tubo, em um fluxo de 20 ml/hora. A estimativa da concentração de proteína em cada tubo foi realizada por absorbância de 280 nm utilizando-se um espectrofotômetro SPEKOL UV VIS da Zeiss. As frações obtidas foram liofilizadas em um Liofilizador LABCONCO, modelo LYPH – LOCK 1L.

3.2.4 - Dosagem de Proteínas

Para quantificar as proteínas presentes nas amostras de peçonha e frações, soluções contendo de 0,1 a 2,0 mg de proteínas serão submetidas à dosagem pelo método do microbiureto, conforme descrito por ITZHAKI & GILL (1964). Utilizou-se a soroalbumina bovina para estimar a curva padrão. As amostras de proteínas foram completadas para o volume de 2 ml com água, aos quais foram acrescentados 1 ml dos reagentes R1 ou R2. Em seguida, foi feita a leitura em espectrofotômetro a 310 nm, contra um branco sem proteína. O reagente R1 era composto por 0,21 % CuSO₄ · 5H₂O dissolvido em NaOH 30,4 % e o R2 era formado por uma solução de NaOH a 30 %.

3.2.5 - Determinação das Atividades Biológicas

3.2.5.1 - Atividade Fosfolipásica

Descrita por DE HAAS *et al.* (1968), utilizou-se como substrato uma emulsão aquosa de gema de ovo (uma gema em 50 ml de água desionizada) em presença de desoxicolato de sódio e de CaCl_2 , como segue: 15 ml da emulsão aquosa da gema de ovo, 1 ml de CaCl_2 0,6 M e 10 ml da solução de desoxicolato de sódio 0,03 M; o volume foi completado para 100 ml com água desionizada, sendo que 10 ml dessa solução foram utilizados para cada ensaio enzimático.

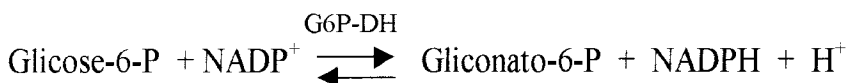
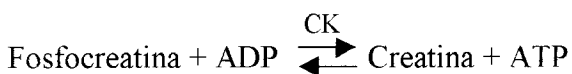
Os ácidos graxos liberados enzimaticamente foram titulados com uma solução padrão de NaOH (0,1208 N) em pH 8,0 e temperatura ambiente (28° C). A atividade fosfolipásica específica foi realizada utilizando-se 10 µg de proteína da amostra, e calculada pela quantidade de microequivalentes de base consumida por minuto, por mg de proteína.

3.2.5.2 - Atividade Miotóxica

Amostras contendo 50 µg de proteína foram diluídas em 50 µl de PBS pH 7,2, e injetadas intramuscularmente no músculo gastrocnemius direito de camundongos (25g - 30g de peso), os controles receberam somente PBS. Após três horas o sangue dos camundongos foi coletado por punção cardíaca na presença de EDTA, e imediatamente centrifugados em baixa rotação (2000 rpm) por 10 minutos à 4°C.

A atividade da enzima creatina kinase foi determinada fotometricamente pela velocidade de formação do NADPH (DGKC, 1977), segundo o esquema abaixo:

Princípio da reação:



O procedimento consiste em incubar 20µl 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 activated 335 da Randox), realizar a leitura inicial a 340 nm e após 1, 2 e 3 min. A atividade creatina kinase da amostra do plasma foi expressa em unidades/litro.

3.2.6 - Eletroforeses em Géis de Poliacrilamida

3.2.6.1 - Preparação dos Géis:

Dois espaçadores em forma de fitas são utilizados para formar entre as placas um espaço retangular de aproximadamente 0,2 mm de espessura, as placas de vidro utilizadas na preparação dos géis medem aproximadamente 10 cm de largura, 10,5 cm de comprimento e 0,1 cm de espessura. Com auxílio de um suporte de montagem, as placas foram imobilizadas verticalmente, formando assim uma câmara que foi preenchida com a solução do gel.

Terminada a polimerização, a placa foi colocada em uma cuba de acrílico e conectada aos eletrodos. A eletroforese foi conduzida a 20 mA de corrente, por aproximadamente 80 minutos.

Após a eletroforese, os géis foram retirados da placa e mergulhados em uma solução fixadora (metanol 50 %; ácido acético 10 %) por 5 minutos, sendo posteriormente corados por aproximadamente 10 minutos com Coomassie Brilliant Blue R-250 0,1% (p/v) em água – metanol – ácido acético (40:50:10 v/v) e o excesso desta solução corante foi retirado com água – etanol – ácido acético (60:30:10 v/v). Em seguida, os géis foram prensados entre duas folhas de papel celofane poroso, em bastidores fixados por garras e deixados à temperatura ambiente por aproximadamente 2 a 3 dias para a secagem. Neste procedimento os géis se desidratam, transformando-se numa fina película entre as folhas de celofane, que são recortadas e guardadas para análise posterior e fotografadas.

3.2.6.2 - Condições Desnaturantes:

As eletroforeses para a estimativa dos pesos moleculares foram realizadas segundo o método de LAEMMLI (1970), utilizando-se géis de poliacrilamida com agentes desnaturantes na presença de SDS (dodecil sulfato de sódio).

Na preparação dos géis a 10%, foram utilizadas as seguintes soluções:

SOLUÇÕES ESTOQUES	VOLUME (µl)	
	GEL DE SEPARAÇÃO	GEL DE EMPILHAMENTO
Tris-HCl 2M pH 8,8	1292	-
Tris-HCl 2M pH 6,8	-	138
EDTA 200 mM	69	22
Acrilamida:bis (30 : 0,8)	3658	358
Água desionizada	1705	1628
TEMED	8,2	2,8
Persulfato de amônio (10%)	41	19

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

As amostras de proteína foram dissolvidas em 50 µl de água desionizada e 25 µl de tampão STOP (Tris-HCl 187 mM pH 6,8; SDS 6 %; EDTA 6 mM; azul de bromofenol 1% e glicerol 27%) e 5 µl de β-mercaptoetanol, aquecidas por 2 minutos a 100° C, e aplicadas nos poços de gel.

Utilizou-se o seguinte marcador padrão (Dalton Mark VII-L): α-lactoalbumina (PM 14.200), inibidor de tripsina (PM 20.100), tripsinogênio de pâncreas (PM 24.000), anidrase carbônica (PM 29.000), gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (PM 36.000), ovoalbumina (PM 45.000) e soroalbumina bovina (PM 66.000).

3.2.6.3 - Condições Nativas em pH Ácido:

Esta eletroforese seguiu a técnica descrita por REISFELD *et al.* (1962), com algumas modificações.

Na preparação dos géis a 10% foram utilizadas as seguintes soluções:

SOLUÇÕES ESTOQUES	VOLUME(µl)
Solução A	775
Solução C	2100
Água desionizada	3375
TEMED	20
Persulfato de amônio (10%)	50

A solução A era composta de KOH 1N (2,85g em 50 ml de água desionizada), sendo que 48 ml dessa solução teve seu pH acertado para 4,5 com ácido acético glacial; em seguida, completou-se o volume da solução para 100 ml com água desionizada.

A solução C foi preparada com 28 g de acrilamida e 0,8 g de bis-acrilamida, diluídos com água desionizada para 100 ml.

A solução do eletrodo era constituída de β -alanina e ácido acético 0,35 M, pH 4,3 (solução estoque) tanto para o cátodo quanto para o ânodo, sendo diluída 10 vezes no momento do uso.

As amostras de proteína, foram dissolvidas em 50 μ l do tampão do eletrodo diluído 10 vezes e 10 % de glicerol. A fucsina básica foi utilizada como indicador de migração.

4 – RESULTADOS

4.1 - Cromatografia de Troca Iônica em CM - Sepharose Fast Flow

O perfil cromatográfico de 200mg do VB de *Bothrops moojeni* obtido por cromatografia de troca iônica em CM - Sepharose Fast Flow, é mostrado na Figura 1. Os principais picos protéicos obtidos foram: Mla, Mlb, MIIa, MIIb, MIII, MIV, MV, MVI e MVII e após liofilização e dosagem de proteínas foram armazenados a -20°C para ensaios posteriores. Na Tabela 1 estão expressos os percentuais de recuperação protéica das frações obtidas no fracionamento e as atividades PLA₂ e miotóxica.

Tabela 1 - Percentual de recuperação protéica das frações obtidas no fracionamento em CM - Sepharose Fast Flow.

Amostras	Proteína		Atividades	
	A _{280 nm} (total)	Recuperação (%)	PLA ₂ (U/mg/min)	Miotóxica CK (U/l)
VB	155,9	100	83,39	1736,19
Mla	49,46	31,72	94,95	-
MLb	31,35	20,11	-	-
MIla	9,0	5,83	-	-
MIlb	11,97	7,68	-	-
MIII	8,99	5,77	-	-
MIV	4,58	2,94	-	-
MV	7,22	4,63	90,02	-
MVI	11,98	7,68	-	2017,27
MVII	7,11	4,56	-	1952,51
Total	141,75	90,92		

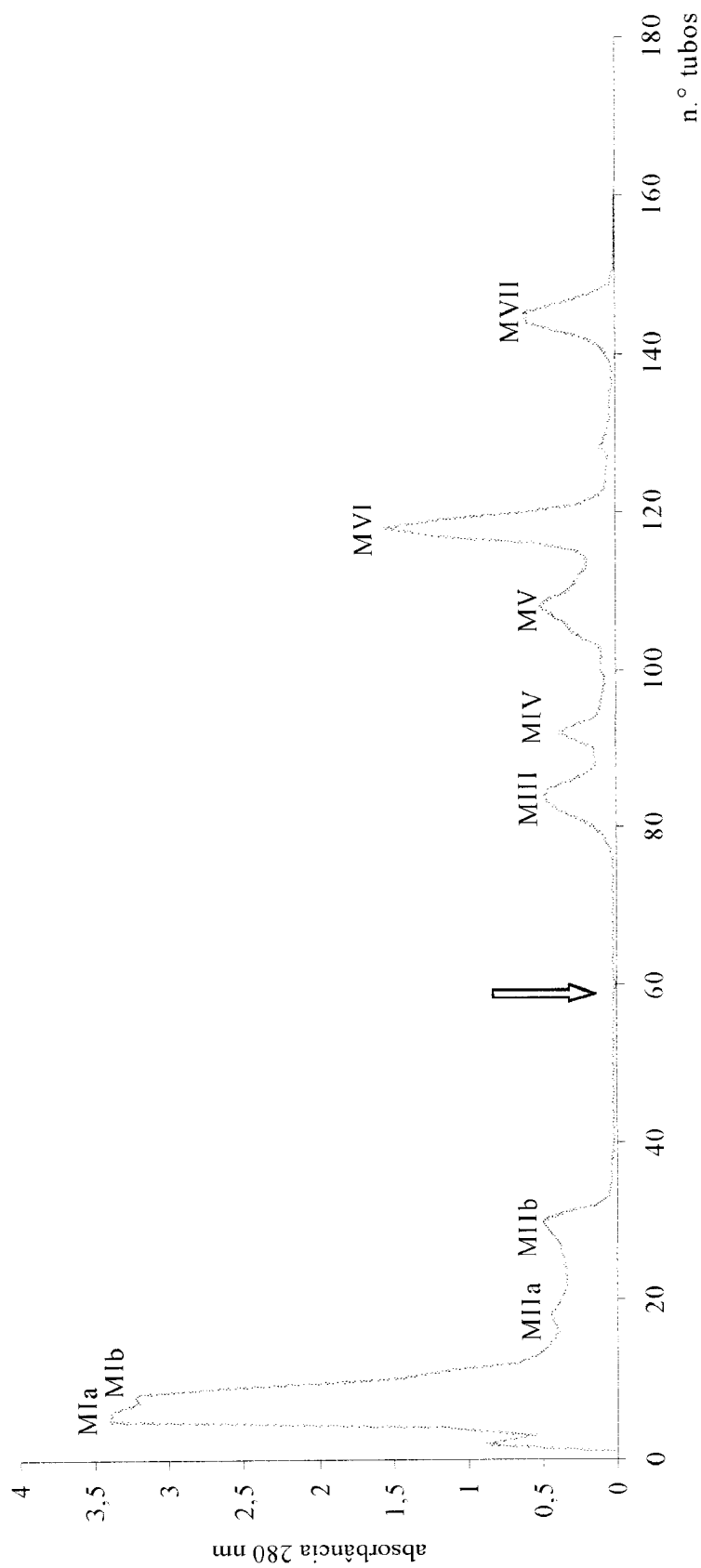


Fig. 1 - Perfil cromatográfico de 200 mg do VB de *Bothrops moojeni* em coluna de CM-Sepharose Fast Flow (30 x 1,5 cm), equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,05 M em pH 8, estabelecendo-se um gradiente convexo de concentração 0,05 a 0,5 M (seta), a partir do 60.º tubo, com fluxo de 20 ml/hora e coletadas frações de 3,0 ml/tubo a temperatura ambiente.

4.2 - Atividade Fosfolipásica

A atividade fosfolipásica do VB, frações Mla e MV obtidas do fracionamento do VB e das peçonhas individuais das *Bothrops moojeni* irmãs, foi determinada sobre uma emulsão de gema de ovo, por titulação potenciométrica. A Figura 2 mostra os resultados obtidos. O VB e as frações Mla e MV possuem uma atividade com valores bem próximos. Entre as peçonhas individuais, algumas apresentam elevada atividade enzimática específica, maior que VB, Mla e MV, sendo que nas restantes está é muito baixa.

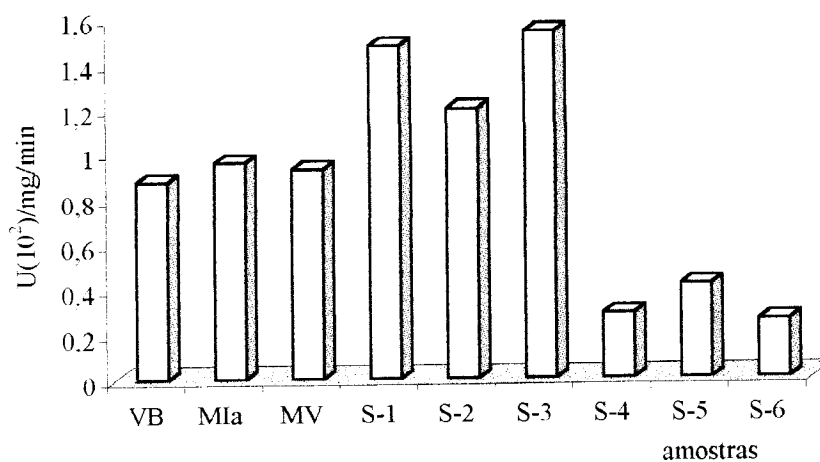


Fig. 2 - Atividade fosfolipásica (média de três ensaios) do VB; frações Mla, MV e peçonhas de *Bothrops moojeni* irmãs (S-1 a S-6) sobre emulsão de gema de ovo, por titulação potenciométrica, utilizando-se 10 µg de proteína em cada ensaio a temperatura ambiente (28°C), sendo a atividade específica expressa em U(10²)/mg/min.

4.4 – Eletroforeses em géis de poliacrilamida

Foram realizadas em géis de poliacrilamida a 10% em condições desnaturantes (Figuras 4 e 5) e nativas pH ácido (Figura 6, 7 e 8). Observar na Figura 4, linha B, que a fração MV apresenta uma banda protéica principal (seta) de maior mobilidade eletroforética. Na Figura 5, linhas B e C, as frações MVII e MVI respectivamente, também apresentam uma banda protéica (setas) de maior mobilidade eletroforética. Já na Figura 6 pode-se observar a presença de uma banda protéica (seta) presente no VB (linha H), na fração MV (linha G) e muito forte nas peçonhas individuais de somente 3 irmãs (linhas D, E e F). E finalmente, na Figura 7, observa-se uma banda protéica (seta) presente em todas as amostras. Na Figura 8, são mostrados os mesmos resultados obtidos nas Figuras 6 e 7, porém nesta foi realizado dosagem de proteína das amostras.

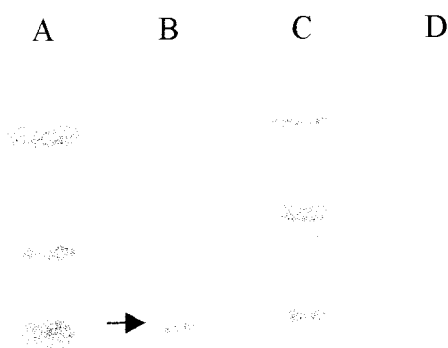


Fig. 4 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% em condições desnaturantes, tampão Tris-glicina pH 8,3, segundo LAEMMLI (1970). A- VB de *Bothrops moojeni* / B- fração MV/ C- fração MII / D- padrão de peso molecular (Dalton Mark VII-L): soroalbumina bovina (PM 66.000), ovoalbumina (PM 45.000), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (PM 36.000), anidrase carbônica bovina (PM 29.000), tripsinogênio de pâncreas bovino (PM 24.000), inibidor de tripsina (PM 20.100), α -lactoalbumina (PM 14.200).

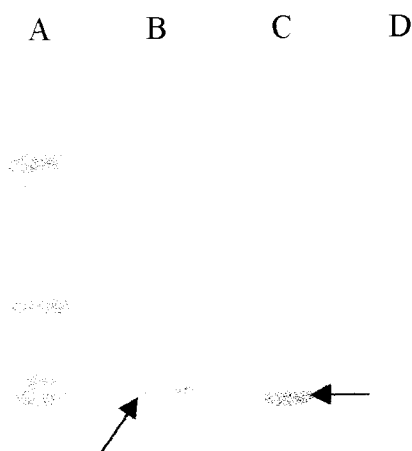


Fig. 5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% em condições desnaturantes, tampão Tris-glicina pH 8,3, segundo LAEMMLI (1970). A- VB de *Bothrops moojeni*/ B- fração MVII/ C- fração MVI/ D- padrão de peso molecular (Dalton Mark VII-L): soroalbumina bovina (PM 66.000), ovoalbumina (PM 45.000), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (PM 36.000), anidrase carbônica bovina (PM 29.000), tripsinogênio de pâncreas bovino (PM 24.000), inibidor de tripsina (PM 20.100), α -lactoalbumina (PM 14.200).

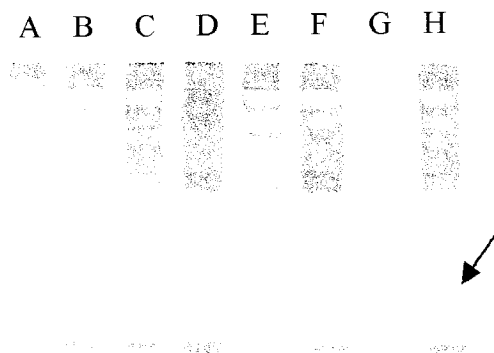


Fig. 6 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% em condições nativas, tampão β -alanina/ácido acético pH 4,5 para verificar proteínas de caráter básico, segundo REISFELD *et al.* (1962). A: S-6/ B: S-5/ C: S-4/ D: S-3/ E: S-2/ F: S-1/ G: fração MV/ H: VB de *Bothrops moojeni*.

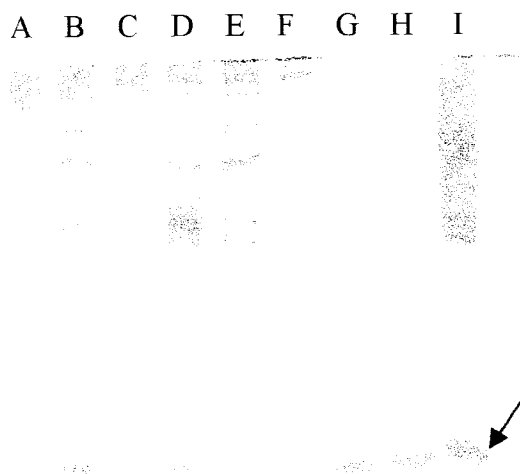


Fig. 7 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% em condições nativas, tampão β -alanina/ácido acético pH 4,5 para verificar proteínas de caráter básico, segundo REISFELD *et al.* (1962). A: S-7/ B: S-8/ C: S-9/ D: S-10/ E: S-11/ F: S-12/ G: fração MVII/ H: fração MVI/ I: VB de *Bothrops moojeni*.

A B C D E F G H I

Fig. 8 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% em condições nativas, tampão β -alanina/ácido acético pH 4,5 para verificar proteínas de caráter básico, segundo REISFELD *et al.* (1962). Foram aplicados 30 μ g de proteína em cada poço do gel. A: S-6/ B: S-5/ C: S-4/ D: S-3/ E: S-2/ F: S-1/ G: fração MV/ H: fração MVI/ I: fração MVII.

4.5 – Determinação do peso molecular dos constituintes das frações

As migrações relativas do padrão de peso molecular foram traçadas em gráficos, revelando uma curva logarítmica, que foi exposta na forma de equação logarítmica. A equação de cada perfil do padrão de peso molecular é apresentada na Figura 8. Na Tabela 2, estão as estimativas do peso molecular de alguns constituintes da frações.

Tabela 2 - Estimativas dos pesos moleculares dos constituintes das frações, submetidas a eletroforese em PAGE - SDS (10%).

Frações analisadas	Pesos moleculares estimados
MIa	14.400
MV	16.200
MVI	15.300
MVII	15.900

Os pesos moleculares das bandas protéicas foram obtidas pela equação expressa nos gráficos A e B da Figura 8.

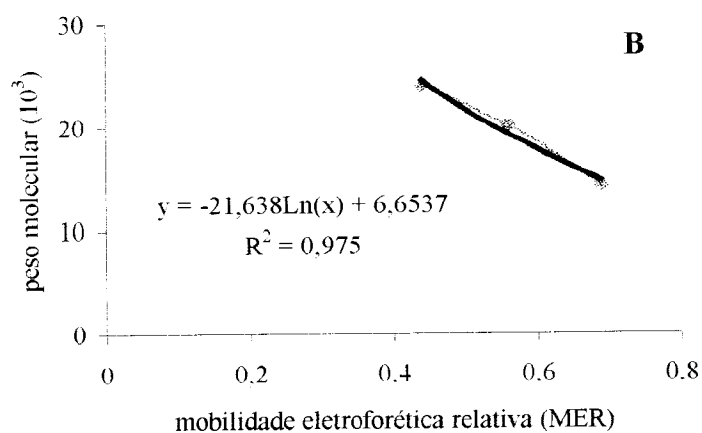
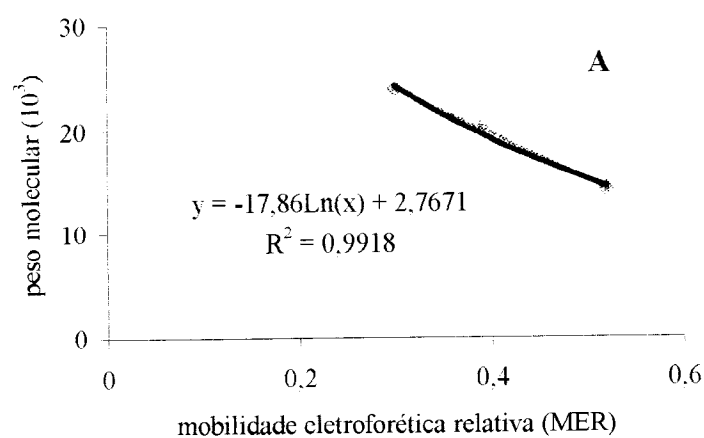


Fig. 9 - Curvas padrões para a estimativa dos pesos moleculares, através da mobilidade eletroforética relativa (MER) das principais bandas protéicas presente nas frações obtidas no fracionamento em CM - Sepharose Fast Flow. **A** - Representa a MER da Figura 4 e **B** - Representa a MER da Figura 5.

5 – DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

As peçonhas sempre foram objetos cobiçados de estudo e somente após iniciar o isolamento e caracterização de seus componentes, muitos deles puderam ser utilizados em diversas áreas de pesquisa em benefício do homem.

Diversos pesquisadores observaram que no envenenamento botrópico o antisoro geralmente não era capaz de reverter os danos locais, cujo principal efeito é a mionecrose. Assim, houve um considerável interesse no estudo dos componentes responsáveis pelas mionecroses e seus mecanismos de ação. Em consequência, várias miotoxinas de peçonhas botrópicas foram isoladas e caracterizadas.

Sendo estas proteínas básicas, utiliza-se usualmente processos de isolamento incluindo cromatografias de troca catiônica com gradiente de sal em pH neutro, separando-as dos componentes ácidos das peçonhas (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1995).

O fracionamento do VB de peçonhas de *Bothrops moojeni* realizado em CM-Sepharose Fast Flow, conforme descrito por SOARES *et al.* (1998a), é relativamente simples, rápido e eficiente. Já que o tampão de eluição (NH_4HCO_3 0,05 M pH 8) é extremamente volátil, facilitando sua eliminação durante o processo de liofilização, não havendo a necessidade de se dializar as frações.

Dentre todas as frações obtidas no fracionamento (Figura 1), somente MIIa e MV apresentaram atividade fosfolipásica (Figura 2), enquanto que a atividade miotóxica indireta foi detectada nas frações MVI e MVII (Figura 3). Com base na literatura, também esperava-se encontrar atividade miotóxica indireta na fração MV, entretanto, não foi possível realizar os experimentos com esta amostra, devido a problemas de contaminação ocorridos durante este trabalho.

Considerando que MIIa foi excluída da coluna de troca catiônica e que MV, MVI e MVII foram retidas, estes resultados indicam que MIIa contém uma fosfolipase ácida e MV, MVI e MVII PLA_2 s básicas. Em geral, as fosfolipases básicas de peçonhas de serpentes apresentam miotoxicidade (HOMSI-BRANDEBURGO *et al.*, 1988; GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1995). Esta miotoxicidade pode ser observada quando as miotoxinas botrópicas são injetadas intramuscularmente em camundongos, produzindo um proeminente aumento nos níveis de creatina kinase do plasma, culminando entre 1 a 3 horas após a aplicação, com posterior decréscimo (LOMONTE *et al.*, 1990).

MOURA-da-SILVA *et al.* (1991), relataram a presença de duas proteínas básicas com

altas atividades PLA₂ e miotóxica na peçonha de *Bothrops moojeni*, designadas MOO-1 e MOO-2, respectivamente. A fração MV, portanto, pode conter uma destas PLA₂ miotóxicas.

Por outro lado, REICHL *et al.* (1989) descreveram o isolamento de uma PLA₂ ácida da peçonha de *Bothrops moojeni*, a qual pode ser a mesma contida na fração MIa.

As frações MVI e MVII, provavelmente contém as duas miotoxinas (I e II, respectivamente) isoladas da peçonha de *Bothrops moojeni* por LOMONTE *et al.* (1990), estas apresentam elevada atividade miotóxica e nenhuma atividade PLA₂. SOARES (1997) relata a presença de atividade edematogênica nestas miotoxinas.

O perfil eletroforético de MV em PAGE-SDS (Figura 4; seta) mostra uma banda majoritária com peso molecular em torno de 16.200 (Tabela 2), que deve corresponder à uma PLA₂ básica desta peçonha, visto que estas enzimas apresentam peso molecular para o monômero, com valores que variam de 13.000 a 18.000 (MOURA-da-SILVA *et al.*, 1991).

A fração MIa também mostrou bandas com massa molecular característica de PLA₂s, embora tenha apresentado baixo grau de pureza, o que impossibilitou uma comparação com o perfil eletroforético das peçonhas individuais das irmãs.

Na Figura 5, linhas B e C, estão apresentados os perfis eletroforéticos em PAGE-SDS das frações MVII e MVI, respectivamente. Estas apresentam pesos moleculares característicos de PLA₂, 15.300 para MVI e 15.900 para MVII (Tabela 2), entretanto não possuem atividade enzimática sobre lipídeos de membrana.

Embora todas as miotoxinas das peçonhas do gênero *Bothrops* apresentem estrutura de PLA₂, muitas destas perdem sua atividade catalítica devido a substituição de um aminoácido na região de ligação do cálcio, especialmente Lys por Asp na posição 49 (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1995).

KINI & IWANAGA (1986) comparando as seqüências de aminoácidos de miotoxinas e PLA₂s, sugeriram que um sítio catiônico localizado entre os resíduos 79 – 87 associado a uma região hidrofóbica seja o responsável pela miotoxicidade, e independente da atividade fosfolipásica. O “sítio miotóxico” destas toxinas pode ser responsável pela ligação e penetração em membranas plasmáticas do músculo esquelético, possivelmente por interações hidrofóbicas (GUTIÉRREZ *et al.*, 1989).

Os métodos de eletroforese em condições nativas, são comumente utilizados para evidenciar a variabilidade existente entre as peçonhas de serpentes (SOARES *et al.*, 1998b), ou para analisar o grau de pureza das amostras (HOMSI-BRANDEBURGO *et al.*, 1988).

O perfil eletroforético obtido na Figura 6, evidenciou uma banda protéica (seta) de mesma mobilidade para o VB, fração MV e três peçonhas individuais de *Bothrops moojeni*

irmãs. Coincidentemente, todas estas amostras apresentaram elevada atividade PLA₂ (Figura 2). Por outro lado, as demais irmãs praticamente não apresentaram esta banda e sua atividade PLA₂ é muito baixa.

Esta variabilidade observada por eletroforese, nas bandas protéicas associadas com a atividade PLA₂ entre as peçonhas individuais, evidencia fortemente diferenças quantitativas na expressão gênica destas isoformas, já que os demais fatores que influenciam a variabilidade das peçonhas eram idênticos.

É comum encontrar isoformas de PLA₂s em peçonhas de serpentes de mesma espécie ou num mesmo indivíduo (VALIENTE *et al.*, 1992; FAURE & BON, 1987; HOMSI-BRANDEBURGO *et al.*, 1988).

Portanto, com relação à atividade PLA₂ total (frações MIIa + MV) e à atividade PLA₂ presente na fração MV, pode-se concluir que as peçonhas das serpentes irmãs apresentam somente variabilidade quantitativa.

Diferenças na expressão de isoformas miotóxicas em nível individual foram observadas em *Bothrops asper*, de modo que pelo menos cinco variantes foram distinguidas eletroforéticamente (LOMONTE & CARMONA, 1992).

Analisando o perfil eletroforético da Figura 7, é possível observar nas linhas G e H uma banda de maior mobilidade eletroforética que provavelmente corresponde às miotoxinas II e I respectivamente (seta). Comparando com o perfil das irmãs é possível observar a presença desta banda em todas as amostras. Pode-se concluir portanto, que esta variabilidade é somente quantitativa, pois todas as irmãs apresentam a banda miotóxica porém com diferentes intensidades.

Nas Figuras 6 e 7 não foi realizado dosagem de proteínas, este fato poderia estar mascarando alguns resultados. Sendo assim, foi realizada uma nova eletroforese nas mesmas condições (Figura 8) com doses iguais de proteína para todas as amostras, reproduzido todos os resultados obtidos.

O conhecimento das atividades biológicas das peçonhas, assim como a intensidade de cada uma delas, auxiliam na verificação do poder neutralizante dos antisoros, como também na utilização de uma terapia mais adequada no tratamento de pacientes acidentados por ofídios.

Vários estudos tem buscado antídotos contra peçonhas de serpentes, principalmente extratos vegetais de conhecimento popular. Entretanto, a administração do soro antiofídico ainda é a forma mais eficaz de tratamento, sendo que sua capacidade de neutralização muitas vezes é limitada, devido a variação nos componentes das peçonhas.

Uma das hipóteses mais prováveis para explicar a variabilidade bioquímica da composição das peçonhas de serpentes é a origem genética. De acordo com esta hipótese, esta variabilidade pode ser devido a uma diferença de concentração de toda fração (variação quantitativa) ou por modificações estruturais de certas proteínas (variação qualitativa) (NKININ *et al.*, 1997).

A seleção de espécimes para a produção de antisoros, com base em critérios bioquímicos e na toxicidade das amostras é de vital importância terapêutica, visto que a variação observada entre as diferentes peçonhas, pode limitar a capacidade de neutralização dos soros antiofídicos produzidos.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNI, R. K. & WARD, R. J. Phospholipase A₂ – A structural review. **Toxicon**, 34: p. 827-41, 1996.

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

BARRAVIEIRA, B. **Venenos animais: Uma visão integrada**. 1. ed. Rio de Janeiro. Editora de Publicações Científicas Ltda., 1994. 411 p. IBSN 94-0062

BELL, W. R. Jr. Defibrinogenating enzymes. **Drugs**, 54 Suppl 3 p. 18-30: discussion p. 30-1, 1997.

BON, C.; CHANGEUX, J. -P.; JENG, T. W.; *et al.* Post-synaptic effects of Crotoxin and its isolated subunits. **Eur. J. Biochem.**, 99: p. 471-81, 1979.

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

CANIVATO, R. A.; REMOLD, H. & KIPNIS, T. L. Purification and variability in thrombin-like activity of *Bothrops atrox* venom from different geographic regions. **Toxicon**, 36: p. 257-67, 1998.

CHANG, C. C.; LEE, C. Y.; EAKER, D.; *et al.* The presynaptic neuromuscular blocking action of taipoxin. A comparison with β -bungarotoxin and crotoxin. **Toxicon**, 15: p. 571-76, 1977.

CHIPPAUX, J. -P.; WILLIAMS, V. & WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, 29: p. 1279- 303, 1991.

CONDREA, E.; YANG, C. C. & ROSENBERG, P. Lack correlation between the anticoagulant activity and phospholipase hydrolysis by anske venom phospholipases A₂. **Thromb. Hemostasis**, 45: p. 82-9, 1981.

DE HAAS, G. H.; POSTEMA, N. M.; NIEUWENHUIZEN, W.; *et al.* Purification and properties of phospholipase A from porcine pancreas. **Biochim. Biophys. Acta**, 24: p. 103-17, 1968.

DE ROOT, A. R.; DOLAB, J. A.; DOKMETJAIN, J. C.; *et al.* A comparison of different methods to assess the hemorrhagic activity of *Bothrops* venoms. **Toxicon**, 38: p. 865-73, 2000.

DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR KLINISCHE CHEMIE (DGKC). Standard method for the determination of cretine kinase activity. **J. Clin. Chem. Clin. Biochem.**, 15: 249-60, 1977.

FAURE, G. & BON, C. Several isoforms of crotoxin are present in individual venoms from the South American rattlesnake *crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, 25: p. 229-34, 1987.

FLETCHER, J. E.; RAPUANO, B. E.; CONDREA, E.; *et al.* Comparison of a relatively toxic phospholipase A₂ from *Naja nigricollis* snake venom with that of a relatively non-toxic phospholipase A₂ from *Hemachatus hemachatus* snake venom II. Pharmacological properties in relationship to enzymatic activity. **Biochem. Pharmac.**, 29: p. 1565-75, 1980.

FLETCHER, J. E.; RAPUANO, B. E.; CONDREA, E.; *et al.* Relationship between catalysis and toxicological properties of three phospholipase A₂ from elapid snake venom. **Toxic. appl. Pharmac.**, 59: p. 375-82, 1981.

FURTADO, F. D.; MARUYAMA, M.; KAMIGUTI, A. S.; *et al.* Comparative-study of 9 *Bothrops* snake-venoms from adult female snakes and their offspring. **Toxicon**, 29: p. 219-26, 1991.

GERRARD, J. M.; ROBINSON, P.; NARVEY, M.; *et al.* Increased phosphatidic acid and decreased lysophosphatidic acid in response to thrombin is associated with inhibition of platelet aggregation. **Biochem. cell. Biol.**, 71: p. 432-39, 1993.

GLENN, J. L. & STRAIGHT, R. C. Mojave rattlesnake *Crotalus scutulatus scutulatus* venom: variation in toxicity with geographical origin. **Toxicon**, 16: p. 81-4, 1978.

GUTIÉRREZ, J. M.; CHAVES, F.; GENE, J. A.; *et al.* Myonecrosis induced in mice by basic myotoxin isolated from the of the snake *Bothrops nummifer* (jumping viper) from Costa Rica. **Toxicon**, 27: p. 735-45, 1989.

GUTIÉRREZ, J. M.; ROMERO, M.; NÚÑEZ, J.; *et al.* Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of BaH₁, a hemorrhagic metalloproteinase isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (Terciopelo). **Exp. Mol. Pathol.**, 62: p. 28-41, 1995.

GUTIÉRREZ, J. M. & LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, 33: p. 1405-24, 1995.

HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; QUEIROZ, L. S.; SANTO-NETO, H.; *et al.* Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**, 26: p. 615-27, 1988.

HUANG, H. C. Release of slowly reacting substance from the guinea-pig lung by phospholipase A₂ of *Vipera russelli* snake venom. **Toxicon**, 22: p. 359-65, 1984.

ITZHAKI, R. F. & GILL, D. M. A microbiuret method for estimating proteins. **Analytical Biochemistry**, 9: p.401-10, 1964.

KINI, R. M. & IWANAGA, S. Structure function relationships of phospholipases II: charge density distribution and myotoxicity of presynaptically neurotoxic phospholipases. **Toxicon**, 24: p. 895-905, 1986.

KUDO, I.; MURAKAMI, M.; HARA, S.; *et al.* Mammalian non-pancreatic phospholipases A₂. **Biochem. biophys. Acta**, 117: p. 217-31, 1993.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins, during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227: p. 680-9, 1970.

LLORET, S. & MORENO, J. J. Odema formation and degranulation of mast cells by phospholipase A₂ purified from porcine pancreas and snake venoms. **Toxicon**, 31: p. 949-56, 1993.

LÔBO DE ARAÚJO, A.; RADVANYI, F. & BON, C. Purification of na acidic phospholipase A₂ from *Bothrops lanceolatus* (Fer de Lance) Venom: molecular and enzymatic properties. **Toxicon**, 32: p. 1069-81, 1994.

LOMONTE, B. & CARMONA, E. Individual expression patterns of myotoxin isoforms in the venom of the snake *Bothrops asper*. **Comp. Biochem. Physiol. [B]**, 102: p. 325-9, 1992.

LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; FURTADO, M. F.; *et al.* Isolation of basic myotoxins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* snake venoms. **Toxicon**, 28: p. 1137-46, 1990.

MARIA, W. S.; CAMBUY, M. O.; COSTA, J. O.; *et al.* Neutralizing potency of horse antiothropic antivenom. Correlation between *in vivo* and *in vitro* methods. **Toxicon**, 36: p. 1433-9, 1998.

MEBS, D. Myotoxic activity of phospholipase A₂ isolated from cobra venoms: netralization by polyvalent antivenoms. **Toxicon**, 24: p. 161-8, 1986.

MONTEIRO, R. Q.; CARLINI, C. R.; GUIMARÃES, J. A.; *et al.* Distinct bothrojaracin isoforms produced by individual jararaca (*Bothrops jararaca*) snakes. **Toxicon**, 35: p. 649-57, 1997.

MONTEIRO, R. Q.; YAMANOUYE, N.; CARLINI, C. R.; *et al.* Variability of bothrojaracin isoforms and other venom principales in individual jararaca (*Bothrops jararaca*) snakes maintained under seasonally invariant conditions. **Toxicon**, 36: p. 153-63, 1998.

- MOURA-da-SILVA, A. M.; DESMOND, H.; LAING, G.; *et al.* Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. **Toxicon**, 29: p. 713-23, 1991.
- NAHAS, L.; KAMIGUTI, A. S. & BARROS, M. A. Thrombin-like and factor X-activator components of *Bothrops* snakes venoms. **Thromb. Haemost.**, 23: p. 314-28, 1979.
- NASCIMENTO, L. B.; BERNANDES, A. T. & COTTA, G. A. **Herpetologia na Brasil**, 1. Belo Horizonte: PUC-MG, FAPEMIG, SBH, 1994. 134 p. ISBN 85-85401-06-0.
- NISHIOKA, S. A. & SILVEIRA, P. V. P. A clinical and epidemiologic study of 292 cases lance-headed viper bite in a Brazilian teaching hospital. **Am. J. Trop. Med. Hug.**, 47: p. 805-10, 1992.
- NKININ, S. W.; CHIPPAUX, J. -P.; PIÉTIN, D.; *et al.* L'origine génétique de la variabilité des venins: impact sur la préoaration des sérums antivenimeux. **Bull. Soc. Path. Ex.**, 90: p. 277-81, 1997.
- OHSAKA, A.; OMORI-SATOH, T.; KONDO, H.; *et al.* Biochemical and pathological aspects of hemorrhagic principles in snake venoms with special reference to habu (*Trimeresurus flavoviridis*) venom. **Mem. Inst. Butantan (Simp. Int. Suppl.)**, 33: p. 193-205, 1966.
- OWNBY, C. L. Structure, function and biophysical aspects of the myotoxins from snake venoms. **Journal of Toxicology- Toxin Reviews**, 17: p. 213-38, 1998.
- REICHL, A. P.; SERRANO, S. M. T.; ASSAKURA, M. T.; *et al.* Isolation and properties of a phospholipase A₂ from the venom of the *Bothrops moojeni*. **Mem. Inst. Butantan**, 51: p. 225-37, 1989.
- REICHL, A. P. & MANDELBAUM, F. R. Proteolytic specificity of moojeni protease A isolated from the venom of *Bothrops moojeni*. **Toxicon**, 31: p. 187-94, 1993.

- REISFELD, R. A.; LEWIS, V. L. & WILLIAMS, D. E. Disk eletrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. **Nature**, 195: p. 281-3, 1962.
- RENETSEDER, R.; BRUNIE, S.; DIJKSTRA, B. W.; *et al.* A comparison of the crystal structures of phospholipase A₂ from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom. **J. biol. Chem.**, 260: p. 1627-36, 1985.
- RODRIGUES, V. M. **Purificação e caracterização química parciais de duas miotoxinas do veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (jararaca pintada)**. 1996, 98 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia - MG.
- SERRANO, S. M.; SAMPAIO, C. A. & MANDELBAUM, F. R. Basic proteinases from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom - - II. Isolation of the metalloproteinase MPB. Comparison of the proteolytic activity on natural substrates by MPB, MSP₁ and MSP₂. **Toxicon**, 31: p. 483-92, 1993.
- SOARES, A. M. **Caracterização bioquímica parcial das miotoxinas básicas do veneno de *Bothrops moojeni*: seqüência aminoterminal, cristalografia e estudo da transição dos estados nativo e desenovelado**. 1997, 91 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto - SP.
- SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; *et al.* A rapid procedure for the isolation of the Lys 49 myotoxin II from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom: biochemical characterization, crystallization, myotoxic and edematogenic activity. **Toxicon**, 36: p. 503-14, 1998a.
- SOARES, A. M.; ANZALONI PEDROSA, L. H.; FONTES, M. R. M.; *et al.* Polyacrilamide gel electrophoresis as a tool the taxonomic identification of snakes from the Elapidae and Viperidae families. **J. Venom. Anim. Toxins**, 4: p. 137-42, 1998b.
- 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), 1991. 816 p. ISBN 86-1120

- VALIENTE, C.; MORENO, E.; SITTENFELD, A.; *et al.* An eletrophoretic study on phospholipase A₂ isoenzymes in the venoms of Central American crotaline snakes. **Toxicon**, 30: p. 815-23, 1992.
- YU, B. -Z.; BERG, O. G. & JAIN, M. K. The divalent cation is obligatory for the binding of ligands to the catalytic site of secreted PLA₂. **Biochemistry**, 32: p. 6485-92, 1993.
- YUAN, Y.; JACKSON, S. P.; MITCHELL, C. A.; *et al.* Purification and characterization of a snake venom phospholipase A₂: a potent inhibitor of platelet aggregation. **Thromb. Res.**, 70: p. 471-81, 1993.