

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

**FRACIONAMENTO E DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS
PRESENTES NO VENENO DE *Bothrops neuwiedi pauloensis*
(jararaca pintada).**

VERIDIANA DE MELO RODRIGUES

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

**Uberlândia, MG
Dezembro -1993.**

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

**FRACIONAMENTO E DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS
PRESENTES NO VENENO DE *Bothrops neuwiedi pauloensis*
(jararaca pintada)**

VERIDIANA DE MELO RODRIGUES

MARIA INÊS HOMSI BRANDEBURGO

**Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, da Universida-
de Federal de Uberlândia, para obtenção do
grau de Bacharel em Ciências Biológicas**

**Uberlândia - MG
Dezembro - 1993**

**FRACIONAMENTO E DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS
PRESENTES NO VENENO DE *Bothrops neuwiedi pauloensis*
(jararaca pintada).**

APROVADA PELA COMISSÃO EXAMINADORA EM ____/____/____

**MARIA INÊS HOMSI BRANDEBURGO
ORIENTADOR**

**NILSON PENHA SILVA
(Primeiro conselheiro)**

**ANA MARIA BONETTI
(Segundo conselheiro)**

**Uberlândia - MG
Dezembro - 1993.**

AGRADECIMENTOS

ii

À Deus, por me abençoar e iluminar em todos os passos da minha vida.

Aos meus queridos pais, por toda dedicação e espírito de renúncia.

Aos meus irmãos, companheiros de sempre.

À professora Dr. Maria Inês Homsí Brandeburgo, pelo convívio e dedicação, principalmente por todos os ensinamentos e experiência, minha sincera admiração.

Ao Ricardo, meu namorado e amigo, por compartilhar comigo todas as etapas e dificuldades encontradas.

Aos professores do Departamento de Biociências da Universidade Federal de Uberlândia, pela contribuição à minha formação acadêmica.

Aos professores Nilson Penha Silva e Ana Maria Bonetti, pelo incentivo a este trabalho.

À professora Vera Lúcia Brites, pela colaboração em doar o nosso instrumento de trabalho.

Aos amigos Fábio e Andreimar que compõem o nosso grupo de trabalho.

À Cristiane, Paula, Ana, Alessandra, Leandro e James, por tornarem o nosso ambiente de trabalho tão agradável.

Aos professores do Departamento de Ciências Fisiológicas.

À Sebastiana e Cleuber pela colaboração dispensada a este trabalho.

Ao laboratório de Análises Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente pela realização deste trabalho.

RESUMO.....	iv
1- INTRODUÇÃO.....	1
2 - MATERIAIS.....	12
2.1 - Obtenção do veneno bruto.....	12
2.2 - Substratos.....	12
2.3 - Materiais para cromatografia e eletroforese.....	13
2.4 - Ensaio biológicos.....	13
3 - MÉTODOS.....	14
3.1 - Preparação das amostras.....	14
3.2 - Filtração em gel de Sephadex G-75.....	15
3.3 - Filtração em gel de Sephacryl S-200.....	15
3.4 - Determinação Quantitativa de Proteínas.....	16
3.5 - Determinação de Atividades Enzimáticas.....	16
3.6 - Estimativa dos Pesos Moleculares.....	19
3.7 - Critérios de Pureza.....	21
4 - RESULTADOS.....	25
4.1 - Fracionamento do veneno bruto.....	25
4.2 - Determinação Quantitativa de Proteínas.....	28
4.3 - Determinação das Atividades Enzimáticas e Efeitos Biológicos.....	29
4.4 - Critérios de Pureza.....	33
4.5 - Estimativa dos Pesos Moleculares.....	34
5 - DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	39
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

Resumo

Os venenos de serpentes têm evoluído como secreções altamente especializadas em matar, imobilizar e iniciar a digestão de suas presas. São constituídos na sua maioria por proteínas na forma de enzimas, toxinas não enzimáticas e peptídeos. Estes não são somente complexos na sua composição química mas também na sua diversidade de ação. Nenhum outro produto natural apresenta uma mistura tão efetiva de diferentes fatores exercendo simultaneamente efeitos tóxicos sobre os sistemas sanguíneo, respiratório, cardiovascular e/ou nervoso. Assim sendo, para que possamos compreender a extrema complexidade de seus componentes, é importante extraí-los deles os diversos constituintes e examinarmos suas propriedades individuais.

O gênero *Bothrops* é responsável pela grande maioria dos acidentes ofídicos que ocorrem no Brasil. Os sintomas de envenenamento causados por este gênero são caracterizados principalmente, por efeitos como hemorragia, necrose, dor local intensa, ação coagulante e anticoagulante, etc.

O presente trabalho teve como objetivos fracionar o veneno bruto de *B. neuwiedi pauloensis* e determinar as atividades enzimáticas presentes nas frações isoladas.

Foram realizados três fracionamentos em colunas de filtração molecular, Sephadex G-75 (teste piloto) e Sephacryl S-200 para os dois últimos, os quais resultaram em três picos de absorbância para os dois primeiros e quatro picos de absorbância para o terceiro, que foram denominados de N1, N2, N3 e N4, respectivamente. O rendimento dos fracionamentos foi cerca de 93,8% para o segundo e 97,66% para o terceiro. A fração N1 representou 44% do veneno total; N2, 35% ; N3, 17% e N4, 12% aproximadamente.

O veneno de *Bothrops nnewiedi pauloensis* apresentou atividade hemorrágica, coagulante, fosfolipásica e proteolítica, não foram detectadas as atividades anticoagulante e hemolítica direta.

A fração N1 representou quase que a totalidade da atividade hemorrágica presente no veneno total, em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes, apresentou a maioria de suas bandas migrando entre os padrões de peso molecular anidrase carbônica (29.000) e calmodulina (66.000).

A atividade coagulante ficou restrita às frações N1 e N2.

A atividade PLA₂ teve seu maior valor entre os picos N2 e N3, sendo melhor caracterizada no pico N3 para terceiro fracionamento .

A fração N3 apresentou apenas três bandas em PAGE sem agentes desnaturantes, devendo conter somente três proteínas distintas.

Nossos estudos prosseguem na tentativa de isolar em alto grau de pureza estes componentes fosfolipásicos.

1. INTRODUÇÃO

Serpentes ou ofídios são répteis desprovidos de membros, que podem ser peçonhentos, ou não, com ampla distribuição mundial. No Brasil são mais comumente chamados cobras, nome de determinadas serpentes asiáticas trazidas pelos portugueses (ROMANO-HOGE, 1990).

Das 3.500 espécies distribuídas pelo mundo, cerca de 500 são peçonhentas, embora pouco mais de 200 sejam causadoras de envenenamento grave em seres humanos.

O termo peçonha se refere à capacidade que a serpente tem de produzir e inocular toxinas.

A palavra "peçonha" (em inglês "venom" e em francês "venim") designa uma substância tóxica produzida por uma planta ou animal num órgão secretor, ou grupo altamente desenvolvido de células secretoras, que pode ser inoculada no ato da picada.

"Veneno" (em inglês e francês "poison") por sua vez, designa uma substância que, em quantidades relativamente pequenas, mata ou prejudica seriamente a função de um órgão ou tecido.

Animais venenosos possuem tecidos parcial ou totalmente tóxicos. O envenenamento "poisoning", geralmente ocorre pela ingestão desses tecidos.

A palavra "peçonha", portanto, tem sentido mais restrito do que "veneno". Assim, todos os animais peçonhentos são venenosos, mas nem todos os venenosos são peçonhentos, (RUSSEL, 1987).

Animais peçonhentos, por sua vez, possuem o "aparelho venenífero" constituído pelas glândulas ou células secretoras e todo um aparato necessário para inocular a peçonha na presa escolhida.

Estas peçonhas evoluíram como secreções especializadas de alta eficiência em matar, imobilizar e iniciar a digestão de presas.

Segundo GANZ (1978) a sequência evolucionária básica, culminando no desenvolvimento das glândulas de veneno, envolve três passos:

- 1) A secreção se iniciou para lubrificar os alimentos, condicionar as membranas bucais e facilitar a limpeza e digestão de materiais que podem aderir aos tecidos, em particular aos dentes.

- 2) A ocorrência de algumas enzimas misturadas com as secreções lubrificantes forneceu uma pré adaptação para a elaboração de proteínas e polipeptídeos tóxicos, facilitando a utilização de pequenos corpos alimentares ingeridos ou imobilizando presas maiores.

- 3) Um conjunto de secreções ainda mais complexo e de maior volume facilitou a quebra interna do bolo alimentar, assim como a defesa contra predadores.

Os progressos das ciências, em particular os da Química Orgânica e da Fisiopatologia, permitiram demonstrar não só a natureza heterogênea dos venenos de serpentes, de composição predominantemente protéica (BIEBER, 1979), como também grande parte de seus efeitos biológicos. Mais de 90% do seu peso seco é proteína, na forma de enzimas, toxinas não enzimáticas e peptídeos.

Os venenos de serpentes não são complexos somente na sua composição química, mas também na sua diversidade de ação. Nenhum outro produto natural apresenta uma mistura tão efetiva de diferentes fatores, exercendo simultaneamente efeitos tóxicos sobre os sistemas sanguíneo, respiratório, cardiovascular e/ ou nervoso.

Na fauna brasileira ocorrem nove famílias de ofídios. Destas, quatro são peçonhentas, causadoras da quase totalidade dos acidentes: Viperidae, Elapidae, Hydrophiidae, Crotalidae (KLEMMER, 1963).

Dos setenta e cinco gêneros de serpentes existentes no Brasil, somente quatro são classicamente considerados peçonhentos.

A família Viperidae compreende as principais serpentes peçonhentas, representada pelos gêneros: *Bothrops*, *Crotalus*, *Micrurus*, *Lachesis*, etc. As serpentes desta família encontram-se principalmente na América do Sul, possuem um aparelho inoculador especializado, constituído pelos dois dentes maxilares superiores modificados (presas) e ligados às glândulas veneníferas por dois ductos (SELISTRE, 1988).

O aparelho inoculador das serpentes Viperidae é o mais eficiente em termos de peçonha injetada (HOMSI-BRANDEBURGO, 1987).

No período de junho/86 à dezembro/87 foram notificados no Ministério da Saúde do Brasil 27.138 acidentes por serpentes. Destes, 8.579 (31,69%) não foram identificados quanto ao gênero da serpente, por falta de informação. Somente 352 (1,2%) foram definidos como causados por serpentes não peçonhentas. Dentre os acidentes causados por serpentes não peçonhentas, o gênero *Bothrops* teve maior índice (88,1%), seguido por *Crotalus* (8,2%), *Lachesis* (2,9%) e *Micrurus* (0,7%) entretanto a mortalidade nos acidentes crotálicos foi de 3,3% contra 0,5% dos acidentes botrópicos (BRAZIL, 1989).

Das vinte espécies conhecidas do gênero *Bothrops*, quatro são mais comumente responsáveis por acidentes humanos: *B. jararaca*, no sul-sudeste; *B. moojeni*, no centro-oeste; *B. erythromelas*, no nordeste e *B. atrox*, no norte (HAAD, 1989).

No Triângulo Mineiro, entre 1984 a 1991, a maioria dos casos confirmados foram por *B. moojeni* e em seguida por *B. neuwiedi* (NISHIOKA e SILVEIRA, 1992).

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

Segundo VITAL BRAZIL (1982), os venenos destas serpentes se caracterizam por:

- induzir estado de choque, causa mais freqüente de morte;
- exercer intensa atividade proteolítica (MEBS,1970);
- coagular o plasma sanguíneo (KLOBUSITIZKI,1961);
- liberar substâncias farmacologicamente ativas, tais como histamina e bradicinina (ROTHSCHILD e ROTHSCHILD, 1979)
- produzir hemorragias (BJARNASON e TU, 1979);
- causar pronunciado efeito local, com hemorragia e necrose tissular, ocasionando sequelas com perda de tecido, que podem levar à necessidade de amputação da extremidade afetada (BRAZIL,1911; JIMENEZ-PORRAS,1973).

A completa lesão causada pelos venenos botrópicos parece ser devida à somatória dos efeitos isolados de diferentes componentes com distintas ações biológicas ou que atuam sinergisticamente.

Assim, para que possamos compreender a extrema complexidade dos venenos, é importante extraírmolos deles os diversos constituintes e examinarmos suas propriedades individuais.

O desenvolvimento de novos métodos para a purificação dos componentes ativos dos venenos, assim como, o uso de proteínas puras e bem caracterizadas bioquimicamente nos estudos farmacológicos e fisiopatológicos, têm levado a resultados mais conclusivos e a um melhor entendimento dos efeitos desses venenos e do seu mecanismo de ação a nível molecular, permitindo seu uso como valiosos instrumentos de pesquisa .

Os principais componentes dos venenos, que têm sido relacionados com os efeitos causados por envenenamento botrópico, são as proteases, hemorraginas, fosfolipases, miotoxinas, fatores coagulantes e anticoagulantes.

A hemorragia é um dos efeitos característicos induzido por envenenamento botrópico, muitos componentes hemorrágicos isolados de venenos são proteases, e sua

atividade enzimática pode ser relevante para o processo de dano capilar. Várias toxinas hemorrágicas degradam o colágeno e é sabido que o colágeno tipo IV é um componente da lâmina basal, que circunda as células endoteliais nos capilares. Os mecanismos de ação de toxinas hemorrágicas se baseiam na destruição enzimática da membrana basal, com subsequente perda da integridade vascular. O rompimento da membrana basal se daria à nível das junções entre as células endoteliais, formando aberturas ou poros por onde se daria o extravazamento de eritrócitos.

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

Muitos fatores hemorrágicos dos venenos de serpentes da Ásia e da América do Norte já foram isolados e exaustivamente estudados. Para as serpentes da América Latina foram isoladas hemorraginas somente de algumas espécies *Bothrops* e de *Lachesis muta muta*, a saber: - dois fatores hemorrágicos isolados dos venenos de *Bothrops neuwiedi*: NHFa e NHFb (MANDELBAUM, et al., 1984); - três fatores hemorrágicos isolados dos venenos de *Bothrops jararaca*: HF1, HF2 e HF3 (ASSAKURA et al., 1986); um fator hemorrágico isolado do veneno de *Lachesis muta muta* (SANCHES et al., 1987); - três fatores hemorrágicos do veneno de *Bothrops insularis* (SELISTRE et al., 1990 a).

A maioria das toxinas hemorrágicas são metaloproteínas contendo Zn^{++} , sendo que muitas também possuem Ca^{++} .

Mionecrose ou necrose muscular é uma característica comum de envenenamento por espécies botrópicas. Este efeito pode ser devido à ação direta de miotoxinas sobre as membranas plasmáticas de células musculares ou indireta, pela ação de hemorraginas, que provocariam danos vasculares, levando à depleção do sangue que supre as células musculares, induzindo isquemia e, conseqüentemente, morte celular.

A miotoxicidade está muito relacionada com a ação de fosfolipases do tipo A_2 .

Estas enzimas estão presentes em grande concentração em venenos de serpentes, abelhas e escorpiões, também encontradas, porém em menor quantidade, em glândulas como o pâncreas,

As fosfolipases (PLA_2) catalisam a hidrólise da ligação éster na posição 2 dos fosfolípideos (fig 1) sendo esta atividade dependente de cálcio. Elas participam na liberação do ácido araquidônico, precursor das prostaglandinas e dos leucotrienos, estando envolvidas ainda, na liberação de neuromediadores e hormônios.

Diversas fosfolipases miotóxicas já foram descritas, muitas causando também bloqueio da transmissão neuromuscular, como as neurotoxinas pré-sinápticas, que inibem a liberação de acetilcolina dos terminais nervosos motores (HARRIS, 1984).

O mecanismo de ação pelo qual essas miotoxinas causam danos musculares, ainda não é bem claro. Segundo GUTIERREZ (1986), as miotoxinas agiriam à nível da membrana plasmática do músculo esquelético induzindo uma desorganização dos componentes fosfolipídicos, que permitiria a saída de moléculas intracelulares como creatina e creatina - quinase. Esse 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 (DUCAN, 1978) e fosfolipase A2 endógenas (TRUMP et al., 1981).

A somatória de todas estas alterações poderia então, levar à morte celular. Os efeitos induzidos pelas miotoxinas de venenos botrópicos e pelas fosfolipases miotóxicas isoladas de outros venenos são muito semelhantes.

O isolamento de miotoxinas de venenos botrópicos iniciou-se somente em meados da década de oitenta. Até esta data, as inúmeras miotoxinas isoladas de venenos podiam ser classificadas em três grupos principais: a) fosfolipases miotóxicas, tais como notexina (HARRIS et al., 1984); miotoxinas isoladas de venenos elapídeos australianos (MEBS e SAMEJIMA, 1980) e de venenos crotalídeos (MEBS e SAMEJIMA, 1986); b) cardiotoxinas, presentes em alguns venenos elapídeos (LAI et al., 1972; DUCHEN et al., 1974; CHANG, 1979); c) alguns oligopeptídeos básicos não enzimáticos, de peso molecular ao redor de 5.000, isolados dos venenos de cascavéis, tais como a crotamina de *Crotalus viridis viridis* (CAMERONTU, 1977; OWNBY et al., 1976) e duas miotoxinas de *Crotalus viridis concolor* (POOL et al., 1981).

São conhecidas atualmente diversas miotoxinas de venenos botrópicos, as quais apresentam as seguintes características.

- do veneno de *B. asper* foram isoladas três miotoxinas, sendo que duas delas possuem alta atividade fosfolipásica A_2 e anti-coagulante (GUTIERREZ et al., 1984 a,b, c, 1986; KAISER et al., 1990; LOMONTE e GUTIERREZ, 1989; FRANCIS et al., 1991)

- do veneno de *B. jararacussu*: duas miotoxinas básicas e anticoagulantes, sendo uma delas denominada de botropstoxina II (BthTX II), que apresenta baixa atividade PLA_2 , enquanto BthTX I não apresenta atividade fosfolipásica mas é estruturalmente semelhante às PLA_2 (HOMSI-BRANDEBURGO et al., 1988; GUTIERREZ, 1991; HELUANY et al., 1992)

- do veneno de *B. insularis*: uma miotoxina ácida que apresenta atividade PLA_2 e anticoagulante. (SELISTRE et al., 1990 a, b)

- dos venenos de *B. atrox* e *B. moojeni*: três miotoxinas, sendo que a miotoxina de *B. atrox* tem atividade anticoagulante e PLA_2 , enquanto que as miotoxinas I e II de *B. moojeni* não as possuem (LOMONTE et al., 1990).

Até o momento, dentre as miotoxinas isoladas de venenos botrópicos, parece estar surgindo um grupo de miotoxinas que não apresentam atividade PLA_2 mas que

9
poderiam ser classificadas como miotoxinas que apresentam estrutura de PLA_2 , como a botropstoxina I (BthTX I), isolada do veneno de *Bothrops jararacussu* por HOMSI-BRANDEBURGO et. al., (1987).

Os componentes que afetam o sistema de coagulação são divididos em dois grupos, coagulantes e anticoagulantes. No entanto o mesmo veneno pode conter ambos os fatores simultaneamente, podendo atuar de uma ou de outra form, dependendo da concentração utilizada.

Existem vários mecanismos pelos quais os venenos podem induzir a coagulação sanguínea (TU,1977). Estes podem:

- (1) produzir atividade semelhante à tromboplastina;
- (2) possuir um ativador do fator X;
- (3) ativar o fator V;
- (4) ativar a protrombina e
- (5) possuir atividade semelhante a trombina.

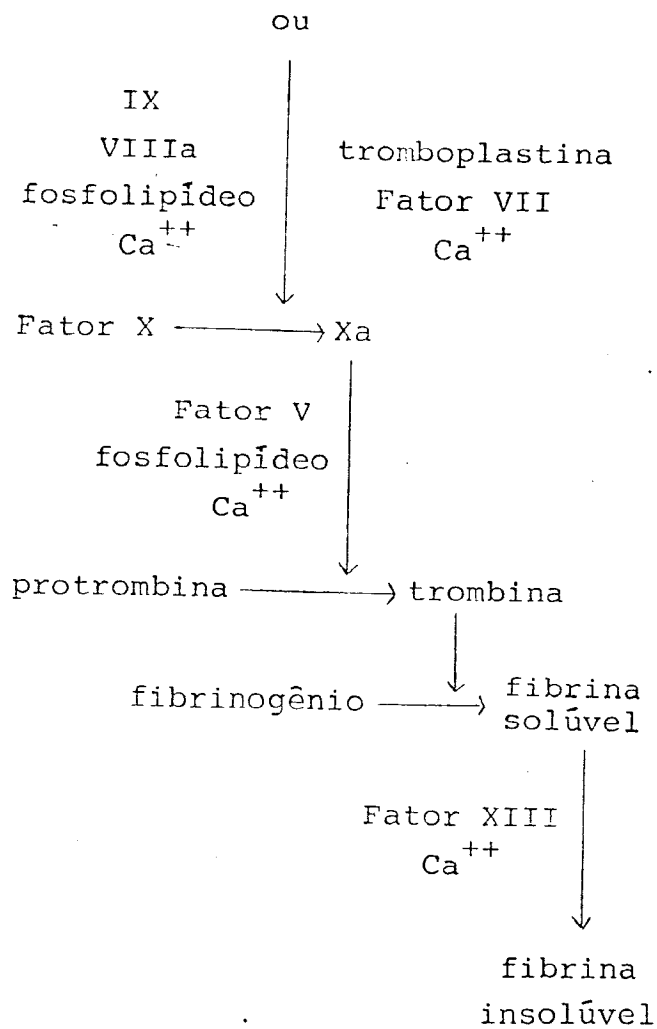
A grande maioria dos venenos dos gêneros *Bothrops*, *Crotalus*, *Trimeressurus*, etc, apresentam enzimas que atuam de modo semelhante, mas não igual ao da trombina, transformando o fibrinogênio em fibrina.

As diferentes atividades coagulantes dos venenos foram classificadas segundo DENSON (1969) em um sistema paralelo de enzimas semelhante ao sistema em cascata proposto para a coagulação sanguínea (Fig:2).

Segundo TU (1977) um veneno pode atuar como anticoagulante se:

- (1) contiver atividade fibrinolítica;
- (2) contiver atividade fibrinogenolítica;

Coagulação Sanguínea



Ação coagulante de venenos

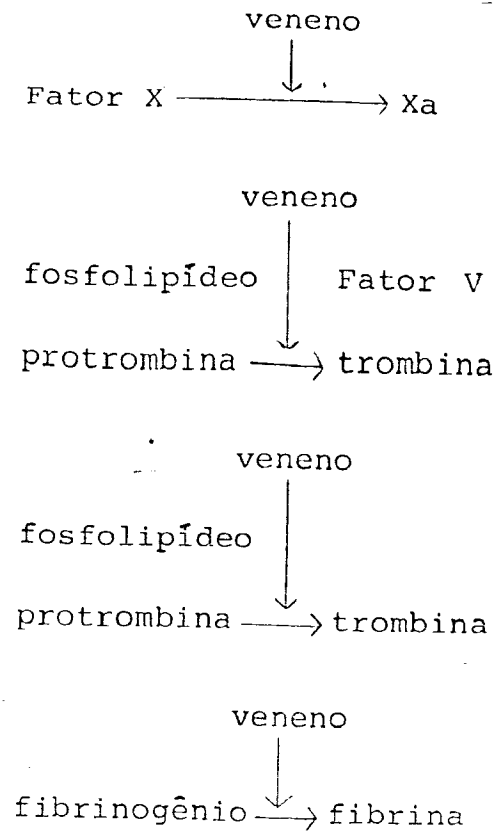


Fig:2 Comparação entre as atividades coagulantes de venenos de serpentes e enzimas da coagulação sanguínea (DENSON, 1969).

- (3) ativar o plasminogênio;
- (4) possuir atividade inibitória sobre alguns dos fatores da coagulação sanguínea e
- (5) possuir atividade antitrombínica.

O edema induzido por veneno botrópico é, provavelmente, devido à ação de uma variedade de substâncias: (a) toxinas hemorrágicas que rompem a microvasculatura, induzindo extravazamento (OHSAKA,1973 e OWNBY,1982); (b) toxinas que agem diretamente sobre células endoteliais de capilares e vênulas, aumentando sua permeabilidade; (c) componentes do veneno (fosfolipases ou citotoxinas) que induzem à liberação de compostos farmacologicamente ativos como a histamina liberada por mastócitos; (d) fosfolipase A_2 , que libera ácido aracdônico de fosfolipídeos de membranas de células, iniciando a síntese de prostaglandinas (ROBBINS et al.,1987); etc.

A subespécie *Bothrops neuwiedi pauloensis*, conhecida por jararaca pintada ou boca de sapo, descrita por Amaral em 1925, segundo PETERS e OREJAS - MIRANDA(1970), tem larga distribuição nas áreas do sul do estado de São Paulo. Esta subespécie é frequente em Goiás, Distrito Federal e centro sul de Tocantins (PAULINO et. al., 1991) e distribui-se também em regiões do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba (BRITES e BAUAB,1988).

Em virtude de todos estes efeitos causados por envenenamento botrópico, o nosso trabalho teve como objetivos fracionar o veneno bruto de *Bothrops neuwiedi pauloensis*, e testar as atividades enzimáticas nas frações isoladas.

O veneno desta subespécie foi o escolhido, por ser esta responsável pela elevada frequência dos acidentes ofídicos ocorridos em nossa região.

2. Materiais

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Bioquímica do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Uberlândia.

2.1. Obtenção do veneno bruto:

O veneno de *B. neuwiedi pauloensis* utilizado neste trabalho foi gentilmente doado pelos professores Fernando Bauab (Faculdade de Medicina de Catanduva) e Vera Lúcia de Cmapos Brites (Departamento de Biociências da Universidade Federal de Uberlândia), sendo coletado de serpentes capturadas na região de Uberlândia)BRITES, c. p.).

2.2. Substratos:

-Plasma sanguíneo e eritrócitos foram gentilmente doados pelo Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Escola da Universidade Federal de Uberlândia.

-Caseína (Merk)

2.3. Materiais para cromatografia, eletroforese e dosagem protéica.

-Sephadex G-75 e Sephacryl S-200 da Pharmacia, Suécia;

_ Acrilamida, Bis acrilamida (N,N -metilenobisacrilamida), TEMED (N, N, N', N' - tetrametiletenodiamino), SDS (dodecil sulfato de sódio), Comassie Brilliant Blue G-250, Padrões de peso molecular, EDTA(Ácido Etilenediaminetetraacético), Soroalbumina Bovina, Azul de Bromofenol, β -mercaptoetanol (Sigma Chem. Co., USA).

Os demais reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico.

2.4- Ensaios Biológicos:

Os camundongos utilizados foram procedentes do Valeé Nordeste S/A
(Uberlândia, MG)

3. Métodos

Foram realizados três fracionamentos do veneno bruto em colunas de cromatografia, sendo que o primeiro foi um teste piloto realizado em gel de Sephadex G-75 e os dois últimos em gel de Sephacryl S-200.

3.1. Preparação das Amostras :

Inicialmente foi realizado um teste piloto, utilizando-se 50µl(0,26mg) do veneno bruto diluídos para 2000 µl em tampão formato de amônio (NH_4Fo) 0,05 M pH 3,5. A suspensão obtida foi aplicada à coluna de cromatografia em gel de Sephadex G- 75.

No segundo fracionamento, foram utilizados cerca de 130 µl (10,4 mg) do veneno bruto, que foram diluídos para 2.000 µl em tampão bicarbonato de amônio NH_4HCO_3 0,05 M pH 7,4. Desta solução 100 µl foram retirados para dosagem protéica e 100 µl para testes enzimáticos. O restante desta solução foi submetido à filtração em Sephacryl S-200.

No terceiro e último fracionamento foram utilizados cerca de 320 µl (25,6 mg) do veneno bruto, que foram diluídos para 2.000 µl em tampão bicarbonato de amônio

0,05M pH 7,4. Desta solução 100 µl foram retirados para dosagem protéica e 100 µl para testes enzimáticos. O restante desta solução foi aplicado à uma coluna de filtração em gel de Sephacryl S-200.

3.2. Filtração em gel de Sephadex G-75:

A solução preparada no teste piloto foi aplicada a uma coluna (37,0 cm comprimento por 1,5 cm de diâmetro) de Sephadex G-75, equilibrada com NH_4F 0,05M pH 3,5. A amostra foi eluída com o mesmo tampão e frações de 3 ml foram coletadas, num fluxo de 30 ml/h, em um coletor de frações BIO.RAD. A absorbância de cada fração coletada foi lida em 280 nm, num espectrofotômetro da MICRONAL. O gráfico foi traçado e os "pools" delimitados foram liofilizados.

3.3. Filtração em Gel de Sephacryl S-200:

As duas últimas filtrações foram realizadas em gel de Sephacryl S-200, equilibradas com tampão NH_4HCO_3 0,05M pH 7,4 em uma coluna de 50 cm de comprimento por 2,0 cm de diâmetro. No segundo fracionamento, foram eluídos 9,36 mg do veneno bruto, em um fluxo de 30,0 ml/h, sendo coletados cerca de 3 ml/tubo. As amostras foram coletadas em um coletor de frações BIO.RAD. A absorbância de cada fração foi lida à 280 nm, num espectrofotômetro da MICRONAL, o gráfico foi traçado e os "pools" delimitados foram liofilizados e suas atividades enzimáticas testadas.

O último fracionamento foi realizado sob as mesmas condições anteriores, no entanto, foram aplicados à coluna 23,04 mg do veneno bruto. A eluição ocorreu num fluxo de 56 ml/h.

3.4. Determinação Quantitativa de Proteínas:

As dosagens de proteínas em soluções de 0,1 mg a 2,0 mg de proteínas/2.0 ml, foram realizadas pelo método do microbiureto, conforme descrito por ITZHAKI e GILL (1964).

A reta padrão foi construída com soroalbumina bovina, considerando - se o seu coeficiente de extinção $E_{1,0\text{cm}}^{1,0\text{mg/ml}}$ em 278nm = 0,666 (DOTY e GEIDUSCHEC, 1953).

As dosagens de proteínas foram realizadas com o veneno bruto e com as frações obtidas em cada fracionamento.

3.5. Determinação de Atividades Enzimáticas:

3.5.1 Atividade Fosfolipásica (PLA₂): Ensaio Potenciométrico:

Esta foi a primeira atividade a ser executada após os fracionamentos, segundo o método descrito por DE HAAS et al. (1986), com modificações.

Como substrato foi utilizada uma emulsão aquosa de gema de ovo (uma gema em 50 ml de água desionizada) em presença de desoxicolato de sódio 0,03 M e CaCl₂ 0,6 M. O substrato foi preparado da seguinte maneira: 7,5 ml da emulsão aquosa da gema de ovo, 0,5 ml de CaCl₂ 0,6 M e 5,0 ml da solução de desoxicolato de sódio 0,03M, o volume era completado para 50 ml com água deionizada. Dez ml desta solução foram utilizados para cada ensaio enzimático.

Os ácidos graxos liberados enzimaticamente, eram titulados com uma solução padrão de NaOH 0,0935 N em pH 8,0 e temperatura ambiente (28 ° C). A atividade fosfolipásica 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 miligrama de proteína. Em cada ensaio foram utilizados 20 µg de proteínas.

3.5.2 Ensaio Hemolítico Direto:

A atividade hemolítica direta foi testada somente no veneno bruto, utilizando eritrócitos obtidos do Laboratório de Análises Clínicas da UFU.

Os eritrócitos foram lavados três vezes a 3000 rpm, durante 4 minutos. A preparação da suspensão de eritrócitos foi feita a 2,5% com tampão fosfato de sódio pH 7,4 em solução salina(PBS).

Para o ensaio foram utilizadas 10 µg da amostra, 50 µl de CaCl_2 10mM, 0,6 ml de suspensão de eritrócitos, completando - se o volume para 3,0 ml com tampão fosfato de sódio (PBS). Foi preparado um branco que não continha a amostra e um hemolizado, colocando -se água destilada no lugar do tampão.

Após trinta minutos à 37°C , os tubos foram centrifugados por cinco minutos em uma centrífuga de mesa e as absorbâncias dos sobrenadantes foram lidas a 540 nm.

Por este método, uma unidade de atividade hemolítica corresponde à quantidade de enzima capaz de produzir um aumento de 0,001 (1 miliunidade) na A540 nm.

3.5.3. Atividade Proteolítica:

A atividade proteolítica foi determinada usando-se a caseína como substrato, segundo o método descrito por REIMERDES e KLOSTERMERYER (1976) com modificações.

A solução de caseína foi preparada no momento do uso, dissolvendo - se 50 mg de caseína em 0,5 ml de NaOH 0,1 N e 3,0 ml de água destilada. Após aquecer por 15 minutos a 90°C para terminar a dissolução, o pH foi ajustado para 7,4 com HCl e o volume completado para 5 ml.

A solução teste continha 50 µl da enzima (260 µg), 50 µl de CaCl_2 20 mM, 400 µl do tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 e 500 µl de caseína a 1%. No controle a enzima foi substituída por PBS.

Após incubar por 60 minuto a 37°C a reação foi interrompida, adicionando-se 3,0 ml de TCA (ácido tricloroacético) a 16% (v/v) sobre 1 ml da mistura de incubação. Esta solução foi aquecida em banho maria à 100 °C, por 5min e resfriada em água corrente e centrifugada a 10.000 rpm. A absorbância do sobrenadante foi lida a 280 nm.

Por definição, uma unidade de atividade proteolítica corresponde a um acréscimo de 0,001 de absorbância em 280 nm por minuto de digestão da caseína, nas condições acima especificadas.

3.5. 4. Atividade Coagulante:

Amostras de 20 µg do veneno bruto ou frações foram dissolvidas em 1 ml de tampão NH_4HCO_3 0,05 M pH 7,4, 10 µl desta solução foram incubados com 0,1 ml do plasma humano à 37°C.

O aparecimento da rede de fibrina era o indicativo da atividade coagulante. O tempo de coagulação foi medido e comparado com um controle, onde a amostra era substituída por solução de NaCl 0,9%.

3.5.5. Atividade Anticoagulante:

Esta atividade foi realizada segundo ALVARADO (1988) com algumas modificações. Cem (100) µl do plasma humano foram incubados por 10 minuto com 20 µg do veneno bruto ou frações a 37°C. Após 10 minutos de incubação, foi acrescentado a cada tubo 20 µl de CaCl_2 0,25 M. O tempo de recalcificação do plasma foi medido pela formação da rede de fribina.

3.5.6. Atividade Hemorrágica:

Esta técnica foi realizada segundo NIKAI et al. (1984).

Cerca de 20 µg do veneno bruto ou frações foram dissolvidos em solução salina (NaCl 0,9 %), em um volume de 0,1 ml e aplicados subcutaneamente no dorso de camundongos, ligeiramente anestesiados com éter. Após 5 horas de inoculação, os animais eram sacrificados, as peles removidas e a presença de halos hemorrágicos era indicativo desta atividade.

3.6. Estimativa do Peso Molecular das frações por PAGE -SDS:

Para estimativa dos pesos moleculares das frações foram realizadas eletroforeses em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes na presença de SDS (dodecil sulfato de sódio), para o segundo e terceiro fracionamento.

As placas de vidro para preparação dos géis mediam 10,5 cm de largura, 12cm ou 10 cm de comprimento e 0,3 cm de espessura

3.6.1 Preparação dos géis:

Três espaçadores de teflon em forma de fitas foram utilizados para formar entre as placas um espaço retangular de aproximadamente 1,0 mm de espessura. As placas foram imobilizadas verticalmente com auxílio de pinças metálicas, formando assim uma câmara que era preenchida com a solução do gel.

Na preparação dos géis utilizaram -se as seguintes soluções:

Gel de empilhamento a 5 % em acrilamida

Soluções estoques	Quantidade utilizada (µl)
Tris-HCl 2 M pH 6,8	250,0
EDTA 200 Mm	40,0
Acrilamida:bis (30: 0,8)	650,0
Água desionizada	2.000,0
TEMED	5,0
Persulfato de amônio (10 %)	35,0

Gel de Separação a 12 % em acrilamida.

Soluções estoques	Quantidade utilizada (µl)
Tris-HCl 2 M pH 8.8	1.170,0
EDTA 200 mM	62,5
Acrilamida:bis (30:0.8)	2.500,0
Água desionizada	2.432,0
TEMED	7,5
Persulfato de amônio (10 %)	37,5

Terminada a polimerização, as pinças e o espaçador inferior foram retirados, a placa foi colocada em uma cuba de acrílico e conectada aos eletrodos.

A solução de trizma base 0,1 M, EDTA 7,8 mM, glicina 0,77 M e SDS 0,3 M (p/v) pH 8.3 foi utilizada como tampão para o cátodo e a mesma solução, porém sem glicina, foi utilizada para ânodo.

As amostras contendo cerca de 30 ug de proteína foram dissolvidas em 100 ul do tampão STOP(Tris - HCl, pH 6,8, SDS 6%, EDTA 6mM, uma pitada de Azul de Bromofenol e Glicerol, 27%) e 10 ul de β - mercaptoetanol, aquecidas por 2 minutos, e aplicadas aos poços do gel.

A eletroforese foi conduzida a 20 mA por aproximadamente 100 minutos. Os marcadores de peso molecular utilizados foram Calmodulina (PM 16.700); Anidrase Carbônica (PM 29.000); Ovoalbumina (PM 45.000); Albumina bovina (PM 66.000); Fosforilase B (PM 97.000); β galactosidase (PM 116.000) e Miosina (PM 205.000).

Após a eletroforese, os géis foram corados por aproximadamente 10 min com Comassie Brilliant Blue G 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 secos em papel celofone previamente umedecido com água destilada e fotografados, utilizando um polaroid, com filtro laranja e tempo de exposição de 1/30 de segundo.

3.7. Critérios de Pureza:

Para critérios de pureza foram realizadas eletroforeses em gel de poliacrilamida (PAGE) sem agentes desnaturantes.

Foram feitos dois tipos de géis, um para para proteínas ácidas e outro para proteínas básicas.

3.7.1 PAGE não desnaturante para proteínas ácidas

Para a preparação destes géis foram utilizadas as seguintes soluções:

Gel de Empilhamento a 5.0 % em acrilamida.

Soluções estoques	Quantidade utilizada (µl)
Água desionizada	4.120,0
Acrilamida:bis (30:0.8)	980,0
Tris-HCl 1,5 M pH 6.8	800,0
TEMED	100,0
Persulfato de amônio (10 %)	4,0

Gel de Separação a 12% em acrilamida.

Soluções estoques	Quantidade utilizada (µl)
Água desionizada	7.200,0
Acrilamida:bis (30:0.8)	6.400,0
Tris-HCl 1,5 M pH 8.8	2.130,0
TEMED	10,0
Persulfato de amônio (10 %)	260,0

A solução do eletrodo era contituída de Tris - glicina pH 8.3 0,05 M de Tris e 0,038 M de glicina, tanto para o cátodo como para o ânodo.

As amostras contendo cerca de 30 ug eram dissolvidas em tampão Tris -HCl 0,1M pH 8.8, contendo glicerol a 10 % e azul de Bromofenol a 0,1 %.

O procedimento dos passos da eletroforese seguem as condições citadas no item 3.6

3.7.2 PAGE não desnaturante para proteínas básicas

Esta eletroforese segue a técnica descrita por Reisfeld (1962), com as seguintes modificações:

Gel de Empilhamento a 2,5 % em acrilamida.

Soluções estoques	Quantidade utilizada (µl)
Água desionizada	4.000,0
Acetato de potássio 1 N pH 6.8	800,0
Acrilamida:bis (1: 0,25)	1.600,0
TEMED	7,0
Persulfato de amônio (20 mg/ 2 ml de H ₂ O)	1.750,0

Gel de Separação a 15 % em acrilamida.

Soluções estoques	Quantidade utilizada (µl)
Água desionizada	7.500,0
Acetato de Potássio 1 N pH 4.3	1.500,0
Acrilamida : bis (30:0.2)	3.000,0
TEMED	90,0
Persulfato de amônio (20 mg / 2ml de H ₂ O)	558,0

A solução do eletrodo era constituída de β alanina e ácido acético pH 4,3, 0,35M, sendo diluída 10 vezes no momento do uso.

As amostras contendo cerca de 30 µg de proteína, eram dissolvidas em 50 µl de água desionizada, e 10 µl de glicerol, completando - se o volume para 100 µl com água desionizada. A fucsina básica foi utilizada como indicador.

O procedimento para a corrida eletroforética, coloração e secagem e posteriores passos, seguiram como descrito no item 3.6.

4. Resultados

4.1 Fracionamento do veneno de *B. neuwiedi pauloensis*:

4.1.1 Filtração em gel de Sephadex G-75:

A primeira etapa do fracionamento compreendeu a filtração do veneno bruto em gel de Sephadex G-75 em tampão formato de amônio 0,05 M pH 3,5, realizada como descrito no item 3.2. O perfil assim obtido é mostrado na fig 1. O veneno total foi resolvido em três picos de absorbância a 280 nm, designados de N1, N2 e N3. As frações correspondentes a cada pico foram reunidas em "pools" e depois liofilizadas.

4.1.2 Filtração em gel de Sephacryl S-200.

Os dois últimos fracionamentos compreenderam a filtração do veneno bruto em gel de Sephacryl S-200 em tampão bicarbonato de amônio 0,05 M pH 7,4 conforme descrito no item 3.3. Os perfis cromatográficos são mostrados nas figuras 2 e 3.

O veneno total foi resolvido em três picos de absorbância a 280 nm (N1, N2 e N3) e em quatro picos no último fracionamento, sendo designados de N1, N2, N3 e N4.

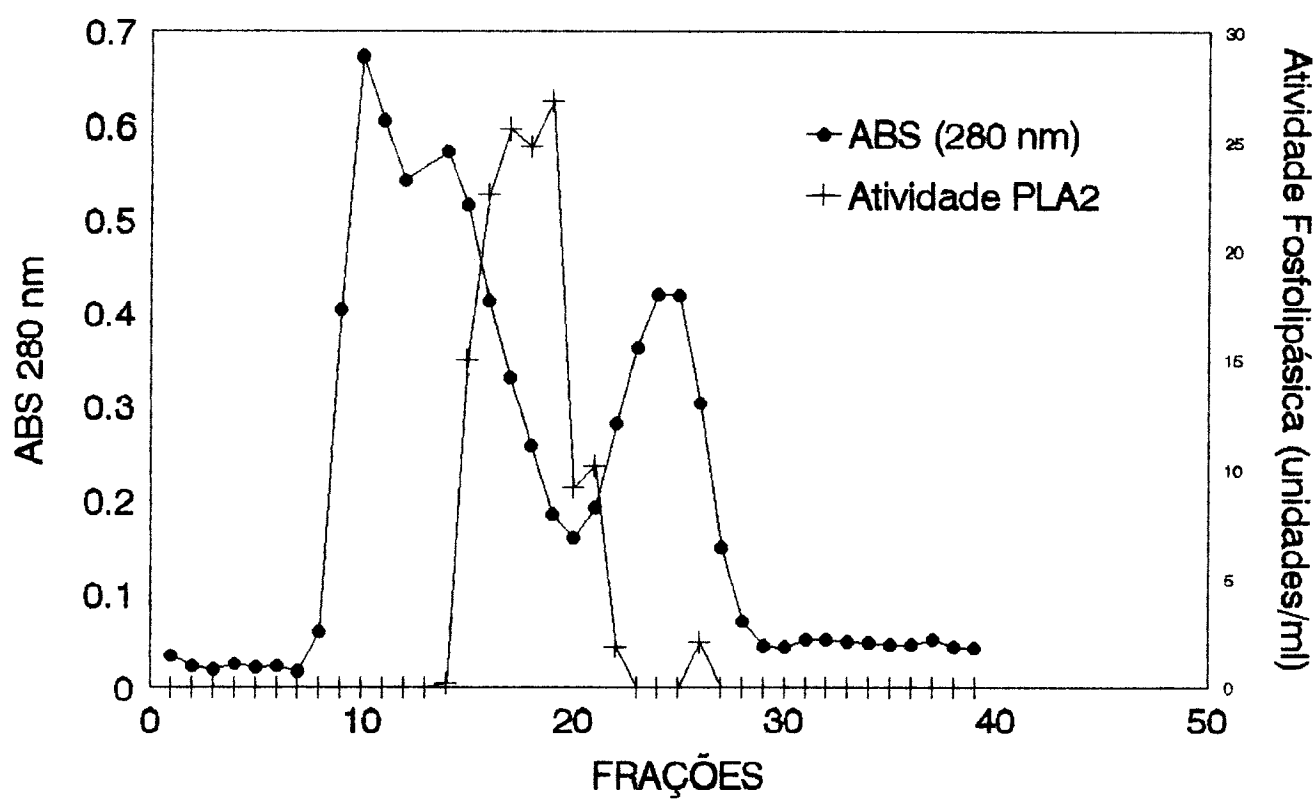


Fig. 1: Filtração em gel de Sephadex G-75 de 50ul(0,26mg) do veneno bruto de *B.*

neuwiedi pauloensis em tampão formato de amônio 0,05 M pH 3,5.

Condições: coluna de 37,0 x 1,5 cm de dimensões,

fluxo: 30 ml/h; temperatura ambiente; 3ml/tubo.

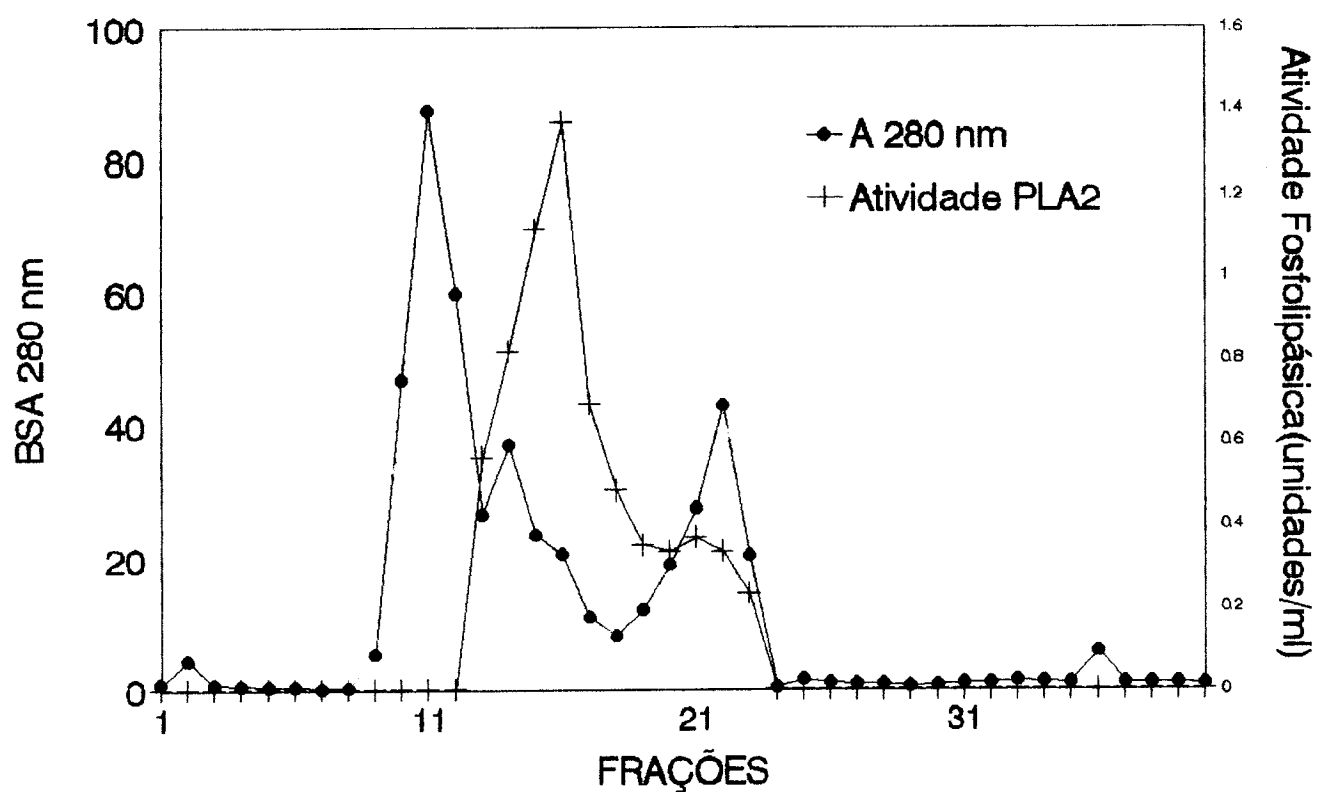


Fig. 2: Filtração em gel de Sephacry S-200 de 9,36 mg do veneno bruto de *B. neuwiedi pauloensis* em tampão NH_4HCO_3 0,05 M pH 7,4.

Condições: coluna : 50,0 cm x 2,0 cm de dimensões.

fluxo : 30 ml/h; temperatura ambiente; 3ml/tubo.

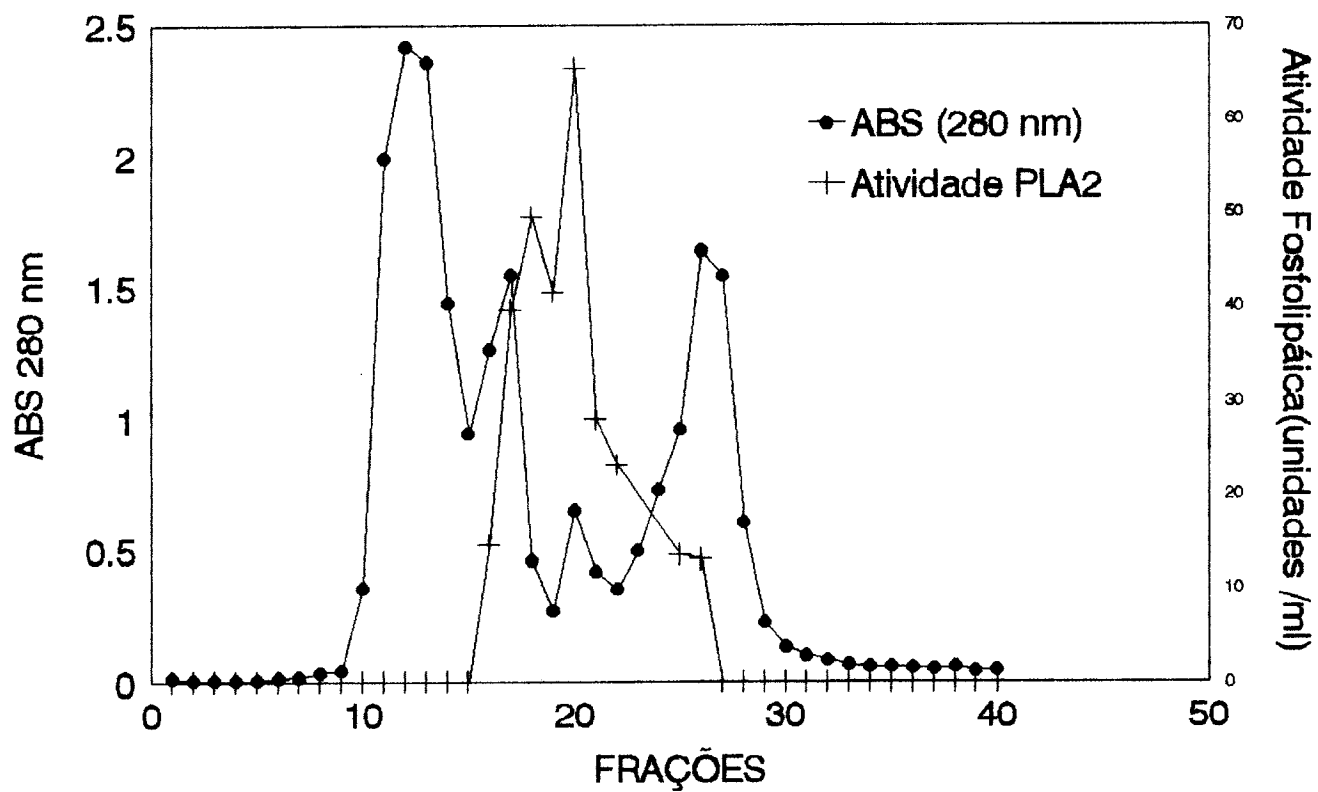


Fig. 3: Filtração em gel de Sephacryl S-200 de 23,04 mg do veneno bruto em tampão NH_4HCO_3 0,05 M pH 7,4.

Condições: coluna : 50,0 cm x 2,0 cm de dimensões,

fluxo: 56 ml/h; temperatura ambiente; 3ml/tubo.

4.2 Determinação Quantitativa de Proteínas:

Pelo método do microbiureto, foi construída uma reta padrão com a soroalbumina bovina, sendo possível determinar as concentrações do veneno bruto e frações a cada fracionamento, por interpolação dos valores nesta reta, obtendo-se assim o valor correspondente a concentração de cada amostra.

A figura 4 mostra a reta padrão obtida com a soroalbumina bovina.

O método do microbiureto apresentou linearidade compreendida entre 0,1 e 1,5 mg de proteína, observada na reta padrão obtida com soroalbumina bovina, cuja equação é a seguinte: $| \text{Proteína} | = 1,25 \times \Delta A$, onde $| \text{Proteína} |$ = mg de proteína, contida em 2,0 ml de solução a serem dosadas.

4.3 Determinação das atividades enzimáticas e efeitos biológicos:

Para o primeiro fracionamento foi realizada somente a atividade fosfolipásica e esta ficou evidenciada entre os picos N2 e N3 (fig. 1).

A atividade coagulante foi evidenciada somente nas frações N1 e N2, para os dois últimos fracionamentos.

A atividade fosfolipásica foi detectada no segundo fracionamento, entre os picos N2 e N3 (fig.2). No terceiro fracionamento esta ficou melhor caracterizada, tendo seu valor máximo no pico N3 (fig. 3).

A atividade anticoagulante não foi encontrada em nenhuma das frações, de acordo com as condições utilizadas.

A atividade hemorrágica foi detectada principalmente na fração N1, para ambos fracionamentos (fig.5-b). Esta fração provoca intensa hemorragia no local da injeção e pronunciada hemorragia peritoneal. A fração N2 apresentou uma pequena atividade como pode ser evidenciado na figura 5-c.

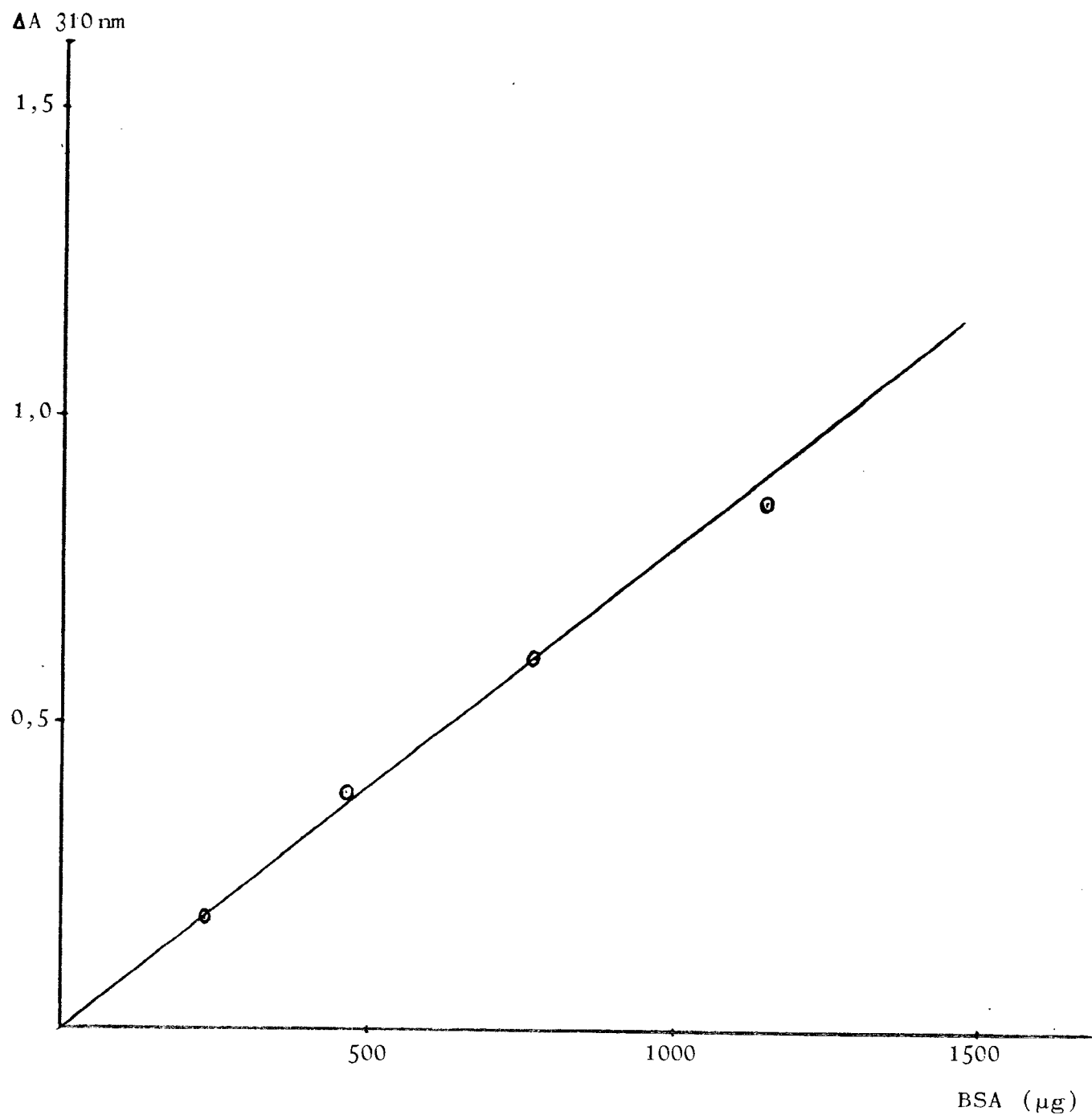


Fig.4: Reta padrão para determinação quantitativa de proteínas, segundo o método do microbiureto. Foi utilizada uma solução contendo 1mg/ml de soroalbumina bovina e os reagentes utilizados foram: R1- solução de sulfato de cobre a 0,21% em NaOH 30,4% e R2- solução de NaO a 30,0%

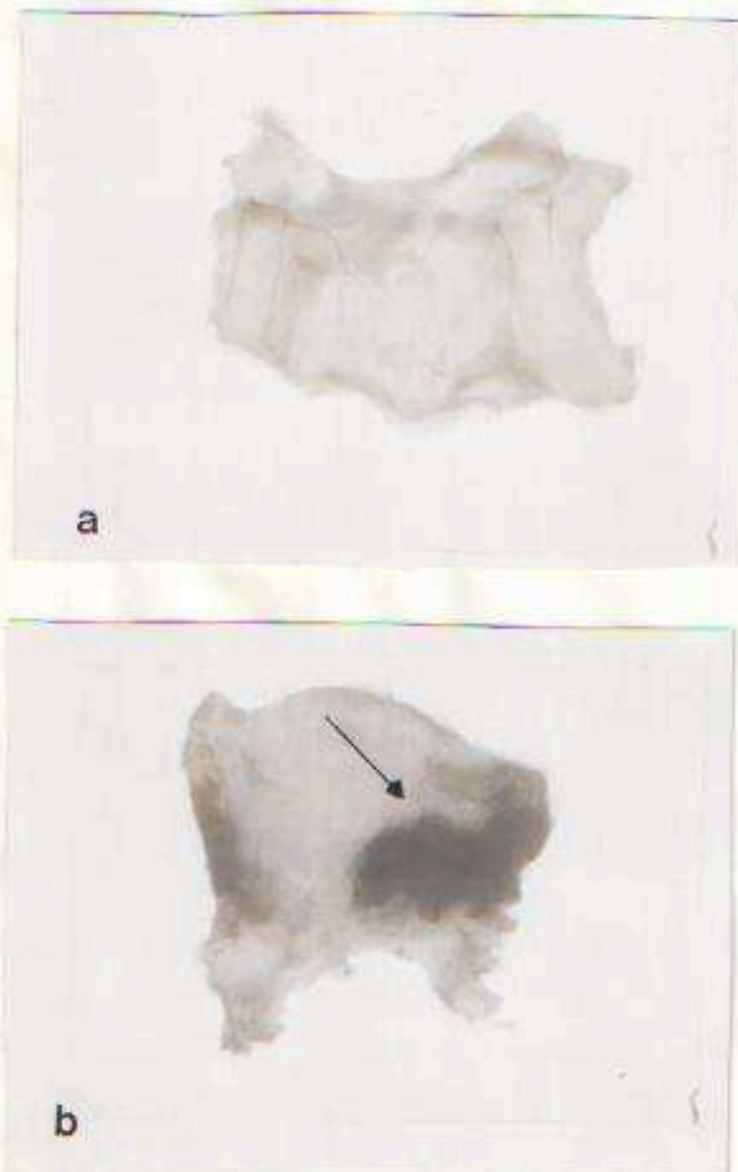


Fig.5: Atividade hemorrágica do veneno bruto e frações obtidas do fracionamento em Sephacryl S-200. Aliquotas de 20 ug do veneno bruto e frações diluídos em salina, foram injetadas por via subcutânea no dorso de camundongos anestesiados com éter, sendo sacrificados 5 horas após a injeção:

- a- controle,
- b- fração N1,
- c- fração N2,
- d- veneno bruto.

As setas indicam os halos hemorrágicos



A atividade proteolítica foi testada somente no veneno bruto, não sendo testada nas frações devido a pequena disponibilidade do substrato (caseína) em alto grau de pureza.

Na tabela I estão expressos os rendimentos do segundo e terceiro fracionamentos.

A atividade hemolítica direta não foi evidenciada no veneno bruto, consequentemente, não sendo testada nas frações.

Tabela I: Rendimento das frações obtidas por Cromatografia em gel de Sephacryl S-200.

Amostras	Proteínas (2º fracion.)		Proteínas (3º fracion.)	
	mg(totais)	% (recup.)	mg(totais)	% (recup.)
ven. bruto	9,36	100,0	23,04	100,0
N1	4,32	46,15	10,0	42,7
N2	4,16	44,40	6,4	27,3
N3	0,30	3,21	3,2	13,9
N4	-	-	2,9	12,6
total	8,78	93,8	22,5	97,66

4.4 Critérios de Pureza:

4.4.1 Eletroforese em gel de Poliacrilamida sem agentes desnaturantes.

As quatro frações obtidas em gel de Sephacryl S-200 do último fracionamento, foram analisadas quanto à pureza por eletroforese em gel de poliacrilamida, sem agentes desnaturantes, conforme descrito nos itens 3.7.1 e 3.7.2.

Os resultados obtidos nesta etapa são mostrados nas figuras 6 e 7.

4.5 Estimativa do Peso Molecular das frações por PAGE-SDS.

A eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes, realizada como descrito no item 3.6, foi utilizada para averiguar o peso molecular de cada amostra. Como é possível observar na figura 8 (2º fracionamento), e figura 9 (3º fracionamento), as frações apresentam várias bandas, principalmente N1, necessitando serem submetidas à outros fracionamentos. No entanto, pode-se estimar o peso molecular de certas bandas das frações por comparação de suas migrações com a dos padrões de pesos moleculares. As frações N2 e N3 tiveram a maioria de suas bandas migrando próximas à Calmodulina (PM 16.700) e à Anidrase Carbônica (PM 29.000) respectivamente. Já a fração N1 apresentou o maior número de bandas próximos aos padrões de maiores pesos moleculares.

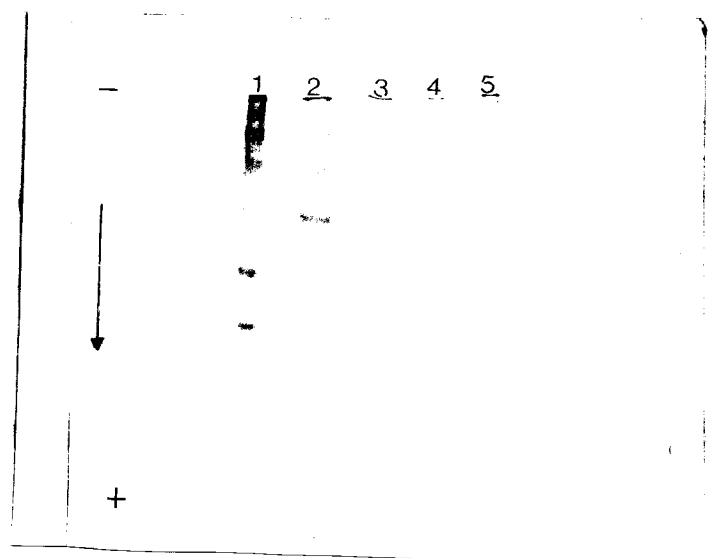


Fig.6: Eletroforese em gel de poliacrilamida sem agentes desnaturantes para proteínas ácidas. Gel a 12% em acrilamida; tampão Tris-glicina pH 8,3; corrente 25mA, 200V; tempo de corrida 2 horas.

Amostras: 1- Veneno bruto,

2- Fração N1,

3- Fração N2,

4- Fração N3,

5- Fração N4.

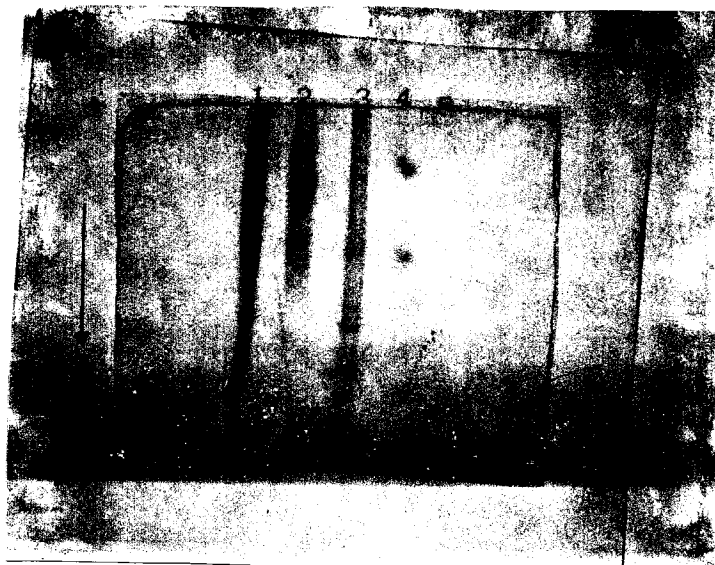


Fig. 7: Eletroforese em gel de poliacrilamida sem agentes desnaturantes para proteínas básicas. Gel a 15% em acrilamida; tampão β - alanina pH 4,3; corrente 25mA; 200V; tempo de corrida 2 horas.

Amostras: 1- Veneno bruto,

2- Fração N1,

3- Fração N2,

4- Fração N3,

5- Fração N4.

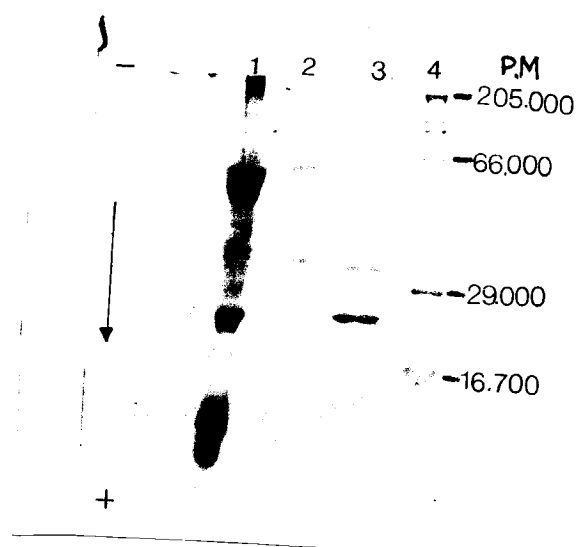


Fig. 8: Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes. Gel a 12% em acrilamida; tampão Tris-HCl pH 8,3; corrente 25 mA, 200V; corrida 2 horas.

Amostras (2º fracion.):

- 1- Veneno bruto,
- 2- Fração N1,
- 3- Fração N2,
- 4- Padrões de peso molecular.

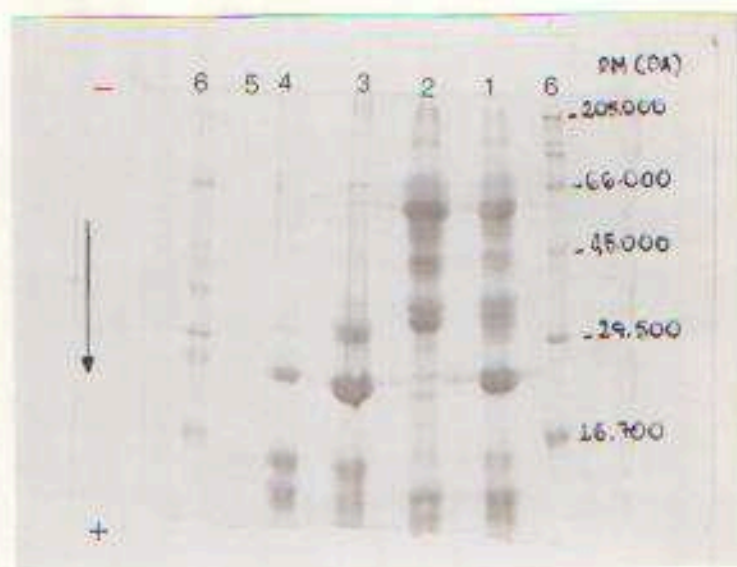


Fig. 9: Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes. Gel a 12% em acrilamida; tampão Tris-HCl pH 8,3; corrente 25mA, 200V; corrida 2 horas.

Amostras(3º fracion.):

- 1- Veneno bruto,
- 2- Fração N1,
- 3- Fração N2,
- 4- Fração N3,
- 5- Fração N4,
- 6- Padrões de peso molecular.

5. Discussão e Conclusões

Os objetivos deste trabalho foram o fracionamento do veneno bruto de *B. neuwiedi pauloensis* (jararaca pintada) e a determinação das atividades enzimáticas capazes de provocar alguns dos efeitos causados por envenenamento botrópico, tais como: hemorragia, coagulação ou incoagulabilidade sanguínea, necrose, ação fosfolipásica, proteolítica, etc.

Assim, quando submetemos o veneno bruto a um fracionamento piloto para se testar quais as melhores condições de cromatografia como o fluxo da coluna, resina cromatográfica, tampão eluente, etc, obtivemos três picos de absorbância a 280 nm, os quais foram designados de N1, N2 e N3. Não houve uma separação satisfatória entre os picos N1 e N2 (fig. 1), sendo assim, novas condições de fracionamento foram utilizadas.

A resina de filtração molecular Sephacryl S-200 passou a ser utilizada para os dois últimos fracionamentos. Embora o intuito fosse o de melhorar a resolução do cromatograma, ou seja, separar melhor os picos, houve certa reprodutibilidade do primeiro para o segundo fracionamento (figuras 1 e 2) e uma melhor definição dos picos no terceiro fracionamento.

O rendimento das frações foi satisfatório, cerca de 93,8% para o segundo e 97,66% para o último fracionamento, demonstrando a eficácia das condições utilizadas.

Basicamente, os fatores que proporcionaram a eficiência do método cromatográfico foram: a resina Sephacryl S-200, o fluxo estabelecido e a quantidade de amostra aplicada à coluna.

O veneno bruto mostrou ser bastante hemorrágico, sendo que a fração N1, representando cerca de 44,0% da massa total de proteínas, apresentou quase que a totalidade da atividade hemorrágica presente no veneno total, uma vez que N2 apresentou uma atividade menor, e N3 e N4 não causaram hemorragias.

Do veneno de *Bothrops neuwiedi*, já foram isolados dois fatores hemorrágicos NHFa e NHFb, por MANDELBAUM et al. (1984). Estes fatores ou toxinas hemorrágicas são proteínas ácidas de pI 4,2 - 4,4 e consistem de cadeias polipeptídicas únicas, com pesos moleculares de 46.000 e 58.000.

A fração N1, correspondeu sempre ao primeiro pico de absorbância a 280 nm. Nos dois últimos fracionamentos, mostrou na eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes, ser constituída em sua grande maioria por proteínas de maior peso molecular entre 30.000 a 66.000 Da, por comparação de suas migrações com as dos padrões de pesos moleculares.

É provável que a fração N1 possua os mesmos fatores hemorrágicos já isolados por MANDELBAUM et al (1984), uma vez que os pesos moleculares estimados das bandas de N1 estão próximos aos das toxinas NHFa e NHFb de *B. neuwiedi*. Mas deve ser ressaltado que as toxinas hemorrágicas já isoladas, foram purificadas de um pool de venenos oriundos de várias subespécies, enquanto que neste trabalho, a fração N1 isolada de *B. neuwiedi pauloensis* corresponde ao veneno extraído de uma única subespécie. A fração N1 pode apresentar ou não as duas toxinas hemorrágicas já caracterizadas pela autores citados anteriormente.

A presença de várias isoformas de proteínas ocorrendo num único veneno, é frequente e bastante descrita na literatura (DURKIN et al., 1981; VIDAL e STOPPANI, 1971). As bases bioquímicas para esta diversidade não são ainda conhecidas, mas múltiplas formas de enzimas podem representar diferentes produtos gênicos, ou seja,

diferentes sequências de aminoácidos, o que poderia resultar em diferenças de PM e carga líquida (TU, 1977; DUBOURDIEU et al 1987)

No presente trabalho as frações N1 e N2 que contêm as toxinas hemorrágicas, também apresentaram atividade coagulante. A ação coagulante pode ou não estar relacionada com a atividade hemorrágica. Assim, OWNBY et al.(1978) descreveram que as hemorraginas isoladas do veneno de *Crotalus atrox* provocam danos capilares e agregação plaquetária, enquanto que OSHAKA, (1978) sugere um efeito inibitório sobre a agregação plaquetária e formação de trombos para as hemorraginas presentes no veneno de *Timoressus flavoviridis*. Estes resultados mostram que diferentes venenos, embora produzindo o mesmo quadro hemorrágico, podem variar quanto ao mecanismo de ação.

As toxinas hemorrágicas isoladas e descritas na literatura possuem algum tipo de atividade proteolítica, que promove a destruição enzimática da membrana basal, especificamente do colágeno tipo IV, resultando na abertura de junções entre células endoteliais. Esta abertura dos poros levaria ao extravazamento de eritrócitos (ISHIDA et al., 1986).

A atividade proteolítica deveria ser testada nas frações, especialmente na fração N1, no entanto, esta atividade foi testada apenas no veneno bruto, devido à insuficiência de reagentes apropriados. O veneno bruto apresentou atividade proteolítica.

Os venenos de serpentes podem causar hemólise in vitro de duas formas : a) diretamente, isto é, sem qualquer adição de uma fonte de fosfolípidos, pela ação de um componente presente nos venenos de serpentes, como as da família Elapidae, que hidrolisa diretamente as hemáceas e que foi denominado de "fator lítico direto"(CONDREA et al., 1979), b) indiretamente, isto é, PLA₂ presentes nos venenos agiriam sobre fosfolípidos liberando seus produtos (ácidos graxos e lisofosfatídeos) que promoveriam a lise das células vermelhas.

O teste hemolítico direto foi negativo no veneno bruto, em virtude deste resultado, este ensaio não foi realizado com as frações.

Das filtrações realizadas, a atividade PLA_2 apresentou um pico mais elevado entre as frações N2 e N3 para o segundo fracionamento, sendo melhor caracterizada no último fracionamento, mostrando um pico de alta atividade coincidente com a fração N3 e outro menor com N4.

Uma das fontes mais ricas de PLA_2 na natureza, são os venenos de serpentes peçonhentas. Estas PLA_2 são responsáveis pela grande maioria dos efeitos observados por envenenamento ofídico, podendo causar mionecrose tecidual, edema, ação coagulante e anticoagulante e até mesmo à morte (GUTIERREZ, 1986). Sendo assim, é de extrema importância detectar sua presença no veneno bruto e diferentes frações.

Já foram descritas várias fosfolipases de venenos botrópicos com ação miotóxica. Nossos estudos prosseguem na tentativa de purificar tais enzimas que podem apresentar ou não atividade miotóxica.

Em gel de poliacrilamida sem agentes desnaturantes, a fração N3, que representa quase a totalidade da atividade PLA_2 do veneno total, apresentou três bandas, necessitando ser submetida a novos fracionamentos, afim de obtermos as proteínas isoladas em alto grau de pureza

A fração N4 foi a última a ser eluída na cromatografia de peneiramento molecular, sendo portanto composta pelos menores constituintes do veneno total, também apresentou um baixíssimo rendimento proteico (Tabela I). Estes resultados poderiam explicar a ausência de bandas na eletroforese em gel de poliacrilamida (figuras 8 e 9).

Os estudos realizados até agora permitiram detectar as diferentes atividades enzimáticas do veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* tais como: hemorrágica, proteolítica, coagulante e fosfolipásica. Nossos resultados sobre um fracionamento inicial deste veneno também foram bastante promissores, mostrando que cada fração isolada contém componentes distintos que são responsáveis pelos diferentes efeitos observados com o veneno total. Deste modo, a continuidade dos estudos na purificação destes componentes em alto grau de pureza, poderá contribuir substancialmente em diversas áreas do conhecimento, tais como: bioquímica, fisiopatologia e filogenética.

Referências Bibliográficas

- ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P. and MANDELBAUM, R. (1986). Comparison of immunological, biochemical and biophysical properties to three hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops jararaca* (jararaca). *Toxicon*, **24**: 943.
- ALVARADO, J and GUTIERREZ, J, M. (1988). Anticoagulant effect of myotoxin phospholipase A2 isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (Viperidae) *Rev. Biol. Trop.* **36(2B)**: 563-565.
- BIEBER, A. L. (1979) Metal and nonprotein constituents in snake venoms. In: Snake Venoms. *Handbook of Experimental Pharmacology*. LEE, C.Y. **52**: 295. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- BJARNASON, J. B. and TU, A. T. (1979). Hemorrhagic toxins from western diamond back rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom isolation and characterization of five toxins and role of zinc in hemorrhagic toxin. *Biochemistry*, **17**: 3395.

- BRASIL. 1989. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Ações Básicas de Saúde - Manual de diagnósticos e taratamento de acidentes ofídicos. Brasília. Centro de Documentações do Ministério da Saude,(Normas e Manuais Técnicos, 35).
- BRITES, V. L. C. e BAUAB, F. A. (1988). Fauna ofidiana do município de Uberlândia, Minas Gerais - Brasil. I. Ocorrência na área urbana. *R. Cent. Ci. Biomed. Universidade Federal de Uberlândia*, 4(1) : 3.
- CAMERON, D. e TU, A. T. (1977). Characterization of myotoxin from the venom of prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*). *Biochemistry*, 16: 2546.
- CHANG, C. C. (1979). The action of venoms on nerve and muscle. In: LEE, C. Y. Snake Venoms: *Handbook of Experimental Pharmacology*, 52 : 309. Springer Verlaq Berlin - Heideberg, New York.
- CONDREA, E. (1979). Hemolytic effects of snake venoms. In: Snake venoms. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 52: 448.
- .DEHAAS, G. H., POSTEMA, N. M. , NIEUWENHVIZEN, W. AND VAN DEENEN, L. L. M. (1986). Purificattion and properties of phospholipase A from porcine pancreas. *Biochim biophys. Acta*, 159: 103.
- DENSON. K. W. E. (1969). Coagulant and anticoagulant action of snake venoms. *Toxicon*, 7: 5-11.
- DOTY, P. and GEIDUSCHEC, E. P. (1953). In: *The proteins* (Neurath, H. and Bailey, K. Eds), I-A: 434.

- DUBOURDIEU, D. J. ; KAWSGUCHI, H.; SHIER, W. T. (1987). Molecular weight variations in the diversity of phospholipase A2 forms in reptile venoms. *Toxicon*, **25**: 333.
- DUCAN, C. J. (1978). Role of intracellular calcium in promoting muscle damage: a strategy for controlling the dystrophic conditions. *Experientia*, **34** : 1531.
- DUCHEN, L. W. ; EXCELL, B. J. ; PATEL, R. ; SMITH, B. (1974). Changes in motor endplates resulting from muscle fibre necrosis and regeneration. A light and electron microscopic study of the effects of the depolarizing fraction (cardiotoxin) of *Dendroaspis jamesoni* venom. *J. Neurol. Sci.*, **21** : 391.
- DURKIN, J. P. ; PICKWELL, G. V. ; TROTTER, J. T. ; SHIER, W. T. (1981). Phospholipase A₂ electrophoretic variants in reptile venoms. *Toxicon*, **19**: 535.
- FRANCIS, B. ; GUTIERREZ, J. M. ; LOMONTE, N. and KAISER, I. I. (1991). Miotoxin II from *Bothrops asper* (terciopelo) venom is lysine- 49 phospholipase A2. *Arch. Biochem. Biophys*, **284** :352.
- GANS, C. (Ed.) (1978) . Biology of the Reptila. London. *Academic Press*.
- GUTIERREZ, J. M. ; LOMONTE, B. ; CHAVES, F. ; MORENO, and CERDAS, L. (1986). Pharmacological activities of a toxin phospholipase A isolated from the venom of the *Bothrops asper*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **84c** : 159- 164.

- GUTIERREZ, J. M. ; NUNES, J. ; DIAZ, C. ; CINTRA, A. C. O. ; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. and GIGLIO, J. R. (1991). Skeletal muscle degeneration after infection of bothropstoxin-II, a phospholipase A2 isolated from the snake *Bothrops jararacussu*. *Exp. Mol. Pathol.*, **55** : 217.
- GUTIERREZ, J. M. ; OWNBY, C. L. and ODELL, G. U. (1984a). Isolation of a myotoxin from *Bothrops asper* venom: partial characterization and of skeletal muscle. *Toxicon*, **22** : 155.
- GUTIERREZ, J. M. ; OWNBY, C. L. and ODELL, G. U. (1984b). Pathogenesis of myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin of *Bothrops asper*. *Exp. Mol. Pathol.*, **40** : 367-379.
- GUTIERREZ, J. M. ; OWNBY, C. L. and ODELL, G. U. (1984c). Skeletal muscle regeneration after myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin from the snake *Bothrops asper* (Fer- de - Lana). *Toxicon*, **22**: 719- 773.
- HAAD, J. J. S. (1989). Las serpientes del genero *Bothrops* en la Amazonia Colombiana. *Acta Med. Colomb.*, **14** : 148 - 165.
- HARRIS, J. B. (1984). Polipeptides from snake venoms which act on nerve and muscle. In: *Progress in medicinal Chemistry*, **21** : 64.
- HELUANY, N. F. ; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. ; GIGLIO, J. R.; PRADO-FRANCHESCHI and RODRIGUES SIMIONI, L. (1992). Effects induced by *Bothrops jararacussu* snake venom on mouse and chick muscle preparations. *Toxicon*, **30** : 1203.

- HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. (1987). Fracionamento do veneno de *Bothrops jararacussu*: caracterização química parcial de componentes ativos e estudo dos efeitos farmacológicos e anatomopatológicos da Bothropstoxina. *Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Univerdidade 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. *Toxin*, 26 (7) : 605-627.
- ISHIDA, Y. ; YAMASHITA, S. ; OSHAKA, A; TAKAHASHI, T. and OMORI- SATOH T. (1986). Pharmacology studies of the hemorrhagic principles isolated from the venom of *Trimeressurus flavoviridis*, a crotalid. In: *Animal, Plant and Microbial Toxins*.(OSHAKA, A. ; HAYASJI, K.; SAWAI,Y.; Eds.), 2: 263. Plenum, New York.
- ITZHAKI, R. F. and GILL, D. M. (1964). A micro-biuret method for estimating proteins. *Anal. Biochem.*, 9 : 401.
- JIMENEZ-PORRAS, J. M. (1973). Biochemistry of snake venoms (a review). *Clin. Toxicol.*, 3 : 389.
- KAISER, I. I. ; GUTIERREZ, 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 : 319-325.
- KLEMMER, K. (1963). Liste der rezenten Giftschlangen. Elapidae, Hidrophiidae, Viperidae und Croatalidae. In: Die Giftschlangen der Erde. Wirkung und Antigenitat

- der Gifte. *Therapie von Giftschagenbissen. Berhringwerk-Mitteilungem* pp. 255, Marburg/ Lahn: Elwert.
- KLOBUSITZKY, D. (1961). Coagulant and anticoagulant agents in snake venoms. *Am. J. Med. Sci.*, **242**: 107.
- LAI, M. K. ; WEN, C. Y. and LEE, C. Y. (1972). Local lesion caused by cardiotoxin from Formosa cobra venom. *J. Formosan Med. Ass.*, **71** : 328.
- LOMONTE, B. and GUTIERREZ, J. M. (1989). A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon*, **27** : 725-733.
- LOMONTE. B. ; GUTIERREZ, J. M. ; FURTADO, M. F. ; OTERO, R. ; ROSSO, J. P. ; VARGAS, O. ; CARMONA, E. and ROVIRA, M. E. (1990). Isolation of basic myotoxins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* snake venoms. *Toxicon*, **28** : 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.
- MEBS, D and SAMEJIMA, Y. (1980). Purification from Australian elapid venoms, and properties of phospholipases. A which cause myoglobinuria in mice. *Toxicon*, **18** : 393.
- MEBS, D. (1970). A comparative study of enzyme activities in snake venoms. *Int. J. Biochem.*, **1**, 335.

- MEBS, D. and SAMEJIMA, Y. (1986). Isolation and characterization of myotoxic phospholipases A2 from crotalid venoms. *Toxicon*, **24** : 161.
- 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.
- NISHIOKA, S. A. and SILVEIRA, P. V. P. (1992). Clinical and epidemiological study of 292 cases of lance - headed vipers. *Ann Trop Med Parasit* (**86**): 89 a 91.
- OSHAKA, A. ; JUST, M. ; HABERMAN, E. (1973). Action of snake venom hemorrhagic principles on isolated glomerular basement membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, **323** : 425-428.
- OSHAKA, A..(1979). Hemorrhagic, necrotizing and edema. Forming effects of snake venoms. In: Snake venoms. *Handbook of Experimental Pharmacology*, **52**: 480.
- OWNBY, C. L. ; CAMERON, D. ; TU, A. T. (1976). Isolation of myotoxic component from rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. Electron microscopic analysis of muscle damage. *AM. J. Path.*, **85**: 149.
- OWNBY, C. L.; BJARNASON, J. and TU, A. T. (1978). Hemorrhagic toxins from rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. Pathogenesis of hemorrhage induced by three purified toxins. *AM. J. Path.* , **93**: 201.
- OWNBY, C. Z. (1982). Pathology of rattlesnake envenomation. In: Tu, A. Tu. A. T. ed rattlesnake venoms, their action and treatment. New York, Marcel Dekker, 163-209.

- PAULINO, F. E. C. ; MAGALHÃES, M. R. e SILVA, N. J. (1991). Atualização da distribuição geográfica de serpentes do grupo *Bothrops* nos estados de Goiás, Tocantins e Distrito Federal. (**Resumos do XVIII Congresso Brasileiro de Zoologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Ba**).
- PETERS, J. A. e OREJAS-MIRANDA. B. (1970). Catalogue of the neotropical Squamata. Part 1. Snakes. *V. S. Natl. Mus. Bul.* , 297: 1- 347.
- POOL, W. R. ; ENGLE, C. M. and BIEBER, A. L. (1981). Isolation and characterization of two myotoxic from venom of the midget faded rattlesnake (*Crotalus viridis concolor*). *Fedn. Proc. Am. Socs. Exp. Biol.*, 40: 1570
- REIMERDES, E. H. and KLOSTERMEYER, H. (1976). Determination of proteolytic activities on caseins substrates. In: *Methodos Enzymology*, 65: 26 (Academic Press, New York and London.
- REISFELD, R. A. ; LEWIS, J. ; WILLIAMS , D.E. (1962). Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrilamida gel. *Nature*, 4838: 281.
- ROBBINS, S. L. ; COTRAN, R. S. ; KUMAR, U. (1987). Patologia estrutural y funcional. México. Nueva Editorial Interamericana.
- ROMANO-HOGE, S. A. R. W. L. (1990). Principais serpentes de interesse médico . Reconhecimento e Distribuição geográfica no continente americano. In: **Sorensen, B. - Animais peçonhentos**. Rio de Janeiro. Atheneu.
- ROTHSCHILD, A. M. ; ROTHSCCHILD, Z. (1979). Liberation of Pharmacologically active substances by snake venoms. In: Snake Venoms. *Handbook of Experimental Pharmacology*, Lee, C. C. , 52: 591, Springer- Verlaq Berlin Heidelberg New York.

- RUSSEL, F. E. (1987). Toxinology in the 1987: A new era for an ancient science - Newsletter, International Society on Toxinology - *Toxicon*.
- SANCHES, E. F. ; MAGALH+ES, A. and DINIZ, C. R. (1987). Purification of a hemorrhagic factor (LHF-I) from the venom of bushmaster snake, *Hesis muta muta*. *Toxicon*, 25: 611.
- SELISTRE, H. S. ; GIGLIO, J. R. (1988). Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of the snake *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa). *Toxin*, 25 : 1135.
- SELISTRE, H. S. ; QUEIROZ, L. S. ; CUNHA, O. A. B. ; SOUZA, G. E. P. and GIGLIO, J. R. (1990 a). Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema inducing toxins from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. *Toxicon*, 28(30): 261.
- SELISTRE, H. S. ; QUEIROZ, L. S. ; CUNHA, O. A. B. ; SOUZA, G. E. P. and GIGLIO, J. R. (1990a). Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema inducing toxins from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. *Toxin*, 28 (30) : 261.
- TRUMP, B. F. ; BEREZESKY, I. K. ; OSORNIO-VARGAS, A. R. (1981). Cell death and the disease process. The role of calcim. In: Cell Death in Biology an Pathology. Bowen I. D. , Lockshin, R. A. Condon: Chapman and Hall.
- TU, A. T. (1977). Blood coagulation. In: Venoms Chemistry and Molecular Bilogy, *Jonh Wiley and Sais*.

VIDAL. J.C. and STOPANI, A. O. (1971) Isolation and purification of two phospholipases A from *Bothrops venoms*. *Archs. Biochem. Biophys.* , **145**: 543.

VITAL BRAZIL (1911). La defense contre l'ophidisme. 2. ed. São Paulo : *Pocai and Weiss*, p. 48.

VITAL BRAZIL, O. (1982). Peçonhas. In: *Farmacodinâmica*, Corbett, C. E. , pp. 1044, Guanabara, RJ.