

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

ISOLAMENTO E PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS DAS
MIOTOXINAS DA PEÇONHA DE *B. jararacussu*.

MÁRCIA HELENA BORGES

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

Uberlândia - MG
Dezembro/1995.

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

ISOLAMENTO E PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS DAS
MIOTOXINAS DA PEÇONHA DE *B. jararacussu*.

MÁRCIA HELENA BORGES

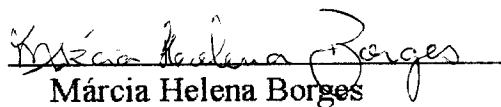
MARIA INÊS HOMSI BRANDEBURGO

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

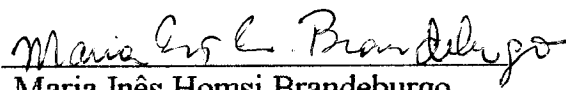
Uberlândia - MG
Dezembro/1995.

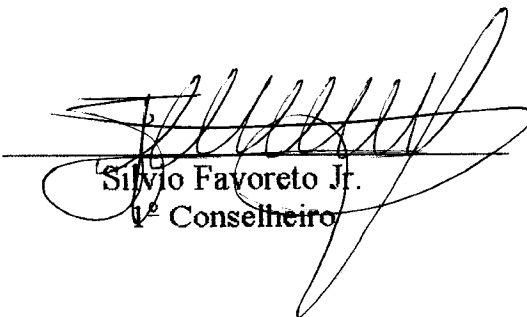
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

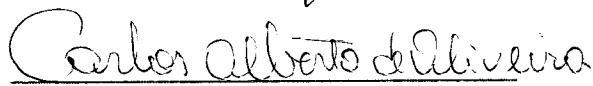
ISOLAMENTO E PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS DAS
MIOTOXINAS DA PEÇONHA DE *B. jararacussu*.


Márcia Helena Borges

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


Maria Inês Homsi Brandeburgo
Orientador


Silvio Favoreto Jr.
1º Conselheiro


Carlos Alberto de Oliveira
2º Conselheiro.


Nora Ney Santos Barcelos
Coordenadora do curso

Uberlândia, 22/12/95 de 1995..

Este trabalho é dedicado.

à Deus, que nos ilumina no dia-a-dia, dando-nos força para continuar nesta jornada, sempre seguindo os caminhos por Ele ensinados;

à meus Pais: João Martins Borges e Maria Abadia Borges, pelo incentivo e apoio nas horas mais difíceis, o respeito, o carinho e o eterno agradecimento;

à meus irmãos: Geraldo Marcelo e Magdo César, pelos dias passados lado a lado na busca da justa vitória;

à meu namorado Frederico Romagnoli, pela compreensão, paciência e convivência;

à minha orientadora Maria Inês Homsi Brandeburgo, pela transmissão de idéias, experiências e sobretudo de muita amizade.

*"Nunca se percebe o que já foi feito;
a gente só nota o que
ainda está por fazer. "*
(Marie Curie)

Agradecimentos,

Aos conselheiros, Silvio e Carlos, por aceitarem prontamente colaborar para a realização deste trabalho;

Aos professores: Amélia Hamaguchi e Nilson P. Silva pelo incentivo nas tarefas dentro do laboratório;

Aos membros do grupo Peçonha, nosso grupo de pesquisas: Veridiana, Fábio, Andreimar, Gislaine, Luciana, Ana Paula e Fernanda pelo trabalho de grupo

À profª Ana Maria Bonetti, tutora do grupo PET pelo carinho, apoio e incentivo;

Aos membros do grupo PET pelo crescimento em conjunto e verdadeiro espírito de grupo;

Aos que trabalham no Laboratório de Bioquímica pelo convívio diário e múltipla ajuda nas tarefas realizadas;

Aos amigos do Laboratório de Imunologia, pelo auxílio nas horas necessárias;

A Edna Burns Navarro, secretária da Coordenação do C. Biológicas, pela presteza em resolver os problemas dos outros;

A todos os professores que fazem parte do curso de Ciências Biológicas, por ampliar meus conhecimentos;

E a todos que se dispuseram a ajudar à realização deste trabalho.

Resumo:

Serpentes são répteis com larga distribuição mundial. A grande maioria desses animais produzem substâncias deletérias que podem deixar sequelas ou até mesmo levar à morte da vítima. Os acidentes são causados muitas vezes devido à falta de uso de equipamentos adequados, visto que as áreas mais atingidas são pés e mãos, e a época de ocorrência se dá principalmente nos períodos de safra. As serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis pela maioria dos acidentes ofídicos no Brasil. O envenenamento botrópico é caracterizado por mionecrose, hemorragia e edema, podendo ocorrer também efeitos sistêmicos como coagulação sanguínea e menos frequentemente choque cardiovascular. Esses efeitos são provocados pela complexa mistura de proteínas tóxicas presentes. Então para entender melhor o quadro de envenenamento é necessário descobrir a causa dos efeitos. Para isto utilizam-se processos de purificação que visam separar os componentes desta mistura e estudá-los separadamente. O veneno de cada espécie pode ser totalmente ou parcialmente neutralizado por antisoros heterogêneos. Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi purificar as miotoxinas presentes no veneno de *Bothrops jararacussu* e a partir destas produzir anticorpos policlonais. Inicialmente foi feita uma filtração em Sephadex G-75 do veneno bruto, a partir da qual se obteve 4 picos: J1, J2, J3 e J4. Foi feita a atividade fosfolipásica (PLA₂) das frações que indicou a presença de atividade apenas na fração J3. A fração J3 foi então cromatografada em Sp-Sephadex C-25, resultando em 5 picos, denominados de SpI a SpV. A atividade PLA₂ também foi testada para estas subfrações, apresentando-se positiva nos picos SpI, SpIII e SpIV. SpII não foi testada quanto à PLA₂ e SpV ao ser testada não apresentou atividade PLA₂. As subfrações foram monitoradas por eletroforeses em gel de poliacrilamida indicando que SpIV e SpV estavam puras, pois apresentaram apenas uma banda em PAGE não desnaturante. Estudos de outros autores demonstraram que estas duas frações são miotóxicas. SpV e SpIV foram denominadas de Botropstoxina I (BthTX-I) e Botropstoxina II (BthTX-II), respectivamente. Essas duas frações foram, então inoculadas em 2 lotes de coelhos, obedecendo o mesmo esquema de imunização com intervalos de 12 dias entre as doses. O 1º lote de coelhos produziu alto título de anticorpos testados por Elisa e imunodifusão, enquanto o 2º lote apresentou baixa produção de anticorpos quando testados por imunodifusão. Foram ainda observadas reações cruzadas quando anticorpos contra BthTX-I reconheceram BthTX-II e vice-versa, indicando que estas miotoxinas são semelhantes. A presença de reações cruzadas para diferentes espécies é indicativo de parentesco evolutivo e permite a utilização do soro de uma espécie para combater os sintomas produzidos por outra espécie.

Sumário:

1- Introdução.....	1
2- Objetivos.....	12
3- Materiais e métodos.....	13
3.1- Obtenção do veneno	13
3.2- Materiais utilizados no fracionamento	13
3.3- Fracionamento do veneno bruto de <i>B. jararacussu</i>	14
3.3.1- Gel Filtração em Sephadex G-75	14
3.3.1.1- Preparo da resina	14
3.3.1.2- Preparo da amostra a ser purificada	14
3.3.2- Subfracionamento da fração J3 de <i>B. jararacussu</i> em resina de troca iônica	14
3.3.2.1- Preparo da resina SP-Sephadex C-25	14
3.3.2.2- Preparo da amostra a ser purificada	15
3.3.2.3- Purificação das miotoxinas BthTx-I e BthTx-II	15
3.3.2.4- Diálise das frações	15
3.4- Determinação quantitativa de proteínas.....	15
3.5- Determinação da atividade fosfolipásica.....	15
3.6- Critérios de pureza.....	16
3.6.1- PAGE não desnaturante	16
3.6.2- PAGE desnaturante (SDS).....	17

3.6.3- Revelação e secagem dos géis	18
3.7- Produção de anticorpos policlonais para imunização	19
3.7.3- Cronograma de imunização	19
3.7.4- Verificação da presença de anticorpos.....	20
4- Resultados.....	22
4.1- Gel Filtração em Sephadex G-75	22
4.2- Cromatografia de troca iônica em SP-Sephadex C-25	22
4.3- Eletroforeses	23
4.4- Cronograma da purificação de miotoxinas presentes no veneno bruto de <i>B. jararacussu</i>	30
4.5- Produção de anticorpos	31
5- Discussões e conclusões	37
6- Referências bibliográficas	43

1-INTRODUÇÃO:

Serpentes ou ofídios são répteis desprovidos de membros, que podem ser peçonhentos ou não e com modificações que lhes permitem alimentar-se de grandes animais, engolindo-os inteiros. Não possuem cintura escapular, pálpebras móveis e nem tímpano. No Brasil, o termo mais usado é cobra, do latim “colubra”: cobra se refere à qualquer serpente peçonhenta ou não, indiferentemente. Este termo foi introduzido pelos Portugueses que o trouxeram da Índia onde o nome é dado à *Naja tripudians* (SOERENSEN, 1990).

Constituem um grupo de animais altamente especializados. Os fósseis mais antigos mostram um estágio avançado de evolução porém não revelam informações sobre sua origem (BARRAVIERA, 1994).

Estudos mostram que a maioria dos fósseis de serpentes são do Cretáceo (cerca de 136 milhões de anos atrás) e vêm do continente de Gondwana, incluindo África e América do Sul, indicando a ampla distribuição desses animais quando os continentes eram unidos. A difusão das serpentes para outros locais como a América do Norte, ocorreu no final do Cretáceo quando este continente esteve ligado à América do Sul. Assim, partindo da América do Norte, os boídeos e aniliídeos se espalharam por toda a Europa, até chegar à Ásia, de onde acredita-se que surgiram os viperídeos e colubrídeos. (BARRAVIERA, 1994).

Aproximadamente, um terço de todos os répteis produz alguma toxina bucal e estas substâncias têm um efeito deletério no organismo da presa (GANS, 1978)

Venenos são produtos metabólicos produzidos ou estocados em órgãos que, em condições naturais afetam o organismo quando ingeridos ou podem atuar

artificialmente, por via parenteral (FREYVOGEL e PERRET, 1973). O termo peçonha 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.

Animais peçonhentos são aqueles que possuem um aparelho inoculador capaz de perfurar a presa e injetar a substância tóxica. Por outro lado, animais considerados venenosos são aqueles que possuem tecidos parcial ou totalmente tóxicos e o envenenamento ocorre por ingestão desses tecidos.

Portanto, a palavra “peçonha” tem sentido mais restrito do que “veneno” e pode-se dizer que todos os animais peçonhentos são venenosos, mas nem todos os venenosos são peçonhentos (RUSSEL, 1987).

Em geral, as peçonhas produzidas por uma determinada espécie são compostas por diversas toxinas com diferentes ações deletérias que são utilizadas na captura da presa e na defesa desses indivíduos. A natureza química de cada toxina é característica da espécie que a produz e é variável quanto à sua composição, sítio e modo de ação.

As secreções peçonhentas também participaram de um amplo processo evolutivo, culminando no desenvolvimento de glândulas, ductos e dentes especializados utilizados para transferir a peçonha. BARRAVIERA (1994) cita a presença de 11 tipos de glândulas presentes na cabeça de serpentes e as associou à lubrificação de alimentos que envolve abundante salivação. Inicialmente, as glândulas orais produziram substâncias que tranquilizavam a presa facilitando sua captura. Esse seria o mecanismo evolutivo de captura de presas por serpentes, que teria se originado a partir da constrição. A constrição parece estar inteiramente associada à estrutura locomotora e ao comportamento das serpentes. Para haver uma locomoção sem patas é necessário modificações estruturais no corpo incluindo o alongamento

dos elementos musculares provocando um aumento na locomoção por ondulação lateral e permitindo a constrição da presa.

Os boídeos (jibóia e sucuri) possuem vértebras curtas e robustas, ligadas por cadeia de musculatura axial, permitindo a flexão da coluna vertebral o que lhes dão grande poder de constrição. Já os colubrídeos possuem vértebras mais frágeis, há um maior espaço que permite a superposição dos feixes musculares, permitindo rápida locomoção.

A mudança climática ao longo dos anos na Terra, de um clima quente, úmido e ambientes fechados para um clima mais frio com clareiras, permitiu a radiação de um grande número de roedores, que serviriam de presa para os colubrídeos, os quais se adequaram mais ao novo clima que os primitivos boídeos.

Porém, os boídeos ainda podiam contar com o mecanismo de constrição na captura de suas presas enquanto os colubrídeos apesar da grande agilidade locomotora não tinham o mecanismo de constrição, restando-lhes a alternativa da liberação de secreções veneníferas através de glândulas capazes de imobilizar a presa.

Os dentes talvez não tenham evoluído em função da injeção da peçonha, mas sim devido ao uso na deglutição. A peçonha inicialmente também não teria a função de matar a presa, mas sim de lubrificar e higienizar os dentes, ajudar na digestão e na deglutição. O alongamento dos dentes aumentou a capacidade de deglutição e simultaneamente a inoculação do veneno (BARRAVIERA, 1994).

A sequência evolutiva das secreções peçonhentas, conforme Gans (1978) é a seguinte:

1-A secreção iniciou-se 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.

As serpentes podem ser classificadas quanto a dentição em quatro grupos:

- Áglifas: dentes maciços, sem sulco ou canal central. Não inoculam veneno. Ex.: Família Boidae;
- Opistóglifas: Um par de dentes maiores presentes na extremidade posterior do maxilar superior, contém sulcos relacionados com o canal excretor das glândulas supralabiais. Ex.: Família Colubridae;
- Proteróglifas: Presença de um par de dentes mais longos e fortes que os restantes, com profundo sulco na porção anterior, implantado na frente do maxilar superior. O canal externo das glândulas supralabiais conecta-se com o sulco dos dentes. Ex.: Famílias Elapidae e Hydrophiidae;
- Solenóglifas: Possuem um par de dentes anteriores muito desenvolvidos, providos de canal central que se comunica com o canal excretor da glândula de veneno. Esses dentes são móveis e em repouso ficam deitados e voltados para trás dentro de larga prega mucosa. Os outros dentes são menores e maciços. Ex.: Famílias Viperidae e Crotalidae.

Segundo BARRAVIERA (1990), as serpentes consideradas venenosas são classificadas de acordo com suas características morfológicas em cinco famílias: Crotalidae, Viperidae, Elapidae, Hydrophiidae e Colubridae.

A peçonha da família dos crotalídeos (gêneros: *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*) contém um grande número de proteínas farmacologicamente e bioquimicamente ativas.

As espécies da família Viperidae são encontradas na Ásia, Europa e África. As propriedades bioquímicas do veneno desta família são similares às da família Crotalidae.

A família Elapidae tem representantes na África, Ásia e Américas. No Brasil são representadas pelos gêneros: *Micrurus* e *Leptomicrurus*. Esses venenos contêm potentes neurotoxinas, que provocam um elevado índice de letalidade.

Os hidrofiídeos são serpentes marinhas cujo veneno também apresenta neurotoxinas muito potentes. Esses animais são pouco caracterizados, devido à dificuldade em serem encontrados e à pouca quantidade de veneno que pode ser obtida.

A família Colubridae possui um maior número de representantes, porém nem todos são venenosos e muito pouco se conhece sobre o veneno desses animais.

Os componentes dos venenos são carboidratos, lipídeos, metais, peptídeos, diversos íons e mais de 90% de seu peso seco é constituído por proteínas compreendendo grande variedade de enzimas, toxinas não enzimáticas e proteínas não tóxicas. A especificidade e a interação desses componentes em casos de envenenamento humano ainda não estão totalmente esclarecidos (SCHVARTSMAN, 1992).

Assim para se compreender a extrema complexidade dos venenos é importante extrair deles seus diversos constituintes e examinar suas propriedades individuais. Os métodos mais comumente utilizados nestes estudos, são a cromatografia e a eletroforese.

A cromatografia é um método de purificação muito comum devido à sua facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação das espécies químicas. Se baseia em um processo físico-químico para separação dos componentes de uma mistura. Há vários tipos de cromatografia, a escolha de um ou de outro ocorre de acordo com o objetivo do trabalho em questão. Algumas são baseadas no tamanho da molécula a ser purificada, outras utilizam o princípio da força iônica onde os componentes proteicos são separados por tampões de diferentes concentrações (COLLINS, 1990). Muitas proteínas podem ser purificadas tendo como base a afinidade de seus grupamentos químicos. Para isso se utiliza uma coluna com grupamentos que tenham afinidade ao substrato que se quer purificar, desse modo ao passar a proteína, esta se ligará à coluna sendo eluída com um tampão de maior concentração (LENINGHER, 1989).

A eletroforese pode ser utilizada para purificação de pequenas quantidades de proteínas, diferentemente da cromatografia, onde se pode separar quantidades maiores. A eletroforese fornece a comparação e o estado de pureza dos componentes da mistura. Geralmente é utilizada em conjunto com a cromatografia. A separação é feita através da migração protéica sob um campo elétrico, utilizando como parâmetro a carga de cada proteína ou ainda o tamanho destas (LENINGHER, 1989).

Dos setenta e cinco gêneros de serpentes existentes no Brasil, somente quatro são considerados como peçonhentas sendo eles: *Bothrops*, *Crotalus*, *Micrurus* e *Lachesis*.

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

Os acidentes com humanos ocorrem nos períodos de aumento das atividades agrícolas. Os indivíduos do sexo masculino são os mais acometidos (compreendem

aproximadamente 70% dos casos registrados). A picada na maioria das vezes ocorre nos pés e nas pernas abaixo dos joelhos, há registros também de picadas nas mãos e antebraços, o que indica que se os acidentados utilizassem equipamentos de proteção individual a frequência de casos seria reduzida (BARRAVIERA, 1990).

Apesar do maior número de acidentes ser causado por indivíduos do gênero *Bothrops*, os casos mais graves são os provocados pelo gênero *Crotalus*.

No Triângulo Mineiro, segundo NISHIOKA and SILVEIRA (1992), a maioria dos casos confirmados foram com *Bothrops moojeni* e *Bothrops neuwiedi*.

Os venenos destas serpentes causam intensa dor, hemorragia e necrose no local da inoculação podendo ser necessária a amputação (JIMÉNEZ-PORRAS, 1973). Os efeitos sistêmicos consistem em coagulação sangüínea (KLOBUSITZKKI, 1961), hemorragia (OHSAKA, 1979) e às vezes choque cardiovascular, o que freqüentemente leva à morte. (VITAL BRAZIL, 1982).

O número de óbitos está intimamente relacionado com o tempo decorrido entre o acidente e o atendimento médico. A maioria dos doentes que evoluem para letalidade são atendidos seis horas após o acidente ter ocorrido. Quanto mais rápida for a aplicação do soro antiofídico mais chances o indivíduo terá de sobreviver (BARRAVIERA, 1994).

A serpentes do gênero *Bothrops* habitam preferencialmente ambientes úmidos como matas, áreas cultivadas e locais de proliferação de roedores. Possuem hábitos noturnos e são muito agressivas, quando se sentem ameaçadas atacam em silêncio.

O veneno de *Bothrops jararacussu* têm sido largamente estudado, VIDAL and STOPPANI (1971) registraram o isolamento de duas fosfolipase A₂ neste veneno. Já RODRIGUES-SIMIONI et al (1983) investigaram os efeitos de uma fração deste veneno na junção neuro-muscular da rã. QUEIROZ et al (1984) estudaram a necrose e

a regeneração muscular causada pelo envenenamento e AMARAL et al (1985) detectaram necrose renal em indivíduos picados por *Bothrops jararacussu*.

Os principais efeitos das peçonhas bothrópicas são: coagulação, citotoxicidade podendo levar a necrose e a hemorragia.

A ação coagulante é a propriedade que o veneno das serpentes dos gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis* tem de transformar o fibrinogênio em fibrina. A maioria dos venenos botrópicos têm capacidade de ativar o fator X e a protombina da cascata de coagulação. Possui ação semelhante à tromboplastina e à trombina (TU,1977). Quando ocorre a ativação do fator X, há também consumo dos fatores V e VII e de plaquetas, levando a um quadro de coagulação intravascular disseminada, com a formação e deposição de coágulos na rede capilar o que pode desencadear a insuficiência renal aguda. (Barraviera, 1994)

A citotoxicidade pode ocorrer diretamente nos tecidos, podendo haver a necrose de células (liponecrose e mionecrose) e a lise das paredes vasculares.

O gênero *Bothrops* pode ainda causar hemorragia local ou sistêmica a nível de pulmões, cérebro e rins. A ação sistêmica é provocada por hemorraginas que agem sobre os capilares, destruindo inicialmente a membrana basal e causando sua posterior ruptura, que algumas vezes é fatal. O edema que ocorre minutos após a picada, é decorrente da lesão do endotélio.

Dentre outros sintomas podem ser citados a hipovolemia por perda de sangue ou plasma do membro edemaciado, a ativação de substâncias hipotensoras, edema pulmonar e coagulação intravascular disseminada. Podem ser citados ainda sintomas inespecíficos como vômitos, diarreia, cefaléia e até mesmo colapso circulatório devido a ação de cininas.

A dor é imediata e de intensidade variável. O edema pode ser acompanhado de calor e rubor e se instala nas primeiras seis horas. As hemorragias podem ser

locais ou em pontos distantes da picada. A incidência de hemorragia sistêmica é relativamente pequena.

O veneno de cada espécie pode ser parcialmente ou totalmente neutralizado por antisoros heterogêneos (HOUSSAY and NEGRETE, 1921; MINTON, 1977; TU and SALAFRANCA, 1974; BOLANOS et al, 1975 citados por MOURA DA SILVA, et al, 1990). Tais antisoros contêm proteínas especializadas, as imunoglobulinas ou anticorpos, sintetizadas pelos plasmócitos e capazes de reconhecer, precipitar ou neutralizar bactérias e vírus invasores ou proteínas estranhas de outras espécies e até mesmo contra qualquer outra macromolécula, mesmo que não seja de ocorrência natural (LEHNINGER, 1990).

Antisoros produzidos por animais são utilizados em muitos casos, incluindo o tratamento de infecções microbianas, por exemplo o soro antitetânico, e para a neutralização de toxinas no homem (AMENO et al, 1990), como é o caso dos soros peçonhentos que são medicamentos contendo imunoglobulinas purificadas (SOERENSEN, 1990) usadas no tratamento de picadas de serpentes e outros animais peçonhentos.

A produção de antivenenos depende da imunogenicidade de cada veneno que é variável de acordo com o gênero, sendo que no Brasil o veneno mais imunogênico corresponde ao gênero *Bothrops*, seguido por *Lachesis*, *Crotalus* e *Micrurus*. (SOERENSEN, 1990).

SOERENSEN (1990) cita ainda alguns fatores que influenciam na imunogenicidade:

- a quantidade de veneno inoculada no animal;
- o adjuvante utilizado na imunização;
- o estado nutricional do animal a ser imunizado.

Os adjuvantes são representados por uma série de substâncias minerais ou orgânicas, imunologicamente inativas, mas que associadas às vacinas aplicadas por via parenteral, potencializam a resposta imune. (GUIDOLIN, 1988). Segundo GUIDOLIN (1988) as principais funções dos adjuvantes são:

- Induzir o aumento da imunogenicidade do antígeno, potencializando a resposta;
- Elevar o número e o tempo de duração de anticorpos produzidos por um dado antígeno;
- Induzir ou aumentar a hipersensibilidade retardada.

VITAL BRAZIL em seus estudos no início do século concluiu que há elevada especificidade entre os soros para o veneno de cada gênero de animal peçonhento. (SOERENSEN, 1990)

Testes de imunodifusão revelam que os venenos de várias espécies possuem alguns componentes em comum permitindo que ocorram reações cruzadas entre várias espécies. (MOURA DA SILVA, et al 1990). LOMONTE, et al (1990) ao estudar a presença de proteínas antigenicamente relacionadas à miotoxina de *Bothrops asper* em venenos de serpentes de diferentes gêneros e espécies, e em venenos de serpentes de mesma espécie, mas de regiões diferentes, mostra a importância de se verificar essas reações cruzadas, pois a partir destas se obtêm informações sobre o parentesco evolutivo entre os grupos estudados e permite a aplicação deste conhecimento que é essencial para designar misturas imunogênicas para a produção do antiveneno a nível industrial. Também permite prever a capacidade neutralizante do antiveneno diante de venenos heterólogos.

Da serpente *Bothrops jararacussu* também foram isoladas duas miotoxinas denominadas Bothropstoxina: BthTX-I e BthTX-II.(HOMSI-BRANDEBURGO, 1987) A BthTX-I é uma proteína monomérica cuja estrutura primária revela alto grau de homologia com fosfolipases e outras miotoxinas, apesar desta toxina não apresentar

atividade fosfolipásica. A BthTX-II apresenta atividade fosfolipásica residual e possui peso molecular próximo de 15.700 D. (HOMSI-BRANDEBURGO, 1987)

GUTIERREZ et al (1991) estudaram os efeitos miotóxicos de BthTX-II e verificaram que a toxina provoca um aumento do nível de creatina quinase no plasma de ratos.

HELUANY, et al (1992) estudando os efeitos farmacológicos da BthTx-I em preparações do nervo frênico-diafragma de camundongo verificaram que ela induz despolarização e contratura (dose-dependente) do músculo esquelético, culminando com o bloqueio da transmissão neuro-muscular.

Posteriormente, MELO et al (1993) estudaram a neutralização dos efeitos miotóxicos do veneno de *B. jararacussu* e da BthTx-I por poliânions.

O estudo do efeito miotóxico local induzido por venenos botrópicos têm despertado o interesse de diversos pesquisadores, pois este efeito não é revertido pela aplicação de antisoros nos acidentes ofídicos, sendo o principal agente responsável pelas seqüelas permanentes dos acidentados.

2-OBJETIVOS:

Este trabalho teve como finalidade:

1 - Fracionar a peçonha de *B. jararacussu* e isolar as duas miotoxinas: BthTX-I e BthTX-II.

2 - Produzir anticorpos policlonais a partir de BthTX-I e BthTX-II.

3 -MATERIAIS E MÉTODOS:

3.1- Obtenção do Veneno:

Gentilmente doado pelo prof. Dr. Augusto S. Abe, Departamento de Biologia da UNESP de Rio Claro e pelo Dr. José Roberto Giglio, Departamento de Bioquímica USP-Ribeirão Preto.

3.2- Materiais utilizados no fracionamento:

Resinas para Cromatografias:

Sephadex G-75 e SP-Sephadex C-25.(Pharmacia)

Tampões utilizados:

Tampão Formato de Amônio (FoNH_4) 0,05M pH 3,5

Este tampão foi preparado utilizando 4,0ml de ácido fórmico para cada 2.000ml de água. O pH foi então acertado até chegar em 3,5 com hidróxido de Amônio concentrado (NH_4OH).

Tampão Acetato de Amônio (AcNH_4) 2M pH 5,0

Foi preparado o tampão AcNH_4 2M utilizando 115ml de ácido acético glacial para cada 1.000ml de água. Acertou-se o pH com hidróxido de amônio concentrado (NH_4OH).

Materiais para Eletroforese:

Acrilamida - Sigma

Temed (N,N,N',N'- tetrametiletileno diamina)- Sigma

Bis-Acrilamida (N,N''- metilenobisacrilamida) - Sigma

Coomassie Brilliant Blue G-250 - Sigma

PSA.- Ammonium Persulfate - Sigma

Os demais reagentes, solventes e drogas utilizados foram de grau analítico

3.3- Fracionamento do Veneno Bruto de *B. jararacussu*:

3.3.1 - Gel Filtração em Sephadex G-75:

3.3.1.1- Preparo da resina:

A resina foi colocada em água e armazenada em geladeira por 24 horas até que estivesse totalmente hidratada, sendo posteriormente empacotada em uma coluna de vidro (90,0 x 1,3 cm) e equilibrada em tampão formato de Amônio ($\text{Fo}(\text{NH}_4)$ 0,05M pH 3,5.

3.3.1.2- Preparo da amostra a ser purificada:

Foram pesados 250 mg do veneno bruto de *B. jararacussu* e adicionados 1,0ml de tampão $\text{Fo}(\text{NH}_4)$ 0,05M pH 3,5, após homogeneização, o material foi centrifugado por 10 minutos em baixa velocidade. O sobrenadante foi retirado e reservado, foram adicionados mais 1,0 ml do mesmo tampão ao precipitado e foi levado à centrifugação nas mesmas condições por mais 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e misturado ao anterior. A amostra foi então submetida à uma leitura a 280nm de absorbância, retirou-se uma alíquota para testes enzimáticos e o restante foi aplicado à coluna de Sephadex G-75. Foram coletadas frações de 8ml/tubo num fluxo de 24 ml/hora em um coletor FRACSIL 100 à temperatura ambiente. As frações tiveram sua absorbância medida em um espectrofotômetro UV-VIS SPEKOL. Traçou-se um gráfico das respectivas frações e sua leitura de absorbância a 280nm, os picos foram reunidos, liofilizados e armazenados à -20°C.

3.3.2- Subfracionamento da fração J3 de *B. jararacussu* em resina de troca iônica:

3.3.2.1- Preparo da resina SP-Sephadex C-25

Inicialmente a resina foi suspensa em uma solução de NaOH 0,5N por 5 minutos. Posteriormente, a resina foi colocada em um funil de placa sinterizada e foi lavada exaustivamente com água até que atingisse pH 7,0. Repetiu-se a operação utilizando solução de HCl 0,5N. Finalmente, a resina foi suspensa em tampão acetato de amônio $\text{Ac}(\text{NH}_4)$ 0,1M pH 5,0.

3.3.2.2- Preparo da amostra a ser purificada:

Foram dosados 33,92mg da fração J3 liofilizada e dissolvida em 0,5ml de tampão $\text{Ac}(\text{NH}_4)$ 0,1M pH=5,0, levando à centrifugação por 5 min. em baixa velocidade. Separou-se o sobrenadante e adicionou-se mais 0,5ml do tampão ao precipitado, centrifugando novamente nas mesmas condições. Os sobrenadantes foram reunidos e aplicados na coluna.

3.3.2.3- Purificação das miotoxinas BthTX-I e BthTX-II

A amostra foi eluída com tampão $\text{Ac}(\text{NH}_4)$, inicialmente em menor concentração (0,1M). A seguir iniciou-se um gradiente convexo e contínuo de concentração, onde um funil situado em um nível superior contendo o tampão a ser substituído pelo de maior concentração (1,0M e 2,0M), foi conectado a um erlenmeyer, contendo 125,0 ml do tampão inicial sob volume e agitação constantes e diretamente ligado à coluna. Frações de 3,0ml foram coletadas num fluxo de 20,0 ml/hora em um coletor FRACFIL 100 à temperatura ambiente. De cada fração foi lida a absorbância em 280,0 nm em espectrofotômetro Spekol. O gráfico foi traçado e os picos foram reunidos e liofilizados.

3.3.2.4- Diálise das frações:

As frações foram dializadas contra Ácido Acético 0,01M a 4°C sob agitação constante. Foram feitas três trocas por 24 horas. Utilizou-se o reagente de Nessler para verificar a presença do íon Amônio, a cor amarelo forte indicava a necessidade de continuar a diálise.

3.4 - Determinação quantitativa de Proteínas:

As dosagens protéicas em soluções contendo de 0,1 a 2,0 mg de proteína foram realizadas pelo método do Microbiureto (Itzhaki e Gill, 1964). A soroalbumina bovina foi utilizada para estimar a reta padrão.

3.5 - Determinação da Atividade Fosfolipásica: (De Haas et al, 1968)

A atividade fosfolipásica (PLA_2) foi utilizada para o acompanhamento da purificação das miotoxinas. Usou-se como substrato a gema de ovo em presença de desoxicolato de sódio 0,03M e CaCl_2 0,6M na proporção de 1,5:1,0:0,1 ml respectivamente para cada 10,0ml de solução.

Foram utilizadas sempre 10µg de amostra para cada ensaio enzimático. A determinação da atividade PLA2 se baseia na liberação de ácidos graxos presentes na gema do ovo e que são titulados com NaOH 0,0935N em pH 8,0. A atividade específica é expressa em microequivalentes de base consumida por minuto, por mg de proteína.

3.6 - Critérios de pureza:

O processo de purificação da toxina foi acompanhado por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições nativas.

3.6.1- PAGE Não desnaturante:

Permite a análise das proteínas quanto ao seu grau de pureza sob condições nativas. Foi realizada como descrito por Reisfeld (1962) com pequenas modificações.

<i>SOLUÇÕES ESTOQUE</i>	<i>VOLUME (µl)</i>
<i>Solução C</i>	3.300
<i>Solução A</i>	1.500
<i>PSA (24mg/2,25ml água)</i>	2.250
<i>TEMED</i>	70
<i>H₂O q.sp</i>	7.950

Após preparada a solução do gel, esta foi colocada entre duas placas de vidro previamente preparadas para que polimerizasse.

Foi utilizado somente o gel de resolução preparado como descrito acima. Antes da aplicação da amostra foi feita uma pré-corrída, usando-se uma corrente de 12mA por 30 minutos.

SOLUÇÕES		QUANTIDADES
A	KOH 1N	48,0 ml
	Hác. glacial	17,2 ml
	H ₂ O q.s.p	100,0 ml
C	Acrilamida	48,0 g
	Bis acrilamida	1,6 g
	H ₂ O q.s.p	100,0 ml

A solução do eletrodo foi formada por tampão β -alanina e ácido acético 0,35M pH 4,3, dez vezes diluído no momento do uso. As amostras foram preparadas usando 10 μ l de glicerol para cada 100 μ l de amostra. A corrida foi feita à uma corrente constante de 12mA, o indicador usado foi a fucsina básica e o tempo de corrida foi de aproximadamente 60 minutos ou quando a fucsina atingiu a altura mediana da placa.

3.6.2.- PAGE Desnaturante (SDS) (LAEMMLI and LAVRE,1973):

Permite a separação das proteínas de acordo com seu peso molecular. O padrão utilizado foi o Dalton Mark (Sigma). O gel foi preparado a 15% conforme descrição à baixo.

SOLUÇÕES	GEL DE SEPARAÇÃO (μ l)	GEL DE EMPILHAMENTO (μ l)
Tris-HCl 2M pH 6,8	-	250
Tris-HCl 2M pH 8,8	2.350	-
H ₂ O desionizada	125	40
EDTA 200mM	125	40
Acril-Bis (30:08)	6.250	650
H ₂ O desionizada	3.500	2.960
Temed	15	5
PSA (10%)	75	35

As amostras foram preparadas, utilizando 50 µl de STOP (solução de Tris-HCl 0,1M pH 8,8, contendo glicerol a 10% e azul de Bromofenol a 0,1%) e 10 µl de βmercaptoetanol para cada 100 µl de amostra, que foram então aquecidas em banho-maria por 2 minutos.

O tampão do eletrodo superior foi composto por Tris-glicina pH 8,3, conforme receita abaixo:

Tris 0,1M (30g)
EDTA 78 mM (7,25g)
Completar para 2,0 l
Glicina 0,77 (144g)
SDS 0,3% (7,5g)
Completar para 2,5l

* O tampão do eletrodo inferior é idêntico ao superior, com exceção de que não se coloca glicina.

A corrida foi feita à uma corrente constante de 20mA por 1:30h, o indicador utilizado foi o Azul de Bromofenol presente na solução STOP.

3.6.3.- Revelação e Secagem dos géis:

Após a corrida, os géis foram corados por 10 minutos em Coomassie Brilliant Blue G-250 0,1 % (p/v) dissolvido em água, metanol e ácido acético (40:50:10v/v) e descorados em solução constituída de água, etanol e ácido acético (60:30:10 v/v). Em seguida foram colocados em uma solução de secagem formada por ácido acético a 7%. Então, colocou-se o gel em meio de duas folhas de celofane umedecidas em água, prendendo com bastidores. Para evitar possíveis rachaduras, passou-se glicerol nos géis que finalmente foram deixados para secar em temperatura ambiente ou em estufa a baixa temperatura.

3.7- Produção de Anticorpos policlonais:

3.7.1- Animais utilizados:

Foram utilizados para imunização 4,0 coelhos machos, previamente comprados em casas de animais nesta cidade.

3.7.2- Preparo das amostras para imunização:

O antígeno foi preparado no momento da imunização utilizando-se 200µg da toxina, inicialmente homogeneizada com 1,0ml de tampão PBS pH 7,2 e com 1,0ml de Adjuvante de Freund até a formação de uma emulsão densa.

Na primeira dose da imunização utilizou-se adjuvante completo e nas demais adjuvante incompleto.

3.7.3 - Cronograma de Imunização:

As injeções com o antígeno foram aplicadas em quatro coelhos, dois foram imunizados com BthTX-I e dois com BthTX-II, em doses com intervalo de 12 dias, conforme esquema abaixo:

Dose	Qtde.(µg)	Adjuvante	Vol. final(ml)	Via	Local	Interv (dias)
1 ^a	200	ACF	1,0	IM	Pata diant.	12
2 ^a	200	AIF	1,0	IM	Pata traz.	12
3 ^a	100	AIF	1,0	IM	Pata diant.	12
4 ^a	100	Sem adj.	1.0	EV	Orelha	3-6

O soro foi testado por imunodifusão e/ou ELISA para se verificar a produção de anticorpos. Se necessário retornava-se à 3^a dose.

Legenda do esquema de imunização:

ACF: Adjuvante completo de Freund

AIF: Adjuvante incompleto de Freund

IM: via intra muscular

ED: via endovenosa

Preparo do tampão PBS 0,15M pH 7,2

NaCl	1,60g
KCl	0,04g
KH ₂ PO ₄	0,04g
Na ₂ HPO ₄	0,23g
H ₂ O q.s.p	200 ml

3.7.4 - Verificação da presença de anticorpos:

Inicialmente foram feitas sangrias parciais onde se coletou aproximadamente 3,0 ml de sangue para realização dos testes. O sangue coletado foi incubado a 37°C por 1,0 hora, sendo posteriormente armazenado a 4°C por 24 horas. Logo após o soro foi separado. Aliquotado e armazenado a -20°C.

3.7.4.1- ELISA (MINEO,1982):

O teste foi realizado em uma placa de PVC contendo pocinhos aos quais se adicionou inicialmente o antígeno e tampão carbonato- bicarbonato pH 9,5. A placa foi mantida a 4°C overnight, sendo então lavada por 3,0 vezes, 5 minutos com tampão PBS. Os soros diluídos (de 1/10 a 1/5120) foram incubados por 45' a 37°. A placa foi novamente lavada com PBS 0,15M e foi adicionado o conjugado anti-IgG de coelho marcado com peroxidase. Em seguida colocou-se solução reveladora (água oxigenada + OPD) em tampão citrato. A positividade da reação foi então aferida por leitor de Elisa (TITERTEK MULTISKAN PLUS MK-11) a 492nm.

3.7.4.2- Imunodifusão (OUCHTERLONY, 1986):

Em uma lâmina de vidro foi colocado ágar a 10%, onde foram feitos furos, sendo um central e outros seis em volta deste. Nestes poços laterais foi colocado o soro com prováveis anticorpos, cada poço apresenta uma diluição diferente iniciando de 1/2 até 1/32 sentido horário, no poço central colocou-se o antígeno numa concentração de 1mg/ml. Utilizou-se 20µl de cada diluição bem como do antígeno. Uma linha de precipitação pode ser notada após 24 horas do início do experimento, indicando reação positiva.

Os géis de imunodifusão foram retirados das lâminas e colocados em placas de Petri contendo PBS e deixados sob agitação constante por 24 horas, durante as quais foram realizadas três trocas do tampão PBS. Desse modo, as proteínas que não fazem parte da reação antígeno-anticorpo são eluídas do gel. Antes de serem corados, os géis foram colocados em H₂O desionizada ainda sob agitação por duas horas, a fim de que o excesso de sal seja retirado. Finalmente, os géis foram corados em solução de Coomassie Blue G-250 0,1% preparado conforme item 3.6.2. e descorados em solução de água, etanol e ácido acético. Passaram para a solução fixadora contendo ácido acético (7%), água e glicerol. Então os géis foram colocados entre duas folhas de celofane, umedecidas em água e firmemente presas em placas de vidro por fita crepe. Os géis foram então deixados à temperatura ambiente para secarem.

4 - Resultados:

4.1- Gel filtração em Sephadex G-75

Para purificar as miotoxinas inicialmente foi realizada uma filtração em gel de Sephadex G-75 como descrito no item 2.3.1. A figura 01 mostra o perfil cromatográfico obtido e a atividade fosfolipásica. Foram obtidos 4 picos denominados J1, J2, J3 e J4, e a atividade fosfolipásica ficou restrita ao pico 03. Após a eluição, os picos foram liofilizados e armazenados à -20°C. A dosagem de proteínas (Tab.01) demonstrou que a fração J3, que contém as fosfolipases e miotoxinas da peçonha representa aproximadamente 40% de seu peso seco.

Tab. 01- Dosagem proteica pelo microbiureto da filtração do veneno bruto de *B. jararacussu*.

AMOSTRA	mg de proteínas totais	% de Veneno bruto
VB	161,04	100,0
J1	18,4	11,4
J2	29,0	18,0
J3	67,8	42,1
J4	12,7	7,8
RECUPERAÇÃO	127,9	79,3

4.2- Cromatografia de troca iônica em SP-Sephadex C-25

O segundo passo na purificação das miotoxinas foi o subfracionamento da fração J3. Este ocorreu conforme item 2.3.2. As subfrações foram denominadas de SpI a SpV e estão demonstradas na fig. 02. As subfrações foram dializadas para retirada do excesso de sal, liofilizadas e armazenadas a -20°C. A dosagem das subfrações está indicada na tabela II e mostra uma recuperação de 58%, o que está

dentro dos padrões considerados já que SpII foi perdida durante o fracionamento. A atividade fosfolipásica resultante do subfracionamento é apresentada na fig. 03 e indica que SpI, SpIII e SpIV retêm a atividade PLA₂. SpI demonstrou uma atividade PLA₂ duas vezes maior que o veneno bruto enquanto SpIII apresentou aproximadamente a metade da atividade em relação ao veneno bruto e SpIV apresentou uma atividade próxima ao veneno bruto. SpV não apresentou atividade PLA₂, mesmo quando se utilizou 20µg da fração, ou seja 2 vezes o que se utilizou com outras frações.

Tab. 02- Dosagem proteica pelo microbiureto das subfrações do veneno bruto de *B. jararacussu* referente ao fracionamento de J3.

AMOSTRA	mg de proteínas totais	% de Veneno bruto
J3	33,92	100
SpI	0,24	0,70
SpII	-	-
SpIII	0,40	1,18
SpIV	2,95	8,70
SpV	14,5	42,70
RECUPERAÇÃO	18,09	53,68

* SpII não foi quantificada, pois foi perdida durante o fracionamento.

4.3- Eletroforeses:

A purificação das proteínas foi acompanhada por eletroforeses, descritas no item 3.6. em condições nativas e desnaturantes (SDS) indicada na fig. 04.

A PAGE em condições nativas indicou a presença de banda única para as subfrações SpIV (BthTX-II) e SpV (BthTX-I) (fig. 04a) e permitiu a comparação das frações purificadas por HOMSI-BRANDEBURGO(1987) e BORGES (neste trabalho) (fig. 04c). Enquanto a SDS (fig. 04b) indicou a similaridade de BthTX-I e BthTX-II quanto ao peso molecular.

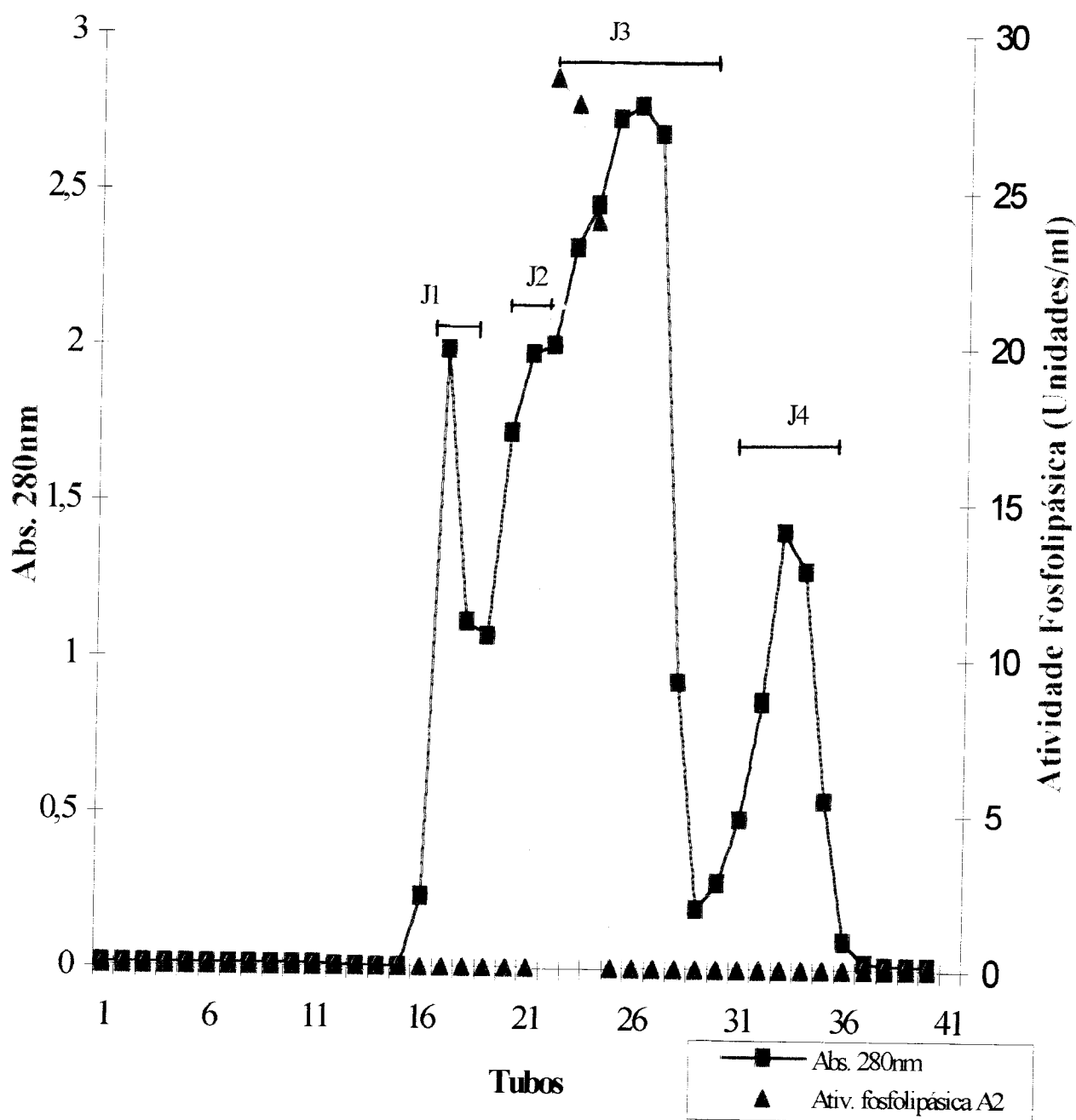


Fig.:01 - Filtração de 250mg de VB de *Botrhops jararacussu* em Sephadex G-75.
 Fluxo: 24,0 ml/hora-8ml/tubo Coluna: 90 x 1,3cm
 Tampão Fo(NH4) 0,05M pH 3,5
 Temperatura ambiente.

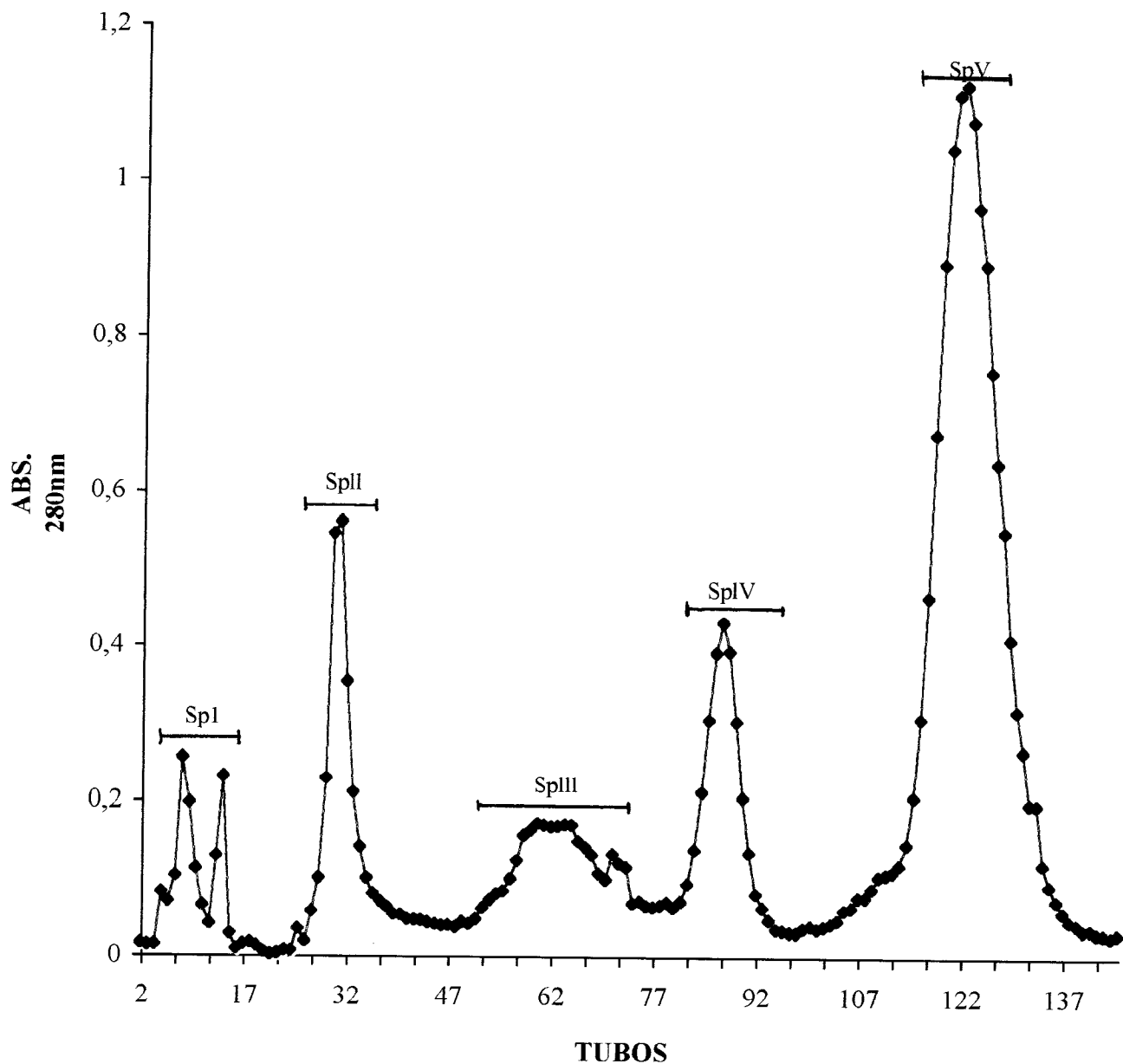


Fig. 02: Cromatografia em troca iônica de 33,92mg da fração J3 de *B. jararacussu* em SP- Sephadex C-25
 Fluxo: 20ml/hora - 3ml/tubo Coluna: 37 x 1,3 cm
 Tampão: $\text{Ac}(\text{NH}_4)$ 0,1M pH 5,0 Temperatura ambiente.

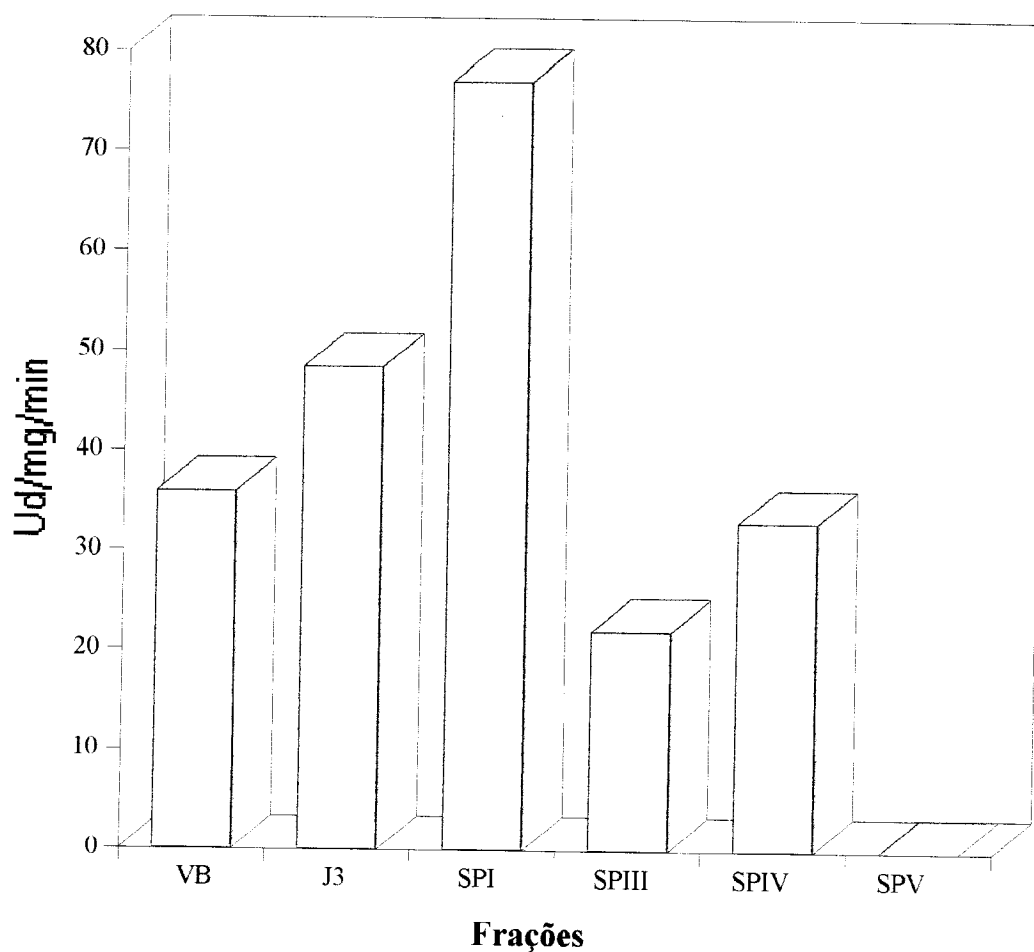


Fig.:03- Atividade fosfolipásica específica referente ao subfracionamento de J3 em SP-Sephadex C-25, realizada sobre a gema de ovo com 10 μ g do veneno bruto e suas frações. As amostras foram aplicadas no substrato de reação pH 8,0 e tituladas com NaOH 0,0935N por 3,0 minutos à temperatura ambiente.

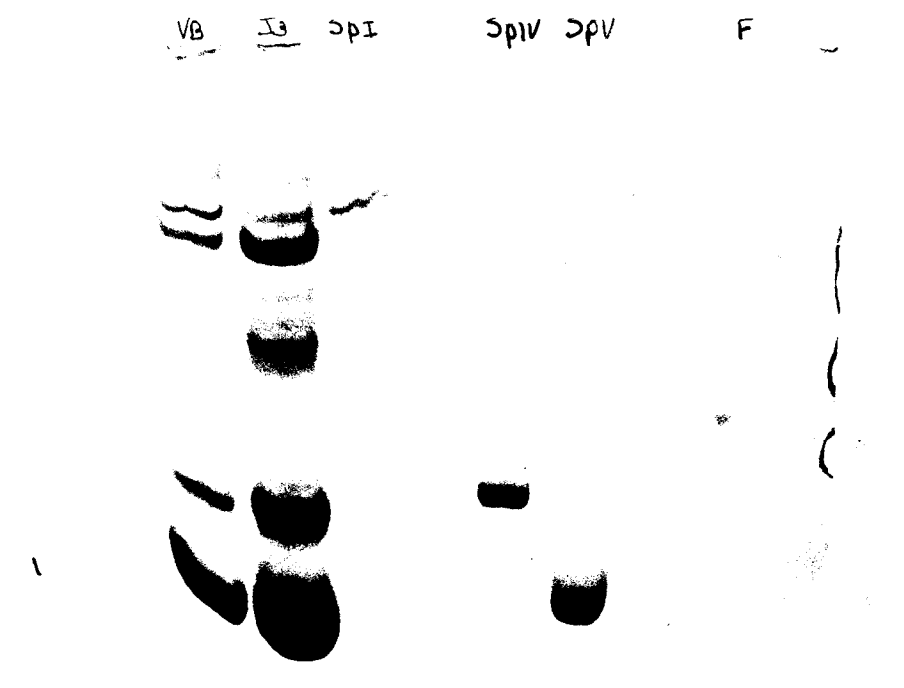


Fig.:04a - Eletroforese em gel de Poliacrilamida em condições nativas.
 Pré-corrída: 12mA, corrente constante por 30'.
 Corrida: 12mA, corrente constante por 50'.
 Tampão: β -alanina pH 4,3
 Indicador: Fucsina Básica.
 Temperatura ambiente.

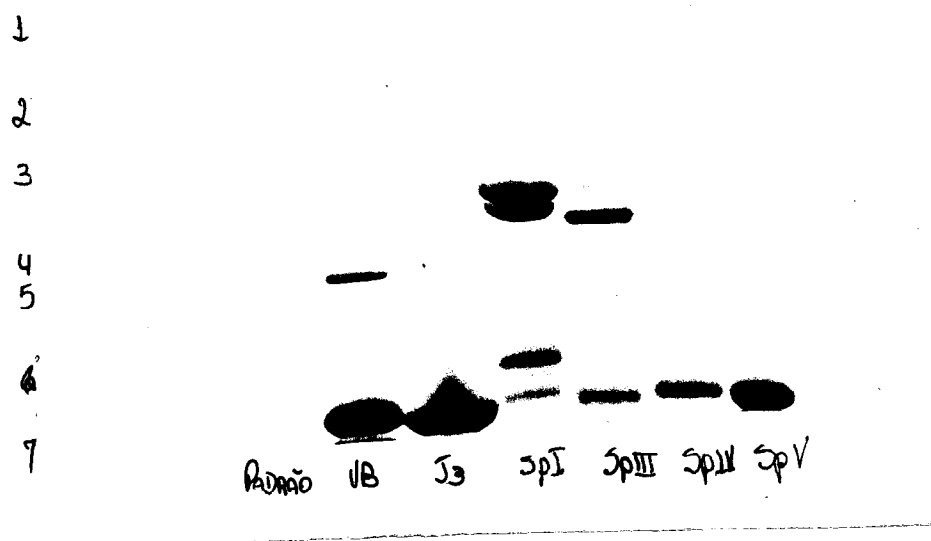


Fig.:04b - Eletroforese em gel de Poliacrilamida a 15% com SDS.
Corrida: 20mA, corrente constante por uma hora e meia.
Temperatura ambiente.

Padrão: Dalton Marck VII-L (PM 14000-7000) Sigma.

- 1- Albumina Bovina: 66.000
- 2- Albumina Ovo: 45.000
- 3- Gliceraldeído 3P desidrogenase: 36.000
- 4- Anidrase Carbônica: 29.000
- 5- Tripsinogênio (PMSF): 24.000
- 6- Tripsina inibidor: 20.100
- 7- α - Lactoalbumina: 14.200

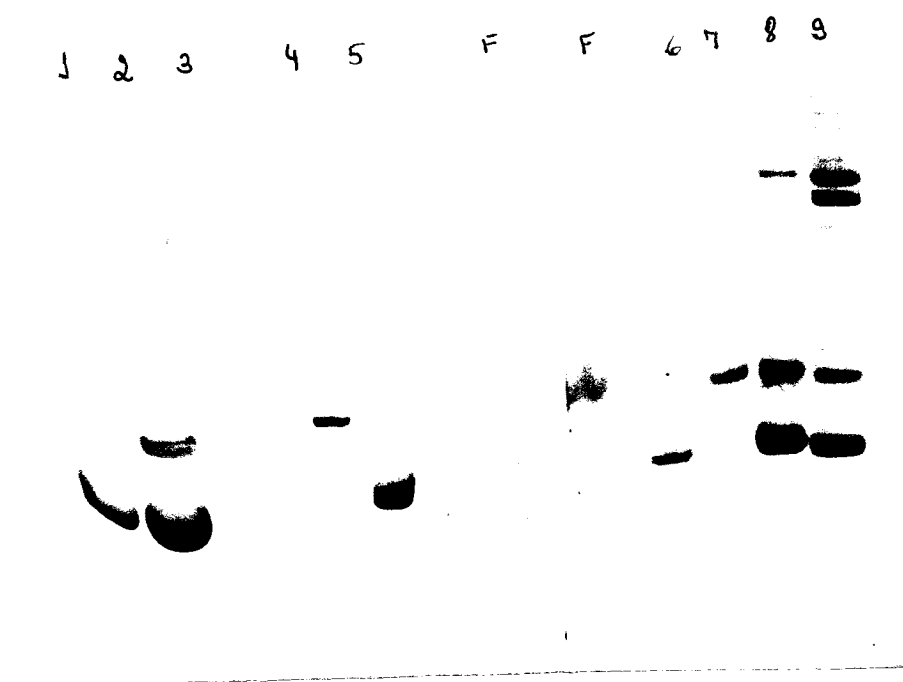


Fig.:04c- Eletroforese em gel de Poliacrilamida em condições nativas para comparação das amostras purificadas por HOMSI-BRANDEBURGO (1987) e BORGES (neste trabalho).

Pré-corrida: 12mA, corrente constante por 30'.

Corrida: 12mA, corrente constante por 50'.

Tampão: β -alanina pH 4,3

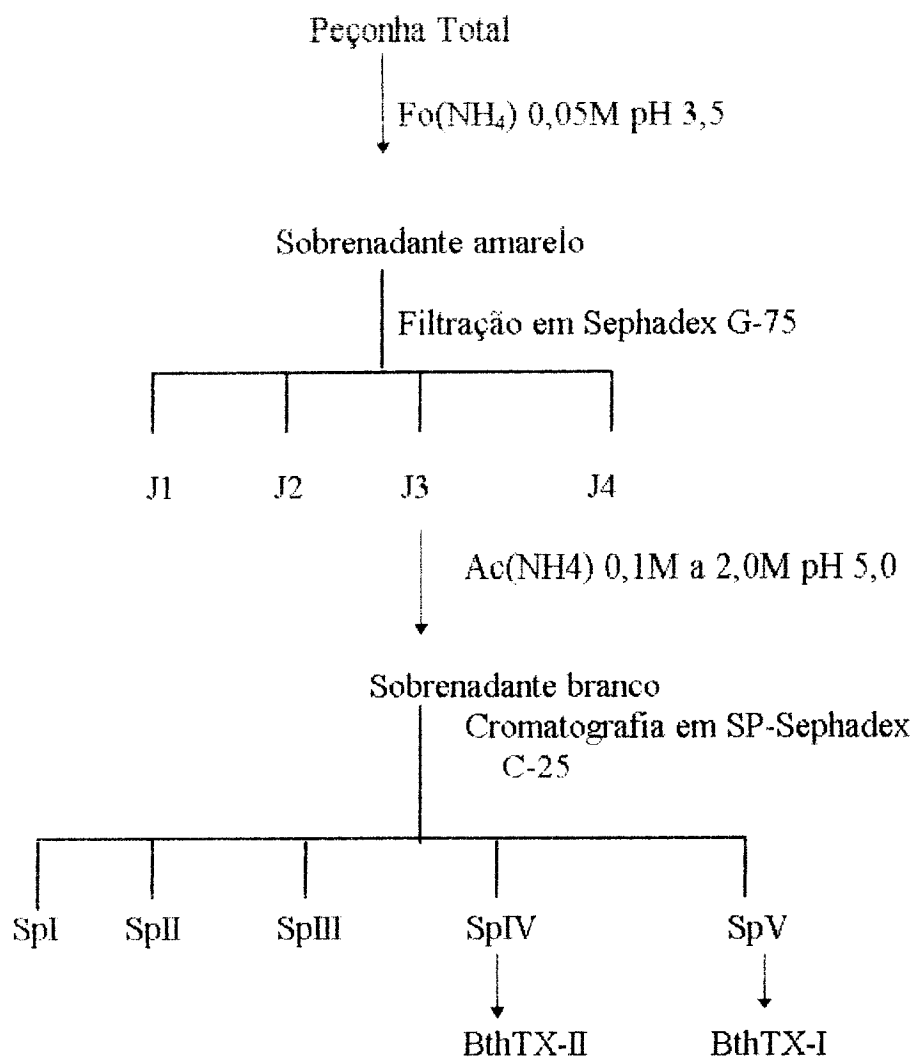
Indicador: Fucsina Básica.

Temperatura ambiente.

Amostras de Borges: 1- VB 2-J3 3-SpI 4-SpIV 5-SpV

Amostras de Homsí-Brandeburgo: 6- SpV 7-SpIV 8-J3 9-VB

4.4- Cronograma da Purificação de miotoxinas presentes no veneno bruto de *B. Jararacussu*



4.5- Produção de Anticorpos:

As miotoxinas purificadas foram preparadas para imunização conforme item 3.7.2. Dois lotes contendo 4 coelhos cada foram utilizados para as imunizações. Em cada lote, 2 coelhos foram imunizados com BthTX-I e os outros 2 com BthTX-II.

No 1º lote, após a 4a. Dose foi feita uma sangria parcial e o soro foi testado quanto à produção de anticorpos por ELISA, que indicou um título de aproximadamente 5.000, ou seja para uma diluição do soro de 5000 vezes, o teste ainda se mostrou positivo.(fig 05).

No 2º lote, um dos animais imunizados com BthTX-I morreu durante o experimento. Após a primeira sangria, o soro foi testado pelo método de imunodifusão, não apresentando nenhum título, sendo necessário retornar ao esquema de imunização conforme item 3.7.3. Foram feitas mais 4 doses de 200µg da toxina, obtendo após novos testes um título ainda muito baixo, então foi aplicada uma dose de 500µg para cada coelho e feita uma sangria total.

A imunodifusão realizada para o 1º lote de coelhos, mostrou a especificidade do anticorpo frente ao antígeno, através da formação de linhas de precipitação. A imunodifusão também mostrou a existência de reações cruzadas, quando o soro de coelhos imunizados com BthTx-I foi testado com antígeno BthTX-II e vice-versa. Os resultados são mostrados na tab.03 e figura 06.

Tab.03a- Teste de Imunodifusão realizado com cinco diluições do soro bruto obtido a partir de BthTX-I e BthTX-II presentes no veneno de *B. jararacussu* para o 1º lote de coelhos.

Coelho	Soro	Antígeno	Linha de precipitação
1	SpIV	SpIV	+
		SpV	+*
2	SpIV	SpIV	+
		SpV	+*
3	SpV	SpIV	+*
		SpV	+
4	SpV	SpIV	+*
		SpV	+

* Observar a presença de reações cruzadas.

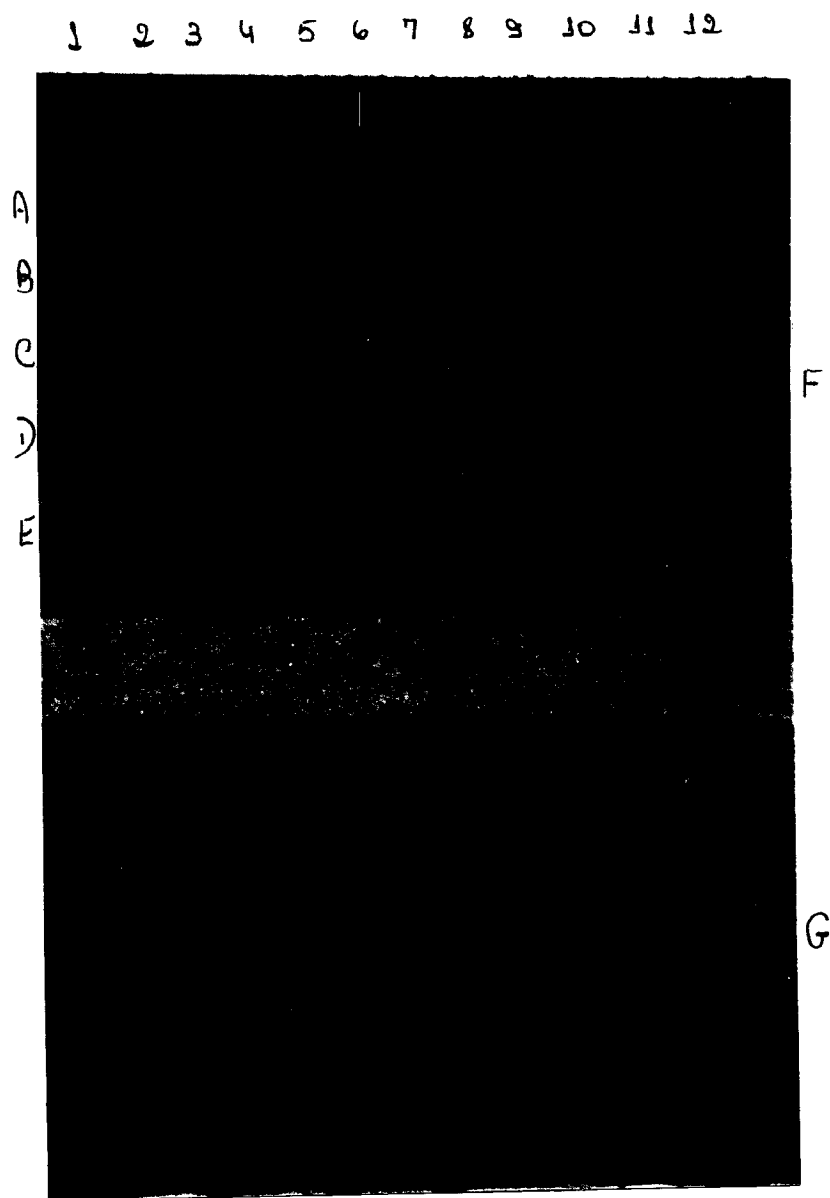


Fig.:05 - Teste Elisa realizado para o 1º lote de coelhos.

As colunas de 1 a 10 indicam as diluições do soro bruto que vão 1/10 a 1/5120. As colunas 11 e 12 representam os brancos e não contém os antígenos. As linhas A, B, C e D mostram os soros testes em duplicata. A linha E representa os soros negativos de coelhos não imunizados. Na placa F foi sensibilizada com BthTX-II e a placa G com BthTX-I.

Tab.03b- Teste de Imunodifusão realizado com cinco diluições do soro bruto obtido a partir de BthTX-I e BthTX-II presentes no veneno de *B. jararacussu* para o 2º lote de coelhos.

Coelho	Soro	Antígeno	Linha de precipitação
1	SpIV	SpIV	+
2	SpIV	SpIV	◆
3	SpV	SpV	+
4	●	-	-

◆ Reação negativa

● Morreu durante o experimento.

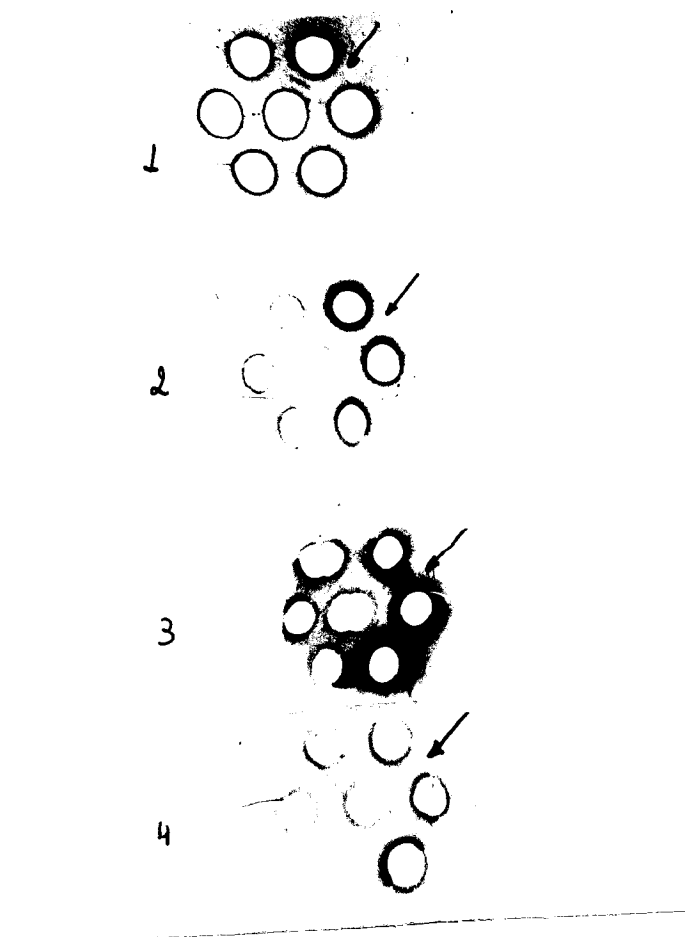


Fig.: 06a - Teste imunodifusão realizado para o soro bruto obtido a partir de BthTX-I e BthTX-II presentes no veneno de *Bothrops jararacassu* para o 1º lote de coelhos. - Reação específica.

	Soro	Antígeno
1	SpIV	SpIV
2	SpIV	SpIV
3	SpV	SpV
4	SpV	SpV

5 - Discussões e Conclusões:

Dentre os animais peçonhentos capazes de provocar acidentes graves em suas presas, podemos destacar as serpentes. A peçonha destes répteis pode produzir efeitos deletérios sobre suas vítimas, entre as quais se incluem os seres humanos, provocando um quadro clínico que muitas vezes leva à perda de membros ou até mesmo à morte.

A maioria dos acidentes com serpentes no Brasil são provocados pelo gênero *Bothrops* (GUTIÉRREZ, et al 1991). Na região do Triângulo Mineiro se destacam as espécies de *B. moojeni* e *B. neuwiedi* (NISHIOKA and SILVEIRA, 1992). O envenenamento bothrópico se caracteriza por danos locais e imediatos tais como: dor, mionecrose, hemorragia e edema, podendo ainda chegar a complicações cardiovasculares, choque hipovolêmico, desordens na coagulação (GUTIÉRREZ et al 1989), liberação de substâncias vasoativas como a histamina e a bradicinina (SELISTRE et al, 1990), complicações renais e até mesmo a morte.

Os estudos do veneno de *B. jararacussu* tem tido relevância cada vez maior, o isolamento de substâncias presentes no veneno, permite entender melhor a ação de cada componente do veneno total e buscar assim mecanismos que possam reverter a sintomatologia.

Este trabalho visou a purificação dos componentes miotóxicos presentes no veneno de *B. jararacussu* e a posterior produção de anticorpos a partir dessas miotoxinas.

Os passos de purificação se deram conforme descrito por HOMSI-BRANDEBURGO et al (1988). Trabalhos anteriores, realizados em nosso laboratório mostram que o veneno possui como atividades enzimáticas as atividades coagulante, hemorrágica e fosfolipásica.

O fracionamento do veneno bruto apresentou quatro picos, denominados de J1, J2, J3 e J4. A resina utilizada neste fracionamento foi a Sephadex G-75 que constituída de poros, por onde as proteínas de baixo peso molecular penetram, ficando assim, retidas por mais tempo na coluna que as proteínas de peso molecular alto, já que estas passam diretamente, sem penetrar nos poros. Portanto, a fração J4 deve ser formada por peptídeos, pois é a última fração a ser eluída. SOARES (1994) ao fracionar o mesmo veneno em nosso laboratório, utilizando tampão bicarbonato de amônio 0,05M pH 7,4, obteve também 4 picos e os caracterizou com suas respectivas atividades, desse modo o pico 1 induzia hemorragia, agregação plaquetária espontânea e atividade coagulante, enquanto a atividade fosfolipásica ficou contida

nos picos 2 e 3. A agregação plaquetária foi observada no pico 4 e em menor quantidade nos picos 2 e 3.

Neste trabalho, testamos apenas a atividade PLA_2 que ao ser comparada ao trabalho de nosso colega teve um deslocamento apresentando-se apenas no pico 3. Este fato pode ser devido à diferença nas condições de purificação, tais como o pH.

Ao comparar nosso fracionamento com o de HOMSI-BRANDEBURGO (1987) observamos o mesmo perfil, com obtenção de quatro picos dos quais somente o 3º retém a atividade PLA_2 .

O segundo passo de purificação das miotoxinas foi o subfracionamento de J3 em SP-Sephadex C-25 que forneceu 5 picos, denominados de SpI a SpV. Essa resina separa as proteínas de acordo com a carga resultante, assim as proteínas de sinais contrário se ligam à resina, sendo eluídas quando é colocado um tampão com força iônica maior (COLLINS et al, 1993).

Estes resultados são condizentes com os de HOMSI-BRANDEBURGO (1987) que ao subfracionar J3 obteve também cinco picos. Houve apenas ligeiras alterações no perfil cromatográfico, sendo que em nosso trabalho a fração SpI se dividiu em dois picos.

Neste estudo, verificamos que a atividade PLA_2 foi encontrada em SpI, (SpII não foi ensaiada quanto à PLA_2 , porém acredita-se que esta fração também devesse apresentar atividade), SpIII apresentou uma atividade residual (mesmo quando se utilizou 3vezes mais a quantidade ensaiada), SpIV apresentou uma atividade PLA_2 considerável, enquanto SpV não apresentou atividade PLA_2 , mesmo quando testada para 20µg de amostra, ou seja o dobro usado para outras frações. HOMSI-BRANDEBURGO (1987) ao caracterizar as subfrações quanto à atividade PLA_2 , obteve resultados semelhantes. Nos trabalhos de HOMSI-BRANDEBURGO (1987), SpIII apresentou uma atividade PLA_2 maior que SpIV, enquanto neste trabalho SpIV apresentou maior atividade. Essas diferenças encontradas entre o nosso trabalho e o da referida autora acima citada podem ser devidas ao "pool" de veneno utilizado, pois a qualidade do "pool" depende de vários fatores tais como a estação de coleta, a morfologia, o sexo e a idade do espécime, além de variações geográficas (CHIPPAUX, 1991). Esses fatores contribuem para variações de um pool para outro, o que pode provocar pequenas alterações nas características do veneno total.

HOMSI-BRANDEBURGO (1987) também caracterizou as subfrações quanto à presença ou ausência de miotoxicidade, observando após efetuar injeções no músculo tibial anterior de camundongos que as subfrações SpI a SpIII não induziram nenhum efeito patológico, enquanto SpIV e SpV causaram intensa mionecrose, sendo que SpV apresenta regeneração mais rápida que SpIV.

A dosagem de proteínas das frações obtidas a partir da filtração em Sephadex G-75 mostrou que a fração J3 representa aproximadamente 40% (TAB. 01) do veneno bruto. SpV representa aproximadamente 40% da fração J3 (TAB. 02) e 18% do veneno bruto. Essas proporções são muito semelhantes ao trabalho de HOMSI-BRANDEBURGO (1987).

As resoluções em eletroforese para PAGE não desnaturante mostram bandas únicas para SpIV e SpV(fig), indicando que as proteínas estão em alto grau de pureza. PAGE SDS para agentes desnaturantes (fig.) mostrou que SpIV e SpV têm aproximadamente o mesmo peso molecular, em torno de 14.000, como revelado pelo padrão utilizado

Várias eletroforeses em condições nativas foram feitas colocando as amostras fracionadas por HOMSI-BRANDEBURGO (1987) e as obtidas neste trabalho a fim de comparação do perfil eletroforético destas proteínas. (Fig.: 04c)

Para confirmar a pureza relativa dessas frações, HOMSI-BRANDEBURGO (1987) realizou a análise amino-terminal dos três últimos picos SpIII, SpIV e SpV, obtendo apenas um resíduo amino-terminal para cada uma dessas proteínas.

Embora não tenhamos realizado testes de miotoxicidade acreditamos que as frações SpIV e SpV purificadas neste trabalho, correspondem às frações miotóxicas purificadas por HOMSI-BRANDEBURGO (1987), pois houve apenas ligeiras alterações entre os resultados por ela encontrados e os aqui apresentados. Atividade PLA₂, comparação de dosagens e eletroforeses foram definitivos para se acreditar que as proteínas por nós purificadas são as mesmas miotoxinas presentes no trabalho da referida autora.

Várias miotoxinas têm sido isoladas de venenos de serpentes. Uma classificação mais antiga divide essas miotoxinas em três grupos: a) miotoxinas fosfolipásicas: a) notexina e crotoxina (GUTIERREZ et al 1984; HARRIS, et al 1984); b) cardiotoxinas presentes nos venenos elapídicos (GUTIÉRREZ et al, 1984; LAI et al, 1972; DUCHEN et al, 1974; CHANG, 1979); c) pequenas toxinas básicas como a miotoxina α e a crotamina (GUTIÉRREZ et al, 1984; CAMERON e TU, 1977; OWNBY et al, 1976).

Estudos de venenos botrópicos levaram ao isolamento de novas miotoxinas com propriedades que diferiam da classificação acima. Assim, foram isoladas miotoxinas com atividades PLA₂ e anticoagulante (GUTIERREZ et al, 1984a,b,c, 1986a; KAISER et al, 1990; LOMONTE e GUTIERREZ, 1989; FRANCIS et al, 1991); miotoxinas básicas com pequena atividade PLA₂ (HOMSI-BRANDEBURGO

et al, 1988; GUTIERREZ et al, 1991; HELUANY et al, 1992); e sem atividade PLA_2 , mas com peso molecular e estrutura semelhante à fosfolipases (GUTIÉRREZ et al, 1986 b; HOMSI-BRANDEBURGO et al, 1988; LOMONTE, et al, 1990); miotoxinas ácidas com atividades PLA_2 e anticoagulante. Desse modo surgiu um novo grupo de miotoxinas que não apresentam atividade PLA_2 , mas que possuem estrutura semelhante às fosfolipases.

Os veneno de *Bothrops jararacussu* contém duas frações miotóxicas (SpV e SPIV) chamadas de Bothropstoxina I (BthTX-I) e Bothropstoxina II (BthTX-II), respectivamente. BthTX-II apresenta atividade PLA_2 enquanto BthTX-I não apresenta (HOMSI-BRANDEBURGO et al, 1988

As fosfolipases A_2 permitem a hidrólise da ligação do 2-acil éster de 3n-fosfolípídeo, liberando ácidos graxos livres. Estão presentes em muitos tecidos de mamíferos e também em peçonhas como nas botrópicas, sendo responsáveis por diversas ações tóxicas tais como atividade miotóxica, indução ou inibição da agregação plaquetária, além de apresentarem efeitos hemolíticos, edematogênicos e anticoagulante (KINI e EVANS, 1989). Um mesmo veneno pode apresentar várias isoformas de PLA_2 (VALIENTE, 1992). Segundo GUTIERREZ, et al 1984, as fosfolipases se ligam à membrana plasmática provocando a reação enzimática, promovendo um rápido aumento no nível de creatina quinase no plasma e de cálcio citossólico, o que é provavelmente consequência da ruptura da integridade da membrana.

KAISER (1990) isolou uma fosfolipase A_2 básica, miotóxica, e com atividade anticoagulante, do veneno de *B. asper*. Essa fosfolipase é conhecida como miotoxina I. Vários estudos foram realizados para identificar a relação entre a miotoxidade e a atividade catalítica da PLA_2 bem como o mecanismo pelo qual as enzimas causam os efeitos nocivos. (KASTURI, 1990)

Modificações no sítio ativo da His 48 levaram à perda da atividade catalítica e a diminuição da toxicidade entre outras propriedades, sugerindo que a atividade é essencial para a produção dos sintomas patológicos (KASTURI, 1990). Porém, ao prosseguir seus estudos, KASTURI (1990) realizou modificações químicas nos aminoácidos específicos, mostrando que não há ligação direta entre a atividade enzimática e a miotoxidade. Talvez haja dentro da molécula de PLA_2 regiões separadas responsáveis pela atividade catalítica e outra responsável pelas características farmacológicas, assim esses efeitos são independentes da hidrólise do fosfolípídeo. É exatamente isso que é proposto por KASTURI (1990), quando mostra a presença de sítios distintos em uma mesma molécula responsáveis pela neurotoxicidade, atividade catalítica, atividade coagulante e miotóxica.

Anticorpos específicos contra fosfolipase A_2 podem inibir a atividade de fosfolipase presente em venenos de espécies intimamente relacionadas. As cadeias

polipeptídicas da PLA₂ são similares, mas os locais específicos da estrutura podem variar de uma PLA₂ para outra. (MOLLIER, 1990).

O estudo e a caracterização dos componentes individuais presentes nos venenos de espécies de mesmo gênero é importante por possibilitar a obtenção de antígenos específicos para imunodiagnósticos, na seleção dos melhores venenos para a produção de soros, permitindo um melhor entendimento do quadro clínico provocado pelo envenenamento (Moura-da-Silva, 1991)

As miotoxinas SpIV(BthTX-II) e SpV(BthTX-I) ao serem injetadas em coelhos induziram a produção de anticorpos. Foram realizados dois lotes de imunizações, com amostras puras das toxinas. No primeiro caso a produção de anticorpos foi testada por Elisa, onde se obteve um título bem elevado de mais de 5.000. No 2º lote de imunização houve uma baixa produção de anticorpos, como constatado por imunodifusão.

O enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) é frequentemente usado para identificação e quantificação de anticorpos contra venenos, produzidos por modelos animais. Sua característica básica é alta sensibilidade, sendo capaz de detectar quantidades muito baixas de antígeno ou de anticorpo (LI, 1994).

Os testes de imunodifusão mostram a especificidade desses anticorpos. Apesar de ser mais específicos são menos sensíveis, sendo necessário quantidades maiores de antígenos ou de anticorpos, aproximadamente cerca de 1,0mg/ml. É um método simples e conveniente para análise dos componentes do veneno e para comparação entre os componentes antigênicos de espécies e gêneros (CHIPPAUX, 1991).

A presença de reações cruzadas além ser indicativa de parentesco evolutivo, torna possível a utilização do soro de uma espécie para combater os sintomas produzidos por outra espécie o que é essencial para produção de soro a nível industrial.(LOMONTE, 1990).

Pelos nossos ensaios de imunodifusão, tanto os anticorpos produzidos contra BthTX-I como contra BthTX-II apresentaram reação cruzada, pois reconheceram ambos os antígenos.

Os estudos de HOMSI-BRANDEBURGO (1987) mostram que BthTX-I e BthTX-II são muito semelhantes, possuem peso molecular aproximado. O número de resíduos e a composição em aminoácidos é também muito semelhante para as duas proteínas. Assim BthTX-I possui, 123 resíduos de aminoácidos (para 139 de BthTX-II), elevado conteúdo de Asx, Gly e Lys e 16 Cys, o mesmo ocorrendo para BthTX-II. Essas semelhanças podem levar a ocorrências de reações cruzadas como mostrado em nossos resultados.

MOURA DA SILVA et al (1990) realizou um trabalho onde testou anticorpos formados contra *B. jararacussu* em diversas espécies do gênero *Bothrops*. Utilizou como antígeno as espécies de *B. moojeni*, *neuwiedi*, *pradoi*, *jararaca*, *alternatus*, *atrox*, *cotiara* e *erytromelas*. Seus resultados mostraram um alto grau de afinidade entre *B. jararacussu* e as espécies de *moojeni*, *neuwiedi* e *pradoi*. Houve pequena

reação com *B. jararaca* porém, *alternatus*, *atrox*, *cotiara* e *erytromelas* não apresentaram nenhuma reação.

LOMONTE et al (1990) também realizaram um estudo semelhante utilizando outras espécies botrópicas e obtiveram resultados concordantes com os de MOURA DA SILVA (1990).

Nosso trabalho ainda prossegue numa tentativa de purificar os anticorpos produzidos a fim de utilizá-los na detecção de miotoxinas presentes em outras espécies. Sempre com o firme propósito de que a bioquímica, constituinte principal da vida na terra, encerra grandes segredos que vão sendo desvendados pouco a pouco, mas que contribuem enormemente para a melhora da vida na Terra. Não foge à regra no que diz respeito aos animais peçonhentos, onde a busca de informações possibilitam o seu estudo e dos efeitos que suas substâncias podem trazer aos organismos vivos como um todo.

6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ALBUQUERQUE, D. A. de (1994) Efeito adjuvante da Jacalina sobre a reposta humoral. **Tese Doutorado Imunologia Básica e Aplicada Facul. de Medicina Ribeirão Preto, SP, Universidade de S. Paulo USP-Ribeirão Preto.**
- AMARAL, C.F.S.; SILVA, O. A.; GODÓI, P. and MIRANDA, D. (1985) Renal Cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *B. jararacussu* snake bite. **Toxicon 23** 877.
- AMENO, S.; AMENO, K.; FUKU, C.; KINJU, T.; and IJURI, I. (1990) IgG subclass distributions of anti-horse serum antibodies and natural venom-antibodies produced in response to antivenom injection or snake bite in humans. **Toxicon 28**, 347
- BARRAVIERA, B. (1994) Venenos animais: uma visão integrada 1ª ed RJ Ed. de Publicações Científicas p. 411
- BOLANOS, R.; CERDAS, L. and TAYLOR, R. (1975) The production and characteristics of a coral snake antivenom. **Toxicon 13**: 139
- CAMERON, D.; 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 snake venoms on nerve and muscle. In: Lee, C. Y. **Snake Venoms: Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 52 p.309 Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York.

- CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V. and WHITE, J. (1991) Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. Review Article **Toxicon** 29(11): 1279
- COLLINS, C. H. (1990) Princípios Básicos de Cromatografia In: **Introdução a métodos cromatográficos**. 4^a ed SP Editora da UNICAMP p. 135.
- DE HAAS, G. H.; POSTEMA, N. M.; NIEUWENHUIZEN, W. and VAN DEENEN, L.L.M. (1968) Purification and properties of phospholipase a from porcine pancreas. **Biochem. Biophys. Acta**, 159, 103
- 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 *Denchoaspis jamesoni* venom. **J. Neurol. Sci.** 21: 391
- FRANCIS, B.; GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, N. and KAISER, I. I. (1991). Myotoxin II from *Bothrops asper* (terciopelo) venom is a lysine-49 phospholipase A₂. **Arch. Biochem. Biophys.** 284: 352
- GANS, C. and GANS K. A. (1978) **Biology of the reptilia** 8, 1-180 New York - Academic Press.
- GUIDOLIN, R. (1988) Imunoprofilaxia e Imunoterapia. In: **Imunologia Básica** 1^a ed, p. 367(CALICH, V.L.G. and VAZ, C. A. C.) São Paulo: Livraria Editora Artes Médicas Ltda
- GUTIERREZ, J.M.; OWNBY, C. L. and ODELL, G. V. (1984a) Isolation of a myotoxin from *Bothrops asper* venom: partial characterization and action on skeletal muscle. **Toxicon** 22(1): 115

- GUTIERREZ, J.M.; OWNBY, C. L. and ODELL, G. V. (1984b) Phathogenesis of myonecrosis induced by crude venom and myotoxin of *Bothrops asper*. **Exp. Mol. Pathol.** **40**: 367
- GUTIERREZ, J.M.; OWNBY, C. L. and ODELL, G. V. (1984c) Skeletal muscle regeneration after myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin from the snake *Bothrops asper* (Fer-de-Lance). **Toxicon** **22**: 719
- GUTIERREZ, J.M.; ARROYO, O.; CHAVES, F.; LOMONTE, B. And CERDAS, L. (1986) Phatogenesis of myonecrosis induced by coral snake (*Micrurus nigrocinctus*) venom in mice. **Br. J. Exp. Pathol.**, **67**:1
- GUTIERREZ, J.M and LOMONTE, B.(1989) - Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms, a review. **Mem. Inst. Butantã** **51(4)**:211
- GUTIERREZ, J. M.; NUNEZ, J.; DIAZ, C.; CINTRA, A. C. D.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. and GIGLIO, J.R. (1991) - Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of Bothrotoxina-II, a Phospholipase A2 isolated from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. **Experimental and molecular Pathology** **55**: 217
- HAAD, J.J. S. (1989) Las serpientes del genero *Bothrops* en la Amazonia Colombiana. **Acta Med. Colomb** **14**: 148
- HARRIS, J. B. (1984) Polypeptides from snake venoms which act on nerve and muscle. In: **Progress in Medicinal Chemistry** (ELIIS, G. P.; WEST, G. B., Eds.), vl. 21, p. 64, Elsevier Science Publishers, B. V.

- HELUANY, N. F.; HOMSI-BRANDEBURGO; GIGLIO, J.R.; PRADO FRANCHESCHI and RODRIGUES-SIMIONI, L. (1992) Effects induced By Bothropstoxin, a component from *Bothrops jararacussu* snake venom, on mouse and chick muscle preparations. **Toxicon** 30(10):1203
- HENEINE, L. G. D. and CATTY, D. (1993) Species-Specific detection of venom antigens from snakes of the *Bothrops* and *Lachesis* genera. **Toxicon** 31:591
- 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, Facul. de Medicina de Ribeirão Preto, Univ. São Paulo.**
- HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; QUEIROZ, L. S.; SANTO-NETO, H; RODRIGUES-SIMIONI, L. and GIGLIO, J. R. (1988) Fraction of *Bothrops jararacussu* snake venom: Partial chemical characterization and biological activity of Bothropstoxina. **Toxicon** 26(7):615
- HOUSSAY, B. A. and NEGRETE, J. (1921) - Proporciones en que el suero antiofídico neutraliza la ponjona de las serpientes. **Asoc. Méd. Argent.** 34: 845.
- ITZHAKI, R. F. and GILL, D. M. (1964). A microbiuret method for stimating proteins. **Anal Biochem.**, 9: 401
- JIMENEZ-PORRAS, J. M. (1973) - Reptile Toxins in **Biology Data Book**, 2nd edn vol II, p. 697 - Federation of Americam Societes for Experimental Biology (FASEB), Bethesda M. D. - USA.

- JOHNSTONE, A and THORPE ROBIN (1988) Immunoassays In Immunochemistry in practice 2^a ed p 257.
- KAISER, I.I ; GUTIERREZ, J. M.; PLUMMER, I.; AIRD, S.L. and ODELL, G.U. (1990) - The amino acid sequence of a myotoxic phospholipase from the venom of *Bothrops asper*. **Arch Biochem. Biophys**, 278(2): 319.
- KASTURI, S. and VEERABASAPPA GOWDA, T. (1990) Detection using antibodies, of pharmacologically actives sites, apart from the catalytic site, on venom phospholipase A₂. **Toxicon** 2(1):91
- KINI, R. M. and EVANS, H. J. (1989) A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂. **Toxicon**, 27(6):613
- KLOBUSITZKY, D. (1961) Coagulant and anticoagulant agents in snake venoms **Am. J. Med. Sci** 242: 107
- LAEMMLI, V. K and FAVRE, M. (1973) Maturation of the head of Bacteriophage T₄ **J. Mol Biol** 80 575.
- 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
- LEHNINGER, A.L. (1990) Proteínas estrutura covalente e função biológica. In: **Princípios de Bioquímica** São Paulo Ed. Savier de Livros Médicos Ltda.

- LI, Q. and OWNBY, C.L. (1994) Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) for identification of venoms from snakes in the *Agkistrodon* genus. **Toxicon 32(11): 1315**
- 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.**
- LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J. M; FURTADO, M. F.; OTERO, R.; ROSSO, J. P.; VARGAS, O.; CARMONA, E. and ROVIRA, M.(1990) Isolation of basic myotoxins from *Bothrops atrox* snake venoms. **Toxicon 28: 1137.**
- LOMONTE, B.; FURTADO, M. F.; ROVIRA, M. E.; CARMOURA, E.; ROJAS, G.; AYMERICH, R. and GUTIERREZ, J. M. (1990) South american snake venom proteins antigenically related to *Bothrops asper* myotoxins - **Braz. J. Med. Biol.Res.: 23(5), 427.**
- MELO, P. A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R. and SUAREZ-KURTZ, G. (1993) Antagonism of the myotoxic effects of *Bothrops jararacussu* venom and Bothropstoxin by polyanions **Toxicon 31(3): 285**
- MINEO, J. R.(1982) Detecção de Antígenos e de anticorpos com técnicas imunoenzimáticas, para o diagnóstico sorológico da toxoplasmose "aguda".Tese apresentada ao Departamento de Microbiologia e Imunologia do Inst. De C. Biomédicas da Univ. São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

- MINTON, S.A. (1967) Observations on toxicity and antigenic makeup of venoms from juvenile snakes In: **Animal toxins**, pp. 211-222 (Russel, F.E. and Saunders, P. R. Eds.) Oxford: Pergamon Press.
- MOLLIER, P.; CHWETZOFF, S. and MÉNEZ, A. (1990) A monoclonal antibody recognizing a conserved epitope in a group of phospholipases A₂. **Molecular Immunology**: 27(1):7
- MOURA DA SILVA, A. M.; D'IMPÉRIO LIMA, M. R.; NISHIKAWA, A.K.; BRODSKYN, C. I.; SANTOS, M.C. DOS; FURTADO, M. F. D.; DIAS DA SILVA, W. and MOTA, I. (1990) Antigenic cross-reactivity of venoms obtained from snakes of genus *Bothrops*. **Toxicon** 28, 181.
- MOURA DA SILVA, A. M.; DESMOND, H.; LAING, G. and THEAKSTON, R.D.G. (1991) Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops snakes*. **Toxicon** 29(6), 713.
- NAHAS, L.; DENSON, K.W.E. and MACFARLANE, R.G. (1964) A study of the coagulant action of eight snake venoms. **Thromb. Diath. Haemorrh.** 12, 355.
- NAHAS, L.; KAMIGUTI, A. S. and BARROS, M. A. R. (1979) Thrombin-like and factor X-activator components of *Bothrops* snake venoms. **Thromb. Haemost** 41, 314.
- NAIR, B. C.; NAIR, C and ELLIOTT, W. B. (1975) Action of antisera against homologous and heterologous snake venom phospholipase A₂. **Toxicon**, 13, 453.

- 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.
- OSHAKA, S. A. (1979) Hemorrhagic, necrotizing and edema: Forming effects of snake venoms. In: Snake venoms. **Handbook of Experimental Pharmacology** **52**, 480
- OUCHTERLONY, O. And NILSSON L.A. (1986) Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. IN **Handbook Experimental Immunology**, Vol. 1: Immunochemistry (D.M.Weir, L.A. Herzenberg, C. Blackwell and L.A. Herzenberg, eds.) pp 32.1-32.50 Blackwell, Oxford.
- OWBBY, C. L.; CAMERON, D. And TU, A.T. (1976). Isolation of myotoxic component from rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) Electron microscopic analysis of muscle damage. **Am. J. Path.** **85**: 149.
- QUEIROZ, L.S.; SANTO NETO, H.; RODRIGUEZ-SIMIONI, L. and PRADO-FRANCESCHI, J. (1984). Muscle necrosis and regeneration after envenomation by *B. jararacussu* venom. **Toxicon** **22**, 339.
- RODRIGUEZ-SIMIONI, L.; BORGESE, N. and CECCARELLI, B. (1983) The effects of *Bothrops* venom and it's components on frag nerve muscle preparation . **Neuroscience** **10**, 475.
- RODRIGUES, V. M. (1993) Fracionamento e determinação das atividades enzimáticas presentes no veneno de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (jararaca pintada). Monografia apresentada à coordenação do Curso de Ciências

Biológicas da Un. F. de Uberlândia para obtenção do grau de Bacharel em C. Biológicas.

RUSSEL, F. E. (1979) The clinical problem of Crotalid snake venom poisoning. In: **snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology.** (LEE, C.Y.), Springer-Verlag Berlin.

SELISTRE, H. S.; QUEIROZ, L.S.; CUNHA, O.A.B.; SOUZA, G.E.P. and GIGLIO, J.R. (1990) Isolation and characterization of hemorrhagic, mionecrotic and edema-inducing toxins from *Bothrops insulari* (jararaca-ilhoa) snake venom. **Toxicon**, **28(30)**: 261.

SELISTRE, H. S.; GIGLIO, J.R. and HOMSI-BRANDEBURGO (1990) Atividade anticoagulante de toxinas de *Bothrops insulari* e *Bothrops jararacussu*. **Mem. Inst. Butantã**, **52** (sup.) 73

SOARES, A. M. (1994) Caracterização das atividades enzimáticas presentes na peçonha de *Bothrops jararacussu* Lacerda, 1884 (Viperidae-Crotalinae): Purificação parcial de proteínas Biologicamente ativas. **Monografia apresentada à coordenação do Curso de Ciências Biológicas da Un. F. de Uberlândia para obtenção do grau de Bacharel em C. Biológicas.**

SOERENSEN, B. (1990) **Animais peçonhentos.** 2nd Ed. RJ. Atheneu Editora.

STUDIER, I. W. (1973) Analyses of Bacteriophage T7 early RNAr and proteins on slab gels **J. Mol. Biol** **79**, 237.

- TU, A.T. and SALAFRANCA, E. S. (1974) Immunological properties and neutralization of the sea snake venoms (II) *Amer. J. Trop. Hyg* **23**, 135.
- VALIENTE, C.; MORENO, E.; SITTENFELD, A.; LOMONTE, B. and GUTIÉRREZ, J. M. (1992) An electrophoretic study on phospholipase A2 isoenzymes in venoms of Central American Crotaline snakes. *Toxicon* **30(8)**, 815
- VIDAL, J. C. and STOPPANI, A. O. M. (1971) Isolation and purification of two phospholipases A from *Bothrops* venoms. *Archs. Biochem. Biophys* **145**, 543.
- VIDAL, J.C.; BADAMO, B.N. and STOPPANI, A.O.M. (1966) Inhibition of electron transport chain by purified phospholipase A2 from *B. neuwiedi* venom. *Mem. Inst. Butantan*, **33**, 913.
- VIDAL, J. C.; CATTANEO, P. and STOPPANI, A. O. M. (1972) Some characteristic properties of phospholipases A2 from *Bothrops neuwiedi* venom. *Archs. Biochem. Biophys* **151**, 168.
- VITAL BRAZIL, O. (1982) Peçonhas. In *Farmacodinâmica* 6th edn, p:1044 (Corbett, C. E., Ed.) Rj: Guanabara Koogan.