LAURA VIRGINIA PEREIRA NARVAES

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
TOXINAS DO VENENO DE *Bothrops alcatraz*
Marques, Martins e Sazima, 2002 E
ASPECTOS COEVOLUTIVOS COM A DIETA**

**SÃO PAULO
2007**

LAURA VIRGINIA PEREIRA NARVAES

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
TOXINAS DO VENENO DE *Bothrops alcatraz*
Marques, Martins e Sazima, 2002 E
ASPECTOS COEVOLUTIVOS COM A DIETA**

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biociências da Universidade de
São Paulo, para obtenção de título
de Mestre em Ciências, na área de
Fisiologia Geral.

Orientadora: Dra. Maria de Fátima
Domingues Furtado

**SÃO PAULO
2007**

FICHA CATALOGRÁFICA

N 238i	Narvaes, Laura Virginia Pereira Isolamento e caracterização de toxinas do veneno de <i>Bothrops alcatraz</i> Marques, Martins e Sazima, 2002 e aspectos coevolutivos com a dieta / Laura Virginia Pereira Narvaes. – São Paulo : L. V. P. N., 2007 123 p. : il. + anexo
São	Dissertação (Mestrado) - Universidade de
de	Paulo, Instituto de Biociências, Departamento
	Fisiologia, 2007.
alcatraz -	1. Bothrops alcatraz – Ilha de Alcatrazes
Fosfolipase	2. Venenos de origem animal 3. Bothrops
Título.	Endemismo 4. Bothrops alcatraz - Dieta 5.
	A2 I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Fisiologia. II.
	LC: QL 666.o6

COMISSÃO JULGADORA

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Dedico a todos os amigos que fizeram diferença em algum ponto,
que fizeram valer a pena.

Agradecimentos

Agradeço a Dra. Maria de Fátima D. Furtado, pela orientação, apoio, participação, incentivo e paciência.

À Silvia R. T. Cardoso pelo auxílio na realização das extrações de veneno, na manutenção dos animais, pela foto da capa e pela amizade.

Marisa M. T. Rocha pelo auxílio com os experimentos, colaboração nas muitas horas de apuro e amizade.

Ao Wilson Fernandes, Diretor do Laboratório de Herpetologia, por permitir a realização do trabalho neste Laboratório.

Ao Otávio A. V. Marques, Ricardo J. Sawaya, Cíntia Brasileiro, Valdir Germano, Murilo R. Guimarães, Fausto E. Barbo, Kelly Zamudio, Tereza T. Chiarione, Rogério Bertani e Antônio C. O. R. Costa, pelo auxílio nas buscas e extrações de veneno durante as expedições realizadas à Ilha de Alcatrazes e pelas fotos cedidas.

Ao Dr. Mário Sérgio Palma pela atenção e auxílio com os experimentos realizados com abelhas, no Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), no Laboratório de Biologia Estrutural e Zooquímica da UNESP, Rio Claro.

Ao Apiário pertencente à associação APACAME que gentilmente cedeu os animais para experimentação.

Ao Rogério Bertani pelo fornecimento das lacraias para experimentação.

À Patrícia Bianca do Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan, pelo auxílio na gel filtração.

Ao Patrick J. Spencer pela atenção e enorme paciência nas horas mais adversas possíveis, no auxílio nas purificações e diversos experimentos realizados no IPEN.

Lucélia Campos, Jean, Marcos Júnior e demais pessoas do IPEN, que ajudaram com os experimentos e demonstraram grande simpatia e prontidão em ajudar.

Ao Patrick J. Spencer, Maria Aparecida Visconti e Kátia Bárbaro pela participação na banca de qualificação.

A Sirlei e Aline do ICB – USP, pelo auxílio e realização da corrida em espectrômetro de massa, assim como Daniel Pimenta e Clécio, do CAT - CEPID, Instituto Butantan.

Ao pessoal dos venenos: André Zelanis, Ana Carolina Parpinelli, Adriana Rafael, Carla Manzato, Circe C. Albuquerque, Henrique B. P. Braz, Rosângela R. Barreto e demais pessoas do laboratório, pelo grande carinho, amizades, colaboração, horas de lazer e brincadeiras.

Ao pessoal da Coleção de serpentes, pela amizade e as muitas festas.

A Ana Carolina Parpinelli e Lina Almeida pela amizade, paciência e por ajudarem a compreender de alguma forma o valor de dividir e aprender com a convivência.

A Einat Hauzman, grande amiga, irmã e conselheira, pelo amor, carinho, paz de espírito e pronta ajuda em qualquer momento ou situação.

Aos Deuses e todos seu elementais.

Aos meus pais, irmão, abuelita e demais familiares pelo amor, apoio e auxílio.

Aos pequenos que me acompanharam nos melhores e piores momentos: Magali e Abreu.

A Equipe do Projeto *Scinax alcatraz* (Biodiversitas/CEPAN) pelo auxílio financeiro em trabalho de campo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) pelo apoio financeiro.

A todos que porventura estiveram ao meu lado no desenvolvimento deste trabalho.

Resumo

Os venenos de serpentes são misturas complexas com composição variada, possuindo constituintes orgânicos e inorgânicos. Dentre os compostos orgânicos, destacam-se as proteínas, tóxicas e/ou com altas atividades enzimáticas. Desta forma, os venenos desenvolvem importante papel na captura de presas e auxílio à digestão.

Venenos de serpentes da família Viperidae apresentam ampla e variada gama de ações biológicas, como proteólise, coagulação, hemorragia, neurotoxicidade e miotoxidade.

Populações de serpentes habitantes endemicamente em ilhas são bons modelos para estudos de evolução, especialmente quando comparadas a espécies de mesmo gênero que habitam o continente. Espécies ancestrais de serpentes do gênero *Bothrops* sofreram isolamento geográfico cerca de 9 mil anos atrás, quando no Período Pleistoceno porções de terra na região Sudeste do Brasil foram isoladas do continente, levando a formação de ilhas costeiras, devido a elevação do nível do mar. Tal isolamento deu origem a novas espécies insulares pertencentes ao gênero *Bothrops*. Estudos relacionados aos venenos destas espécies, suas especificidades e diferenças com relação a serpentes continentais são escassos.

O Arquipélago de Alcatrazes localiza-se no litoral de São Paulo, distando aproximadamente 35 Km da costa. Não há relatos da existência de mamíferos na ilha, com exceção de morcegos. Serpentes adultas da espécie *Bothrops alcatraz*, endêmica da Ilha de Alcatrazes, apresentam características encontradas em serpentes juvenis do grupo das jararacas, como a dieta

baseada exclusivamente em animais ectotérmicos e a composição diferenciada do veneno.

O presente trabalho tem como objetivo caracterizar as principais ações do veneno da serpente *B. alcatraz*, espécie endêmica e ilha, isolando cromatograficamente suas frações.

Resultados indicam no veneno de *B. alcatraz* apresenta as atividades coagulante sobre plasma humano, fosfolipásica, miotóxica e edematogênica mais ativas quando comparadas com as ações do veneno de *B. jararaca* do continente.

As ações proteolítica, hemorrágica e toxicidade para camundongos são mais potentes no veneno de *B. jararaca*.

A presença de ação neurotóxica específica para artrópodes no veneno de *B. alcatraz* sugere a ação de uma fosfolipase A2, a qual foi isolada cromatograficamente.

As propriedades e composição do veneno de *B. alcatraz* indicam uma provável evolução de toxinas adaptadas a seu tipo de presa/alimento.

Abstract

Snakes venoms are complex mixtures with varied composition constituted by organic and inorganic molecules. The main organic components are proteins, which can be toxic and show high enzymatic activities, thus playing important role in prey capture and digestion in snakes.

Viperidae snakes family show wide range of biological actions, as proteolytic, coagulant, hemorrhagic, neurotoxic and myotoxic activities.

Snake populations inhabiting endemically islands are useful models for evolution studies, specially when compared to their congeneric continental species. *Bothrops* species ancestors from Southeastern Brazil underwent geographic isolation about 9 thousand years ago, during the Pleistocene Period, when land portions were separated from the continent by the sea. The isolation originated new (island endemic) *Bothrops* species. Studies related to those snake venoms, its specialties and differences among continental species of the genera *Bothrops* are scarce.

The Alcatrazes Archipelago is located in São Paulo coast, 35 kilometer far from the continent. There are no register of mammals in those islands, except for bats. *Bothrops alcatraz* is endemic from the Alcatrazes Island. Adults show some similarities to young specimens from the continental jararaca group. They feed exclusively on ectothermic animals and their venom shows a different composition.

The aim of this study was to analyze the endemic island snake, *B. alcatraz*, venom, isolating by chromatography the venom fractions.

Results indicated that *B. alcatraz* venom presents coagulant, phospholipase, myotoxic and edema forming activities higher than continental

B. jararaca venom. The proteolytic, haemorrhagic and mice toxicity are higher on *B. jararaca* venom.

The specific neurotoxic action in arthropods of *B. alcatraz* venom suggests a phospholipase A2 action, which was isolated by chromatography.

The properties and composition of *B. alcatraz* venom indicates a possible evolution of toxins adapted to the prey kinds.

Índice

1. Introdução	1
1.1 Variação dos venenos de serpentes	1
1.2 Isolamento como modelo - favorecimento dos estudos de evolução ...	4
1.3 Arquipélago de Alcatrazes.....	8
1.3.1 Descrição da área.....	8
1.3.2 Descrição da espécie - <i>Bothrops alcatraz</i>	11
1.3.3 Dados preliminares do veneno	15
2. Objetivos	17
3. Material e Métodos	18
3.1 Veneno total	18
a. Venenos.....	18
b. Dosagem de proteínas totais	18
c. Perfil eletroforético	18
d. Zimografia em gel de poliacrilamida com SDS	23
3.1.1 Atividades Bioquímicas	24
3.1.1.1 Atividade proteolítica sobre caseína	24
3.1.1.2 Atividade coagulante em plasma humano	24
3.1.1.3 Atividade hialuronidásica	25
3.1.1.4 Atividade fosfolipásica.....	26
3.1.2 Atividades Biológicas.....	26
3.1.2.1 Animais	27
a. Baratas	27
b. Camundongos	27
c. Abelhas	27
d. Grilos	27
e. Lacraias	27
f. Lagartixas	27
3.1.2.2 Dose Letal Média (DL50) em camundongos	28
3.1.2.3 Atividade hemorrágica	28
3.1.2.4 Atividade miotóxica	28

3.1.2.5 Atividade edematogênica	30
3.1.3 Ensaio de toxicidade em modelos biológicos ectotérmicos	31
3.1.3.1 Ensaio de toxicidade em abelhas	31
3.1.3.2 Ensaio de toxicidade em grilos	31
3.1.3.3 Ensaio de toxicidade em lacraias	31
3.1.3.4 Ensaio de toxicidade em lagartixas	32
3.1.3.5 Ensaio de toxicidade baratas	32
3.2 Cromatografia - Fracionamento do veneno de <i>B. alcatraz</i>	33
3.2.1 Gel filtração em coluna Superdex 75	33
3.2.2 Cromatografia de troca iônica em Coluna Mono S	33
3.2.3 Cromatografia de troca iônica em Coluna Mono Q	33
3.2.4 Atividade fosfolipásica em placa de 96 poços das frações do veneno	34
3.2.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida de frações do veneno	34
3.2.6 Atividade hemolítica indireta por fosfolipases A2	35
3.2.7 Cultura celular	36
3.2.8 Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> de frações do veneno	37
3.2.9 Ensaio de toxicidade em abelhas com frações obtidas em cromatografia de troca iônica	37
3.2.10 Cromatografia de fase reversa	38
3.2.11 Espectrometria de massa	38
3.2.12 Análise estatística dos resultados	38
4. Resultados	39
4.1 Veneno total	39
a. Dosagem de proteínas totais	39
b. Perfil eletroforético	40
c. Zimografia em gel de poliacrilamida com SDS	42
4.1.1 ATIVIDADES BIOQUÍMICAS	43
4.1.1.1 Atividade proteolítica sobre caseína	43
4.1.1.2 Atividade coagulante em plasma humano	44
4.1.1.3 Atividade hialuronidásica	46
4.1.1.4 Atividade fosfolipásica	48
4.1.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS	50

4.1.2.1 Dose letal Média (DL50) em camundongos	50
4.1.2.2 Atividade hemorrágica	51
4.1.2.3 Atividade miotóxica	53
4.1.2.4 Atividade edematogênica.....	55
4.1.3 ENSAIOS DE TOXICIDADE EM MODELOS BIOLÓGICOS ECTOTÉRMICOS.....	57
4.1.3.1 Ensaio de toxicidade em abelhas	57
4.1.3.2 Ensaio de toxicidade em grilos	59
4.1.3.3 Ensaio de toxicidade em lacraias.....	60
4.1.3.4 Ensaio de toxicidade em lagartixas.....	64
4.1.3.5 Ensaio de toxicidade em baratas	64
4.2 Cromatografia – Fracionamento do veneno de <i>B. alcatraz</i>	64
4.2.1 Gel filtração em coluna Superdex 75	64
4.2.2 Atividade fosfolipásica em placa de 96 poços das frações obtidas em Gel filtração	65
4.2.3 Eletroforese em gel de poliácridamida de frações do veneno obtidas em Gel filtração	66
4.2.4 Cromatografia de troca iônica em Coluna Mono S	68
4.2.5 Cromatografia de troca iônica das frações 11 a 16 SD em coluna Mono Q.....	69
4.2.6 Atividade fosfolipásica em placa de 96 poços das frações obtidas em Cromatografia de troca iônica.....	70
4.2.7 Atividade hemolítica indireta por fosfolipases A2.....	71
4.2.8 Eletroforese em gel de poliácridamida de frações do veneno obtidas em Cromatografia de troca iônica.....	72
4.2.9 Cultura celular e ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> de frações do veneno	73
4.2.10 Ensaio de toxicidade em abelhas com frações obtidas em cromatografia de troca iônica	74
4.2.11 Cromatografia de fase reversa.....	75
4.2.12 Atividade fosfolipásica em placa de 96 poços das frações obtidas em Cromatografia de fase reversa	76
4.2.13 Cromatografia de troca iônica das frações 29 a 33 MQ em coluna Mono Q.....	76

4.2.14 Atividade fosfolipásica em placa de 96 poços das frações obtidas em Cromatografia de troca iônica.....	78
4.2.15 Atividade hemolítica indireta por fosfolipases A2 de frações obtidas em cromatografia de troca iônica	79
4.2.16 Eletroforese em gel de poliacrilamida de frações do veneno obtidas em Cromatografia de troca iônica.....	81
4.2.17 Ensaio de toxicidade em abelhas com frações obtidas em cromatografia de troca iônica	82
4.2.18 Espectrometria de massa	83
5. Discussão	85
6. Conclusões	106
7. Referências bibliográficas	108
Anexo	

1. INTRODUÇÃO

1.1 Variação dos venenos de serpentes

Os venenos de serpentes possuem constituintes inorgânicos e orgânicos, neste último estando em destaque as proteínas, tóxicas e/ou com altas atividades enzimáticas. Essa mistura complexa, com composição extremamente variada, tem por finalidade a obtenção de presas e auxílio à digestão (MEBS, 1999 e CHIPPAUX *et al*, 1991). Cada população de serpentes tem suas particularidades na ação do veneno e a proporção da mistura de componentes e ações biológicas determinadas. Os venenos podem conter uma mistura das seguintes atividades: neurotóxica (pós ou pré-sináptica), cardiotoxica, miolítica, coagulante, anticoagulante, ativadora ou inibidora hemostática, hemorrágica e nefro ou hepatotóxica (CHIPPAUX *et al*, 1991). Estes componentes podem causar sintomas como sangramento, choque, necrose, hemorragia ou paralisia muscular (MEBS, 1978), sendo, geralmente, muito mais ativos em animais homeotermos que em heterotermos (AMARAL, 1925).

Sugere-se que, durante a evolução, as glândulas de veneno primariamente produziam enzimas semelhantes às que eram secretadas pelo pâncreas (KOCHVA, 1987), cuja finalidade básica seria o auxílio no processo digestivo das serpentes.

Todas as famílias de serpentes possuem glândulas cefálicas secretoras de substâncias tóxicas, destacando-se os Colubridae, Atractaspidae, Elapidae e Viperidae. Os colubrídeos produzem secreções enzimaticamente ativas na glândula supralabial e de Duvernoy (WEINSTEIN & KARDONG, 1994). Veneno de Atractaspídeos possuem componentes peculiares como sarafoxina e o

polipeptídio cardiotoxina (WOLLBERG *et al*, 1988). Elapídeos são caracterizados pela presença de neurotoxinas de ação pós e pré-sináptica e polipeptídeos cardio-citotóxicos (BRAZIL, 1984).

Nos venenos de Viperídeos são encontradas grandes variedades de proteases, por exemplo: calicreínas, hemorraginas e enzimas que afetam a cascata de coagulação (HARVEY, 1991). Apresentam uma gama ampla e variada de ações biológicas, entre estas: proteólise, coagulação, hemorragia, neurotoxicidade e miotoxidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998).

Esta variabilidade ocorre a níveis interfamília, intergênero, intraespécie e interespécie; devendo ser consideradas também variações individuais, idade, sazonalidade, dieta, habitat, dimorfismo sexual, região geográfica e variabilidade genética (CHIPPAUX *et al*, 1991).

O conhecimento da variação geográfica dos venenos é de extrema importância na composição de antivenenos efetivos e mais específicos (CHIPPAUX *et al*, 1991), nos tratamentos dos acidentes ofídicos em humanos.

ROCHA (1995) realizou estudo sobre a variação intraespecífica do veneno de *Bothrops alternatus* em função da distribuição geográfica e concluiu que o veneno desta espécie apresentou variabilidade individual mais ampla e definida que as variações relacionadas com áreas biogeográficas.

FURTADO (1987) estudou variação de veneno de *Bothrops moojeni* em relação à idade, concluindo que há variações qualitativas e quantitativas dos componentes protéicos nas diferentes idades, que induzem alterações nas atividades biológicas.

Há evidências de que a variação ocorrida no veneno de *Calloselasma rhodostoma* está intimamente relacionada à sua dieta. Sendo a imobilização e

digestão de presas função primária do veneno de viperídeos, somando-se o fato de que animais possuem suscetibilidades diferenciadas ao veneno, DALTRY *et al.*(1996) sugere que a variação geográfica na composição do veneno reflete uma seleção natural para a dieta apropriada à presa local. Os venenos de *C. rhodostoma* nascidas em cativeiro apresentaram padrões eletroforéticos idênticos àqueles de espécimes selvagens providas da mesma localidade que seus pais, apesar de sua alimentação não-natural em cativeiro. Deduziu-se então que a associação veneno/presa é herdada e não induzida pelo meio, demonstrando que a composição do veneno está, possivelmente, sob controle genético.

CHIPPAUX *et al* (1991) ressalta que a variabilidade encontrada entre indivíduos de uma mesma espécie é de extrema importância, evidenciando que, igualmente ao caso anteriormente citado, a composição do veneno encontra-se sob controle genético. Também destaca que a composição do veneno e a manutenção desta são dependentes da efetividade deste veneno à presa específica. A toxicidade do veneno varia em relação aos itens alimentares em algumas espécies, por exemplo: *Micrurus surinamenses*, geralmente piscívoras, possui atividade mais ativa a peixes (AIRD & JORGE DA SILVA, 1991 e JORGE DA SILVA *et al.*, 1991) e *Bothrops insularis*, arbórea, possui efeitos tóxicos quase instantâneos em pássaros (COGO *et al.*, 1993).

A suscetibilidade da presa ao veneno varia, se considerada a morte ou a imobilização desta. Porém as serpentes inoculam uma quantidade muito maior (de cem a mil vezes) que a dose letal, o que causa rapidamente o óbito ou a paralisia. Esta grande quantidade de veneno inoculado dificulta a distinção

entre um veneno ser considerado forte ou fraco. Neste caso, a perda de um componente tóxico pode ser compensada por este mecanismo (MEBS, 1999).

Em grandes populações onde ocorrem cruzamentos livres, a variabilidade individual tende a ser grande, enquanto que em populações pequenas e isoladas a troca gênica é restrita, resultando uma produção de veneno mais homogênea (CHIPPAUX *et al*, 1991).

Para a maioria das serpentes venenosas, possuir uma peçonha potente ou com componentes peculiares não representa uma vantagem alimentar clara, pois serpentes não venenosas também subjugam (por constrição, por exemplo) presas semelhantes com sucesso. Considera-se também que elas se alimentam de uma larga escala de tipos de presas, de invertebrados a mamíferos, e que a presença de veneno, principalmente em viperídeos, proporciona melhor chance de captura de seres maiores e mais pesados. Não são evidentes investigações que demonstrem pressões evolucionárias para a produção de venenos mais potentes devido às presas se tornarem mais resistentes ou se é preciso novos tipos de toxinas para matá-las (MEBS, 1999).

1.2 Isolamento como modelo - favorecimento dos estudos de evolução

Populações de serpentes habitantes endemicamente em ilhas são bom modelo de estudo de evolução, principalmente se comparadas aos parentes do mesmo gênero habitantes do continente (MARQUES *et al*, 2002b). Estas populações merecem atenção especial no que se trata de conservação, pois geralmente ocorrem em áreas exclusivas e restritas (DUARTE *et al*, 1995).

No litoral do estado de São Paulo, na Ilha da Queimada Grande e Arquipélago dos Alcatrazes ocorrem duas espécies de *Bothrops*

aparentemente derivadas de uma espécie ancestral da *Bothrops jararaca* (Wagler, 1824) continental, sendo respectivamente: *B. insularis* e *B. alcatraz* (MARQUES *et al.*, 2002b).

O isolamento destas ilhas costeiras do sudeste do Brasil deu-se provavelmente no Pleistoceno, a 9 mil anos atrás (FURTADO *et al.*, 1992), sendo a *Bothrops* ancestral espécie de hábito semiarbóreo, com dieta generalista. Desenvolvendo-se então duas rotas evolutivas resultando nestas duas espécies insulares (MARQUES *et al.*, 2002b; GRAZZIOTIN *et al.*, 2006). Como resultado da falta de mamíferos *B. insularis* tornou-se fortemente dependente das aves migratórias (passeriformes) que frequentavam a ilha, fato também ao qual se atribui sua predominância arborícola e o desenvolvimento de um veneno mais efetivo para matar aves (AMARAL, 1925; MARQUES *et al.*, 2002b; ZELANIS, 2006).

Figura 1. Esquema de como ocorreu a especiação de *B. alcatraz* (MARQUES *et al*, 2002a).

Já na espécie *B. alcatraz* o veneno de exemplares adultos apresentam características diferentes do de *B. jararaca* Referência Nacional (FURTADO *et al*, 1991), com predominância da ação sobre o sistema hemostático (FURTADO, 2005), similar aos venenos de serpentes juvenis do gênero *Bothrops* (FURTADO *et al.*, 1991). Sendo a dieta de *B. alcatraz* baseada exclusivamente em animais ectotérmicos como lacraias e anfíbios (MARQUES *et al*, 2002b), semelhante a dieta de juvenis de *Bothrops*, pode-se inferir que este veneno apresenta características adaptativas aos itens alimentares.

As principais presas de *B. insularis* e *B. alcatraz*, aves e lacraias, respectivamente, também ocorrem nas dietas das *Bothrops* generalistas, porém com menor frequência (MARQUES *et al*, 2002b). Em ambas ilhas não ocorrem pequenos roedores (AMARAL, 1925; DUARTE *et al.*, 1995; MARQUES *et al.*, 2002b), principal fonte de alimentação de serpentes do gênero *Bothrops* (SAZIMA, 1992; MARTINS *et al.*, 2003).

Geralmente ilhas possuem pequeno suprimento alimentar, o que pode explicar a ausência de mamíferos (MCNAB, 1994). Por outro lado, animais ectotérmicos requerem menor quantidade de recursos, portanto muitos répteis são bons colonizadores de ilhas (CASE, 1983).

Várias espécies de serpentes colonizaram ilhas com sucesso: espécies de *Bothrops* no Caribe (CAMPBELL & LAMAR, 1989) e sudeste do Brasil (DUARTE *et al.*, 1995), *Agkistrodon piscivorus* na costa da Flórida (WHARTON, 1969), várias espécies de cascavéis (CASE, 1983) do Novo Mundo, *Ovophis okinavensis* e *Gloydius sheddaoensis* (JIAN-LI, 1995) na Ásia. Os hábitos generalistas facilitam a ocupação das serpentes do gênero *Bothrops*, e viperídeos em geral nestas regiões (MARQUES *et al*, 2002b).

1.3. Arquipélago de Alcatrazes

1.3.1 Descrição da área

O Arquipélago de Alcatrazes localiza-se no litoral de São Paulo, distando aproximadamente 35 Km da costa e tendo como coordenadas geográficas: 24° 06' S e 45° 42' W (*Figura 2*). É constituído pela Ilha principal: Ilha de Alcatrazes, sendo esta a maior formação (*Figura 3A*); pela Ilha da Sapata, do Paredão, do Porto (ou do Farol) e Ilha do Sul, além de outras quatro ilhotas não nominadas, cinco lagoes (Dupla, Singela, do Paredão, do Farol e Negra) e dois parcéis (Nordeste e Sudeste) (ÂNGELO, 1989 e MERCADANTE & MOURA, 2005).

Figura 2. Localização geográfica da Ilha da Queimada Grande e Arquipélago de Alcatrazes.

Fonte: Otávio Marques.

A ilha principal eleva-se a 266 m de altitude máxima. Na porção inferior a vegetação predominante é a arbórea e nas partes mais altas encontram-se capoeiras e herbáceas. Em sua porção Nordeste localiza-se o Saco do Funil, cuja declividade pode alcançar 70% (Figura 3B). A linha de costa é totalmente formada por costões rochosos e não há praias (www.alcatrazes.org.br). A formação das pedras é de granito e não se observa presença de barro, areia ou argila, somente depósitos aluviais de húmus preto (LUEDERWALDT & FONSECA, 1923).

A

B

Figura 3. A - Ilha de Alcatrazes, pertencente ao Arquipélago de Alcatrazes (Foto: Fausto P. Campos). **B** - Vista do Saco do Funil (Foto: Lauren Chan).

A área total do Arquipélago é aproximadamente 146,7 hectares enquanto que a da Ilha de Alcatrazes atinge 135,2 hectares (ÂNGELO, 1989). Parte do Arquipélago de Alcatrazes é pertencente à Estação Ecológica Tupinambás (Decreto Federal nº 94.656 de 20/07/87): a ilha do Paredão, as quatro ilhotas e os parciais do NE e SW (ÂNGELO, 1989).

O Arquipélago abriga o maior ninhal de aves marinhas do sudeste brasileiro e é o local onde mamíferos marinhos, baleias-de-bryde (*Balaenoptera edeni*) e golfinhos-pintado (*Stenella frontalis*) encontram refúgio e se alimentam. Foram identificadas 150 espécies de peixes, sendo sua maioria associada ao substrato rochoso. Estão presentes as cinco espécies de tartarugas marinhas ocorrentes no Brasil (www.alcatrazes.org.br e MERCADANTE & MOURA, 2005).

Não há relatos da existência de mamíferos na ilha, com exceção de morcegos (MARQUES *et al.*, 2002b e LUEDERWALDT & FONSECA, 1923). Dentre os répteis ocorrem: o lagarto *Tupinambis teguixim*, bastante frequente, *Mabuya macrorhyncha* e *Hemidactilus mabuia* (lagartixa) (LUEDERWALDT & FONSECA, 1923).

Também ocorre na ilha o elapídeo *Micrurus cf corallinus*, que é encontrado na Floresta Atlântica continental do sudeste do Brasil, possui hábito fossorial e alimenta-se de répteis alongados (MARQUES, 1996); além dos colubrídeos *Dipsas albifrons* e *Siphlophis pulcher*. Espécies de *Dipsas* são arbóreas mas podem forragear e preda caramujos e lesmas no solo. *S. pulcher* possivelmente predam lagartixas no solo, embora também arbórea. Assim, somente *S. pulcher* compete com *B. alcatraz* por alimento (MARQUES *et al.*, 2002b).

1.3.2 Descrição da espécie - *Bothrops alcatraz*

De acordo com MARQUES *et al.* (2002b) as espécies insulares (*B. alcatraz* e *B. jararaca*) se originaram de populações de um ancestral comum de *B. jararaca* da costa brasileira, que pode ter sido isolado durante uma das elevações do nível do mar ocorridas no Pleistoceno. Os resultados apresentados por GRAZZIOTIN *et al.* (2006) corroboram a hipótese de uma origem recente para estas espécies, porém evidenciam que ambas foram derivadas de da própria *B. jararaca* e não de um ancestral de espécie.

Bothrops alcatraz (Figura 4) difere de *Bothrops jararaca* (Figura 5) e *Bothrops insularis* pelas seguintes características: coloração mais escura,

menor tamanho dos adultos, cauda mais curta, cabeça mais longa, escamas cefálicas anteriores arredondadas sem ou com fracas quilhas, menor número de infralabiais (geralmente 10/10), menor número de escamas ventrais e subcaudais (MARQUES *et al.*, 2002b).

Figura 4. *Bothrops alcatraz* (Foto: Otávio Marques).

Figura 5. *Bothrops jararaca*.

Comparando-se à *Bothrops insularis*, espécie também ilhoa e endêmica, a espécie é facilmente distinguida pelo padrão de coloração mais escuro, pelo pequeno porte e o menor número de subcaudais em indivíduos machos (MARQUES *et al.*, 2002b).

Em um estudo realizado por MARQUES *et al.* (2002b) *B. alcatraz* foi encontrada ativa no solo e em vegetação baixa na floresta Atlântica que cobre a ilha. As presas predominantemente encontradas em seu intestino foram lacraias (*Otostigmus sp*) e lagartixas (*Hemidactylus mabouia* e *Mabuya macrorhyncha*), que são comumente vistas nas porções baixas de árvores e troncos de palmeiras, também em muros de construções antigas. A maioria dos espécimes de *B. alcatraz* foram encontrados perto de poleiros de aves marinhas (*Sula leucogaster* e *Fregata magnificens*), no baixo dossel das árvores, onde no solo forma-se um leito de folhas e há acúmulo de guano, local de fácil encontro de suas principais presas.

Esta espécie é a única que se alimenta em sua maioria de animais ectotérmicos, se não exclusivamente destes (MARTINS *et al.*, 2001), não sendo possível alimentarem-se das aves que ocupam a Ilha devido ao pequeno porte da *B. alcatraz* e o avantajado tamanho dos filhotes de aves que ali nidificam.

O tamanho dos corpos de espécies ilhoas são bastante variados. Esta variação pode ser consequência do tamanho das presas e sua disponibilidade, assim como a presença ou ausência de predadores e competidores (CASE, 1983). O tamanho reduzido dos indivíduos adultos de *B. alcatraz* pode ser devido ao pequeno porte e valor nutritivo de suas presas (MARQUES *et al.*, 2002b).

Embora predem lagartixas, nem filhotes nem adultos possuem extremidade de cauda diferenciadas, característica presente em todas as espécies de *Bothrops* continentais, servindo para atrair presas como rãs e pequenos lagartos (engodo caudal) (MARTINS *et al.*, 2001).

O período de recrutamento de juvenis de *B. alcatraz* pode ser similar ao da maioria das espécies de *Bothrops*, cujos nascimentos ocorrem entre janeiro e maio (ALMEIDA-SANTOS & SALOMÃO, 2001). Sua fecundidade provavelmente é menor devido a seu reduzido tamanho (MARQUES *et al.*, 2002b).

A espécie *B. alcatraz* está incluída na categoria Criticamente Em Perigo, critério B1 e B2c da IUCN Lista Vermelha Das Espécies Ameaçadas (IUCN, 2002 <<http://www.redlist.org>>), justamente por seu endemismo e pelo uso de parte da ilha como alvo de canhões para treinamentos da Marinha Brasileira.

Esta situação representa uma ameaça à jararaca de Alcatrazes e aos outros seres vivos habitantes da Ilha (MARQUES *et al.*, 2002b).

1.3.3 Dados preliminares do veneno

Este veneno, segundo FURTADO (2005), possui baixa toxicidade em roedores, baixa atividade hemorrágica, elevada atividade proteolítica sobre caseína e intensa atividade coagulante sobre plasma e fibrinogênio, sendo estas características aproximadas aos dos venenos de filhotes de jararacas continentais.

As propriedades e composição do veneno de *B. alcatraz* demonstram provavelmente adaptação ao tipo de presa, assim como uma relação foi encontrada entre a dieta e composição do veneno de algumas espécies de *Bothrops* e/ou fases ontogenéticas (ANDRADE & ABE, 1999; ANDRADE *et al.*, 1996 e FURTADO *et al.*, 1991).

Estudos preliminares eletroforéticos demonstram a presença particular de três bandas proteicas, com pesos moleculares 20 kDa, 40 kDa e 60 kDa, conforme visualizado na *Figura 6* (FURTADO, 2005).

Figura 6. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE dos venenos individuais de *Bothrops alcatraz* (1 a 4), *Bothrops jararaca* referência nacional (5) e os padrão de peso molecular. Setas à esquerda indicam bandas protéicas que não estão presentes no veneno de *B. jararaca*.

A comprovada existência de diferenças qualitativas e quantitativas nos venenos de *B. alcatraz* e *B. jararaca* (FURTADO, 2005), induz a proposta de investigar a composição do veneno de *B. alcatraz* avaliando os possíveis aspectos coevolutivos do veneno com a dieta desta espécie.

2. Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo estudar o veneno da serpente *B. alcatraz*, espécie endêmica e ilha, isolando cromatograficamente as frações do veneno. Resultados indicam no veneno de *B. alcatraz* a presença de ação neurotóxica específica a artrópodes, se comparado com o veneno de *B. jararaca*, o que sugere a ação de uma fosfolipase A2. Com a identificação de ações biológicas e enzimáticas desta toxina pode-se tentar traçar relações com a evolução de toxinas e possibilidade de adaptação às presas alimentares.

3. Material e Métodos

3.1 Veneno total

a. Venenos. “Pools” de venenos das espécies *Bothrops jararaca* referência e *Bothrops alcatraz*, coletados e liofilizados, produzidos pelo Laboratório de Herpetologia - Venenos do Instituto Butantan foram utilizados. As amostras de venenos foram armazenadas a -20°C até o momento de uso.

b. Dosagem de proteínas totais. Foi realizada reação fenólica pelo Método colorimétrico de LOWRY *et al.* (1951), modificado por MARKWELL *et al* (1978). Inicialmente foi determinada uma curva padrão de albumina bovina como referência, sendo aferida através de regressão linear para a obtenção de uma equação para a absorbância ($y = 0,0026x + 0,406$; $R^2 = 0,9958$). Com os valores de absorbância, nas concentrações de 100 e 200 μg , foram calculadas as concentrações de proteína nas amostras. Após realizou-se leitura em espectrofotômetro a 660 nm.

c. Perfil eletroforético. Separação das proteínas foi realizada por SDS-PAGE, conforme método de LAEMMLI (1970). A preparação dos géis foi realizada com equipamento da Pharmacia: cuba, placas e fonte (padronizada para a voltagem máxima de 494 V e miliamperagem 80mA). A montagem do gel, em gradiente, foi realizada em duas placas de vidro com medidas 18 x 16 cm, nas concentrações de 7,5% a 17,5%. Em cada poço aplicou-se 30 µl da solução de veneno diluído, na concentração de 120 µg/ml, em tampão de amostra com a adição de 2,0 µl de Mercapto-etanol. No gel foram aplicadas: amostras diluídas do veneno de *B. jararaca* referência, *B. alcatraz* e uma amostra de Baixo Peso Molecular (LMW – Low Molecular Weight, Pharmacia). Vide Tabela 1. A coloração utilizada foi Comassie Brilliant Blue R-250 (SIGMA, St. Louis, USA).

Tabela 1. Padrão de peso molecular LMW-Pharmacia.

Baixo peso molecular	
	subunidade (kDa)
Fosforilase b	94,0
Albumina sérica bovina	67,0
Ovoalbumina	43,0
Anidrase carbônica	30,0
Inibidor de tripsina de soja	20,1
α-lactoalbumina	14,4

- *Preparo das soluções*

Tampão de concentração - pH 6,8 (0,25 M)

Tris (Riedel-de Haën-Alemanha) ----- 7,575 g

SDS (Sigma-USA) ----- 0,50 g

H₂O destilada q.s.p. ----- 250 ml

HCl (Merck-Brasil) para ajuste de pH.

Tampão de separação- pH 8,8 (0,75 M Tris)

Tris ----- 22,725 g

SDS ----- 0,50 g

H₂O destilada q.s.p. ----- 250 ml

HCl para ajuste de pH.

Acrilamida - Bis-acrilamida

Acrilamida (Sigma-USA) ----- 37,5 g

Bis-acrilamida (Sigma-USA) ----- 1,0 g

Glicerol (Merck-Brasil) ----- 25,0 ml

H₂O destilada q.s.p. ----- 100 ml

Tampão de corrida- pH 8,3

Tris (0,025 M) ----- 18,18 g

Glicina (0,192 M) (Reagen- Brasil) ----- 86,40 g

SDS (0,1%) ----- 6,0 g

H₂O destilada q.s.p. ----- 6000 ml

HCl para ajuste de pH.

Tampão de amostra- 0,0625 M- Tris HCl- pH 6,8

Tampão de concentração (0,25 M)- pH 6,8	5,0 ml
SDS (10%)	4,0 ml
Glicerol	4,0 ml
Azul de Bromofenol (Inlab-Brasil)	2,0 ml
H ₂ O destilada q.s.p.	19,0 ml
Mercapto-etanol (5%) (Merck-Brasil)	50,0 µl/ 950 µl de solução

Outros reagentes:

Persulfato de amônio 10% (LKD Bromma-Suécia) e N,N,N',N'-tetrametil 1,2-diamino metano (TEMED) (Sigma-USA).

• *Reagentes para géis*

Gel 7,5%

Acrilamida/bis	3,0 ml
Tampão de separação (0,75 M- pH 8,8)	7,5 ml
Persulfato de amônio 10%	75 µl
TEMED	7,5 µl
H ₂ O destilada q.s.p.	4 ml + 420 µl

Gel 17,5%

Acrilamida/bis	7,0 ml
Tampão de separação (0,75 M- pH 8,8)	7,5 ml

Persulfato de amônio 10% -----	75 µl
TEMED -----	7,5 µl
H ₂ O destilada q.s.p. -----	420 µl

Overlay

H ₂ O destilada q.s.p. -----	3,0 ml
Tampão de separação (0,75 M- pH 8,8) -----	1,0 ml

Gel de concentração

Acrilamida/bis -----	1,07 ml
Tampão de concentração (0,25 M- pH 6,8) -----	5,0 ml
Persulfato de amônio 10% -----	52 µl
TEMED -----	6,0 µl
H ₂ O destilada q.s.p. -----	3,875 µl

- *Coloração, descoloração, secagem e fixação*

Solução corante

Etanol (Merck-Brasil) -----	450 ml
Ácido acético (Synth-Brasil) -----	100 ml
H ₂ O destilada q.s.p. -----	450 ml
Corante Comassie brilliant blue R-250 (Merck-Brasil) -----	5 g (5g/l)

Solução descorante

Etanol -----	450 ml
Ácido acético -----	100 ml

H₂O destilada q.s.p. ----- 450 ml

Solução descorante e fixante

Metanol (Reagen-Brasil) ----- 150 ml

Ácido acético ----- 50 ml

Formol ----- 250 µl

Completar para 500 ml com H₂O destilada.

Solução secante

Metanol ----- 250 ml

Ácido acético ----- 50 ml

Completar para 500 ml com H₂O destilada.

d. Zimografia em gel de poliacrilamida com SDS. Para a verificação da presença de proteases nas amostras utilizou-se o método de HEUSSEN & DOWDLE (1980) com modificações. Foram utilizados géis (10 X 7 cm X 0,75 mm) na concentração 10 % de poliacrilamida co-polimerizado com gelatina 1 %. A eletroforese foi realizada em voltagem 100 V, corrente 40 mA, sob condições não redutoras e em temperatura 4^o C. Após a corrida o gel foi lavado em solução tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 + 2,5 % detergente Triton X-100 por 30 minutos. Em seguida lavado em solução tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 por 10 minutos. Utilizou-se o Triton X-100 na primeira lavagem para a remoção do SDS presente no gel, e a segunda lavagem para a remoção do Triton X-100. Após este procedimento os géis foram mantidos em solução tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 + CaCl₂ 10 mM + NaCl 200 mM e incubados a 37^o C por 3

horas. Os géis foram corados com Comassie Brilliant Blue R-250 (SIGMA, St. Louis, USA), utilizando-se o mesmo processo usado na coloração para SDS-PAGE, porém descoloriu-se até o surgimento das bandas com atividade proteolítica, regiões mais claras no gel.

3.1.1 Atividades bioquímicas

3.1.1.1 Atividade proteolítica sobre caseína. Para sua determinação se utilizou o método de LOMONTE & GUTIÉRREZ (1983). Determinam-se as concentrações de veneno a serem utilizadas a partir de uma curva inicial de 50 a 400 µg de veneno. Um mililitro da solução de caseína 1% é adicionada a 1 ml da amostra do veneno, em duas diferentes concentrações: 100 e 200 µg/ml em solução salina 0,85%. As amostras são incubadas por 30 minutos a 37° C. As reações são interrompidas com a adição de 3,0 ml de ácido tricloroacético a 5%. Os tubos são mantidos em repouso em temperatura ambiente por 30 minutos. A seguir centrifuga-se o material por 10 minutos a 3000 rpm (centrífuga Incibrás- Spin VI) e lê-se a absorbância do sobrenadante a 280 nm (espectrofotômetro Micronal- modelo B382), usando como “branco” amostra onde o veneno é substituído por solução fisiológica salina (0,85%). Testa-se em triplicata cada solução de veneno. A unidade caseinolítica foi expressa em unidades por mg de veneno, a ser obtida pela fórmula:

$$\text{U/mg} = A_{280\text{nm}} \times 100/\text{mg de veneno}$$

3.1.1.2 Atividade coagulante em plasma humano. Foi registrado o tempo de coagulação de 200 µl de plasma humano citratado (citrato de sódio 3,8% e sangue, na proporção 1:9; separação do plasma por centrifugação a

4000 rpm, por 15 min) preparado pelo método de THEAKSTON & REID (1983) incubado a 37°C com 100 µl de veneno ressuspendido em solução salina 0,85% na concentração final 1mg/ml, em diferentes diluições (*B. jararaca*- 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 e 1:128 e *B. alcatraz*- 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512 e 1:1024). Foi determinada a Dose Mínima Coagulante (DMC-P) que consiste na menor quantidade de veneno capaz de coagular uma solução teste de plasma humano em 60 segundos a 37° C. O teste foi realizado em triplicata, utilizando-se o Fibrômetro BBL Fibrosystem, Becton Dickinson, Mrylans USA.

3.1.1.3 Atividade hialuronidásica. Determinada segundo o método de FERRANTE (1956) modificado por PUKRITTAYAKAMEE *et al.* (1988). A mistura consiste de 400 ml de acetato de sódio 200 mM (pH 6,0), 100 ml de ácido hialurônico (0,5 mg/ml) dissolvido em de acetato de sódio 200 mM, e 2 ml de solução de veneno dissolvido em Na₂HPO₄/ H₃PO₄ (solução tampão) 50 mM com NaCl 150 mM (pH 7,0). O volume de 500 ml de tampão constitui o “branco” com 0% de turbidez e o substrato com tampão, sem veneno, o “branco” com 100% de turbidez. Incubam-se os tubos experimentais e os “brancos” por 15 minutos a 37° C e após adiciona-se 1 ml de 2,5% brometo de cetil-trimetil-amônio em 2% de NaOH. A absorbância é lida a 400 nm em espectrofotômetro contra o “branco” de 0% de turbidez (500 µl de tampão acetato + 1ml de brometo de cetil-trimetil-amônio). Onde não existe atividade utiliza-se o “branco” 100% de turbidez (100 µl de ácido hialurônico + 400 µl de tampão + 1m de brometo de cetil-trimetil-amônio). Utiliza-se duplicata para análise das amostras. A atividade específica foi determinada utilizando – se a

relação *Unidade de Redução de Turbidez (URT) / Concentração do veneno em miligramas*:

$$URT^* / \text{concentração de veneno (mg)} \quad U/\text{mg}$$

* URT (Unidade de redução de turbidez) = 1U = 50% de hidrólise do ácido hialurônico. Absorbância onde se verifica a redução de 50% de turbidez da solução de ensaio.

3.1.1.4 Atividade fosfolipásica. Para a determinação da atividade fosfolipásica utilizou-se o método de HOLZER & MACKESSY (1996) onde 100µl de uma amostra de veneno diluída em solução salina 0,85% é misturada a um tampão (10mM Tris pH 8.0 + 10mM CaCl₂ + 100mM NaCl) completando uma solução para 1 ml. Posteriormente é adicionado 100µl do substrato ácido benzóico 4-nitro-3 (octanoyloxy) diluído em acetonitrila a 0.3mM. O material é agitado e incubado por 10 minutos a 37°C. Para o bloqueio da reação os tubos são colocados em banho de gelo são adicionados 100µl de Triton X-100 a 2,5%. O material deve ser agitado e incubado a temperatura ambiente por 10 minutos e realizadas as leituras em espectrofotômetro a 425nm. Como controles positivos utilizaram-se 200 µg dos venenos de *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops jararacussu*. A atividade específica é expressa em nmoles/min/mg de veneno, utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Absorbância 425 nm} \times 25,8 / \text{quantidade de veneno (mg)}$$

3.1.2 Atividades biológicas

As coletas de *Otostigmus sp* e *Hemidactilus mabuia* realizadas na Ilha tiveram licença prévia concedida pelo IBAMA (Processo n° 02001,005069/05-68; Licença n° 212/2005). Os ensaios realizados com animais foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética Animal do Instituto Butantan, sob o protocolo 158/2004.

3.1.2.1 Animais

a. Baratas. Foram utilizados exemplares machos de baratas da espécie *Blatta orientalis*, da mesma idade, provenientes do Biotério de Artrópodes do Instituto Butantan, pesando aproximadamente 600 mg.

b. Camundongos. Camundongos machos albinos (*Mus musculus* Linnaeus, 1758), pesando de 18 a 22 g, foram utilizados na determinação das atividades letal, hemorrágica e miotóxica. Estes foram cedidos pelo Biotério Geral do Instituto Butantan.

c. Abelhas. Abelhas recém eclodidas fornecidas pelo apiário pertencente à associação APACAME, pesando aproximadamente 80 mg, foram utilizadas no monitoramento das atividades.

d. Grilos. Foram utilizados exemplares de grilos da espécie *Grillus assimilis*, da mesma idade, provenientes do Biotério de Artrópodes do Instituto Butantan, pesando aproximadamente 180 mg.

e. Lacraias. Foram utilizadas lacraias da espécie *Otostigmus sp* provenientes da Ilha de Alcatrazes, pesando aproximadamente 400 mg. Também lacraias do gênero *Scolopendra*, pesando aproximadamente 3 g,

provenientes do Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan, cedidas pelo Dr. Rogério Bertani.

f. *Lagartixas*. Foram utilizadas lagartixas da espécie *Hemidactylus mabuia* provenientes da Ilha de Alcatrazes, pesando aproximadamente 5 g.

3.1.2.2 Dose Letal Média (DL50) em camundongos. Para a determinação da atividade tóxica dos venenos foram preparadas soluções com diluições crescentes de veneno. Para tal foram utilizados como modelo experimental camundongos da linhagem Swiss, pesando 18 – 22 g, inoculados por via intra peritoneal (0,5 ml da solução de veneno nas diferentes concentrações) e observados por um período de 24 horas e 48 horas. A DL50 foi calculada pela análise de probitos (FINNEY, 1971), usando-se o número total de camundongos mortos por dose de veneno durante o período de observação (SILES VILLARROEL *et al.*, 1978/9). Dose Letal Média (DL50) é definida como a quantidade de veneno responsável pela morte de 50% de animais analisados.

3.1.2.3 Atividade hemorrágica. Essa atividade foi quantitativamente determinada pelo método de KONDO *et al.* (1960) modificado por GUTIÉRREZ *et al.* (1985). O 50 µl de solução teste foi injetada intradermicamente região abdominal de camundongos machos da linhagem Swiss (grupo de 4), pesando de 18 a 22 g. O animais foram mortos com gás carbônico, a pele removida 2 horas após e os diâmetros das áreas hemorrágicas medidos pela face interna, em mm². A quantidade mínima de veneno que produz uma área hemorrágica

de 78,5 mm² ou 10 mm de diâmetro é definida como Dose Mínima Hemorrágica (DMH).

3.1.2.4 Atividade miotóxica. Utiliza-se o método de quantificação de níveis séricos da enzima creatino - quinase (CK), que é liberada após uma lesão muscular (GUTIÉRREZ *et al.*, 1980). Esta atividade é avaliada através do ensaio onde se aplica, por via intramuscular, 50 µl da solução de veneno, em concentração de 30 µg/ml, no músculo gastrocnêmio da pata direita de camundongos albinos não isogênicos. O grupo controle é injetado com solução salina 0,85%, sendo esta utilizada para as diluições das amostras de veneno. Amostras de sangue são coletadas após 3 e 6 h, via “plexo ocular”. Obtêm-se o soro por centrifugação (centrífuga Tomy HF-120) por 5 min e imediatamente após quantifica-se os níveis individuais de CK. No doseamento, 5 µl de uma solução (1 parte de soro/ 9 água) de cada soro foram adicionados a 0,25 ml da solução de fosfocreatina, sendo que no “branco” adiciona-se água destilada ao reagente. Incuba-se por 15 min em banho - maria a 37° C. Após adiciona-se 0,1 ml da solução de ADP- Glutathione e incuba-se as amostras por 30 min à temperatura ambiente. Para interromper a reação adiciona-se 0,1 ml da solução de p- hidroximercuribenzoato. Em seguida se adiciona 0,5 ml de a-naphtol em cada tubo, 0,5 ml de solução de Diacetyl e 3,5 ml de água destilada. Para a reação enzimática ocorrer os tubos devem ser colocados em banho - maria a 37° C por 30 min, centrifugados a 3000 rpm (Centrífuga Incobrás - Spin VI) por 5 min à temperatura ambiente e as absorbâncias dos sobrenadantes são lidas em espectrofotômetro (Micronal- modelo B382) a 520 nm. A atividade CK é calculada através de uma curva de calibração, seguindo-

se instruções do protocolo da SIGMA - Kit 520. Utiliza-se então o Programa KaleidaGraph para a determinação de uma reta de regressão linear, sendo os dados de Densidade Óptica (D.O.) substituídos e os resultados expressos em unidades/ml (U/ml). Para este método utilizam-se Kits da SIGMA Diagnostics (USA) - Creatine Phosphokinase (CK) - Quantitative Colorimetric Determination in Serum or Plasma at 500-540 nm - Procedure 520. As soluções são preparadas da seguinte maneira: Fosfocreatina- adiciona-se 15 ml da solução tampão Trizma; ADP-Glutationa- adiciona-se 6 ml de água destilada; a- Naphtol- adição de 10 ml de Alkali solução; Diacetyl- é adicionado 0,1 ml de Diacetyl em 200 ml de água destilada; Padrão de creatina- adiciona-se 10 ml de água destilada e soro- preparadas na proporção 1/9 (180 ml de água destilada por 20 ml de soro).

3.1.2.5 Atividade edematogênica. Para a determinação da atividade edematogênica dos venenos utiliza-se o método de YAMAKAWA *et al* (1976), com algumas modificações, segundo FURTADO *et al* (1991). Cinética - grupos de 6 camundongos albinos, machos, pesando 18-22 g são injetados 50 µl no coxim plantar das patas traseiras. Na pata direita, “experimental”, é injetado o veneno e na esquerda, “controle”, solução fisiológica salina (0,15M NaCl) estéril. A espessura dos coxins é medida utilizando-se de um especímetro (Mitutoy, sensibilidade de 0,01-9,0 mm) nos tempos de 30 min, 1h, 2h, 3h, 6h, 12h e 24h após a inoculação. O edema é expresso pela diferença entre os aumentos de espessura entre as patas “experimental” e “controle” dividida pela medida da pata “controle” e multiplicado por 100. Com estes dados constrói-se um gráfico “Porcentagem de edema (aumento da espessura da pata)” X

“Tempo”.

Para o cálculo da Dose Mínima Edematogênica (DME) define-se a menor dose necessária de veneno para a formação de um edema de 30% na pata “experimental”. Para sua determinação usa-se o mesmo método acima, porém com doses diferentes de veneno e realizando-se a medida 3h após a inoculação.

3.1.3 Ensaios de toxicidade em modelos biológicos ectotérmicos

3.1.3.1 Ensaio de toxicidade em abelhas. Injetou-se, com auxílio de uma microseringa Hamilton (de 5 µl), um volume de 2 µl contendo 20 ng de veneno total de *B. jararaca* e *B. alcatraz* na lateral do tórax de abelhas (*Apis mellifera*) recém eclodidas, pesando aproximadamente 90 mg. Estas foram então mantidas em caixas, em grupos de 4 animais, a 37°C, umidade 65-70%, com disponibilidade de alimento (5 partes de açúcar para 1 de mel) e água. No grupo controle injetou-se solução salina. Após as inoculações os animais foram observados pelo período de 24 horas e seu comportamento anotado periodicamente para posterior análise. Modificado de MANZOLI-PALMA *et al.* (2003).

3.1.3.2 Ensaio de toxicidade em grilos. Injetou-se, com auxílio de uma microseringa Hamilton (de 5 µl), um volume de 2 µl contendo 40 ng e 80 ng de veneno de *B. jararaca* e *B. alcatraz* na lateral do tórax de grilos da espécie *Grillus assimilis*, pesando aproximadamente 190 mg. Estes foram mantidas em caixas, em grupos de 5 animais/ dose, a 37°C, umidade 65-70%, com disponibilidade de ração e água. No grupo controle injetou-se solução salina.

Após as inoculações os animais foram observados e seu comportamento anotado periodicamente para posterior análise. Modificado de MANZOLI-PALMA *et al.* (2003).

3.1.3.3 Ensaio de toxicidade em lacraias. Injetou-se, com auxílio de uma microseringa Hamilton (de 5 µl), um volume de 2 µl contendo 100 ng de veneno/ 0,4 g massa do animal, de *B. jararaca* e *B. alcatraz* no terço terminal do corpo de lacraias (*Otostigmus sp*), proveniente da Ilha de Alcatrazes, pesando aproximadamente 400 mg; e lacraias do Gênero *Otostigmus*, pesando aproximadamente 3 g, em repetição ao mesmo experimento. Estas foram mantidas em caixas, a 37°C, umidade 65-70%, com disponibilidade de água (algodão embebido). No grupo controle injetou-se solução salina. Após as inoculações os animais foram observados e seu comportamento anotado periodicamente para posterior análise. Modificado de MANZOLI-PALMA *et al.* (2003).

3.1.3.4 Ensaio de toxicidade em lagartixas. Injetou-se, com auxílio de uma microseringa Hamilton (de 5 µl), um volume de 2 µl contendo 1,5 µg de veneno de *B. jararaca* e *B. alcatraz* na lateral do abdome de lagartixas (*Hemidactilus mabuia*), proveniente da Ilha de Alcatrazes, pesando aproximadamente 5 g. Estas foram mantidas em caixas, a 37°C, umidade 65-70%, com disponibilidade de água. No grupo controle injetou-se solução salina. Após as inoculações os animais foram observados e seu comportamento anotado periodicamente para posterior análise. Modificado de MANZOLI-PALMA *et al.* (2003).

3.1.3.5 Ensaio de toxicidade em baratas. Injetou-se, com auxílio de uma microseringa Hamilton (de 5 µl), um volume de 4 µl contendo 120 ng de veneno de *B. jararaca* e *B. alcatraz* no terço inicial da lateral do tórax de baratas da espécie *Blatta orientalis*, pesando aproximadamente 600 mg. Estes foram mantidas em caixas, em grupos de 5 animais/ dose, a 37°C, umidade 65-70%, com disponibilidade de ração e água. No grupo controle injetou-se solução salina. Após as inoculações os animais foram observados e seu comportamento anotado periodicamente para posterior análise. Modificado de MANZOLI-PALMA *et al.* (2003).

3.2 Cromatografia – Fracionamento do veneno de *B. alcatraz*

3.2.1 Gel filtração em coluna Superdex 75. Realizada em coluna Superdex 75, em sistema FPLC, equilibrada com a solução tampão Bicarbonato de amônia NH_4HCO_3 0,2 M, pH 8,0. O fluxo utilizado foi de 0,5 ml/min e o volume final de coleta foi 1 ml. Aplicou-se 20 mg de veneno ressuspensos em 1 ml do tampão. As amostras foram monitoradas em $\lambda 280$ nm.

3.2.2 Cromatografia de troca iônica em coluna Mono S. Realizada em coluna de troca catiônica Mono S, utilizando-se tampão fosfato de sódio 0,10 M pH 7,0, eluição realizada em gradiente linear de NaCl 2 M, em sistema FPLC, sob fluxo de 1 ml/min. As amostras fracionadas foram liofilizadas e conservadas em temperatura de -20°C.

3.2.3 Cromatografia de troca iônica em coluna Mono Q. Realizada em coluna de troca aniônica Mono Q equilibrada com a solução Tris - HCl 0,05 M, pH 8,5. A eluição foi realizada em gradiente linear de NaCl 2 M em sistema FPLC, sob fluxo de 1 ml/min. As amostras fracionadas foram liofilizadas e conservadas em temperatura de -20° C.

3.2.3.4 Atividade fosfolipásica em placa de 96 poços de frações do veneno. Para esta determinação utilizou-se o método de HOLZER & MACKESSY (1996) modificado para placas de 96 poços. Foram colocados nos poços da placa 20 µl da amostra, ressuspendido em solução salina 150 nM; 20 µl do substrato para fosfolipase (substrato ácido benzóico 4-nitro-3 (octanoyloxy) diluído em acetonitrila a 0.3mM) e 100 µl da solução tampão para fosfolipase (10mM Tris pH 8.0 + 10mM CaCl₂ + 100mM NaCl). Como branco aplicam-se todos os componentes exceto a amostra. A placa é homogeneizada e incubada por 20 minutos a 37°C. Para o bloqueio da reação utiliza-se banho de gelo e são adicionados 20µl de Triton X-100 a 2,5%. O material deve ser agitado e incubado a temperatura ambiente por 10 minutos e realizadas as leituras em aparelho leitor de placas de ELISA em λ425nm. A atividade específica é expressa em nmoles/min/mg de veneno.

3.2.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida de frações do veneno. Separação das proteínas e análise do fracionamento foi realizada por SDS-PAGE, conforme método de LAEMMLI (1970). A preparação dos géis foi realizada com equipamento da Pharmacia: cuba, placas e fonte (padronizada para a voltagem máxima de 494 V e miliamperagem 80mA). A montagem do

gel, em gradiente, foi realizada em duas placas de vidro com medidas 18x16 cm, nas concentrações de 10% a 20%. Em cada poço foram aplicados 30 µl da solução fração, em concentrações variadas, em tampão de amostra adicionado de 2,0 µl de β-Mercapto-etanol. No gel foram aplicadas: frações do veneno de *B. alcatraz*, veneno total de *B. alcatraz*, veneno total de *B. jararaca* como parâmetro de comparação e uma amostra de Baixo Peso Molecular (LMW - Pharmacia). A coloração foi realizada segundo método de Vorum - Mann (2000), com nitrato de prata. Fixa-se o gel em solução 50% Metanol, 12% Ácido Acético e 0,05% Formalina por 2 a 18 horas. Lava-se o gel por 3 vezes em solução 35% Etanol, por 20 minutos cada. Sensibiliza-se com solução 0,02% Tiosulfato de sódio. Lava-se com água destilada 3 vezes de 5 minutos cada. Adiciona-se solução 0,2% Nitrato de prata e 0,076% Formalina. Lava-se novamente com água destilada 2 vezes por 1 minuto cada. Para a revelação das bandas protéicas utiliza-se a solução 6% Carbonato de sódio, 0,05% Formalina e 0,0004% Tiosulfato de sódio. Para bloquear a reação utilizou-se 50% Metanol e 12% Ácido acético. Para armazenagem após coloração utiliza-se a solução 1% ácido acético/ água destilada.

3.2.6 Atividade hemolítica indireta por fosfolipases A2. De acordo com GUTIÉRREZ *et al.* (1988) modificado de HABERMANN & HARDT (1972), coleta-se o sangue humano com seringa citratada. Centrifuga-se o sangue por 10 minutos a 1500 rpm. Descarta-se o plasma. Lava-se com solução fisiológica salina 0,15 M por 4 vezes. Prepara-se a solução: 0,3 ml de papa de hemácias + 0,3 ml de gema de ovo diluído 1:4 em solução salina 0,15 M + 0,25 ml CaCl 0,01 M. Junta-se a esta a solução de agarose 0,8 % (em 50 ml PBS pH 7,4) e

aplica-se em placas de Petri. Faz-se 9 furos na placa, distantes aproximadamente 3 cm. Aplicam-se as amostras. Os resultados são representados pelo raio (cm) do halo de hemólise formado.

3.2.7 Cultura celular. Utilizaram-se células C2C12 (ATCC CRL-1772), linhagem murina de mioblastos capaz de unir-se ou diferenciar-se em miotúbulos. As células foram acondicionadas em frascos apropriados contendo meio de congelamento [10% de DMSO (Dimetil-Sulfóxido MERCK), 40% de Soro Fetal Bovino (FCS; Sigma F-2442), e 50% de meio RPMI (1640 Medium - Sigma)]. A ampola retirada do nitrogênio líquido foi colocada em banho-maria 37°C por 3 minutos. Adicionou-se 10 ml de meio DMEM, após homogeneização e centrifugou-se por 5 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas e transferidas a uma garrafa de 25cm², onde foram rotineiramente crescidas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB (soro fetal bovino), 1% de L-Glutamina, 1% de Gentamicina-Streptomicina e 2 g de bicarbonato de sódio; em uma atmosfera umedecida em 5% de CO₂, a 37° C. Após atingirem semiconfluência as células foram submetidas ao descolamento adicionando-se 1,5 ml de tripsina e levadas à estufa por 3 minutos. Adicionou-se 5 ml de meio DMEM na garrafa para inativação da ação da tripsina. O conteúdo foi passado para um tubo falcon (15 ml) e centrifugado por 5 minutos a 1500 rpm. O pellet foi ressuspensado em 10 ml de PBS (tampão fosfato salina) e 20 µl foram colocados na câmara de Neubauer para contagem. As células foram novamente centrifugadas, ressuspensas em meio DMEM e semeadas em microplacas de 96 poços em densidade inicial de $1-4 \times 10^4$ células/ poço, em 150 µl do mesmo meio. Depois de próximo á

confluência, após 3 a 5 dias, o meio de crescimento foi substituído por meio de diferenciação: DMEM suplementado com 1% de Soro Fetal Bovino (Lomonte, 1999). Após 4-6 dias de cultura uma vasta proporção de miotúbulos multinucleados foi observada, sendo estas células então utilizadas nos ensaios de citotoxicidade. Para fins de comparação, células não diferenciadas também foram ensaiadas, visando averiguar se a diferenciação celular influía na sensibilidade do ensaio.

3.2.8 Ensaio de citotoxicidade in vitro de frações do veneno. Método de LOMONTE *et al* (1999). Nos poços da placa, já com as células crescidas e diferenciadas, adicionou-se 10 µg de veneno total de *B. alcatraz*, veneno total de *B. jararaca*, as frações obtidas por cromatografia de troca iônica, controle positivo (PBS + meio de cultura) e controle negativo (Triton 0,1%). O volume aplicado em cada poço foi 150 µl e as amostras foram previamente ressuspendidas em meio de cultura. As preparações foram feitas em duplicata. A placa foi incubada por 4 horas a 37°C. Realizou-se ensaio para quantificação da liberação de LDH (desidrogenase láctica) intracelular, por ruptura de membranas celulares, seguindo-se protocolo e kit LABTEST.

3.2.9 Ensaio de toxicidade em abelhas com frações obtidas em cromatografia de troca iônica. Injetou-se, com auxílio de uma microseringa Hamilton (de 5 µl), um volume de 2 µl contendo 20 ng de frações do veneno de *B. alcatraz*, após cromatografia de troca iônica em coluna Mono Q, na lateral do tórax de abelhas (*Apis mellifera*) recém eclodidas, pesando aproximadamente 90 mg. Estas foram então mantidas em caixas, em grupos de 4 animais, a

37°C, umidade 65-70%, com disponibilidade de alimento (5 partes de açúcar para 1 de mel) e água. No grupo controle injetou-se solução salina. Após as inoculações os animais foram observados e seu comportamento observado e anotado periodicamente para posterior análise. Modificado de MANZOLI-PALMA *et al.* (2003).

3.2.10 Cromatografia de fase reversa. Realizada em coluna de fase reversa utilizando-se os tampões (1) TFA (ácido trifluoracético) 50mM (500 µl qsp 1L) e (2) TFA 50 mM (500 µl)+ acetonitrila qsp 1L. A corrida foi realizada em sistema HPLC, sob fluxo de 1 ml/min.

3.2.11 Espectrometria de massa. Os componentes isolados foram submetidos à análise por espectrometria de massa ESI-MS utilizando-se o equipamento Finningam LCQ Duo Mass (Thermo Quest, EUA) disponível no ICB-2, Laboratório de Parasitologia - USP.

3.2.12 Análise estatística dos resultados. As comparações entre os grupos amostrais foram realizadas por análise de variância (ANOVA). Quando significativo utilizaram-se o teste de Tukey para comparações múltiplas e teste - T para comparações entre duas amostras. Utilizou - se o programa estatístico MINITAB 13 (BUSSAB & MORETTIN, 1986; NETER *et al*, 1996). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4. Resultados

4.1 Veneno total

a. Dosagem de proteínas totais

Tanto o veneno de *B. alcatraz* quanto o de *B. jararaca*, utilizado como modelo de comparação, apresentaram teores protéicos de $1030 \pm 0,05$ μg de proteína por mg de veneno (vide *Tabela 2* e *Figura 7*). Segundo o teste estatístico T a diferença entre ambos não foi significativa ($P = 0,655$; intervalo de confiança 95%).

Tabela 2. Teor proteico (μg de proteína por mg de veneno) dos venenos de *B. alcatraz* e *B. jararaca*. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão.

<i>Espécie</i>	Teor proteico (μg proteína/ mg veneno)
<i>B. alcatraz</i>	$1,02 \pm 0,05$
<i>B. jararaca</i>	$1,03 \pm 0,10$

Figura 7. Teor proteico dos venenos de *B. alcatraz* e *B. jararaca* (μg / mg veneno).

b. Perfil eletroforético

O *perfil eletroforético* realizado sob condições redutoras e não redutoras do veneno de *B. alcatraz* apresentaram bandas proteicas diferenciais se comparado ao veneno de *B. jararaca*. Nota-se no perfil do veneno de *B. alcatraz* bandas exclusivas de aproximadamente 67, 43 e 40 kDa e grande concentração de proteínas nas regiões de 60 e 14 kDa (*Figura 8*). Sob condições não-redutoras, no veneno de *B. alcatraz*, observou-se a presença de bandas proteicas na região de aproximadamente 94 kDa, não visualizadas no perfil submetido a redução com β - mercapto - etanol. Observou-se também grande concentração de proteínas nas regiões de aproximadamente 60, 40 e

25 kDa. A faixa de 14 kDa apresentou bandas, porem em menor intensidade se comparado ao perfil reduzido. O veneno de *B. jararaca*, sob condições não redutoras, apresentou bandas proteicas majoritárias nas faixas de aproximadamente 94, 45 e 30 a 20 kDa, e bandas de 60, 25 e abaixo de 20 em condições redutoras, como pode ser verificado na *Figura 8*.

Figura 8. Eletroforese em gel de gradiente (7,5 - 17,5 %) de poliacrilamida em condições redutoras e não redutoras. Foram aplicados 120 µg de veneno/ poço. Ba = veneno total de *Bothrops alcatraz*; BaR = veneno total de *B. alcatraz* sob condições redutoras; Bj = veneno total de *Bothrops jararaca*; BjR = veneno total de *B. jararaca* sob condições redutoras e PM = Padrão de peso molecular.

c. Zimografia em gel de poliacrilamida com SDS

No veneno de *B. alcatraz* pode-se verificar a presença de proteases degradadoras de gelatina na faixa de massa molecular de aproximadamente 43 kDa e no veneno de *B. jararaca* na região de aproximadamente 60 kDa, como observado na *Figura 9*.

Figura 9. Zimografia em SDS-PAGE dos venenos de *B. alcatraz* e *B. jararaca*. Ba = veneno total de *Bothrops alcatraz*; Bj = veneno total de *Bothrops jararaca* e PM = padrão de peso molecular. Gel 10% poliacrilamida e concentração 1mg/ml de gelatina.

4.1.1 ATIVIDADES BIOQUÍMICAS

4.1.1.1 Atividade proteolítica sobre caseína

A atividade proteolítica sobre caseína de *B. jararaca* apresenta valores elevados se comparados aos apresentados pelo veneno de *B. alcatraz*. Pode-se verificar na *Figura 10* que a atividade apresentada pelo veneno de *B. alcatraz* encontra-se crescente enquanto que de *B. jararaca* já se encontra em declínio, indicando que o pico de atividade desta não está representado no gráfico por atingir essa atividade máxima em concentrações inferiores às utilizadas no ensaio. Observou-se que o pico de atividade do veneno de *B. alcatraz* é atingido na concentração de 60 µg/ml.

A

B

Figura 10. A - Atividade proteolítica sobre caseína dos venenos de *B. alcatraz* e *B. jararaca*. **B** – Os valores representam a média $\pm$ EP (Erro Padrão).

4.1.1.2 Atividade coagulante em plasma humano

Na atividade coagulante sobre plasma humano (Figura 11) o veneno de *B. alcatraz* apresentou valor maior que o apresentado pelo veneno de *B. jararaca*, tendo como Dose Mínima Coagulante (DMC-P) 10,1 mg/l enquanto que o de *B. jararaca* foi de 22,1 mg/l (Tabela 3). Foi realizado teste estatístico de comparação múltipla (TUKEY 95%).

Nesta atividade o fibrinogênio inativo é convertido em rede de fibrina pela ação de uma toxina com ação tipo trombina ou por ativação de fatores da cascata de coagulação. Não é possível se identificar a via de ativação por tratar-se de um método inespecífico.

Figura 11. **A** - Atividade coagulante em plasma humano dos venenos de *B. alcatraz* e *B. jararaca*. **B** - Os valores representam a média $\pm$ EP (erro padrão).

Tabela 3. Atividade coagulante (DMC – P) dos venenos de *B. alcatraz* e *B. jararaca* sobre plasma humano citratado.

Espécie	DMC – P (mg/L)
<i>B. alcatraz</i>	10,1
<i>B. jararaca</i>	22,1

4.1.1.3 Atividade hialuronidásica

O veneno de *B. alcatraz* apresentou atividade hialuronidásica equivalente à do veneno de *B. jararaca*, conforme se visualiza na *Figura 12*. De acordo com o teste estatístico T, $P = 0,049$ com intervalo de confiança 95%.

A

B

Figura 12. Atividade hialuronidásica dos venenos de *B. alcatraz* e *B. jararaca*. **A** - Box Plot atividade hialuronidásica. **B** - Representação gráfica da atividade hialuronidásica específica. Os valores representam a média $\pm$ EP (Erro Padrão).

4.1.1.4 Atividade fosfolipásica

As fosfolipases A2 (PLA2) são proteinases de baixo peso molecular que destroem membranas fosfolipídicas e estão diretamente adaptadas à digestão das serpentes. O veneno de *B. alcatraz* apresentou atividade fosfolipásica elevada em relação ao veneno de *B. jararaca*, na ordem de 12 para 5 nmoles/min/mg respectivamente, porém menor atividade se comparado aos venenos controles (sabidamente positivos): *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops jararacussu*. Estes resultados podem ser visualizados na Figura 13. Foi realizado teste estatístico de TUKEY, com intervalo de confiança 95%.

Figura 13 - A e B. Atividade fosfolipásica dos venenos de *B. alcatraz* (B.a) e *B. jararaca* (B.j). Como controles positivos foram utilizados os venenos de *Crotalus durissus terrificus* (C.d.terrificus) e *Bothrops jararacussu* (B. jararacussu).

4.1.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

4.1.2.1 Dose Letal Média (DL50) em camundongos

O veneno de *B. alcatraz* apresentou Dose Letal Média de 95,1 µg/camundongo, representando este valor baixa letalidade se comparado ao

veneno de *B. jararaca* (24,7 µg/camundongo) e ao de outras espécies pertencentes ao mesmo gênero, como visualizado na *Tabela 4*.

Tabela 4. Dose Letal Média dos venenos de *Bothrops alcatraz*, *Bothrops jararaca* e algumas outras espécies do mesmo gênero (para comparação). Resultados para venenos liofilizados. Valores de DL₅₀ e intervalos inferior e superior de confiança 95%.

Espécie	Dose Letal Média DL50 (µg/camundongo)
<i>B. alcatraz</i>	95,1 (71 – 124)
<i>B. moojeni</i>	92,3 (78 – 100) *
<i>B. atrox</i>	89,1 (84 – 96) *
<i>B. alternatus</i>	67,5 (59 – 76) *
<i>B. jararacussu</i>	58,8 (52 – 67) *
<i>B. cotiara</i>	35,2 (27 – 41) *
<i>B. neuwiedi</i>	30,3 (25 – 41) *
<i>B. jararaca</i>	24,7 (23 – 26)

* FURTADO *et al.* (1991)

4.1.2.2 Atividade hemorrágica

O veneno de *B. alcatraz* apresenta *atividade hemorrágica* menor que o veneno de *B. jararaca*. Necessita-se de menor quantidade de veneno de *B. jararaca* para causar um mesmo dano tecidual, tendo *B. jararaca* um valor de Dose Mínima Hemorrágica (DMH) (quantidade de veneno necessária para

formar uma hemorragia de 10 mm de diâmetro ou de 78,54 mm² de área) de 0,52 µg e *B. alcatraz* 0,84 µg. Vide *Figuras 14, 15 e Tabela 5*.

Figura 14. Atividade hemorrágica dos venenos de *B. alcatraz* e *B. jararaca*.

Tabela 5. Dose Mínima Hemorrágica (DMH), em μg de veneno, dos venenos de *Bothrops alcatraz* e *Bothrops jararaca*.

Espécie	Dose Mínima Hemorrágica (DMH)
<i>B. alcatraz</i>	0,84
<i>B. jararaca</i>	0,52

Figura 15. Pele retirada da região abdominal de camundongo mostrando área hemorrágica (seta) após inoculação de $0,3 \mu\text{g}$ de veneno de *B. alcatraz*.

4.1.2.3 Atividade miotóxica

A *atividade miotóxica*, dosada pela liberação de creatino-quinase (CK), produto de degradação muscular, apresentou-se mais ativa no veneno de *B. alcatraz* que no de *B. jararaca* e no controle utilizado (de acordo com teste

estatístico de Tukey, intervalo de confiança 95%), sendo este aproximadamente 3 vezes maior, apresentando valores de atividade 250 U/mg. Estes padrões repetiram-se tanto para resultados quantificados após 3 horas da inoculação quanto para 6 horas após, conforme visualizado na *Figura 16*.

Figura 16 – A e B . Atividade miotóxica dos venenos de *B. alcatraz*, *B. jararaca* e controle (solução salina 0,15 M), quantificadas após 3 e 6 horas da inoculação.

4.1.2.4 Atividade edematogênica

A atividade edematogênica (Figuras 17 e 18) entre o veneno de ambas as espécies apresenta cinética e intensidade de ação semelhantes. A reação

primária do organismo é o envio de macrófagos ao local da picada e inoculação do veneno no caso de um acidente humano (ação pró-inflamatória). Estes macrófagos, liberando histamina e serotonina, agem auxiliando no aumento da permeabilidade das membranas, ocorrendo então o extravasamento de líquidos que caracteriza o edema. A toxina também age no aumento da permeabilidade, ocorrendo uma retroalimentação que intensifica o efeito edematogênico.

A Dose Mínima Edematogênica (DME) de *B. alcatraz* foi 0,27 µg e de *B. jararaca* 0,41 µg, sugerindo uma tendência de que o veneno de *B. alcatraz* apresentou-se mais ativo. Os cálculos foram realizados através de análise de regressão linear (*Figura 18*) e o método estatístico utilizado foi o Teste de comparação múltipla (TUKEY 95%).

A

Figura 17. A - Cinética da atividade edematogênica dos venenos de *B. alcatraz* e *B. jararaca*, onde determina-se tempo de ensaio (pico de atividade) de 3 horas. **B** – Cinética de atividade edematogênica. Os valores representam a média $\pm$ EP (Erro Padrão).

Figura 18. Atividade edematogênica dos venenos de *B. alcatraz* e *B. jararaca*, tempo de ensaio de 3 horas.

4.1.3 Ensaios de toxicidade em modelos biológicos ectotérmicos

4.1.3.1 Ensaio de toxicidade em abelhas

Ensaio realizado com abelhas (*Apis mellifera*) demonstrou que o veneno (20 ng de veneno em 2 µl/ 90 mg massa abelha) de *B. alcatraz* possui ação neurotóxica ativa sobre este modelo experimental (*Tabela 6*), enquanto que o de *B. jararaca* não expressa tal atividade, embora estes animais tenham apresentado agitação após a inoculação.

Tabela 6. Observação de comportamento de *Apis Mellifera* – sintomatologia de envenenamento neurotóxico após inoculação de veneno de *B. alcatraz*. Comportamento observado e anotado periodicamente dentro de 24 horas.

Sintomatologia

Espasmos abdominais

Agitação

Contração abdominal

Desorientação

Paralisia uni ou bilateral

Ejeção da probóscide (glossa)

Tetania dos membros

Músculos dos membros de locomoção flácidos

Andar vacilante

Bombeamento da ponta do abdome

Morte

4.1.3.2 Ensaio de toxicidade em grilos

Os grilos foram inoculados com doses 40 ng (G40) e 80 ng (G80) dos venenos de B. alcatraz e B. jararaca/190 mg massa do animal. Como controle foi utilizada solução salina 0,15 M. No grupo controle observou-se pouca mas existente movimentação. Ao estímulo de um leve toque com a ponta de uma pinça fugiam agilmente e moviam muito as antenas. Não utilizaram a água nem ração disponíveis. No grupo G40 do veneno de B. alcatraz pode-se observar interrupção abrupta dos movimentos logo após a aplicação e manutenção desta imobilidade por aproximadamente 30 minutos. Neste período verificou-se que as patas posteriores encontravam-se alongadas. Após este tempo voltaram a movimentar-se, porém com poucos movimentos das patas traseiras. Nenhum dos animais alimentou-se ou utilizou-se da água disponibilizados. Quando estimulados com um leve toque da ponta de uma pinça andavam um pouco porem em seguida paravam novamente. Foi verificada contração abdominal periódica, assim como movimentos lentos se comparados ao grupo controle. Após 24 horas de observação houve óbito de 1 animal do grupo. No grupo G80 do veneno de B. alcatraz após aproximadamente 2 minutos pós-inoculação 1 animal virou-se com a patas para cima e apresentou espasmos. Todos encontravam-se imobilizados e esfregando as patas dianteiras contra as antenas. Observou-se que alguns grilos tocavam as paredes da caixa com o abdome, enquanto outros o mantinham suspenso. Três animais caíram enquanto subiam a parede lateral da caixa. Nenhum animal utilizou-se de água e ração disponibilizados. Após aproximadamente 30 minutos outro animal apresentou espasmos e manteve-se em decúbito dorsal. Quando estimulados

com uma pinça paravam logo em seguida ao toque. Observaram-se leves contrações na ponta do abdome.

Os animais inoculados com o veneno de *B. jararaca* apresentaram sintomas leves de envenenamento ou comportamento semelhante ao do grupo controle.

4.1.3.3 Ensaio de toxicidade em lacraias

Lacraias da espécie *Otostigmus sp* (Figura 19), foram inoculadas com 2 µl de dose 100 ng dos venenos de *B. alcatraz* e *B. jararaca*/ 0,4 g massa do animal. Como controle foi utilizada solução salina 0,15 M. Tanto o grupo controle quanto o grupo inoculado mantiveram-se imóveis em todo o período de observação. Todos os animais permaneceram vivos. Não foram observados comportamentos diferenciais entre o grupo controle e o grupo inoculado com veneno, provavelmente devido à dose insuficiente para tal observação. Portanto o ensaio foi realizado novamente, aumentando-se a dose de veneno.

Na repetição do experimento, animais do Gênero *Scolopendra* (Figuras 20 e 21) foram inoculados com 5 µl de doses 100 e 200 ng/ 0,5 g massa do animal dos venenos de *B. alcatraz* e *B. jararaca* (Figura 22). Como controle foi utilizada solução salina 0,15 M.

O grupo controle apresentou-se imóvel durante quase toda observação realizada. Movendo as antenas e movimentando-se pela caixa periodicamente.

Os grupos inoculados com 100 e 200 ng do veneno de *B. jararaca* apresentaram comportamento pouco diferenciado do apresentado pelo grupo controle: agitação leve, movimento das antenas e pouca mobilidade na caixa.

Os animais inoculados com veneno de *B. alcatraz*, em ambas as doses, apresentaram movimentação, agitação, movimento intenso de antenas e forcípulas e tetania dos membros.

Nas *Figuras 23 e 24* vêem-se as caixas experimentais para observação.

Figura 19. *Otostigmus sp.*

Figura 20. Lacaia do Gênero *Scolopendra*.

Figura 21. Detalhe lacaia Gênero

Scolopendra.

Figura 22. Imobilização e inoculação.

Figura 23. Caixas experimentais.

Figura 24. Visão superior de caixa de experimento.

4.1.3.4 Ensaio de toxicidade em lagartixas

Tanto o grupo controle quanto o grupo inoculado com veneno (1,5 µg em 2 µl/ 5 g massa do animal) permaneceram imóveis em todo o período de observação. Nenhum dos animais sobreviveu.

4.1.3.5 Ensaio de toxicidade em baratas

Não foram observados comportamentos diferenciais entre o grupo controle e o grupo inoculado com veneno (120 ng em 4 µl/ 600 mg massa do animal). Todos os animais sobreviveram.

4.2 Cromatografia – Fracionamento do veneno de *B. alcatraz*

4.2.1 Gel filtração em coluna Superdex 75

Na filtração em gel realizada com o veneno de *B. alcatraz* verificou-se a presença de um pico protéico principal com absorbância em λ_{280} nm igual a 0,544 e três picos protéicos secundários (indicados na *Figura 26* abaixo).

Figura 26. Perfil de eluição - Gel filtração em coluna Superdex 75 do veneno de *B. alcatraz*. Presença de pico proteico principal (1) e picos proteicos secundários (2, 3 e 4).

4.2.2 Atividade fosfolipásica em placa de 96 poços das frações obtidas em Gel filtração

As frações obtidas na Gel filtração apresentaram um pico de atividade fosfolipásica, representado pelas frações 11 a 16, conforme demonstrado na *Figura 27*.

Figura 27. Perfil de eluição e Atividade fosfolipásica do veneno de *B. alcatraz*. Leituras em espectrofotometria λ 405 nm realizadas após 12 h de incubação. Principal pico de atividade fosfolipásica indicado pela barra (frações 11 a 16).

4.2.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida de frações do veneno obtidas em Gel filtração

O perfil eletroforético (realizado sob condições redutoras) do veneno de *B. alcatraz* demonstrou bandas proteicas diferenciais se comparado ao veneno de *B. jararaca*. Nota-se no perfil do veneno de *B. alcatraz* bandas exclusivas de aproximadamente 67, 43 e 40 kDa e grande concentração de proteínas nas regiões de 60 e 14 kDa. O “pool” das frações 11 a 16 obtidas por Gel filtração aplicado no gel demonstrou maior concentração de proteínas nas regiões de 67, 40 e 20 e 14 kDa (Figura 28).

Figura 28. Eletroforese em gel de gradiente (7,5 - 17,5 %) de poliacrilamida sob condições redutoras. Foram aplicadas 120 μ g de veneno/ poço. Ba = veneno total de *Bothrops alcatraz*; Bj = veneno total de *Bothrops jararaca* referência, F11-16 = frações 11 a 16 obtidas na Gel filtração e PM = Padrão de peso molecular (LMW- Pharmacia).

4.2.4 Cromatografia de troca iônica em Coluna Mono S

O material aplicado em coluna de troca iônica Mono S não sofreu retenção na coluna, que realiza troca catiônica. O pico apresentado na *Figura 29* representa o material não retido. Visto que o material não pode ser separado utilizou-se em seguida coluna de troca aniônica Mono Q.

Figura 29. Cromatografia de troca iônica em coluna Mono S. Material aplicado não apresentou retenção na coluna. Material não retido indicado por seta.

4.2.5 Cromatografia de troca iônica das frações 11 a 16 SD em coluna Mono Q

As frações com atividade fosfolipásica (11 a 16) obtidas na Gel filtração foram submetidas a cromatografia de troca iônica em coluna Mono Q. Verifica-se o perfil de eluição obtido por monitoramento em espectrofotometria a λ 280 nm com presença de três picos proteicos principais na *Figura 30*.

Figura 30. Perfil de eluição por monitoramento em espectrofotometria a λ 280 nm das frações obtidas em cromatografia de troca iônica em coluna Mono Q. Picos proteicos principais indicados por barras.

4.2.6 Atividade fosfolipásica em placa de 96 poços das frações obtidas em cromatografia de troca iônica

As frações obtidas por Cromatografia de troca iônica em coluna Mono Q apresentaram cinco picos principais de atividade fosfolipásica. O pico selecionado para a próxima etapa de purificação foi o representado pelas frações 29 a 33, conforme demonstrado na *Figura 31*.

Figura 31. Perfil de eluição e Atividade fosfolipásica do veneno de *B. alcatraz*. Pico de atividade fosfolipásica selecionado indicado pela barra (frações 29 a 33).

4.2.7 Atividade hemolítica indireta por fosfolipase A2 de frações obtidas em cromatografia de troca iônica

As frações testadas em placas de agarose contendo hemácias humanas e gema de ovo (*Figura 33*) mostraram halos de hemólise mais proeminentes nas frações 19 a 35, apresentando raios de 0,4 a 0,85 cm. As frações 10, 12, 14 e 15 apresentaram atividade isoladamente, como pode ser visto na *Figura 32*. Os venenos totais de *B. alcatraz*, *B. jararaca* e *C. d. terrificus* foram utilizados como controle positivo e solução salina 0,15 M como controle negativo (resultados não demonstrados). As frações 29 a 33 foram selecionadas para a próxima etapa cromatográfica devido ao maior valor de atividade coincidente a um pico proteico.

Figura 32. Perfil de eluição e atividade hemolítica indireta das frações do veneno de *B. alcatraz* obtidas por cromatografia de troca iônica.

Figura 33. Placas de agarose contendo eritrócitos de camundongos e gema de ovo. Halos formados demarcados. Placa **A** – Frações 19 a 27. Placa **B** - Frações 28 a 36. Placa **C** – Ba = veneno de *B. alcatraz*, Bj = veneno de *B. jararaca* e Cd = veneno de *C. d. terrificus*.

4.2.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida de frações do veneno obtidas em Cromatografia de troca iônica

O perfil eletroforético das frações 29 a 33 obtidas em cromatografia de troca iônica apresentou bandas proteicas majoritárias nas regiões de 67 e 14 kDa, como visualizado na *Figura 34*.

Figura 34. Eletroforese em gel de gradiente (10 - 20 %) de poliacrilamida sob condições redutoras. PM = Padrão de peso molecular (LMW- Pharmacia), Ba = veneno total de *Bothrops alcatraz*; Bj = veneno total de *Bothrops jararaca* referência e F29-33 = frações 29 a 33 obtidas em Cromatografia de troca iônica.

4.2.9 Cultura celular e ensaio de citotoxicidade "in vitro" de frações do veneno

O veneno de *B. alcatraz* apresentou atividade miotóxica proeminente em relação ao de *B. jararaca*. As frações do veneno de *B. alcatraz* testadas não apresentaram atividade miotóxica diferencial comparadas às outras amostras testadas e aos controles (*Figura 35*).

Figura 35. Ensaio de toxicidade *in vitro* utilizando-se mioblastos diferenciados. Controles: meio + PBS e Triton. F1-3, F12-15, F17, F18-21 e F38 = Frações obtidas em cromatografia de troca iônica em coluna Mono Q.

4.2.10 Ensaio de toxicidade em abelhas com frações obtidas em cromatografia de troca iônica

Os animais foram observados após a inoculação das diferentes frações obtidas por cromatografia de troca iônica, na concentração de 20 ng em 2 μ l, e os resultados foram expressos na *Tabela 7*. As frações agrupadas utilizadas na inoculação foram selecionadas de acordo com os picos encontrados nas atividades fosfolipásicas.

Tabela 7. Observação de comportamento de abelhas inoculadas com frações do veneno de *B. alcatraz* obtidas por cromatografia de troca iônica.

Frações	Comportamentos observados
F 1 a 5	N
F 6 a 9	N
F 10 a 13	N
F 14 a 18	N
F 19 a 20	Q, N, G
F 21	DD, Q, Ag
F 22 a 25	DD, Q, N
F 26 a 28	DD, P, T, EP
F 29 a 32	DD, Q, Ag, P, T, BA, EP
F 33 a 35	DD, Ag, T, BA, P
F 36	Ag
Controle	N

Decúbito dorsal = DD; Queda do vidro que cobria a caixa de observação = Q; Agitação = Ag; Aparentemente normal (equivalente ao controle) = N; Paralisia = P; Tremor = T; Bombeamento do abdome = BA; Esfregar patas nas outras = EP; Agrupamento e 2 ou mais animais = G

Dos comportamentos observados apresentaram sintomas de neurotoxicidade proeminente as abelhas inoculadas com as frações 26 a 35.

4.2.11 Cromatografia de fase reversa

A fração 30 obtida por cromatografia de troca iônica foi aplicada em coluna de cromatografia em fase reversa. Pode ser visualizado um pico proteico principal, apontado pela seta na *Figura 36*.

Figura 36. Cromatografia de fase reversa de frações obtidas em cromatografia de troca iônica (Fração 30). Numeração representa o tempo de retenção de cada pico. Seta – pico proteico principal.

4.2.12 Atividade fosfolipásica em placa de 96 poços das frações obtidas em Cromatografia de fase reversa

Não foi verificada atividade PLA2 nas frações obtidas.

4.2.13 Cromatografia de troca iônica das frações 29 a 33 MQ em coluna Mono Q

As frações com atividade fosfolipásica (29 a 33) obtidas em Cromatografia de troca iônica foram submetidas a nova cromatografia de troca iônica em coluna Mono Q. Verifica-se na *Figura 37* o perfil de eluição obtido por

monitoramento em espectrofotometria a λ 280 nm com presença de cinco picos proteicos principais.

Figura 37. Perfil de eluição por monitoramento em espectrofotometria a λ 280 nm das frações obtidas em cromatografia de troca iônica em coluna Mono Q. Picos proteicos principais indicados por setas.

4.2.14 Atividade fosfolipásica em placa de 96 poços das frações obtidas em Cromatografia de troca iônica

As frações obtidas por Cromatografia de troca iônica em coluna Mono Q apresentaram um pico principal e 7 picos secundários de atividade fosfolipásica (Figura 38).

Figura 38. Perfil de eluição e Atividade fosfolipásica do veneno de *B. alcatraz*. Pico de atividade fosfolipásica principal indicado por seta.

4.2.15 Atividade hemolítica indireta por fosfolipase A2 de frações obtidas em cromatografia de troca iônica

As frações testadas em placas de agarose mostraram halos de hemólise proeminentes nas frações 22 a 35, apresentando raios de 0,1 a 0,6 cm (Figuras 39 e 40). O maior halo foi apresentado pela fração 35, medindo 0,6 cm. A fração 13 apresentou atividade isoladamente (Figura 41).

Figura 39. Perfil de eluição e atividade hemolítica indireta das frações do veneno de *B. alcatraz* obtidas em cromatografia de troca iônica.

Figura 40. Placas de agarose contendo eritrócitos humanos e gema de ovo. Placa 1 contém veneno de *B. alcatraz*, *B. jararaca*, *C. d. terrificus* e Solução salina 0,15 M . Placa 2: frações 10 a 18. Placa 3: frações frações 19 a 27. Placa 4: frações frações 28 a 35. Os poços das placas contendo frações (2, 3 e 4) devem ser identificados em sentido de leitura.

Figura 41. Placa de agarose contendo eritrócitos humanos e gema de ovo. Detalhe do halo formado no poço contendo a Fração 25.

4.2.16 Eletroforese em gel de poliacrilamida de frações do veneno obtidas em Cromatografia de troca iônica

As frações 22 a 30 obtidas por cromatografia de troca iônica em Coluna Mono Q apresentaram uma banda protéica na região de 14 kDa, como pode ser visualizado na *Figura 42*.

Figura 42. Eletroforese em gel de gradiente (10 - 20 %) de poliacrilamida sob condições redutoras. PM = Padrão de peso molecular (LMW- Pharmacia), Ba = veneno total de *Bothrops alcatraz*; Bj = veneno total de *Bothrops jararaca* referência e F22-32 = frações 22 a 30 obtidas em Cromatografia de troca iônica. Banda protéica isolada (indicada pela seta).

4.2.17 Ensaio de toxicidade em abelhas com frações obtidas em cromatografia de troca iônica

Os animais foram observados após a inoculação das diferentes frações obtidas por cromatografia de troca iônica, na concentração de 20 ng em 2 ul, como descrito anteriormente, e os resultados foram expressos na *Tabela 8*.

Tabela 8. Observação de comportamento de abelhas inoculadas com frações do veneno de *B. alcatraz* obtidas por cromatografia de troca iônica.

Frações	Comportamentos observados
F 1 a 11	N
F 12 a 18	N, Ag
F 19 a 22	Q, Ag
F 23 a 25	DD, Q, Ag, P, T, BA, EP
F 26 a 28	DD, Q, Ag, P, T, BA, EP
F 29 a 32	DD, Q, Ag, P, BA
F 33 a 35	DD, Q, N
F 36	N
Controle	N

Decúbito dorsal = DD; Queda do vidro que cobria a caixa de observação = Q; Agitação = Ag; Aparentemente normal (equivalente ao controle) = N; Paralisia = P; Tremor = T; Bombeamento do abdome = BA; Esfregar patas nas outras = EP; Agrupamento e 2 ou mais animais = G

Dos comportamentos observados apresentaram sintomas de neurotoxicidade proeminente as abelhas inoculadas com as frações 19 a 32.

4.2.18 Espectrometria de massa

As frações 22-30 obtidas por cromatografia de troca iônica analisados por ESI-MS, em modo positivo, apresentaram o perfil visualizado na *Figura 43*, resultando no valor 13.278,54 Da. Verificaram-se também vestígios de dímeros e trímeros

Figura 43. Análise em espectrometria de massa das frações 22-30 obtidas por cromatografia de troca iônica do veneno de *B. alcatraz*.

5. Discussão

Neste trabalho tratamos das diferenças existentes entre o veneno da serpente *B. alcatraz*, ilha e endêmica da Ilha de Alcatrazes, e o veneno de *B. jararaca* Referência Nacional (FURTADO *et al*, 1991), parâmetro de comparação. A serpente continental *B. jararaca* tem distribuição ampla no Brasil, habitando da Bahia ao Rio Grande do Sul, estendendo-se por Minas Gerais e Goiás; ocupando também grande diversidade de habitats: florestas tropicais, florestas decíduas, savanas e florestas semitropicais de altitude (SAZIMA, 1992; CAMPBELL & LAMAR, 1989). Seu veneno encontra-se extensamente estudado e caracterizado por se tratar de uma espécie das mais frequentes em nosso meio, sendo considerada espécie-tipo do gênero (SILES – VILLARROEL *et al*, 1978/9), justificando a escolha para a comparação deste veneno com o de *B. alcatraz*.

A serpente *B. alcatraz* encontra-se ameaçada e incluída na categoria Criticamente Em Perigo critério B1 e B2c da IUCN Lista Vermelha das Espécies Ameaçadas de Extinção (IUCN, 2002) por seu endemismo e pelo uso de parte da ilha como alvo de canhões para treinamentos da Marinha Brasileira. Esta situação representa uma ameaça à jararaca - de - Alcatrazes e aos outros seres vivos habitantes da Ilha (MARQUES *et al.*, 2002b).

Existem fatores limitantes para obtenção de veneno de *B. alcatraz*, como o pequeno porte do animal (e consequente escassa obtenção de veneno extraído), dificuldade e baixa taxa de encontro de animais em expedições à ilha e número reduzido de animais mantidos em cativeiro, devido à atual proibição de coleta destes animais pelo IBAMA, entre outros motivos.

Serpentes são animais de difícil encontro na natureza por possuírem hábito secretivo, na Mata Atlântica, por exemplo, a taxa média de encontro de serpentes é 10 a 12 horas/ homem de procura (comunicação pessoal, Otávio A V Marques). Estes diversos fatores nos levaram a trabalhar com o “pool” destes venenos, objetivando possuir maior quantidade de material disponível para os ensaios.

FURTADO (2005) analisou perfis eletroforéticos de 4 indivíduos da espécie *B. alcatraz* e verificou que existe homogeneidade nos venenos. Em populações grandes a variação individual do veneno é maior que em pequenas e isoladas, onde o “pool” gênico é restrito e os alelos podem ser fixados, como ocorre em populações isoladas de *Notechis ater* (WILLIAMS & WHITE, 1987). Por esta homogeneidade confirmada também optamos em trabalhar com o “pool” destes venenos.

Os venenos de serpentes são misturas complexas de compostos orgânicos e inorgânicos. Aproximadamente 90 % dos compostos orgânicos são proteínas (enzimáticas ou não enzimáticas), entre outros elementos estão carboidratos, lipídios, peptídeos e aminas biogênicas (IWANAGA & SUZUKI, 1979; BJARNASON & FOX, 1988/89). Os inorgânicos são constituídos basicamente de Ca, Cu, Mg, K, Na, P, Co, Zn, Mn e Ferro, que agem na manutenção da estabilidade estrutural de proteínas e como catalisadores enzimáticos (BJARNASON & FOX, 1988/89; FRIEDERICH & TU, 1971).

A dosagem de proteína apresentada pelos venenos de *B. alcatraz* e *B. jararaca* foi em ambos $1030 \pm 0,05$ µg de proteína por mg de veneno. Verificando-se uma estabilidade no teor proteico destas espécies.

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida permite a separação, identificação e análise do complexo proteico (TAN & PONNUDURAI, 1992) permitindo a comparação do perfil proteico geral dos venenos estudados.

O perfil eletroforético em condições redutoras do veneno de *B. alcatraz* apresentou bandas proteicas exclusivas nas regiões de 67, 43 e 40 kDa e grande concentração de proteínas nas regiões de 60 e 14 kDa, enquanto que o veneno de *B. jararaca*, sob condições redutoras, apresentou bandas proteicas majoritárias nas faixas de aproximadamente 60 e 30 a 20 kDa, indicando a possível presença de metaloproteinases, serinoproteinases e fosfolipases com características diferenciais entre os venenos.

A técnica de zimografia consiste na utilização de um gel de concentração 10% de poliacrilamida co-polimerizado com gelatina 1%. As regiões mais claras formadas no gel representam as bandas com atividade proteolítica do veneno amostrado. No veneno de *B. alcatraz* pode-se verificar a presença de proteases degradadoras de gelatina na faixa de massa molecular de aproximadamente 43 kDa, e no veneno de *B. jararaca* na região de aproximadamente 60 kDa, indicando a provável presença de metaloproteinases (SERRANO *et al.*, 2005).

A atividade caseinolítica é quantificada pela leitura em espectrofotometria do produto de degradação da caseína quando adicionado o veneno (LOMONTE & GUTIÉRREZ, 1983). O veneno de *B. jararaca* apresentou-se mais ativo nesta atividade quando comparado ao de *B. alcatraz*. Este resultado foi diferente do apresentado por FURTADO (2005), onde o veneno de *B. alcatraz* apresenta atividade mais intensa que o de *B. jararaca*.

Os mecanismos fisiopatológicos causadores de distúrbios hemostáticos são complexos. Os componentes do veneno podem ser agrupados segundo as atividades que exercem: as toxinas que agem diretamente na coagulação podem ser classificadas como coagulantes e anticoagulantes. As que atuam sobre plaquetas são agregantes e antiagregantes plaquetárias, e as que agem causando lesões vasculares são denominadas fatores hemorrágicos (ou hemorraginas) (SANO-MARTINS & SANTORO, 2003).

A atividade coagulante sobre o plasma é inespecífica, ou seja, não permite identificar se a toxina age como trombina - símile ou se ocorre ativação de outros fatores de coagulação da cascata, como Fator II e X. Neste ensaio o veneno de *B. alcatraz* apresentou valores maiores que de *B. jararaca*. Esse resultado aproxima o veneno de *B. alcatraz* ao veneno de exemplares juvenis da espécie *B. jararaca*, visto que *B. alcatraz* se trata de uma espécie de menor porte cuja alimentação é baseada exclusivamente de ectotérmicos (semelhante aos filhotes de *B. jararaca*), resultado apresentado também por FURTADO *et al.* (1991), que verificou a intensa atividade coagulante do veneno de filhotes do gênero *Bothrops* brasileiros em plasma humano e em relação à ativação dos fatores II e X da cascata de coagulação, quando comparado com os venenos de exemplares adultos.

A hialuronidase está presente no veneno de répteis e insetos e realiza a hidrólise do ácido hialurônico, mucopolissacarídeo presente na matriz extracelular, cuja função é promover a junção intercelular. Esta quebra leva à desestruturação do tecido e facilita a dispersão dos componentes do veneno (PUKRITTAYAKAMEE *et al.*, 1988; IWANAGA & SUZUKI, 1979), além de potencializar efeitos hemorrágicos e necrose local (TU & HENDON, 1983;

PUKRITTAYAKAMEE *et al.*, 1988). Assim como as fosfolipases A2, as hialuronidas possuem importância nos processos fisiopatológicos causados pelas toxinas dos venenos das famílias Viperidae e Elapidae (MACKESSY, 2002).

O veneno de *B. alcatraz* apresentou atividade hialuronidásica equivalente à do veneno de *B. jararaca*, ambos com valores de 27 e 20 U/mg, respectivamente.

A Dose Letal Média (DL50) é definida como a quantidade de veneno que quando inoculada em camundongos (de 18 a 22 gramas) por via intraperitoneal, promove a morte de 50% dos animais testados, em 48 horas (SILES – VILLARROEL *et al.*, 1978/9). A via de inoculação mais adequada demonstrou ser a intraperitoneal principalmente para determinação de toxicidade de venenos botrópicos, pois exclui a possibilidade de morte imediata do animal devido à coagulação intravascular maciça, observada em inoculação por via sanguínea. A massa de 18 a 22 gramas mostrou-se ideal ao camundongo, pois corresponde a adultos jovens, que oferecem condições biológicas ideais para a realização do experimento (SILES – VILLARROEL *et al.*, 1978/9).

O veneno de *B. alcatraz* apresentou Dose Letal Média de 95,1 µg/camundongo, representando este valor baixa letalidade se comparado ao veneno de *B. jararaca* (24,7 µg/camundongo) e ao de outras espécies pertencentes ao mesmo gênero. Estes resultados são condizentes com os apresentados por FURTADO, 2005.

A atividade hemorrágica é atribuída à ação de hemorraginas, recentemente denominadas metaloproteinases, que são enzimas proteolíticas

dependentes de íon zinco (BJARNASON & FOX, 1988-89, GUTIÉRREZ & LOMONTE, 2003).

As hemorraginas têm a capacidade de alterar a permeabilidade dos vasos sanguíneos, causando aberturas entre as células e consequente extravasamento de sangue. No envenamento botrópico a hemorragia é potencializada pela incoagulabilidade sanguínea e pela formação de edema (extravasamento de líquidos) (KAMIGUTI *et al*, 1994).

O veneno de *B. alcatraz* apresenta *atividade hemorrágica* menor que o veneno de *B. jararaca*. Necessita-se de menor quantidade de veneno de *B. jararaca* para causar um mesmo dano tecidual, tendo *B. jararaca* um valor de Dose Mínima Hemorrágica (DMH) de 0,52 µg e *B. alcatraz* 0,84 µg. Sugere-se que no veneno de *B. jararaca* exista maior quantidade e/ou metaloproteinases mais ativas, visto que estas enzimas estão associadas a processos hemorrágicos (SERRANO & FOX, 2005; GUTIÉRREZ & RUCAVADO, 2000).

A atividade edematogênica é caracterizada por uma ação pró-inflamatória, ocorrendo primariamente migração de macrófagos ao local da picada, liberação de histamina e serotonina, que agem no aumento da permeabilidade das membranas, causando extravasamento de líquidos (YAMAKAWA *et al*, 1976).

Vários componentes podem ser responsáveis pela formação de edema: aminas biogênicas, peptídeos, proteínas, esterases, enzimas liberadoras de cininas, entre outros (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 2003).

O veneno de *B. alcatraz* apresentou dose mínima edematogênica 0,27 µg e *B. jararaca* 0,41 µg, indicando que o veneno de *B. alcatraz* possui

capacidade de incitar resposta inflamatória primária mais eficientemente que o veneno de *B. jararaca*.

As fosfolipases A2 (PLA2) são proteínas de baixo peso molecular, na faixa de 14 kDa, existentes em tecidos de mamíferos, peçonhas de serpentes e abelhas. Agem sobre o fosfatidilinositol, liberando ácido aracdônico (precursor das prostaglandinas) e possuem ações farmacológicas variadas e amplas, entre estas: neurotoxicidade pré e pós sináptica, miotoxidade, cardiotoxidade, efeitos anticoagulante, iniciação e inibição de agregação plaquetária, atividade hemolítica, hemorragia interna, atividade antihemorrágica, convulsiva, hipotensiva, de indução de edema e danos a órgãos e tecidos (KINI, 1997; KINI & EVANS, 1989).

Estudos indicam que a atividade enzimática pode não estar envolvida em todos os efeitos tóxicos das PLA2, parecendo haver sítios separados de atividade farmacológica e enzimática (catalítica) (GOWDA & MIDDLEBROOK, 1993). KINI & EVANS (1989) sugerem que cada um dos efeitos farmacológicos deve-se à presença de sítios específicos na PLA2 e o efeito é induzido pela interação proteína – proteína entre a toxina e proteínas específicas presentes na célula – alvo.

Uma PLA2 básica do veneno de *Naja nigricollis* e duas PLA2 básicas purificadas do veneno de *Vipera russelli* mostraram efeitos tóxicos similares, mas diferiram grandemente em potência tóxica e atividade enzimática. A PLA2 de *Naja nigricollis* apresenta neurotoxicidade (RAPUANO *et al*, 1986), cardiotoxidade (FLETCHER *et al*, 1981), miotoxidade (LEE *et al*, 1977), atividade anticoagulante (STEFANSSON *et al*, 1990) e citotoxicidade

(CHWETZOFF *et al*, 1988). As toxinas de *V. russelli* induzem neurotoxicidade, miotoxicidade, citotoxicidade, atividade anticoagulante e formação de edema (JAYANTHI *et al*, 1989, KASTURI & GOWDA, 1989).

Na lise muscular causada pela atividade de PLA2 ocorre liberação de produtos de degradação, principalmente creatino - fosfoquinase (CPK). Estes produtos encaminham-se para a corrente sanguínea e sua quantificação permite determinar a taxa de miodestruição causada (GUTIÉRREZ *et al*, 1980).

Neste trabalho verificamos atividade PLA2 relevante no veneno de *B. alcatraz*, assim como a atividade miotóxica, o que nos encaminhou os estudos para a busca de uma fosfolipase A2, visto que a miotoxicidade é causada por PLA2 também.

Sugerimos que a atividade neurotóxica apresentada por abelhas e lacraias testadas pudesse ser atribuída à atividade de PLA2, já que nos venenos de viperídeos normalmente é atribuída a esta toxina esta ação farmacológica, informação bastante extensa e padronizada na literatura (DANSE *et al*, 1997; ARNI & WARD, 1996; SCOTT *et al*, 1990; OWBY *et al*, 1999; LIZANO *et al*, 2003; KINI & EVANS, 1989).

PLA2 normalmente contem grande número de isoformas, a razão para sua existência poderia ser a adaptação evolucionária para obtenção de máximo sucesso na subjugação de presas e defesa contra predadores (MACHADO *et al*, 2005).

Utilizamos como controle da atividade PLA2 o veneno de *Bothrops jararacussu* pois este contem proteínas isoladas com atividade de PLA2 (HOMSI-BRANDEBURGO *et al*, 1988) com ação miotóxica, causando necrose

de fibras musculares estriadas e retardo de regeneração (QUEIROZ *et al*, 1884). O veneno de *Crotalus durissus terrificus* apresenta PLA2 e potente atividade miotóxica, atribuída ao complexo crotoxina (GOPALAKRISHNAKONE *et al*, 1984; KOUYOUMDJIAN *et al*, 1986) também foi utilizado como controle.

Com a finalidade de confirmar os dados de atividade fosfolipásica encontrados pelo primeiro método, realizamos também atividade hemolítica indireta por fosfolipases A2 em placas de agarose.

O teste de atividade hemolítica indireta utilizado para a verificação de atividade PLA2 é uma alternativa “in vitro” para evitar o uso em larga escala de camundongos. É baseado na mensuração de halos hemolíticos induzidos por veneno em gel de agarose contendo eritrócitos e gema de ovo. Trata-se de um método sensível, fácil, rápido, barato e muitas amostras podem ser testadas simultaneamente. Foi encontrada uma boa correlação entre este ensaio e o realizado com veneno de *Bothrops asper* para a determinação da neutralização de letalidade (GUTIÉRREZ *et al*, 1988). Concordando com estes dados DA SILVA & BIER (1982) observaram uma boa correlação entre neutralização de hemólise indireta e neutralização de letalidade quando testado antiveneno produzido contra veneno de *Crotalus durissus terrificus* e crotoxina, PLA2 neurotóxica deste veneno.

Os resultados encontrados no método de atividade PLA2 de HOLZER & MACKESSY (1996), utilizando substrato cromogênico e o de GUTIÉRREZ *et al*. (1988), com hemólise indireta, apresentaram resultados equivalentes.

A atividade miotóxica do veneno possui ação no desarranjo das formações de actina - miosina do músculo esquelético. Os venenos de serpentes do gênero *Bothrops* têm componentes que afetam diretamente as

células musculares, estes são chamados miotoxinas. A atividade miotóxica no envenenamento botrópico é atribuída às fosfolipases do tipo A2. As miotoxinas isoladas até o momento tratam-se de proteínas básicas, com peso molecular próximo a 15 kDa, cujas propriedades estruturais permitem classificá-las como fosfolipases A2 (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1989, 1995, 1997).

O veneno de *B. alcatraz* apresentou valores tanto da atividade miotóxica quanto da atividade fosfolipásica maiores que os apresentados pelo veneno de *B. jararaca*, espécie continental utilizada como parâmetro de comparação. Demonstrando que o veneno de *B. alcatraz* possui maior quantidade de proteínas específicas a estas ações e/ou que estas possuem atividades mais pronunciadas. Resultados importantes foram encontrados visto que estas atividades estão diretamente relacionadas à dieta, ou seja, são adaptações à digestão do animal (DALTRY *et al*, 1996b).

A miotoxicidade pode ser resultado de interação de outras toxinas do veneno com o tecido muscular, como hemorraginas e proteases, resultando em perda ou disfunção de tecidos e isquemia (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1989). Portanto para a confirmação desta atividade realizamos ensaio de citotoxicidade *in vitro* em cultura celular, confirmando que o veneno de *B. alcatraz* possui atividade miotóxica pronunciada. Neste método adicionou-se veneno de *B. alcatraz*, de *B. jararaca*, frações obtidas por cromatografia de troca iônica, controle positivo (PBS) e controle negativo (Triton 0,1%) nos poços da placa, já com células crescidas e diferenciadas. As frações do veneno de *B. alcatraz* testadas não apresentaram atividade miotóxica diferencial comparadas às outras amostras testadas e aos controles. A potência em ensaios demonstrada pelo veneno total pode não refletir a potência de toxinas

individuais deste (QUISTAD *et al*, 1992). A placa foi incubada por 4 horas a 37°C e então se realizou ensaio para quantificação da liberação de LDH (desidrogenase láctica) intracelular, por ruptura de membranas celulares.

HO *et al* (1986) reportou a inibição da proliferação de células neuroblastoma pela notexina e pela PLA2 básica do veneno de *Naja nigricollis* (NG-4). CHWETZOFF *et al* (1989) demonstrou que a nigerina, PLA2 básica do veneno de *N. nigricollis*, alterou a viabilidade de células e proliferação de células epiteliais, neuroblastoma e promielócitos leucêmicos, relatando também que a citotoxicidade da nigerina entende-se a vários tipos de células eucarióticas. ZIOLKOWSKI & BIEBER (1992) demonstraram a sensibilidade dos mioblastos à toxina Mojave, uma PLA neurotóxica heterodimérica.

Nos ensaios realizados com abelhas, da espécie *Apis mellifera*, verificase ação neurotóxica com a utilização do veneno de *B. alcatraz*, resultado este que não ocorre em mamíferos (camundongos) para o mesmo veneno. O veneno de *B. jararaca* não causa estas ações tanto em abelhas quanto em camundongos.

É possível a verificação desta ação neurotóxica pela observação dos sintomas apresentados pelos insetos. A glossa (probóscide) é ejetada como uma tentativa de captação de gases aéreos, pois devido à flacidez da musculatura respiratória dificulta-se a abertura e fechamento de espiráculos. Os músculos dos membros locomotores tornam-se flácidos fazendo com que os animais caíssem quando tentavam caminhar ou apresentassem andar vacilante. Também observou-se paralisia dos membros locomotores uni ou bilateralmente, sendo as patas anteriores primeiras a perderem sua função normal. O tempo de paralisia foi variável, podendo: paralisar definitivamente,

paralisar momentaneamente ou ocorrerem paradas esporádicas com alternância entre paradas e atividade; sendo que tempos longos de paralisia (crescentes a cada parada) e curtos de atividade desenvolviam ao óbito; e tempos curtos de paralisia e longos (e gradualmente crescentes) de estado ativo desenvolviam para a recuperação do animal. O bombeamento da ponta do abdome também representou um sinal de neurotoxicidade (Mário Palma, comunicação pessoal, 2003).

Abelhas *Apis mellifera* recém - eclodidas demonstraram ser bons indicadores de toxicidade com vários venenos testados, além de recém - eclodidas serem mais fáceis de se manipular que as adultas, seus ferrões ainda não estão endurecidos, não podendo picar o manipulador. Também é possível se utilizar animais de mesma idade (em horas) e pequenas doses de veneno são necessárias (MANZOLI – PALMA *et al*, 2003). Abelhas são animais bastante ativos, e os efeitos causados pelo veneno são claramente observados. O padrão de comportamento normal considera o grupo controle como sempre ativas, alimentando-se de solução açucarada, andando em círculos, escalando o recipiente onde se encontram e às vezes tocando-se umas às outras (MANZOLI – PALMA *et al*, 2003).

Ensaio realizado com abelhas inoculadas com veneno do escorpião *Tityus serrulatus* mostrou uma fase excitatória com as abelhas locomovendo-se rápido com posterior diminuição da movimentação. Três horas após a inoculação as abelhas caíram/tombaram dorsalmente e apresentavam dificuldade para retornar à posição inicial. Elas apresentavam tontura e as patas metatorácicas não se dobravam. Após caírem dorsalmente as abelhas não retornavam à posição apesar de moverem as patas, ocorrendo neste

estágio contração abdominal até óbito. As abelhas apresentaram-se mais sensíveis ao veneno de escorpião que a qualquer outro modelo testado visto em literatura (DELIMA *et al*, 1986; ESCOUBAS *et al*, 1995; ZLOTKIN *et al*, 1991).

Com a inoculação do veneno de *Phoneutria nigriventer* em abelhas observou-se flacidez e perda de movimentos corporais, com o padrão de movimentação letárgico e queda lateral seguida de paralisia gradual e morte (MANZOLI – PALMA *et al*, 2003).

Por fim, a inoculação do veneno de *Loxosceles gaucho* em abelhas causou desorientação, quedas e contrações da musculatura ventral, desenvolvendo para morte (MANZOLI – PALMA *et al*, 2003).

De acordo com FRIEDEL & NENTWIG (1989) neurotoxinas com diferentes atividades farmacológicas foram encontradas no veneno de aranhas. O efeito pré - sináptico pode ser responsável por quase todos os efeitos excitatórios em insetos. Recentemente toxinas com ação pós – sináptica também foram encontradas no veneno de aranhas. Este bloqueio na transmissão da junção neuromuscular e a transmissão bloqueada por estas toxinas são induzidas por ativação, dependente do agonista (glutamato) e é vagorosamente reversível. Efeitos inibitórios (paralisia) podem ser atribuídos a toxinas de efeito pós – sináptico (FRIEDEL & NENTWIG, 1989). Ambos tipos de toxinas podem ser encontrados no mesmo veneno (ADAMS *et al*, 1986) e podem agir cooperativamente ou sinergisticamente (FRIEDEL & NENTWIG, 1989).

A pesquisa com toxinas de aranhas vêm sendo intensificada na procura de ferramentas farmacológicas específicas para neurofisiologia de insetos

(USHERWOOD & DUCE, 1985). Mas informação básica sobre efeitos de veneno total em presas de aranhas ainda é escasso (FRIEDEL & NENTWIG, 1989).

Estudos relacionados a envenenamento de insetos com veneno de serpentes são escassos. QUISTAD *et al* (1992) testaram veneno de serpentes em modelos biológicos com artrópodes. Embora se possa pensar que qualquer seletividade inseticida seja descoberta acidentalmente, ZLOTKIN *et al* (1976) reportou toxinas seletivas a artrópodes em veneno de serpente. Muitos dos venenos testados por QUISTAD *et al* (1992) foram inativos, porém os venenos de *Naja naja* e *Crotalus atrox* foram letais para a larva da lagarta - do - tabaco (*Manduca sexta*). A descoloração da larva e o rápido desenvolvimento de necrose sugerem que estes venenos causam lise celular não seletiva em insetos.

Um dos objetivos da indústria química é desenvolver novos métodos seguros para o controle de pragas (insetos), este objetivo pode ser alcançado pelo uso de agentes anti – insetos naturais, como venenos de aranhas e escorpiões, que vêm sendo desenvolvidos durante milhões de anos de evolução (MANZOLI – PALMA *et al*, 2003). Potentes neurotoxinas que agem no sistema nervoso central e periférico de insetos têm sido identificadas (GRISHIN, 1994).

Protocolos de experimentação de venenos de aranhas e escorpiões normalmente utilizam-se de insetos de diferentes ordens: Blattaria (*Blatta orientalis*), Lepidóptera (*Manduca sexta*), Coleóptera (*Tenebrio molitor*), Orthoptera (*Acheta domesticus*) e Díptera (*Drosophila melanogaster*, entre outros). Estes insetos podem apresentar sensibilidade muito diferente para

cada tipo de veneno. Portanto, há dificuldade em comparar diferentes resultados para o mesmo veneno, quando ensaiado em diferentes insetos – teste, principalmente sob condições ambientais/experimentais adversas.

Em particular, a busca por novas neurotoxinas inseto – específicas vem se tornando uma área importante de investigação por Companhias Agroquímicas para o desenvolvimento de bioinseticidas altamente seletivos (MANZOLI – PALMA *et al*, 2003).

Os resultados comportamentais observados para o veneno de aranhas comparativamente podem ser considerados equivalentes aos observados quando da inoculação do veneno de *B. alcatraz* em abelhas.

O veneno de *B. alcatraz*, com o aprofundamento de estudos, pode vir a ser potencial para o desenvolvimento destes bioinseticidas, sendo um dos poucos veneno do gênero a apresentar características tão peculiares, ou seja, ação neurotóxica a abelhas como apresentado pelos venenos conhecidamente neurotóxicos e específicos de aranhas e escorpiões.

Nos grilos inoculados com venenos de *B. alcatraz* pôde-se observar interrupção abrupta dos movimentos logo após a aplicação, patas posteriores alongadas, contração abdominal periódica, espasmos, queda, decúbito dorsal. Nenhum dos animais alimentou-se ou utilizou-se da água disponibilizados. Quando estimulados com um leve toque da ponta de uma pinça moviam-se pouco porem em seguida paravam novamente. Os animais inoculados com o veneno de *B. jararaca* apresentaram sintomas leves de envenenamento ou comportamento semelhante ao do grupo controle.

Os efeitos de envenenamento por aranhas observados em *Grillus assimilis* por MANZOLI-PALMA *et al.* (2003) foram: interrupção abrupta de

movimentos, encurtamento do abdome, início do processo de ecdise, tremura dos membros, andar arrastando o abdome, antenas caídas, cair lateralmente e paralisia completa ou incompleta, levando à recuperação ou óbito.

Após a inoculação do veneno de aranhas em barata observa-se uma típica seqüência bifásica de comportamentos: (1) uma fase excitatória indicada por tremura, solavancos e hiperextensão das patas. A locomoção torna-se descontrolada e reduzida. Tremura e movimentos abruptos dos membros progridem do metatórax para as patas protorácicas, sendo a taxa do processo dose – dependente. (2) Paralisia, locomoção reduzida ou suprimida completamente. Tremura e hiperextensão de patas ainda ocorrem, porém em menor frequência e amplitude. Reflexos de escape provocados por estímulos tornam-se fracos ou nulos (FRIEDEL & NENTWIG, 1989). A intensidade dos efeitos foi dependente da concentração do veneno inoculado (FRIEDEL & NENTWIG, 1989), provavelmente por este motivo as baratas testadas com o veneno de *B. alcatraz* podem não ter apresentado sintomas de envenenamento, talvez se o teste fosse realizado novamente com maior concentração de veneno isto seria observado. Esta repetição não foi realizada devido à pequena disponibilidade deste veneno e julgada a prioridade de outros ensaios para seu uso.

A dieta tem papel importante na composição dos venenos de serpentes, atuando como selecionador de características, não como um fator modificador (FRY *et al* 2003a, FRY *et al* 2003b , LI *et al* 2005a , LI *et al* 2005b).

A suscetibilidade e disponibilidade de presas têm papel importante na seleção natural da composição de toxinas. Assim pensa-se que a composição

do veneno reflete diretamente as presas e portanto os hábitos alimentares da serpente (DALTRY *et al*, 1996a).

A duplicação e divergência de genes são apontadas como principais causas das substituições de nucleotídeos, sobretudo não sinônimas, que levam ao surgimento de isoformas (PLA2, por exemplo). Este processo é denominado evolução acelerada e é responsável pela diversificação de potencial biológico e do espectro de ação das toxinas frente a diferentes alvos/presas (MOURA DA SILVA *et al*, 1997; OHNO *et al*, 2003; LI *et al* 2005a).

Serpentes que se alimentam de grande diversidade de presas precisam de uma multiplicidade de tipos de toxinas para afetar a variedade de sistemas de defesa e alvos fisiológicos da presa (FRY *et al*, 2003a).

A seleção natural atuou em populações diferentes de *Calloselasma rhodostoma* produzindo veneno apropriado para subjugar e digerir presas locais (DALTRY *et al*, 1996 a,b), porém SASA (1999) afirma que estudos que evidenciam correlação entre variação intraespecífica de veneno e dieta devem ser considerados cuidadosamente pois a associação observada não necessariamente implica causalidade. Por que muito da diversidade de veneno observada resulta de diferentes alelos codificando para a mesma enzima, forças evolucionárias outras que não a seleção podem também explicar a grande variação de componentes de venenos entre as populações.

LI *et al* (2005a) descrevem uma deleção de um dinucleotídeo no gene da única toxina “tree-finger” expressa no veneno da serpente marinha *Aipysurus eydouxii*, que ocasionou perda de ação neurotóxica, e como isto colaborou para uma significativa mudança de hábito alimentar, de peixes para ovos. Sugerem se tratar do primeiro exemplo de uma ligação evolutiva

alternativa entre composição do veneno e adaptação de dieta em serpentes. Descrevem como a mudança na ecologia afetou a composição do veneno. Neurotoxinas pós sinápticas possuem papel crucial na imobilização e rápida morte da presa. Isto é concordante com o problema de se alimentar de presas rápidas no ambiente aquático (LI *et al*, 2005a).

A serpente coral *Micrurus helmprichii*, da Bacia Amazônica, alimenta-se de *Onychophoros* (que possuem corpo mole), uma dieta em qual a regra adaptativa do veneno não é evidente (GREENE, 1988 a,b). Por outro lado, algumas serpentes marinhas contêm venenos com toxinas das mais potentes, uma adaptação para rapidamente subjugar sua presa. A redução da dentição presente em serpentes marinhas que se alimentam de ovos (*Emydocephalus annulatus*, *E. ijimae*, *Aipysurus eydouxii*) pode refletir uma adaptação à dieta especializada (VORIS, 1966).

A metodologia de purificação utilizada se mostrou adequada. Utilizaram-se seqüencialmente colunas cromatográficas de gel filtração e troca iônica. De acordo com SPENCER (2000) o método inicialmente descrito para purificar a bothropstoxina envolvia uma gel-filtração seguida de uma cromatografia de troca catiônica, conseguindo-se depois padronizar um método mais prático com uma única cromatografia.

A cromatografia de gel filtração, também denominada cromatografia por exclusão de tamanho, emprega fase estacionária aquosa e tem enorme aplicação na separação de biomacromoléculas (proteínas, polinucleotídeos). É uma das técnicas importantes para a determinação de peso molecular e distribuição de peso molecular de polímeros (NETO & NUNES, 2003). Os resultados com o veneno de *B. alcatraz* foram obtidos conforme o esperado e

houve boa resolução e separação dos componentes do veneno, além de constatada reprodutibilidade do método.

Na cromatografia de troca iônica entende-se por troca iônica a troca de íons de mesmo sinal entre uma solução e um corpo sólido insolúvel em contato com ela. O sólido (trocador de íons) deve conter seus próprios íons para que a troca se processe com rapidez e na extensão suficiente. O sólido deve apresentar uma estrutura molecular aberta, permeável, de modo que os íons e moléculas de solvente possam se mover para dentro e fora de sua estrutura (COLLINS *et al*, 1993).

Na cromatografia de troca iônica o material pode ser separado em colunas de resinas trocadoras de cátions, nas quais grupos aniônicos são fixados, e trocadoras de ânions, onde se fixam grupos catiônicos (LEHNINGER, 1984).

A coluna de troca catiônica Mono S, cuja propriedade é reter proteínas de caráter básico, não apresentou retenção do veneno de *B. alcatraz* aplicado, portanto pode-se sugerir que este veneno apresenta majoritariamente proteínas de caráter ácido. Por este motivo utilizamos posteriormente coluna trocadora de ânions Mono Q. Esta nova coluna apresentou boa resolução e separação do material.

Na cromatografia de fase reversa, a fase móvel é mais polar em fase normal, a fase estacionária é mais polar que a móvel. Separações analíticas são predominantemente realizadas em cromatografia de fase reversa, sendo a coluna C18 (octadecil-sílica) a mais usada, ao passo que são preferidas fases que atuem no modo normal para fins preparativos, em vista de que separações no modo reverso utilizam fases móveis aquosas (COLLINS *et al*, 1993).

Após a corrida em cromatografia de fase reversa não observamos atividade PLA2 no material obtido. Isto pode ser devido ao tampão acetonitrila usado, um solvente orgânico que pode desnaturar proteínas.

Após o fracionamento do veneno de *B. alcatraz* por colunas cromatográficas não foram detectados contaminantes na análise por eletroforese.

Para confirmar a pureza e identidade da toxina purificada, a mesma foi submetida a espectrometria de massa por ESI-MS. Esta metodologia se baseia no tempo que o analito leva para atingir o detetor após ter sido ionizado e vaporizado por um feixe de laser. Quanto maior a razão carga/massa de um dado composto, menor o seu momento e maior a sua velocidade (TUBBS *et al*, 2000).

A análise por espectrometria de massa evidencia a existência de outras moléculas na fração purificada, todavia em concentrações muito baixas (SPENCER, 2000).

Sugere-se a pureza do material após esta análise, porém cabe ressaltar que existiram dificuldades de ionização desta amostra e a análise também foi dificultada pela pequena quantidade de material disponível. As dificuldades na ionização sugerem um caráter aniônico ou hidrofóbico (Patrick Spencer, comunicação pessoal).

Os dados apresentados com o veneno de *B. alcatraz* apontam para uma especialização do veneno frente a uma dieta especializada. Pode-se sugerir que estas características, o fato de possuir atividade neurotóxica e a atividade coagulante pronunciada e semelhante à de filhotes, tratem-se de adaptações à dieta desta serpente e estejam relacionadas à evolução de toxinas desta.

Ressalta-se a importância da pesquisa voltada para busca de novas toxinas. Destacando que a purificação, identificação e caracterização de toxinas são necessárias e úteis para o entendimento da fisiopatologia do envenenamento.

As fosfolipases são enzimas com amplo espectro de atividades farmacológicas conhecidas, porém o envenenamento com sintomatologia neurotóxica é comumente encontrada em toxinas de elapídeos. Este trabalho atenta para descoberta de uma atividade farmacológica não usual e pouco estudada dentro do gênero *Bothrops*, trazendo resultados interessantes e despertando o interesse de desenvolvimento de novos estudos.

6. Conclusões

- O veneno de *B. alcatraz* apresentou bandas proteicas exclusivas de aproximadamente 67, 43 e 40 kDa e grande concentração de proteínas nas regiões de 60 e 14 kDa, sob condições redutoras, enquanto o de *B. jararaca* apresentou proteínas majoritárias na faixa de 60, 25 e abaixo de 20 kDa.
- O veneno de *B. alcatraz* apresentou atividade hialuronidásica equivalente à do veneno de *B. jararaca*.
- O veneno de *B. alcatraz* apresenta *atividade hemorrágica* menor que o veneno de *B. jararaca*.
- A atividade proteolítica sobre caseína de *B. jararaca* apresenta valores elevados se comparados aos apresentados pelo veneno de *B. alcatraz*.
- Na atividade coagulante sobre plasma humano e atividade fosfolipásica o veneno de *B. alcatraz* apresentou valores maiores que o apresentado pelo veneno de *B. jararaca*.
- A *atividade miotóxica*, dosada pela liberação de creatino-quinase (CK), apresentou-se mais ativa no veneno de *B. alcatraz* que no de *B. jararaca*.

- A Dose Mínima Edematogênica (DME) de *B. alcatraz* foi 0,27 µg e de *B. jararaca* 0,41 µg, sugerindo uma tendência de que o veneno de *B. alcatraz* é mais ativo.
- O veneno de *B. alcatraz* apresentou Dose Letal Média de 95,1 µg/camundongo, representando este valor baixa letalidade se comparado ao veneno de *B. jararaca* (24,7 µg/camundongo) e de outras espécies do gênero.
- Ensaio realizados com abelhas (*Apis mellifera*) e lacraias do gênero *Otostigmus* demonstraram que o veneno de *B. alcatraz* possui ação neurotóxica ativa sobre estes modelos experimentais, enquanto que o veneno de *B. jararaca* não expressa tal atividade.
- Os resultados sugerem especificidade do veneno de *B. alcatraz* para presas locais/ de seu habitat.
- As técnicas cromatográficas utilizadas mostraram-se eficientes, reprodutíveis e adequadas.
- A análise por espectrometria de massa sugere pureza do material.

7. Referências bibliográficas

ADAMS, M; ENDERLIN, FE; CONE, RI & SCHOOLEY, DA. 1986. Isolation and biological activity of synaptic toxins from the venom of the funnel web spider, *Aglenopsis aperta*. In: **Insect Neurochemistry and Neurophysiology**, p. 397 (BORKOVEC, AB & GELMAN, DB, Eds.). Clifton New York: Humana Press.

AIRD, S.D. & JORGE DA SILVA, N. 1991. Comparative enzymatic composition os Brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms. **Comp. Biochem. Physiol.** 99B: 287-294.

ALMEIDA-SANTOS, SM & SALOMÃO, MG. 2001. Reproductive strategies in tropical pitvipers, genus *Bothrops* (Serpentes: Viperidae: Crotalinae). In press. In G. Schuett, M. Höggren, and H. W. Greene (Eds.), **Biology of the Vipers**. Eagle Mountain Publishing. Eagle Mountain, Utah, U.S.A.

AMARAL, A.1925. A general consideration of snake poisoning and observation on neotropical pitvipers. **Contr. Harvard Inst. Trop. Biol. & Med.** 2: 54-55.

ANDRADE, D.V. & ABE, A.S. 1999. Relationships of venom ontogeny and diet in *Bothrops*. **Herpetologica** 55: 200-204.

ANDRADE, D. V.; ABE, A.S. & DOS SANTOS, M.C.1996. Is the venom related to diet and tail color during *Bothrops moojeni* ontogeny? **Journal of Herpetology** 30: 285-288.

ÂNGELO, S. 1989. **Ilhas do Litoral Paulista**. Secretaria do Meio Ambiente. Série Documentos ISSN 0103-264X. São Paulo-SP. 49 p.

ARNI, RK & WARD, RJ. 1996. Phospholipase A2 – a structural review. **Toxicon** 34: 827 – 841.

BJARNASON, J & FOX, JW. 1988/89. Hemorrhagic Toxins Snake Venoms. J. **Toxicol. Toxin Reviews** 7: 121 – 209.

BRAZIL, O.V. 1984. 71. Peçonhas. In: CORBET, C.E. (ed.). **Farmacodinâmica**. 6 ed. São Paulo, Guanabara Koogan, p. 1044-1074.

BUSSAB, WO & MORETTIN, PA. 1986. **Estatística básica**. São Paulo: Atual.

CAMPBELL, JA & LAMAR, WW. 1989. **The venomous reptiles of Latin America**. 6 ed. Ithaca and London, Comstock, 425 pp.

CASE, T.J. 1983. The reptiles: ecology. Pp. 159-209. In T.J. Case and M.L. Cody (Eds.), **Island Biogeography in the sea of Cortéz. University of California Press**. Berkeley, California, U.S.A.

CHIPPAUX, J.P.; WILLIAMS, V. & WHITE, J. 1991. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon** 29: 1279-1303.

CHWETZOFF, S; TAKESHI, M; FROMAGEOT, P & MENEZ, A. 1988. Basic phospholipase from the venom of *Naja nigricollis* is cytotoxic. **C-R Acad. Sci. – III** 306: 31 – 33.

CHWETZOFF, S; TSUNASAWA, S; SAKIYAMA, F & MENEZ, A. 1989. Nigexine, a phospholipase A2 from cobra venom with cytotoxic properties not related to esterase activity. Purification, amino acid sequence and biological properties. **J. Biol. Chem.** 264 (13): 289 – 297.

COGO, J.C.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CRUZ-HOFLING, M.A.; CORRADO, A.P. & RODRIGUES SIMIONI, L. 1993. Effects of *Bothrops insularis* venom on the mouse and chick nerve-muscle preparation. **Toxicon** 31: 1237-1247.

COLLINS, CH; BRAGA, GL & BONATO, PS. 1993. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas, Editora UNICAMP, 5ª ed.

DA SILVA, MH & BIER, OG. 1982. Titration of antiserum to south American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom by measuring inhibition of phospholipase A2 activity. **Toxicon** 20: 563.

DALTRY, JC; WÜSTER, W & THORPE, RS. 1996a. Diet and venom evolution. **Nature** 379: 537-540.

DALTRY, JC; PONNUDURAI, G; SHIN, CK, TAN; NH; THORPE, RS & WÜSTER, W. 1996b. Electrophoretic profiles and biological activities: Intraspecific variation in the venom of the Malayan pitviper (*Calloselasma rhodostoma*). **Toxicon** 34: 67 – 79.

DANSE, JM; GASPARINI, S & MÉNEZ, A. 1997. Molecular biology of snake venom phospholipases A₂. In: **Venom phospholipase A₂ enzymes: structure, function and mechanism**. KINI, RM (ed). John Wiley & Sons Ltd.

DELIMA, ME; MARTINS, MF; DINIZ, CR & ROCHAT, H. 1986. Tityus serrulatus toxin ii bears pharmacological properties of both beta-toxin and insect from scorpion venoms. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 139: 296 – 302.

DUARTE, M.R.; PUORTO, G. & FRANCO, F.L. 1995. A biological survey of the pitvipers *Bothrops insularis* Amaral (serpentes, Viperidae): an endemic and threatened offshore island snake of southeastern Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment** 30: 1-13.

ESCOUBAS, P; PALMA, MFM & NAKAJIMA, T. 1995. A microinjection technique using *Drosophila melanogaster* for bioassay – guide isolation of neurotoxins in arthropods venoms. **Toxicon** 33: 1549 – 1555.

FERRANTE, N. 1956. Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and hyaluronidase activity. **J. Biol. Chem.** 220: 303 – 306.

FINNEY, D.J. 1971. **Probit analysis**. 3rd (ed.), Cambridge University Press.

FLETCHER, JE; RAPUANO, BE; CONDREA, E; YANG, CC & ROSENBERG, P. 1981. Relationship between catalysis and toxicological properties of three

phospholipases A2 from elapid snake venoms. **Toxicol. Appl. Pharmac.** 59: 375 – 388.

FRIEDEL, T & NENTWIG, W. 1989. Immobilizing and lethal effects of spider venoms on the cockroach and the common mealbeetle. **Toxicon** 27 (3): 305 – 316.

FRIEDERICH, C & TU, AT. 1971. Role of metal in snake venoms for hemorrhage, esterase and proteolytic activities. **Biochemistry** 18(4): 678 – 684.

FRY, BG; WUSTER, W; KINI, RM; BRUSIC, V; KHAN, A; VENKATARAMAN, D & ROONEY, AP. 2003a. Molecular evolution and phylogeny of elapid snake venom three-finger toxins. **J. Mol. Evol.** 57: 110 – 129.

FRY, BG; LUMSDEN, NG; WUSTER, W; WICRAMARATNA, JC; HODGSON, WC & KINI, RM. 2003b. Isolation of a neurotoxin (α-colubritoxin) from a nonvenomous colubrid: evidence for early origin of venom in snakes. **J. Mol. Evol.** 57: 446 – 452.

FURTADO, M.F.D. 1987. Contribuição ao estudo do veneno de *Bothrops moojeni* (Hoge, 1965) (Serpentes, Viperidae, Crotalinae) em função da idade das serpentes. **Tese de doutorado**. São Paulo, Universidade de São Paulo.

FURTADO M.F.D.; MARUYAMA, M.; KAMIGUTI, A.S. & ANTONIO, L.C. 1991. Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. **Toxicon** 29: 219-226.

FURTADO, V.V.; MAHIQUES, M.M. & TESSLER, M.G. 1992. Utilização de Feições topográficas submersas na correlação de paleoníveis marinhos: uma avaliação. In **Congresso da Associação Brasileira de Estudos do Quaternário, 3 Anais**. Associação Brasileira de estudos do Quaternário. Belo Horizonte- M.G., p. 175-186.

FURTADO, MFD. 2005. Biological and immunological properties of the venom of *Bothrops alcatraz*, an endemic species of pitviper from Brazil. **Comparative Biochemistry and Physiology** 141: 117-123.

GOPALAKRISHNAKONE, P; DEMPSTER, DW; HAWGOOD, BJ & ELDER, HY. 1984. Cellular mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A2 complex. **Toxicon**, 22: 85 – 98.

GOWDA, TV & MIDDLEBROOK, JL. 1993. Effects of myonecrotic snake venom phospholipase A2 toxins on cultured muscle cells. **Toxicon** 31: 1267 – 1278.

GRAZZIOTIN, FG; MONZEL, M; ECHEVERRIGARAY, S & BONATTO, SL. 2006. Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. **Mol. Ecol.** 15 (13): 3969-3982.

GREENE, HW. 1988a. The evolution of feeding mechanisms in snakes. **Tucson Herp. Soc. News.** 8: 65 – 69.

GREENE, HW. 1988b. The evolution of feeding mechanisms in snakes. **Tucson Herp. Soc. News.** 9: 75 – 78.

GRISHIN, E. 1994. Spider neurotoxins and their neuronal receptors. **Pure Appl. Chem.** 66: 783 – 790.

GUTIÉRREZ, JM; ARROYO, O & BOLAÑOS, R. 1980. Myonecrosis, hemorragia y edema inducidos por el veneno de *Bothrops asper* en ratón blanco. **Toxicon** 18: 603 – 610.

GUTIÉRREZ, JM; AVILA, C; ROJAS, E & CERDAS, L. 1988. An alternative *in vitro* method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. **Toxicon**, 26 (4): 411-413.

GUTIÉRREZ, JM; GENÉ, JA; ROJAS, G & CERDAS, L. 1985. Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rica snake venoms by a polyvalent antivenom. **Toxicon** 23: 887 – 893.

GUTIÉRREZ, JM & LOMONTE, B. 2003. Efectos locales en el envenenamiento ofídico em América Latina. In: CARDOSO, JLC; FRANÇA, FOS; WEN, FH; MÁLAQUE, CMS & HADDAD, VJr (Ed). **Animais peçonhentos do Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 1 ed. , São Paulo, Sarvier, 310 – 323.

GUTIÉRREZ, JM & LOMONTE, B. 1989. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms: a review. **Mem. Inst. Butantan** 51(4): 211 – 223.

GUTIÉRREZ, JM & LOMONTE, B. 1997. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. In: KINI, RM (Ed.). **Venom Phospholipase A2 Enzymes: Structure, Function and Mechanism**, Wiley & Sons, Chichester, p. 321 – 352.

GUTIÉRREZ, JM & LOMONTE, B. 1995. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon** 33(11): 1405 – 1424.

GUTIÉRREZ, JM & RUCAVADO, A. 2000. Snake venom metaproteinases: Their role in pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie** 82, 841 – 850.

HABERMANN, E & HARDT, KL. 1972. A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases. **Analytical Biochemistry** 50: 163 – 173.

HARVEY, A.L. 1991. Snake toxins. Int. **Encycl. Pharmac.Ther. Sect.** 134; Oxford (Pergamon Press).

HEUSSEN, C & DOWDLE, EB. 1980. Eletrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. **Anal. Biochem.** 102: 196 – 202.

HO, CL; KO, JL & LEE, CY. 1986. Differences in pharmacological actions between β - bungarotoxin and other neurotoxic phospholipase A2 purified from snake venoms. **Proc. Natl. Sci. Counc. Repub. China** 10: 192 – 202.

HOLZER, M & MACKESSY, SP. 1996. A n aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A2. **Toxicon**, 34 (10): 1149-1155.

HOMSI-BRANDEBURGO, MI; QUEIROZ, LS; SANTO-NETO, H; RODRIGUES-SIMIONI, L & GIGLIO, JR. 1988. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon** 26: 615 – 627.

IUCN 2002. *2002 IUCN Red List of Threatened Species*. Downloaded on 04 September 2003 (www.redlist.org)

IWANAGA,S & SUZUKI, T. 1979. Enzymes in snake venom. In: Lee, CY (Ed.). **Snake Venoms**. Berlin, Springer-Velag, p. 61.

JAYANTHI, GP; KASTURI, S & GOWDA, TV. 1989. Dissociation of catalytic activity and neurotoxicity of a basic phospholipase A2 from Russell's viper (*Vipera russelli*) venom. **Toxicon** 27: 875 – 885.

JIAN-LI, L. 1995. China Snake Island. **Liaoning Science and Technology Press**. Liaoning, China.

JORGE DA SILVA, N.; GRIFFIN, P.R. & AIRD, S.D. 1991. Comparative chromatography of Brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms. **Comp. Biochem. Physiol.** 100B: 117-126.

KAMIGUTI, AS; SLUPSKY, JR; ZUZEL, M & HAY, CR. 1994. Properties of fibrinogen cleaved by Jararhagin, a metalloproteinase from the venom of *Bothrops jararaca*. **Thromb. Haemost.** 72 (2): 244 - 249.

KASTURI, S & GOWDA, TV. 1989. Purification and characterization of a major phospholipase A2 from Russell's viper (*Vipera russelli*) venom. **Toxicon** 27: 229 – 237.

KINI, RM. 1997. Chapter 1: Phospholipase A2 – A complex multifunctional protein puzzle. In: KINI, RM (Ed.). **Venom phospholipase A2 enzymes: structure, function and mechanism**. England, Wiley, p. 1 – 28.

KINI, RM & EVANS, HJ. 1989. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipase A2. **Toxicon** 27: 613 – 635.

KOCHVA, E. 1987. The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. **Toxicon** 25: 65-106.

KONDO, H.; KONDO, S.; KEZAWA, H.; MURATA, R. & OHSAKA, A. 1960. Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of habu venom. **Jpn. J. Med. Sci. Biol.** 13, 43-51.

KOUYOUMDJIAN, J.A.; HARRIS, JB & JOHNSON, MA. 1986. Muscle necrosis caused by the sub-units of crotoxin. **Toxicon** 24: 575 – 581.

LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227: 680-685.

LEE, CY; HO, CL & EAKER, D. 1977. Cardiotoxin like action of a basic phospholipase A isolated from *Naja nigricollis* venom. **Toxicon** 15: 355 – 356.

LEHNINGER, A. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1984.

LI, M; FRY, BG & KINI, RM. 2005a. Eggs-only diet: Its implications for the toxin profile changes and ecology of the marbled sea snake (*Aipysurus eydouxii*). **J. Mol. Evol.** 60: 81 – 89.

LI, M; FRY, BG & KINI, RM. 2005b. Putting the brakes on snake venom evolution: the unique molecular evolutionary patterns of *Aipysurus eydouxii* (marbled sea snake) phospholipase A2 toxins. **Mol. Biol. Evol.** 22 (4): 934 – 941.

LIZANO, S; DOMONT, G & PERALES, J. 2003. Natural phospholipase A2 myotoxins inhibitor proteins from snakes, mammal and plants. **Toxicon** 42 (8): 963 – 977.

LOMONTE, B & GUTIÉRREZ, JM. 1983. La actividad proteolítica de los venenos de serpientes da Costa Rica sobre la caseína. **Rev. Biol. Trop.** 31 (1): 37 – 40.

LOMONTE, B; ÂNGULO, Y; RUFINI, S; CHO, W; GIGLIO, JR; OHNO, M; DANIELE, JJ; GEOGHEGAN, P & GUTIÉRREZ, JM. 1999. Comparative study of cytolytic activity of myotoxic phospholipase A2 on mouse endotelial (tEnd) and skeletal muscle (C2C12) cells *in vitro*. **Toxicon** 37: 145 – 158.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-275.

LUEDERWALDT, H. & FONSECA, J.P. 1923. A Ilha dos Alcatrazes. **Rev. Mus. Paulista** 13: 441-512.

LUEDERWALDT, H. & FONSECA, J.P. 1923. A Ilha dos Alcatrazes. **Rev. Mus. Paulista** 13: 441-512.

MACHADO, LF; LAUGESSEN, S; BOTELHO, ED; RICART, CAO; FONTES, W; BARBARO, KC; ROEPSTORFF, P & SOUZA, MV. 2005. Proteome analysis of brown spider venom: Identification of loxnecrogin isoforms in *Loxosceles gaucho* venom. **Proteomics** 5 (8): 2167 – 2176.

MACKESSY, SP. 2002. Biochemistry and Pharmacology of Colubrid Snake Venoms. **J. Toxicol. – Toxin Reviews** 21: 43 – 83.

MANZOLI-PALMA, MF; GOBBI, N; PALMA, MS. 2003. Insects as a biological models to assay spider and scorpion venom toxicity. **J. Venom. Anim. Toxins** 9 (2): 174 – 185.

MARKWELL, M; HASS, SM; BIEBER, LL & TOLBERT, NE. 1978. A modification of the lowry procedures to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. **Anal. Biochem.** 87: 206 – 210.

MARQUES, O.A.V., 1996. Reproduction, seasonal activity and growth of the coral snake, *Micrurus corallinus* (Elapidae), in the southeastern Atlantic forest in Brazil. **Amphibia-Reptilia** 17: 277-285.

MARQUES, OAV.; MARTINS, M; SAZIMA, I. 2002a. A jararaca da Ilha da Queimada Grande. **Ciência Hoje**, v. 31, n. 186, p. 56-59.

MARQUES, O.A.V.; MARTINS, M. & SAZIMA, I. 2002b. A new insular species of pitviper from Brazil, with comments on evolutionary Biology and conservation of the *Bothrops jararaca* group (Serpentes, Viperidae). **Herpetologica** 58 (3): 303-312.

MARTINS, M. MARQUES, O. A.V. & SAZIMA, I. 2001. Ecological and phylogenetic correlates of feeding habits in Neotropical pitvipers os the genus *Bothrops*. In press. In G. Schuett, M. Höggren, and H. W. Greene (Eds.), **Biology of the Vipers**. Eagle Mountain Publishing. Eagle Mountain, Utah, U.S.A.

MCNAB, B.K. 1994. Resource use and the survival of land and fresh water vertebrates on oceanic islands. **American Naturalist** 144: 643-660.

MEBS, D. 1978. Pharmacology of reptilian venoms. In: GANS, C. **Biology of the Reptilia**, 8: 437-560, London (Academic Press).

MEBS, D. 1999. Snake Venom Composition and Evolution of Viperidae. **Kaupia - Darmstädter zur Naturgeschichte** 8: 145-148.

MERCADANTE, O A; MOURA, LFHA. **Serpentes ilhoas: em Alcatrazes e Queimada Grande = Island serpentes: in Alcatrazes and Queimada Grande**. São Paulo: Magma Editora Cultural, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. 1998. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**. Fundação Nacional da Saúde. Brasília.

MOURA-DA-SILVA, AM; THEAKSTON, RDG & CRAMPTON, JM. 1997. Molecular evolution of phospholipase A2 and metalloproteinase/disintegrins from venoms of vipers. **Symp. Zool. Soc. Lond.** 70: 173 – 187.

NETER, J; KUTNER, MH; NACHTSHEIN, CJ & WASSERMAN, W. 1996. **Applied linear statistical models**. 4^o edição, Chigago: Irwin.

NETO, FRA & NUNES, DSS. **Cromatografia – Princípios básicos e técnicas afins**. Rio de janeiro: Interciência, 2003.

OHNO, M; CHIJIWA, T; ODA-UEDA, N; OGAWA, T; HATTORI, S. 2003. Molecular evolution of myotoxic phospholipases A2 from snake venoms. **Toxicon** 42: 841 – 854.

OWBY, CL; ARAUJO, HSS; WHITE, SP & FLETCHER, JE. 1999. Lysine phospholipases A2 proteins. **Toxicon** 37: 411 – 445.

PUKRITTAYAKAMEE, S; WARREL, DA; DESAKORN, V; McMICHAEL, AJ; WHITE, NJ & BUNNAG, D. 1988. The hialuronidase activities of some southeast asian snakes venoms. **Toxicon** 26 (7): 629 – 637.

QUEIROZ, LS; SANTO-NETO, RODRIGUES-SIMIONI, L & PRADO-FRANCESCHI, J. 1984. Muscle necrosis and regeneration after envenomation by *Bothrops jararacussu* snake venoms. **Toxicon** 22: 339 – 346.

QUISTAD, GB; DENNIS, PA; SKINNER, WS. 1992. Insecticidal activity of spider (Aranae), centipede (Chilopoda), scorpion (Scorpionida) and snake (Serpentes) venoms. **J. Econ. Entomol.** 85 (1): 33 – 39.

RAPUANO, BE; YANG, CC & ROSENBERG, P. 1986. The relationship between high affinity noncatalytic binding of snake venom phospholipase A2 to brain synaptic plasma membranes and their central lethal potencies. **Biochem. Biophys. Acta** 856: 457 – 470.

ROCHA, M.M.T. 1995. Estudo da variação intraespecífica do veneno de *Bothrops alternatus* Duméril, Bibron et Duméril, 1854 em função da distribuição geográfica (Serpentes, Viperidae). **Dissertação de Mestrado**. PUC-RS.

SANO-MARTINS, IS & SANTORO, ML. 2003. Distúrbios hemostáticos em envenenamentos por animais peçonhentos do Brasil. In: CARDOSO, JLC *et al* (Eds.), **Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo, Sarvier, p. 289 – 309.

SASA, M. 1999. Diet and snake venom evolution: Can local selection alone explain intraspecific venom variation?. **Toxicon** 37: 249 – 252.

SAZIMA, I. 1992. Natural history of the jararaca pitviper, *Bothrops jararaca*, in southeastern Brazil. In J. A. Campbell and E.D. Brodie (Eds.): 199- 216. **Biology of the Pitvipers**. Selva, Tyler, Texas, U.S.A.

SCOTT, DL; WHITE, SP; OTWINOWSKI, WY; GELB, MH & SIGLER, PB. 1990. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A2. **Science** 250: 1541 – 1546.

SERRANO, SMT & FOX, JW. 2005. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 repolysin family of metalloproteinases. **Toxicon** 45 (8): 969 – 985.

SERRANO, SMT; SHANNON, JD; WANG, D; CAMARGO, ACM & FOX, JW. 2005. A multifaceted analysis of viperis snakes venoms by two-dimensional gel eletrophoresis: an approach to understanding venom proteomics. **Proteomics** 5: 501 – 510.

SILES VILLARROEL, M; ZELANTE, F; ROLIM ROSA, R & FURLANETTO, RC. 1978/9. Padronização da titulação da atividade tóxica de venenos botrópicos, em camundongos. **Mem. Inst. Butantan** 42/43: 311 – 323.

SPENCER, PJ. Efeitos da radiação gama de ^{60}Co na estrutura molecular da bothropstoxina-1. **Tese**, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) – Tecnologia Nuclear. Fev/2000.

STEFANSSON, S; KINI, RM & EVANS, HJ. 1990. The basic phospholipase A2 from *Naja nigricollis* venom inhibits the prothrombinase complex by a novel nonenzymatic mechanism. **Biochemistry** 29: 7742 – 7746.

TAN, NH & PONNUDURAI, G. 1992. A comparative study on the eletrophoretic patterns of snake venoms. **Comparative Biochemistry Physiology** 102B (1): 103 – 109.

THEAKSTON, RDG & REID, HA. 1983. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. **Bull. World Hlth. Org.** 61: 949 – 956.

TU, AT & HENDON, RR. 1983. Characterization of lizard venom hyaluronidase and evidence for its action as a spreading factor. **Comp. Biochem. Physiol. B** (76): 377 – 383.

TUBBS, K; NELSON, RW; KRONE, JR & BIEBER, AL. 2000. Mass spectral studies of snake venoms and some of their toxins. **J. Toxicol.** 19 (1): 1 – 22.

USHERWOOD, PNR & DUCE, IR. 1985. Antagonism of glutamate receptor channel complexes by spider venom polypeptides. **Neurotoxicology** 6: 239.

VORIS, HK. 1966. Fish eggs as the apparent sole food item for a genus of sea snake, *Emydocephalus* (Krefft). **Ecology** 47: 152 – 154.

WEINSTEIN, S.A. & KARDONG, K. V. 1994. Properties of Duvernoy's secretions from opisthoglyphous and aglyphous colubrid snakes. **Toxicon** 32: 1161-1185.

WHARTON, C.H. 1969. The cottonmouth moccasin on Sea Horse Key, Florida. **Bulletin of the Florida State Museum** 14: 227-272.

WILLIAMS, V & WHITE, J. 1987. Variation in venom constituents within a single isolated population of Peninsula tiger snake (*Notechis ater niger*). **Toxicon** 25: 1240 – 1243.

WOLLBERG, Z.; SHABO-SHINA, R.; INTRATOR, N.; BDOLAH, A.; KOCHVA, E.; SHAVIT, G.; ORON, Y.; VIDNE, B. A. & GITTER, S. 1988. A novel cardiotoxin polypeptide from the venom of *Atractaspis engaddensis* (burrowing asp): cardiac effects in mice and isolated rat and human heart preparations. **Toxicon** 26: 525-534.

www.alcatrazes.org.br- site referente ao Projeto Alcatrazes.

YAMAKAWA, SA; NOZAKI, M & HOKAWA, Z. 1976. Fractionation of sakishimahabu (*Trimeresurus elegans*) venom and lethal, hemorrhagic and edema forming activities of the fractions. In: OHSAKA, A; HAYASHI, K & SAWAY, QY. (Eds.). **Animal, Plant and Microbial Toxins**, v. 1, New York: Plenum.

ZELANIS, APP. Análise da variabilidade ontogenética do veneno de *Bothrops insularis* (Amaral, 1921): implicações adaptativas aos itens alimentares. **Dissertação (Mestrado)** – Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, Departamento de Fisiologia, 2006.

ZIOLKOWSKI, C & BIEBER, AL. 1992. Mojave toxins affects fusion of myoblasts and viability of myotubes in cell cultures. **Toxicon** 30: 733 – 744.

ZLOTKIN, E; EITAN, M; BINDOKAS, VP; ADAMS, ME; BURKHART, W & FOWLER, E. 1991. Functional duality and structural uniqueness of depressant insect-selective neurotoxins. **Biochemistry** 30: 4814 – 4821.

ZLOTKIN, E; MENASHE, M; ROCHAT, H; MIRANDA, F & LISSITZKY, S. 1976. Toxic proteins in cobra venom specifically active in arthropods, p. 29 – 37. In: A. OHSAKA *et al* (eds), **Animal, plant and microbial toxins**, vol. 1, Biochemistry. Plenum, New York.

ANEXO

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO
INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB)
Av. Dr. Vital Brazil, 1500 CEP 05503-900 Tel. 011-37267222 r.2239 Fax 011-37261505

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 158/2004, referente ao projeto “Isolamento e caracterização de toxinas do veneno de *Bothrops alcatraz* (Marques, Martins e Sazima 2002) e avaliação dos possíveis aspectos coevolutivos com a dieta”, de responsabilidade da Dra. Maria de Fátima Domingues Furtado está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB).

São Paulo, 23 de abril de 2004.

Wilson Fernandes
Presidente da CEUAIB