

MAURA ANTONIA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DE UMA PROTEÍNA
"CROTOXINA-SÍMILE" DO VENENO DE *Bothrops
jararacussu***

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da
Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do Título de Mestre em Ciências na
área de Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Júlia Prado-Franceschi

Co-orientador: Prof. Dr. Stephen Hyslop

Este exemplar corresponde à versão final da
Dissertação de Mestrado, apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de
Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do título
de Mestre em Ciências, na Área de Farmacologia da
Bióloga Maura Antonia da Silva.

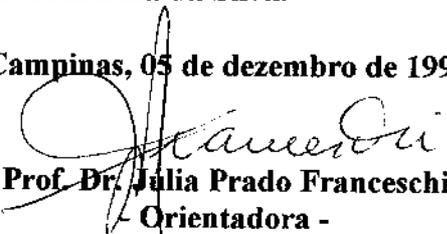
U
Dez

Campinas, 05 de dezembro de 1997

Si38c

33160/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL


Prof. Dr. Júlia Prado Franceschi
- Orientadora -

UNIDADE	BC				
N.º CHAMADA:					
V.	Ex.				
TOMBO BC	33360				
PROC.	895/93				
C	<input type="checkbox"/>	D	<input type="checkbox"/>	X	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00				
DATA	26/03/98				
N.º CPD					

CM-00107324-7

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

Si38c Silva, Maura Antonia da
Caracterização de uma proteína "crotoxina - símile" do veneno de
Bothrops Jararacusu / Maura Antonia da Silva. Campinas, SP :
[s.n.], 1997.

Orientadores : Júlia Prado-Franceschi, Stephen Hyslop
Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas.

1. Venenos. 2. Anticorpos. 3. Crotoxina. I. Júlia Prado-
Franceschi. II. Stephen Hyslop. III. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: PROFA. DRA. JULIA PRADO-FRANCESCHI

Membros:

1. PROFA. DRA. JÚLIA PRADO FRANCESCHI

2. PROFA. DRA. LINDIONEZA ADRIANO RIBEIRO

3. PROF. DR. JOSÉ LUIZ DONATO

Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 05/12/97

DEDICATÓRIA

A DEUS!

Aos meus pais, que me ensinaram caminhar pela vida com humildade, honestidade e sempre me deram muito amor. Amo vocês.

Ao Frederico, por compartilhar minhas dúvidas e inseguranças, pelo estímulo, sempre constante, e suporte nos momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo amor, carinho e incentivo que tornaram possível realizar este trabalho.

À família Amalfi Olivi pelo carinho e amizade.

À Profa. Dra. Júlia Prado-Franceschi por ter me aceitado como orientanda no curso de Pós-Graduação e pela orientação durante o projeto.

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop pelos momentos convvidos onde além de conhecimentos ensinados, o respeito, a paciência de um amigo a todo momento.

Ao Prof. Dr. Carlos Chavez-Olortegui (FUNED, Belo Horizonte, MG), pela assistência durante o desenvolvimento do ELISA e colaboração neste projeto.

Ao Prof. Dr. José L. Donato, pela amizade, e valiosa colaboração com o immunoblotting e eletroforese.

Ao Prof. Dr. José Roberto Rojero, pelo acolhimento nos laboratórios do Departamento de Radiobiologia do IPEN.

Ao Prof. Dr. Stephen Aird (Departamento de Radiobiologia, IPEN, SP) pela colaboração.

Ao Patrick J. Spencer (Departamento de Radiobiologia, IPEN, SP), pela amizade, disponibilidade e ajuda durante minha permanencia no IPEN.

Aos técnicos José Ilton e Gildo pela ajuda técnica, sempre com muita disposição e amizade.

À Gislaine, Rita e Dora pela eficiência, paciência e carinho.

Aos amigos Jadson, Marta Pitali, Mauricio, Yoko, Stella, Carolina, que socializaram seus conhecimentos e de alguma forma contribuíram para realização desta tese.

À Luciana, Sisi, Demian, Elen, Renata Zanardo, Renata, Sócrates, Simone, Soraia, Flávio, Grace e Aldete pela amizade e convivência diária agradável.

Ao Cleber por toda ajuda durante a confecção desta tese e paciência de um amigo.

Ao Ronilson por ter me proporcionado a oportunidade de conhecer este grupo de pesquisa.

À todos os docentes do Departamento de Farmacologia que contribuíram para minha formação.

Aos amigos do laboratório, a todos os alunos do Curso de Pós-Graduação e funcionários do Departamento de Farmacologia, pela convivência amigável.

À FAPESP e FAEP, pelo auxílio financeiro.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi verificar a distribuição de proteínas imunologicamente semelhantes à crotoxina venenos botrópicos, e isolar e caracterizar, a partir do veneno de *Bothrops jararacussu*, a(s) proteína(s) com esta imunoreatividade. Utilizando um anticorpo anti-crotoxina, verificamos através dos métodos de ELISA e “immunoblotting” que, de modo geral, os venenos botrópicos possuem um baixo conteúdo de proteínas imunologicamente relacionadas à crotoxina. O teste ELISA foi dez vezes mais sensível que o immunoblotting para demonstrar a relação imunológica destes venenos. Através de cromatografia por imunoafinidade, purificamos uma proteína do veneno de *B. jararacussu* que foi reconhecida pelo anticorpo anti-crotoxina. A eletroforese na presença de SDS mostrou que essa proteína possui uma massa molecular em torno de 100 kDa e que, na presença de β -mercaptoetanol esse peso cai para a faixa de 30 kDa (região da crotoxina), sugerindo que a proteína normalmente ocorre em forma multimérica. A proteína purificada não possui atividade fosfolipásica, não causa bloqueio neuromuscular na preparação *biventer-cervicis* de pintainho e não corresponde à bothropstoxina I (BthTx) ou à lectina presentes neste mesmo veneno, uma vez que estas duas proteínas não reagiram com o anticorpo anti-crotoxina.

ÍNDICE

Página

CAPÍTULO 1 - Imunoreatividade de venenos botrópicos com anticorpo anti-crotoxina.....	8
1.1. Introdução.....	9
1.1.1. Gênero <i>Bothrops</i>	9
1.1.2. Veneno de <i>B. jararacussu</i>	10
1.1.3. Gênero <i>Crotalus</i>	11
1.1.4. Soroterapia.....	11
1.1.5. Objetivos.....	13
1.2. Materiais e Métodos.....	14
1.3. Resultados.....	20
CAPÍTULO 2 - Caracterização parcial de uma lectina presente no veneno de <i>B. jararacussu</i>.....	35
2.1. Introdução.....	36
2.2. Materiais e Métodos.....	37
2.3. Resultados.....	40
CAPÍTULO 3 -Discussão e conclusões gerais.....	45
SUMMARY.....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	22
Figura 2.	23
Figura 3.	24
Figura 4.	26
Figura 5.	28
Figura 6.	29
Figura 7.	30
Figura 8.	31
Figura 9.	33
Figura 10.	34
Figura 11.	41
Figura 12.	42
Figura 13.	43

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.	25
Tabela 2.	44

CAPÍTULO 1

Imunoreatividade de venenos botrópicos com anticorpo anti-crotoxina

Introdução

Os venenos ofídicos são misturas complexas constituídas principalmente por proteínas (toxinas e/ou enzimas; 70 a 90%), carboidratos, lipídeos, aminas biogênicas, nucleotídeos, aminoácidos, peptídeos e componentes inorgânicos (Devi, 1968; Bieber, 1990). Produzem uma variedade de sintomas quando injetados experimentalmente ou em casos de acidentes, apresentando diferentes sinais que variam de espécie para espécie.

No Brasil, as serpentes venenosas de importância médica pertencem às famílias Elapidae e Viperidae (subfamília Crotalinae). O único gênero da família Elapidae, no Brasil, é o *Micrurus*, cujas espécies são conhecidas popularmente por corais. Os representantes da subfamília Crotalinae pertencem aos gêneros *Crotalus*, *Bothrops* e *Lachesis* (Hoge e Romano-Hoge, 1978/79).

Os acidentes ofídicos no país são provocados principalmente por serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops* (90,5%), enquanto os causados por espécies de *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus* juntos, correspondem aos restantes 9,5% (Ministério da Saúde, 1997). O tratamento usual neste tipo de acidente é a soroterapia, introduzida no país por Vital Brazil Mineiro da Campanha em 1902. Os antissoros utilizados são monovalentes (preparados com veneno de uma única espécie) ou polivalentes (mistura de venenos de mais de uma espécie). Embora eficientes em neutralizar os efeitos sistêmicos dos venenos, exercem pouca atividade sobre os extensos efeitos locais (Gutiérrez e col., 1981).

Gênero *Bothrops*

Existem mais de 30 espécies de serpentes pertencentes ao gênero *Bothrops* no Brasil (Campbell e Lamar, 1989). De modo geral, os venenos botrópicos possuem um conteúdo elevado de enzimas, entre elas, L-aminoácido-oxidase, calicreínas, endopeptidases, esterases, fosfatases, fosfolipases A₂, hialuronidase e várias proteínas que atuam sobre a coagulação (trombina-símile, ativadoras de fator X e protrombina) (Devi, 1971; Elliott, 1978; Iwanaga, 1979), além de miotoxinas (Gutiérrez e Cerdas, 1984; Harris e Cullen, 1990; Mebs e Ownby, 1990).

Apesar da grande variedade no número de espécies, da complexidade e heterogenidade de composição dos venenos (Furtado e col., 1991), seus mecanismos de ação e efeitos

fisiopatológicos são parecidos. A ação local danifica os tecidos por mecanismo que envolve proteases, fosfolipases, miotoxinas (Gutiérrez *e col.*, 1984; Homs-Brandeburgo *e col.*, 1988; Gutiérrez *e col.*, 1989; Moura-da-Silva *e col.*, 1991), fatores hemorrágicos e, secundariamente, através da liberação de agentes vasoativos, o que leva à hemorragia, edema e mionecrose (Osaka, 1979; Amaral *e col.*, 1987; Gutiérrez e Lomonte, 1989). As toxinas hemorrágicas são responsáveis pelo sangramento local e sistêmico (Mandelbaum *e col.*, 1976; Mandelbaum *e col.*, 1984; Kamiguti *e col.*, 1991). Ocorrem ainda alterações na cascata da coagulação (desfibrinação) (Nahas *e col.*, 1979; Hofmann e Bon, 1987), no sistema cardiovascular (incluindo choque hipovolêmico e hemorrágico) (Rosenfeld, 1971; Amaral *e col.*, 1987) e no sistema renal, onde pode haver uma evolução para insuficiência renal aguda (Rosenfeld, 1971; Amaral *e col.*, 1986; Amaral *e col.*, 1987; Kouyoumdjian *e col.*, 1991).

Veneno de *B. jararacussu*

O veneno de *B. jararacussu* é miotóxico, causando necrose de fibras musculares e retardando a sua regeneração (Queiroz *e col.*, 1984; Dos Santos *e col.*, 1992). Quando injetado pela via intramuscular em ratos, este veneno induz uma maior liberação de creatina quinase (indicador de lesão muscular), quando comparado com outros venenos botrópicos (Mebs, 1983; Dos Santos *e col.*, 1992). Do ponto de vista clínico, Amaral *e col.* (1985) detectaram necrose do córtex renal em indivíduos picados por *B. jararacussu*.

Desse veneno foram isoladas proteínas com estrutura fosfolipásica (Vidal e Stoppani, 1972; Homs-Brandeburgo *e col.*, 1988). Uma destas proteínas, conhecida como a bothropstoxina I, possui atividade miotóxica e é termo-estável (Homs-Brandeburgo *e col.*, 1988). Embora possua homologia estrutural com as PLA é uma PLA₂ do tipo Lys 49 (Cintra *e col.*, 1993), a bothropstoxina I tem pouca ou nenhuma atividade fosfolipásica (Homs-Brandeburgo *e col.*, 1988; Rodrigues-Simioni *e col.*, 1995). A bothropstoxina I é uma proteína básica, (pI 8,2) com peso molecular de 13,72 kDa, sete pontes dissulfeto (Cintra *e col.*, 1993) e representa cerca de 15% do conteúdo protéico total do veneno (Homs-Brandeburgo *e col.*, 1988). A bothropstoxina I também apresenta atividade neurotóxica (Rodrigues-Simioni *e col.*, 1983). Além da bothropstoxina I já foram descritos neste veneno: um peptídeo potencializador de bradicinina (Ferreira *e col.*, 1991); uma serina-protease com atividades amidásica e fibrino-coagulante (Zaganelli *e col.*, 1996); um fator de coagulação do tipo trombina (Andrião-Escarso *e col.*, 1997) e uma proteína tipo lectina (Silva *e col.*, 1997).

Gênero *Crotalus*

No Brasil, o gênero *Crotalus* é representado pela espécie *Crotalus durissus*, constituída por sete subespécies. As principais destas são: *C. d. cascavella*, *C. d. ruruima*, *C. d. collilineatus* e *C. d. terrificus* (Campbell e Lamar, 1989), sendo que esta última é a de maior importância médica (Rosenfeld, 1971). As principais ações do veneno de *C. d. terrificus* são: neurotóxica (Brazil, 1966; Brazil e Excell, 1972); miotóxica (Azevedo-Marques *e col.*, 1987) e coagulante (Rosenfeld *e col.*, 1971; Nahas *e col.*, 1979). O principal componente tóxico do veneno de *C. d. terrificus* é a crotoxina, que corresponde a 50% ou mais do peso seco do veneno. Esta toxina, que foi inicialmente isolada e cristalizada por Slotta e Fraenkel-Conrat em 1938, é o componente melhor caracterizado do veneno (Bon *e col.*, 1989; Bieber *e col.*, 1990). Trata-se de um heterodímero composto por uma subunidade ácida desprovida de atividade tóxica ou biológica (crotapotina), e uma subunidade básica com atividade fosfatidato 2-acilhidrolase (fosfolipase A₂, ou PLA₂) (Hendon e Frankel-Conrat, 1971) e de baixa toxicidade. Estes dois componentes quando associados (como é no caso do complexo nativo), apresentam uma potente ação neurotóxica pré-sináptica (Bon *e col.*, 1989). Imunologicamente a crotoxina é mais parecida com as neurotoxinas fosfolipásicas A₂ de outras crotalídeas (agkistrodotoxina, toxina concolor, toxina Mojave, toxina vegrandis) e vipérideas (ammodytoxina e caudotoxina) e parece ter pouca reatividade cruzada com as neurotoxinas elapídicas (Gopakrisnakone *e col.*, 1981; Henderson e Bieber, 1986; Choumet *e col.*, 1989, 1991; Middlebrook e Kaiser, 1989; Weinstein e Smith, 1990). Outras toxinas menos estudadas como a crotamina (Gonçalves e Viera, 1950), convulxina (Prado-Franceschi, 1970) e giroxina (Barrio, 1954) também possuem importantes atividades biológicas que podem contribuir para os efeitos observados com o veneno total *in vivo*.

Soroterapia no envenenamento por *B. jararacussu*

O veneno de *B. jararacussu* é um imunógeno fraco (Dias da Silva *e col.*, 1989; Moura da Silva *e col.*, 1990), e sua atividade letal não é neutralizada de modo eficiente nem pelo antissoro monovalente (Dias da Silva *e col.*, 1989) ou anti-botrópico polivalente (Dos Santos *e col.*, 1992). O tratamento convencional no envenenamento por *B. jararacussu* é feito por soroterapia, sendo o antissoro produzido em equinos imunizados com uma mistura de veneno das cinco espécies de *Bothrops* com relevância clínica: 40% de veneno de *B. jararaca*, 20% de *B. alternatus*, 13,3% de

B. jararacussu, 13,3% de *B. moojeni* e 13,3% de *B. neuwiedi* (Yamaguchi, I.K., comunicação pessoal). Embora o antissoro resultante neutralize a maior parte dos componentes dos venenos botrópicos, em relação a componentes que são espécie-específicos, não o faz eficientemente (Moura da Silva *e col.*, 1990).

No início deste século, Brazil (1911) observou que o tratamento de pacientes picados por *B. jararacussu* era mais efetivo quando se utilizava o antissoro anti-ofídico polivalente (obtido pela inoculação sequencial de venenos botrópico e crotálico no mesmo animal) do que quando o antissoro anti-botrópico padrão era utilizado isoladamente. Esta observação clínica confirmou os seus resultados anteriores sobre a eficácia do antissoro crotálico em neutralizar a ação letal do veneno de *B. jararacussu* (Brazil, 1909). Tal situação não era observada no envenenamento por outras *Bothrops*, particularmente *B. jararaca*, onde para o controle eficaz bastava o uso da soroterapia antibotrópica. Tais observações, embora essencialmente clínicas, sugerem que o veneno de *B. jararacussu* possa conter um (ou mais) componente(s) com atividades antigênicas e biológicas semelhantes a componentes(s) presente(s) no veneno da *C. d. terrificus*. Estudos mais recentes têm confirmado as conclusões de Brazil quanto a maior capacidade do antissoro botrópico-crotálico em neutralizar as atividades coagulantes e miotóxicas bem como a ação letal do veneno da *B. jararacussu* (Dos Santos *e col.*, 1992; Milani *e col.*, 1997).

Com base nas observações de Brazil (1909, 1911) e Dos Santos *e col.* (1992), parece-nos razoável que um estudo imunológico e bioquímico deste veneno venha revelar a presença de toxinas antigênicamente relacionadas àquelas encontradas no veneno de *C. d. terrificus*.

OBJETIVOS

Os objetivos desta tese foram: fazer um “screening” de venenos botrópicos para verificar a distribuição de proteínas imunologicamente semelhantes à crotoxina; isolar e caracterizar a(s) proteína(s) do veneno de *B. jararacussu* com imunoreatividade com o anticorpo anti- crotoxina.

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes e venenos

Acrilamida, azul brilhante de Coomassie R, azul de bromofenol, bisacrilamida, 4-cloronaftol, diaminobenzidina, EDTA (ácido tetracético etileno diamino), glicina, IgG de coelho anti-cavalo acoplado à peroxidase, β -mercaptoetanol, persulfato de amônio, PMSF (fluoreto de fenil metil sulfonil), sacarose, SDS (dodecil sulfato de sódio), TEMED (N,N,N,N-tetra metiletlenodiamina), Tris-base, Tween 20, e as proteínas padrões para a determinação de peso molecular por eletroforese foram comprados da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Membranas de nitrocelulose foram fornecidos pelo Bio-Rad (San Francisco, CA, EUA). Crotoxina purificada e o anticorpo anti-crotoxina (IgG F(ab')₂ de cavalo) foram cedidos pelo Dr. Carlos Chaves-Olortegui da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Belo Horizonte, MG.

Os venenos dessecados de várias espécies de *Bothrops*, de *C. d. terrificus* e de *C. d. cascavella* foram obtidos do Instituto Butantan (São Paulo), do CEVAP (Botucatu) ou de estoques mantidos neste laboratório. Todos os venenos foram conservados em dessecador a 4°C. A botropstoxina-I purificada foi gentilmente cedida pela Dra. Léa Rodrigues-Simioni (Dept° de Farmacologia, FCM, UNICAMP).

Animais

Para o estudo da ação neuromuscular em venenos botrópicos, foram usados pintainhos da linhagem HY-LINE W36 (4-8 dias) doados pela Granja Ito S/A (Campinas). Os animais foram mantidos em gaiolas abastecidas com água e ração *ad libitum*.

Estudos bioquímicos

ELISA para investigar a imunoreatividade com o anticorpo anti-crotoxina

Placas de ELISA ("enzyme-linked immunosorbent assay") (96 poços, Corning; Flow Laboratories, Inc., Mclean, VA, EUA) foram sensibilizadas por 12 horas com 100 μ l (volume padrão) de uma solução de veneno (15,6 a 2000 ng/poço), em tampão carbonato de sódio (0,05 M, pH 9,6). Subsequentemente, as placas foram lavadas duas vezes com uma solução de 0,05% Tween 20-salina (tampão de lavagem, TL) e então bloqueadas com uma solução de 2% de caseína em salina-fosfato (pH 7,4) durante 1 h. Depois de retirar esta solução bloqueadora, foram

acrescentados nos poços 100 µl de uma solução de anticorpo IgG anti-crotoxina diluído 1:400 (à partir de uma solução de 1,7 mg/ml) em tampão de incubação (fosfato salina contendo 2% caseína, 0,0025% Tween-20) e as placas incubadas durante 1 h à temperatura ambiente. Após esta incubação, as placas foram lavadas duas vezes com tampão de lavagem e incubadas novamente durante 1 h à temperatura ambiente com 100 µl de anti- IgG (IgG de coelho produzido contra IgG de cavalo) conjugado à peroxidase diluído 1:2000 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) em tampão de incubação. Ao término desta incubação, foram feitas seis lavagens com TL e depois adicionado a cada poço 100 µl de uma solução de 0,33 mg de O-fenildiamina/ml de tampão de citrato (0,017 M, pH 5,2), contendo 0,04% de H₂O₂. A reação foi interrompida após 15 minutos com a adição de 20 µl de ácido sulfúrico 5%. A absorbância final foi determinada usando um leitor de ELISA modelo Titertek Multiscan Plus II a um comprimento de onda de 492 nm.

Eletroforese

A eletroforese foi feita em mini-gel (8 x 10 cm) de poliacrilamida contendo SDS, (Hames, 1990), utilizando-se um sistema descontínuo em placa vertical (Mighty Small II, Bio-Rad, San Francisco, CA, EUA). O gel de resolução, com gradiente de concentração de poliacrilamida de 13%, foi preparado sob um gel de empacotamento de 3,75% de acrilamida.

Os venenos das espécies de *Bothrops*, de *C. d. terrificus*, e de *C. d. cascavella* foram diluídos em tampão (Tris-HCl 0,063 M, pH 6,8), contendo SDS 2%, glicerol 10% e azul de bromofenol 0,001%, e fervidos durante 4 min. Alíquotas de 30 µl (25 µg) foram aplicadas ao gel. A corrida eletroforética foi realizada à temperatura ambiente com amperagem fixada em 32 mA (voltagem 100-150 V), até o azul de bromofenol atingir 0,5 cm do final do gel (aproximadamente 4 horas).

Após a corrida eletroforética, o gel foi fixado com solução de metanol 50% e ácido acético 10%. Em seguida, foi feita a coloração com solução de azul brilhante de Coomassie R 0,025% em ácido acético 10%. O excesso de corante foi eliminado utilizando-se a mesma solução de fixação do gel. Após a coloração, o gel foi seco entre duas folhas segundo a técnica de Juang e col. (1984) e fotografado.

Immunoblotting

Após a eletroforese, a transferência das proteínas do gel de poliacrilamida para a membrana de nitrocelulose foi feita em sistema semi-seco (2:30 h à 200 mA), com voltagem entre 10 e 20 V. Após a eletroforese e visualização das proteínas transferidas com azul de Ponceau (0,2% em ácido tricloroacético 0,3%), ligações não específicas foram bloqueadas com uma solução PBS (pH 7,4) contendo 0,3% (v/v) Tween 20 e leite desnatado 12% a 4°C sob agitação. Depois, a membrana foi lavada duas vezes (30 min cada) com PBS contendo 0,05% (v/v) Tween 20, e então incubada com o anticorpo F(ab')₂ anti-crotoxina (5 µg/ml em PBS com 0,05% Tween 20) durante 12 h sob agitação à 4°C. Em seguida, a membrana foi lavada quatro vezes (30 min cada) com PBS contendo 0,05% Tween 20 e incubada com o conjugado IgG peroxidase usado no ELISA (1:2000 em PBS com 0,05% Tween 20) por 2 h à temperatura ambiente sob agitação. Depois, foram feitas mais duas lavagens com PBS-Tween 20 (0,05%) e duas lavagens com PBS sem Tween 20 (20 min cada). Finalmente, a membrana foi incubada com o substrato (3,75 mg de 4-cloronaftol e 0,5 mg de diaminobenzidina por ml de PBS sem Tween 20) e a reação desenvolvida.

Preparação da coluna de imunoafinidade

Um grama de CNBr-Sepharose foi ativado através de repetidas lavagens com HCl 0,1 M conforme descrito pelo fabricante (Pharmacia). Em seguida, a resina foi incubada de um dia para outro a 4°C com 25 mg de IgG anti-crotoxina em tampão de acoplamento (bicarbonato de sódio 0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 8,3) sob agitação. Após esta incubação, a resina foi lavada com o mesmo tampão e depois agitada novamente de um dia para outro a 4°C com glicina 0,2 M, pH 8,0, para bloquear os sítios não ocupados pelo anticorpo. Subseqüentemente, a resina foi colocada numa mini-coluna de 6 ml a 4°C e lavada com tampão salina-fosfato, pH 7,4.

Fracionamento do veneno de B. jararacussu por imunoafinidade

O veneno de *B. jararacussu* (40 mg) foi dissolvido em 1,0 ml de tampão salina-fosfato contendo PMSF (0,005 M) e EDTA (0,01 M) para inibir a atividade proteolítica endógena do veneno. Em seguida, o veneno foi aplicado à coluna com um fluxo de 10 ml/h e a coluna lavada até a absorbância a 280 nm voltar a linha base. A proteína retida na coluna foi eluída com tampão glicina-HCl, 0,1 M, pH 2,8, a um fluxo de 20 ml/h coletando-se frações de 2,5 ml. O perfil de eluição foi determinado a 280 nm. A coluna foi regenerada através de uma lavagem com tampão salina-fosfato

(pH 7,4) e depois eluída novamente com tampão Tris-NaOH 0,05 M, pH 11. Finalmente, a coluna foi re-equilibrada com tampão salina-fosfato (Chavez-Olórtegui *e col.*, 1993).

Fracionamento em coluna Mono S da proteína purificada por imunoafinidade

Para investigar a pureza da proteína obtida por imunoafinidade, uma amostra (25 µg) foi fracionada numa coluna (HR 5/5, 5 mm x 50 mm, FPLC Pharmacia) pré-equilibrada com tampão acetato de sódio 25 mM, pH 5,0. A coluna foi eluída com um gradiente de NaCl (0-1,0 M) em tampão acetato de sódio a um fluxo de 1,5 ml/min. O perfil de eluição foi determinado pela absorvância a 280 nm e frações de 1,0 ml foram coletadas.

Atividade fosfolipásica

A atividade fosfolipásica (PLA) foi determinada conforme descrito por Lôbo de Araújo e Radvanyi (1987). Uma amostra da proteína purificada (em 20 µl) foi adicionada a 1 ml de meio de reação (5 ml de NaCl 2M, 1 ml de solução de fosfolipídeos, 2 ml de vermelho de fenol 0,1% e 1 ml de CaCl₂ 1 M, completando o volume para 100 ml com água deionizada) e a mistura incubada à temperatura ambiente durante 15 min. O decaimento da absorvância com o tempo após a adição da amostra foi medido em 578 nm.

Determinação da concentração protéica

A dosagem de proteína foi feita ou pela absorvância à 280 nm (A_{280} de 1.0 = 1mg de proteína/ml) ou pelo método microbiureto conforme descrito por Itzhaki e Gill (1964).

Estudo farmacológico

Preparação biventer cervicis de pintainho

A preparação foi isolada e montada de acordo com o método descrito por Ginsborg e Warriner (1960). O músculo foi suspenso em 4 ml de solução de Krebs com a seguinte composição (em mM): NaCl 118,6, KCl 4,7, CaCl₂ 1,9, KH₂PO₄ 1,2, NaHCO₃ 15 e glicose 11,7, pH 7,4. A solução foi mantida à 37°C e arejada com carbogênio (95% O₂ e 5% CO₂). O músculo foi submetido à uma tensão constante de 0,5 g e estimulado através de eletrodos bipolares posicionados na região de transição entre o tendão e o músculo de modo a produzir uma estimulação de campo. A preparação foi submetida à estímulos supramaximais (0,1 Hz de frequência e 0,2 seg) usando-se um estimulador Grass S4. Os venenos foram adicionados à

preparação num volume final de 0,1 ml (200 a 25 $\mu\text{g/ml}$). As contrações musculares foram registradas durante um tempo máximo de 120 min, usando-se um transdutor isométrico BG-25 GM Kulite (Semiconductor Products Inc., EUA) acoplado a um fisiógrafo Gould RS 3400. Nos experimentos controles, foi adicionado 0,1 ml de solução de Krebs.

RESULTADOS

ELISA dos venenos botrópicos

O método ELISA usando IgG F(ab')₂ anti-crotoxina mostrou que, de modo geral, os venenos botrópicos possuem baixos níveis de proteínas imunologicamente semelhantes à crotoxina (Figura 1). A exceção entre estes venenos foi o de *B. neuwiedi* que mostrou um perfil de reatividade maior do que os outros venenos.

Eletroforese e immunoblotting

A Figura 2 mostra o perfil eletroforético de vários venenos após eletroforese em presença de SDS. Os venenos das espécies de *Bothrops* possuem proteínas com peso molecular variando de 14,0 à 100 kDa, com bandas mais reativas nas regiões de 20 à 30 kDa e 45 à 60 kDa. Os venenos de *C. d. terrificus* e *C. d. cascavella* apresentaram bandas de maior reatividade na região de 14 à 30 kDa, que corresponde à faixa do peso molecular da crotoxina.

A imunoreatividade dos venenos acima foi analisada por immunoblotting (Figura 3). Os venenos da *C. d. terrificus* e *C. d. cascavella*, bem como a crotoxina, reagiram fortemente com o anticorpo, como era esperado. Ao contrário, com a exceção do veneno de *B. neuwiedi*, todos os venenos botrópicos mostraram pouca reatividade com o anticorpo. No caso da *B. jararacussu*, vários lotes de veneno demonstraram baixa reatividade por este método.

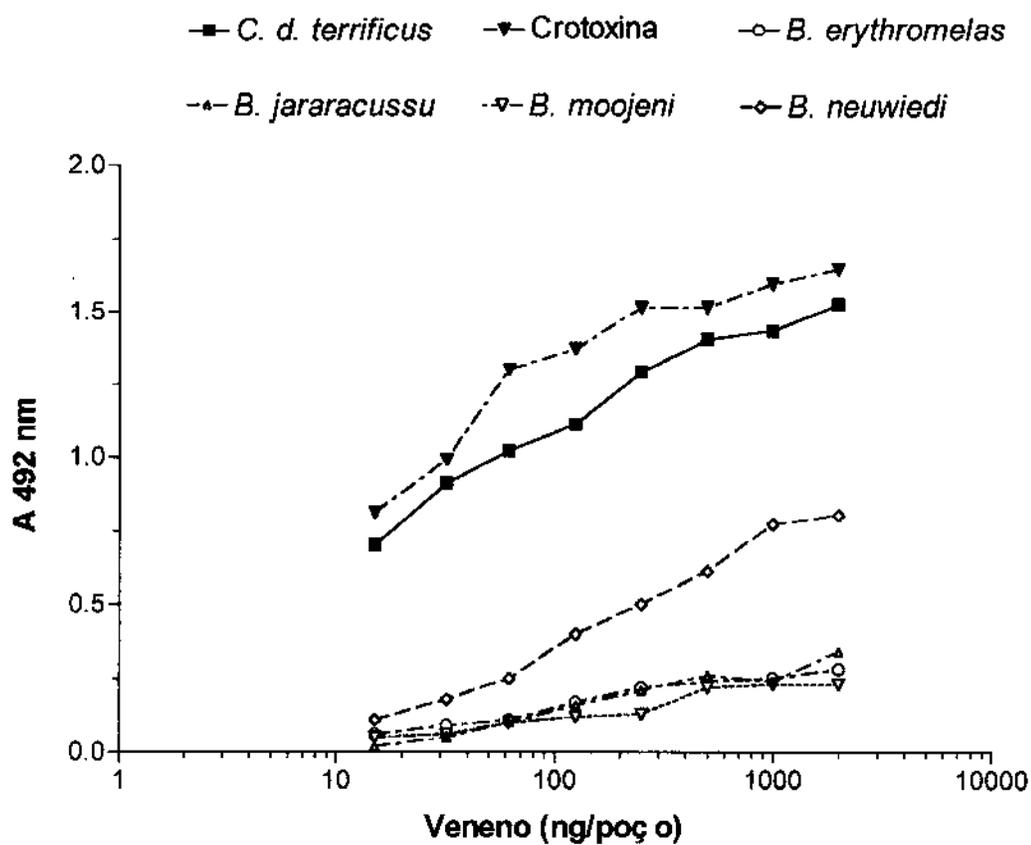


Figura 1. Imunoreatividade de venenos botrópicos com anticorpo anti-crotoxina determinado pelo método ELISA. Os venenos botrópicos não-mostrados (*B. alternatus*, *B. asper*, *B. atrox*, *B. cotiara*, *B. jararaca*) tiveram uma reatividade igual ou menor à de *B. jararacussu*.

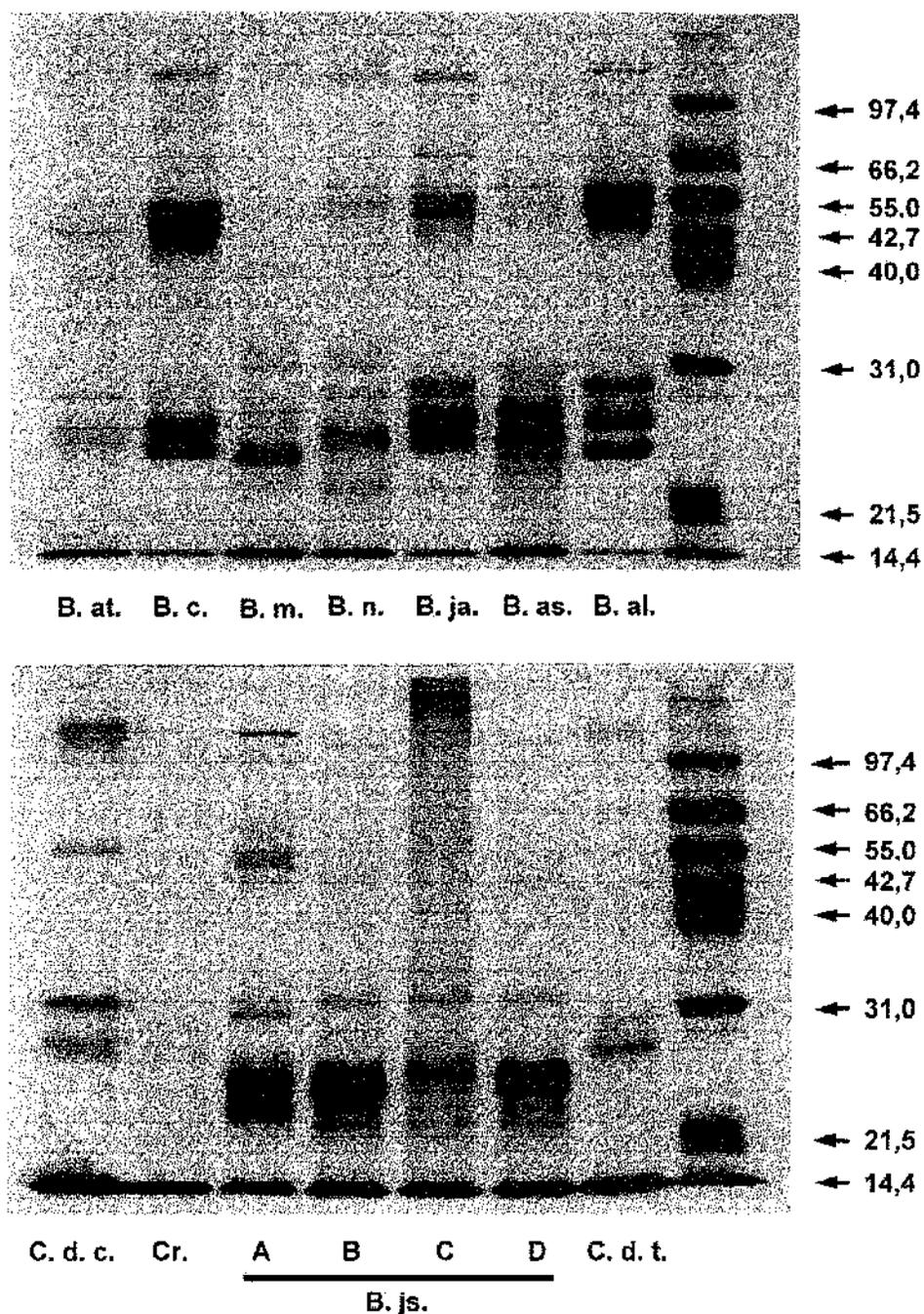


Figura 2. Perfil eletroforético de vários venenos em gel de poliacrilamida (12%) com SDS. Foram aplicados 25 µg de cada veneno e 10 µg de crotoxina. B.al. = *B. alternatus*, B.as. = *B. asper*, B.at. = *B. atrox*, B.c. = *B. cotiara*, B.ja., *B. jararaca*, B.js., *B. jararacussu* (A a D = diferentes lotes), B.m. = *B. moojeni*, B.n. = *B. neuwiedi*. C.d.t. = *C. d. terrificus*, C.d.c. = *C. d. cascavella*, Cr = crotoxina. As proteínas padrões usadas foram lisosima (14,4 kDa), inibidor de tripsina proveniente da soja (21,5 kDa), anidrase carbônica (31,0 kDa), aldolase (40,0 kDa), ovalbumina (42,7 kDa), glutamato desidrogenase (55,0 kDa), albumina bovina (66,2 kDa) e fosforilase B (97,4 kDa).

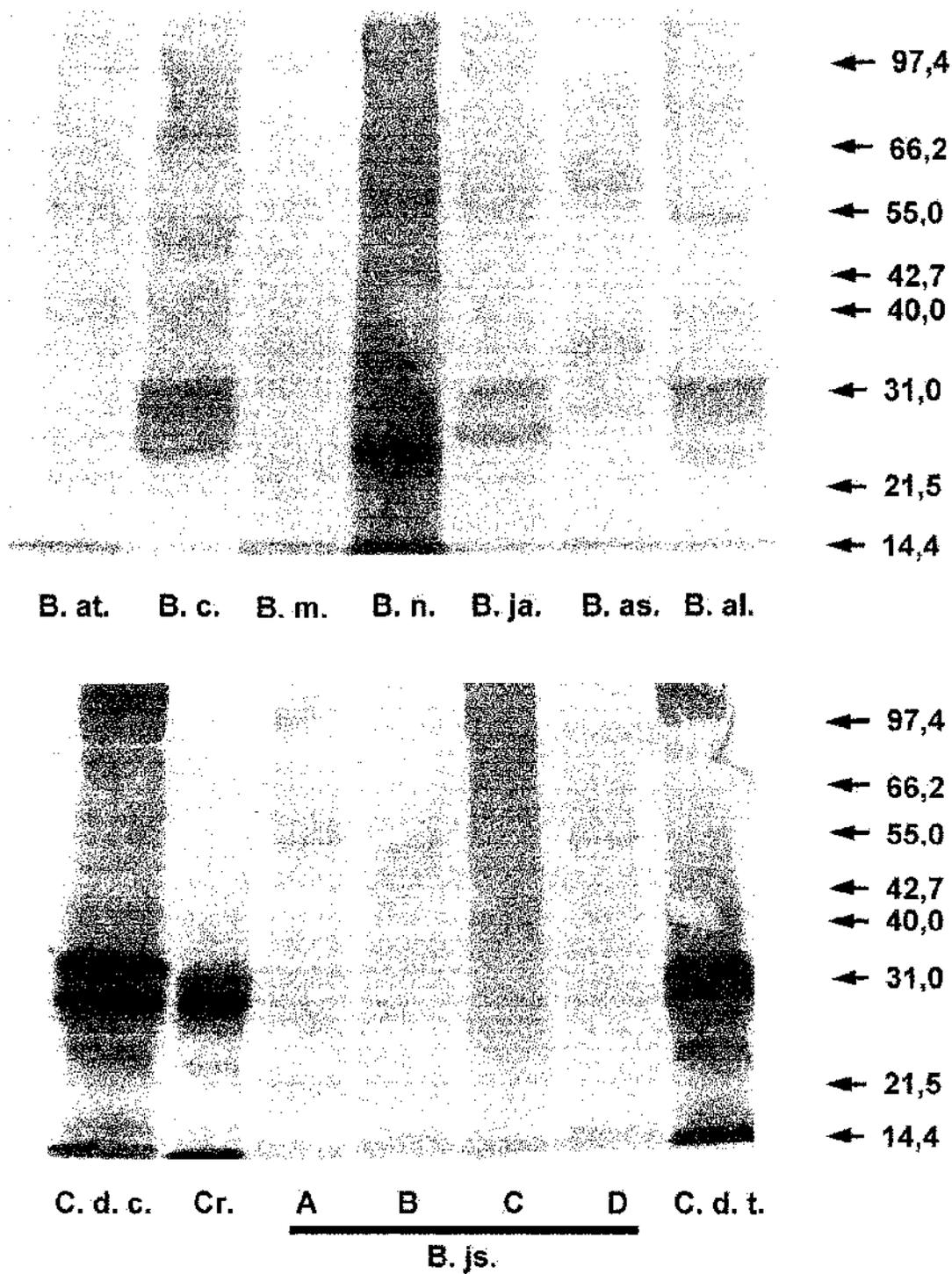


Figura 3. Perfil do imunoblot de vários venenos após eletroforese em gel de poliacrilamida (13%) com SDS. A quantidade usada de cada veneno, as proteínas marcadoras e as abreviações são as mesmas da Figura 2.

A atividade neurotóxica de venenos botrópicos na preparação *biventer cervicis* de pintainho.

Foram usados cinco venenos botrópicos (*B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi* e *B. erythromelas*) que apresentaram uma reatividade no ELISA escolhidos baseado na quantidade disponível, para verificar suas atividades na junção neuromuscular, utilizando o veneno de *C. d. terrificus* como controle positivo. Os venenos de *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. erythromelas* induziram contratura muscular seguida de bloqueio dose-dependente (100, 150, 200 µg/ml) da resposta contrátil nas preparações *biventer cervicis* de pintainho, submetidas à estimulação indireta. A Tabela 1. mostra o tempo necessário para estes venenos produzirem um bloqueio de 50%. O veneno de *B. neuwiedi* induziu bloqueio com um perfil comparável ao obtido com o veneno de *C. d. terrificus* (Figura 4).

Veneno	dose µg/ml	tempo de bloqueio (min.)
<i>B. erythromelas</i>	100	58,3±5,5
<i>B. jararaca</i>	100	67,3±8,2
<i>B. jararacussu</i>	100	29,3±9,8
<i>B. moojeni</i>	100	46,3±11,0
<i>B. neuwiedi</i>	25	26,0±2,1
<i>C. d. terrificus</i>	25	15,0±0,6

Tabela 1. Tempo de 50% de bloqueio para venenos botrópicos em preparações *biventer cervicis* de pintainho. Os valores representam a média ± erro da média do tempo (min) necessário para produzir 50% de bloqueio (n= 3- 4). O veneno de *C. d. terrificus* foi usado como controle positivo.

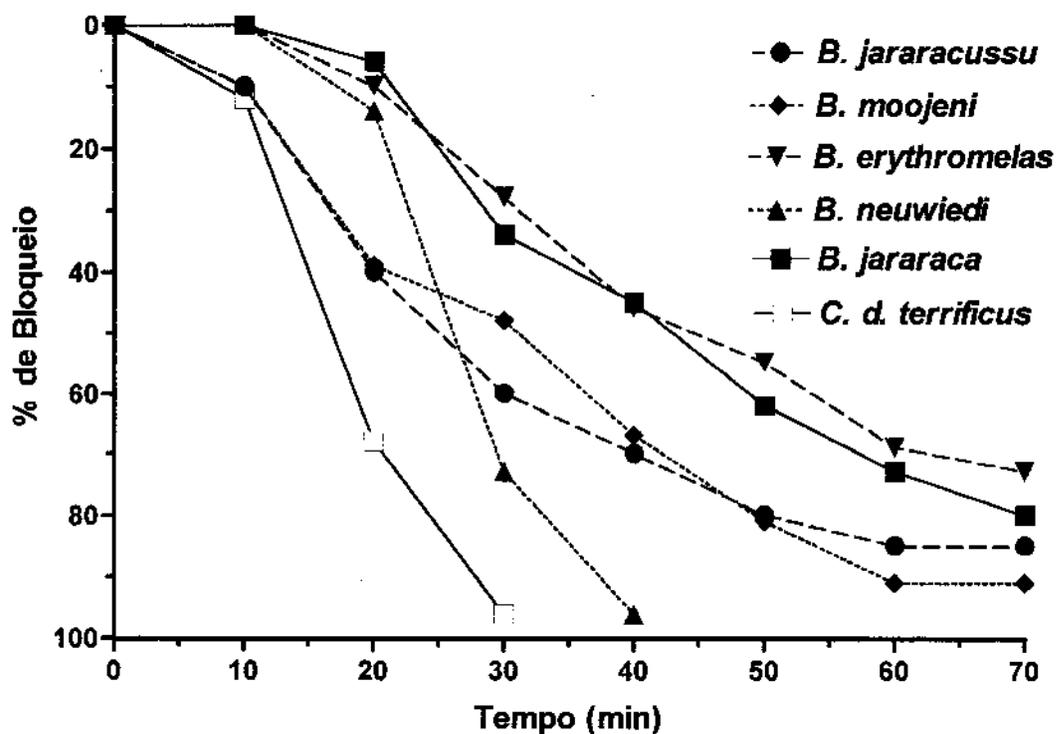


Figura 4. Bloqueio tempo-dependente induzido por vários venenos botrópicos comparado com o de *C. d. terrificus* na preparação *biventer cervicis* de pintainho. Para os venenos de *B. neuwiedi* e *C. d. terrificus*, a dose usada foi de 25 $\mu\text{g/ml}$ e para todos os outros foi de 100 $\mu\text{g/ml}$. Para cada veneno, o nível de bloqueio após 120 min (não mostrado) foi o mesmo observado até 70 min. Os valores representam a média de 3-4 experimentos, sendo que em todos o erro da média para cada ponto foi $\leq 20\%$.

Cromatografia por imunoafinidade

Tendo como base o resultado obtido no ELISA, escolhemos o lote D do veneno de *B. jararacussu* baseado na quantidade disponível no laboratório, fracionando-o através de cromatografia por imunoafinidade em coluna de Sepharose CNBr à qual foi acoplado o anticorpo anti-crotoxina. A Figura 5. mostra o perfil de eluição do veneno de *B. jararacussu*. O rendimento de proteína obtido por este procedimento correspondia à menos de 1,0% do total de veneno aplicado à coluna (três corridas cromatográficas).

Cromatografia por troca iônica em coluna de Mono S

Fracionamento por troca iônica de uma amostra do material obtido por imunoafinidade resultou em um pico só, indicando que a proteína em questão estava essencialmente pura (Figura 6.).

Eletroforese

Após eletroforese na presença de SDS, a proteína purificada por imunoafinidade apresentou bandas principais em torno de 30 kDa e 100 kDa (Figura 7.). Na presença de 2 mM β -mercaptoetanol, apenas a banda de 30 kDa foi observada (não mostrado).

Immunoblotting

A Figura 8. mostra a detecção por imunoblot da proteína purificada. Uma reação positiva foi observada com a banda de alto peso molecular. Na presença de β -mercaptoetanol, esta banda de reatividade caiu para 30 kDa.

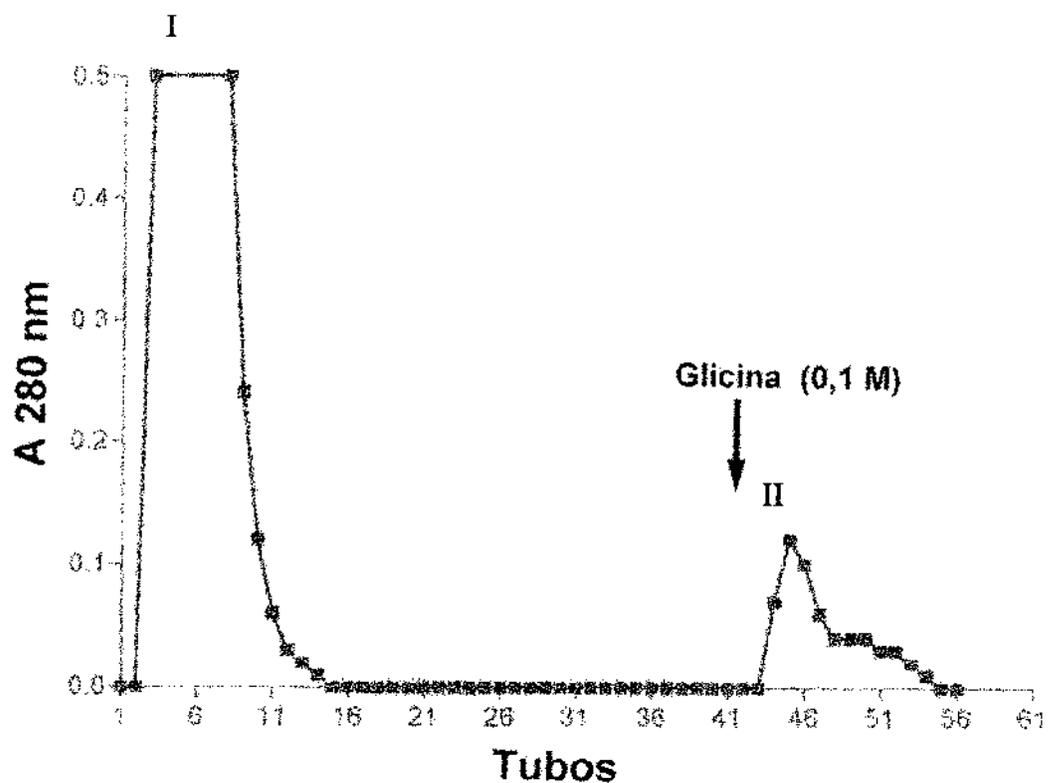


Figura 5. Perfil de eluição do veneno de *B. jararacussu* (40 mg) fracionado por imunoafinidade numa coluna de Sepharose-CNBr com o anticorpo anti-crotoxina acoplado. O pico I representa o material não retido na coluna enquanto pico II representa a proteína eluída com tampão glicina (0,1 M, pH 2,8 contendo HCl, 0,15 M) (seta). Frações de 2,5 ml foram coletadas a um fluxo de 20 ml/h.

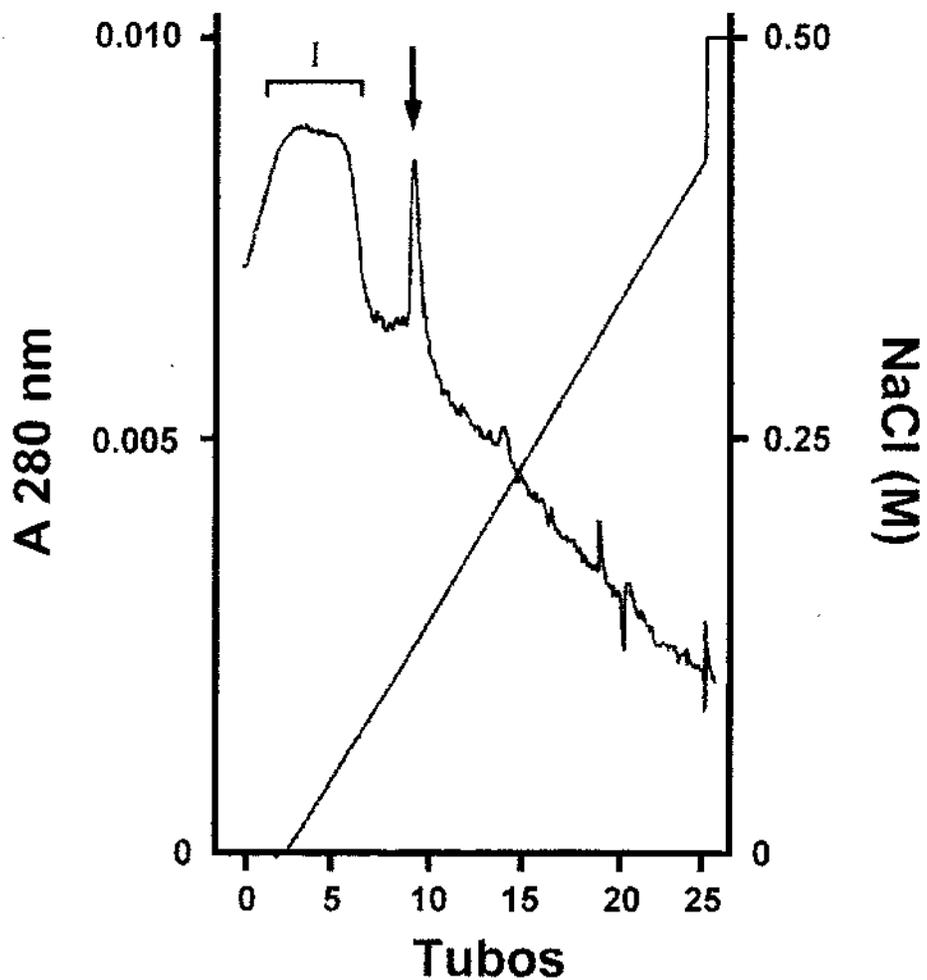


Figura 6. Perfil de eluição após cromatografia por troca iônica numa coluna de Mono S (FPLC) da proteína purificada por imunoafinidade (seta) I, índice de refração do solvente. Foram aplicados 25 μg de proteína à coluna. A eluição foi realizada com um gradiente linear de NaCl (0-0,5 M) em tampão acetato de sódio.

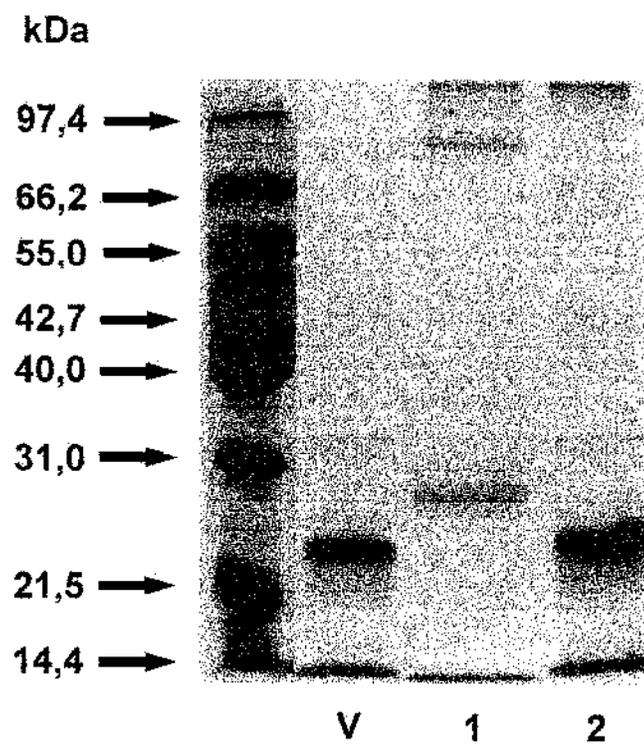


Figura 7. Perfil eletroforético do veneno de *B. jararacussu* (v; 20 μ g), da proteína obtida por imunoafinidade (1,10 μ g) e da fração não retida na coluna (2; 20 μ g). As proteínas marcadoras de peso molecular foram as mesmas descritas na Figura 2.

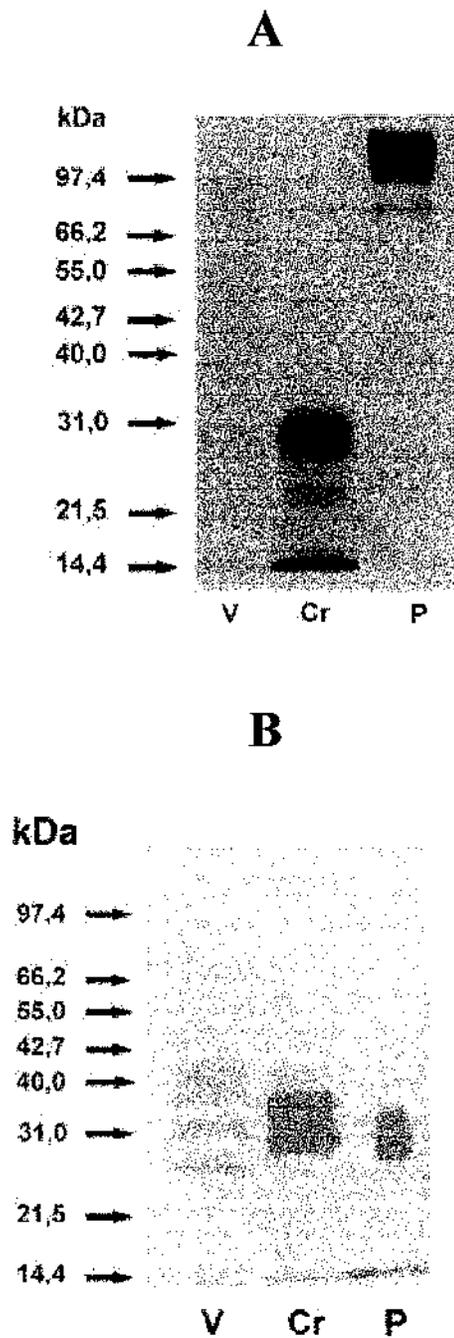


Figura 8. Imunoblot da proteína purificada do veneno da *B. jararacussu* através de cromatografia por imunoafinidade. **A**, com SDS. **B**, SDS + β -mercaptoetanol. v, veneno de *B. jararacussu* (25 μ g); Cr, crotoxina (10 μ g); P, proteína purificada (10 μ g). As proteínas marcadoras foram as mesmas descritas na Figura 2.

ELISA

A Figura 9. mostra que a proteína purificada é reconhecida pelo anticorpo anti-crotoxina de forma mais forte do que o veneno total de *B. jararacussu*, provavelmente porque se encontra agora numa forma pura do que no veneno total.

Esta figura também mostra que a proteína isolada é diferente da bothrosptoxina I (Homs-Brandeburgo, 1988) e de uma lectina (Silva *e col.*, 1997) presentes neste veneno; estas duas proteínas também não reagiram quando testadas por imunoblot (resultados não mostrados).

Atividade fosfolipásica

A proteína purificada do veneno de *B. jararacussu* (10 µg) não apresentou atividade fosfolipásica.

Atividade neuromuscular da proteína purificada por imunoafinidade

Na preparação *biventer cervicis* de pintainho, o componente purificado do veneno de *B. jararacussu* (64 µg/ml, n=2) não apresentou atividade neuromuscular num intervalo máximo de até 120 min, enquanto que com os venenos de *B. jararacussu* (100 µg/ml) e *C. d. terrificus* (50 µg/ml) foi observado um bloqueio de $80 \pm 9\%$ (n=3) e 100% (n=3), respectivamente (Figura 10.).

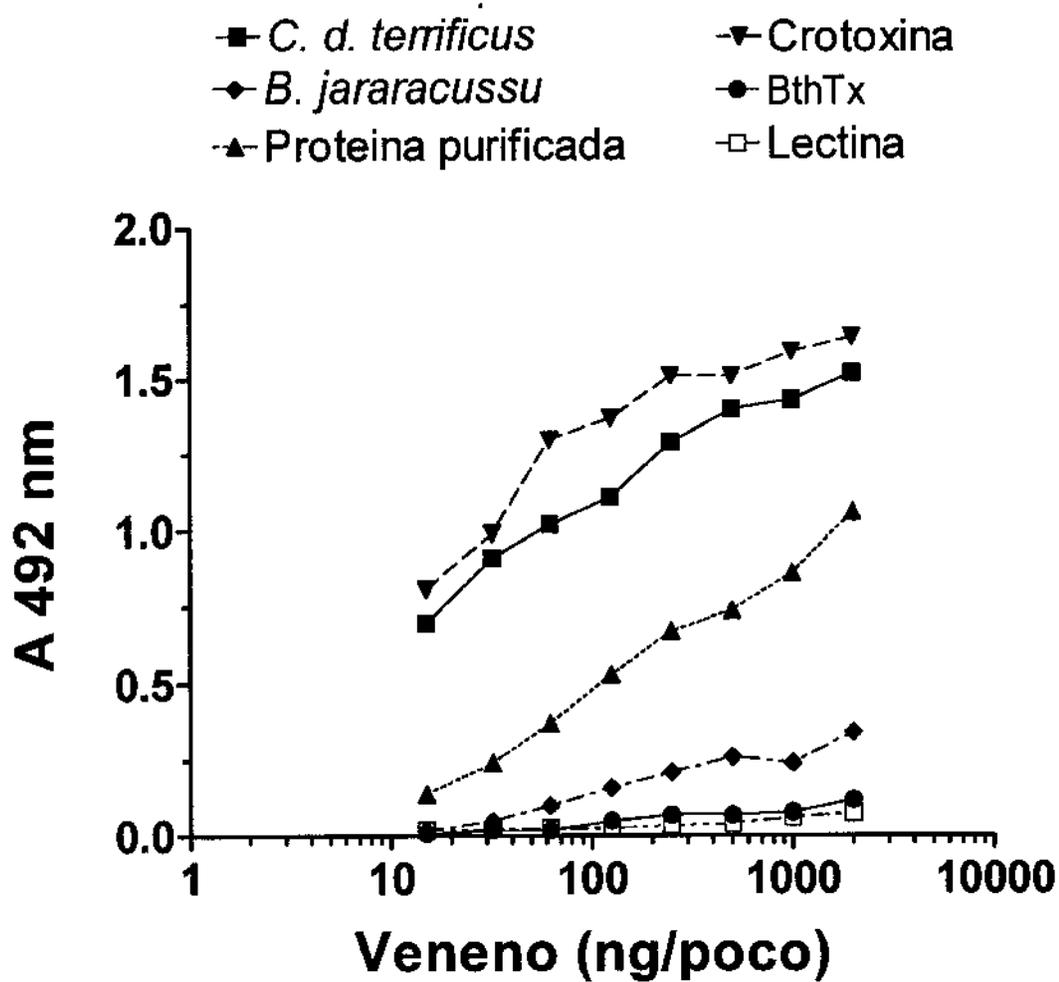


Figura 9. ELISA da proteína purificada do veneno de *B. jararacussu* por imunoafinidade. As condições foram as mesmas descritas anteriormente.

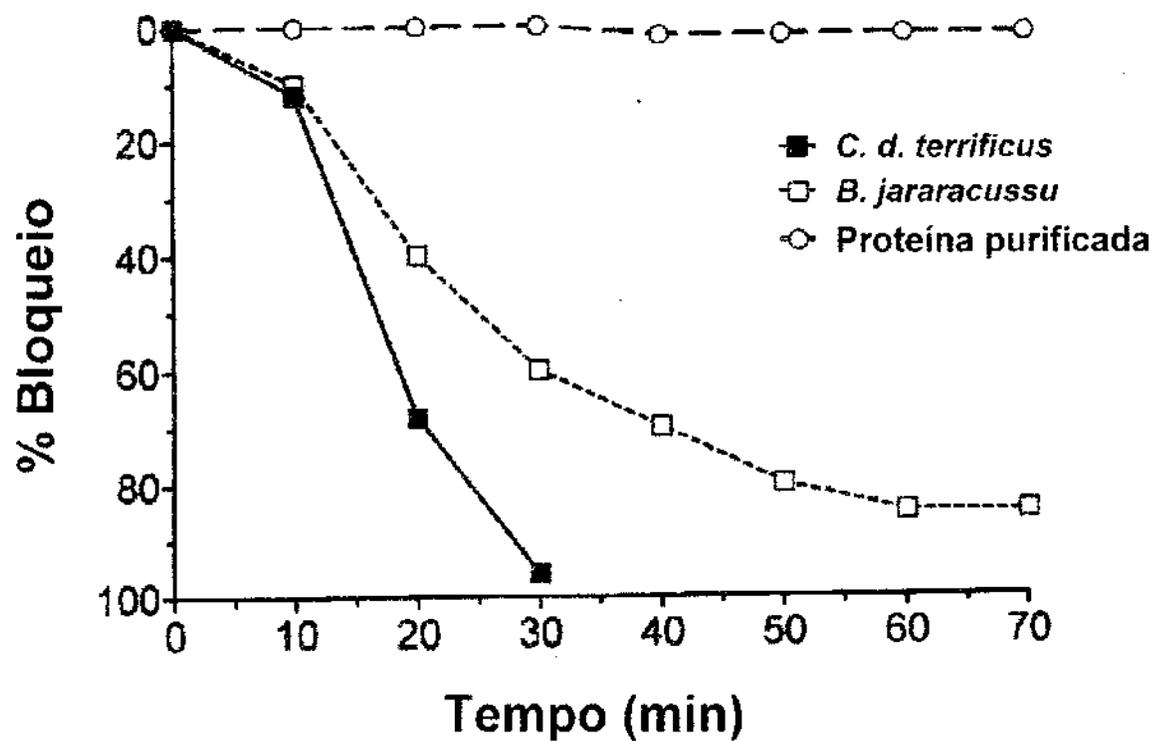


Figura 10. Ausência de atividade neuromuscular da proteína do veneno de *B. jararacussu* (64 $\mu\text{g}/\text{ml}$) na preparação *biventer cervicis* de pintainho. Os venenos de *B. jararacussu* (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e *C. d. terrificus* (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) foram usados como controles positivos (média de 3 experimentos). O erro da média foi $\leq 20\%$ para todos os pontos.

CAPÍTULO 2

**Caracterização parcial de uma lectina
presente no veneno de *B. jararacussu***

INTRODUÇÃO

Lectinas são glicoproteínas caracterizadas por sua habilidade de se ligar à sequências específicas de açúcares (Sharon, 1972; Lis e Sharon, 1986). Embora inicialmente isoladas de plantas, as lectinas têm sido encontradas em uma grande variedade de espécies no reino animal, incluindo os venenos de serpentes (Kocourek, 1986).

Os venenos de várias espécies de serpentes contém baixas quantidades de proteínas do tipo lectina ($\leq 1\%$ de peso seco), muitas das quais são homodímeros com peso molecular em torno de 28.000 (Gartner *e col.*, 1980; Ogilvie and Gartner, 1984; Ogilvie *e col.*, 1986; Lomonte *e col.*, 1990; Hirabayashi *e col.*, 1991; Ozeki *e coll.*, 1994). Além de causar hemaglutinação, estas proteínas também são capazes de agregar plaquetas (Gartner *e col.*, 1980; Ogilvie *e col.*, 1986; Gomes e Aragon, 1986) e de induzir edema de pata em camundongos (Lomonte *e col.*, 1990).

Estas proteínas podem ser facilmente purificadas utilizando-se a resina Sepharose 4B (derivada ou não) à qual elas se ligam permitindo assim o seu isolamento por um processo de afinidade. Como nos experimentos de purificação por imunoafinidade acoplamos o anticorpo anti-crotoxina à Sepharose 4B; investigamos a possibilidade da proteína purificada ter sido retida por possuir alguma semelhança à lectina, e não por ser reconhecida pelo anticorpo anti-crotoxina. Para isso, fracionamos o veneno de *B. jararacussu* numa coluna de Sepharose 4B e examinamos a imunoreatividade do material obtido por ELISA e immunoblotting.

MATERIAIS e MÉTODOS

Purificação de proteína tipo lectina do veneno de B. jararacussu

O veneno de *B. jararacussu* (40-60 mg dissolvidos em 3 ml de solução de Tyrode) foi aplicado à uma coluna de Sepharose 4B não-derivada (1 cm x 10 cm) equilibrada com a mesma solução. A coluna foi lavada com solução Tyrode (composição, em mM: NaCl 137, Na₂PO₄.H₂O 0,42, NaHCO₃ 11,9, CaCl₂ 1,8, MgCl₂ 0,49 e KCl 2,7) a um fluxo de 1 ml/min até a absorbância a 280 nm voltar à linha base. O material ligado à coluna foi eluído com solução Tyrode contendo lactose (100 mM). Frações de 1 ml foram coletadas manualmente em tubos Eppendorf, e o perfil de eluição foi determinado a 280 nm em espectrofotômetro Uvikon 810 (Kontron, Basilha, Suíça). O material eluído com lactose foi dialisado contra água destilada para remover a lactose e depois usado ou para investigar a sua reatividade com o anticorpo anti-crotoxina conforme relatado no capítulo 3 ou para sua caracterização parcial conforme descrito a baixo.

Eletroforese

A eletroforese foi feita essencialmente conforme descrita no capítulo 1, exceto que a coloração foi feita com solução de nitrato de prata após fixação dos géis em solução de H₂O:metanol:ácido acético (40:50:10, v/v) (Blume *et al.*, 1987).

Hemaglutinação

Esta atividade foi determinada segundo o método descrito por Nowak *et al.* (1975). Foram colocados em cada poço da primeira coluna de uma placa de microtitulação 50 µl de tampão fosfato e 50 µl de hemácias humanas lavadas, tripsinizadas e fixadas em formaldeído (2,5% em fosfato). No primeiro poço das outras colunas foram pipetados 50 µl de uma solução de lectina de concentração conhecida e foi feita uma diluição em série com tampão fosfato. Foram adicionados então 50 µl de hemácias a cada um destes poços. Após estas adições, a placa foi levemente agitada e deixada em repouso à temperatura ambiente por 2 h. A reação foi considerada positiva com a formação de um manto e negativa com as hemácias depositadas em

botão no fundo do poço. Em alguns experimentos, concentrações variadas de lactose e EDTA foram adicionadas aos poços para verificar a inibição pelo açúcar e a dependência de Ca^{2+} , respectivamente. Também foi investigado a sensibilidade da lectina ao calor aquecendo-se uma amostra da proteína a 65°C e 100°C por tempos variados (1, 5, e 10 min).

Agregação plaquetária

Obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP)

O sangue de voluntários sadios que não receberam qualquer medicamento durante os 10 dias que antecederam o experimento foi colhido em citrato tri-sódico 3,8% (9:1, v/v). O plasma rico em plaquetas (PRP) foi obtido por centrifugação do sangue total a 200 g em temperatura ambiente por 15 min. O sangue remanescente foi novamente centrifugado a 2.000 g em temperatura ambiente por 15 min para a obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP).

Preparação de plaquetas lavadas (PL)

Ao PRP foi adicionado iloprost (0,8 μM) e o mesmo foi centrifugado a 800 g por 10 min. O sobrenadante foi despresado e ao “pellet” plaquetário foi adicionado solução de Krebs-Ringer desprovida de cálcio, e o mesmo cuidadosamente resuspenso, adicionando-se novamente iloprost (0,8 μM). Repetiu-se o processo acima, adicionando-se ao final 1 mM de cloreto de cálcio (Radomski e Moncada, 1983). O número de plaquetas foi ajustado para $1,5 \times 10^8$ plaquetas/ml através de contagem manual, utilizando-se câmara de Neubauer.

Teste de agregação

A agregação foi monitorada utilizando-se um agregômetro de dois canais (Payton Scientific Instruments, Inc., Buffalo, NY). O aparelho foi calibrado para 0% e 100% de transmissão de luz usando PRP e PPP (ou solução de Krebs), respectivamente. O teste foi iniciado pela adição de agonista (ADP 2-10 μM para PRP, e trombina 180 IU/ml para PL) ou de lectina a 500 μl de suspensão de células e a agregação monitorada durante pelo menos 5 min. Caso não ocorresse agregação pela lectina, a capacidade da mesma em inibir a agregação induzida por outros agonistas foi determinada pré-incubando-se as plaquetas com lectina por 3 à 5 min antes da adição do agonista.

Atividades enzimáticas

Fosfolipásica

A atividade fosfolipásica (PLA) foi determinada conforme descrito por Lôbo de Araújo e Radvanyi (1987). Lectina (em 20 μ l) foi adicionada a 1 ml de meio de reação (5 ml de NaCl 2M, 1 ml de solução de fosfolipídeos, 2 ml de vermelho de fenol 0,1% e 1 ml de CaCl₂ 1 M, completando o volume para 100 ml com água deionizada) e a mistura incubada à temperatura ambiente durante 15 min. O decaimento da absorbância com o tempo após a adição da amostra foi medido em 578 nm.

Hialuronidásica

A atividade hialuronidásica foi quantificada pelo método de Di Ferrante (1956). A 0,2 ml de tampão acetato sódico, 0,2 M, pH 5,0 contendo 0,15 M NaCl e 0,2 ml de substrato (0,2 mg de ácido hialurônico/ml de tampão acetato) foi adicionado 0,1 ml de lectina e a mistura incubada por 15 min à 37°C. A reação foi interrompida pela adição de 2 ml de uma solução de brometo de cetrimetilamônio (2,5% em NaOH 2%) sob agitação vigorosa. A turbidez resultante foi medida a 400 nm após 30 min de incubação à temperatura ambiente. Uma unidade de atividade (“turbidity reducing unit”, TRU) correspondia à quantidade de lectina capaz de causar uma redução de 50% na turbidez gerada por 0,2 mg de ácido hialurônico.

Proteolítica

A atividade proteolítica foi avaliada usando-se caseína como substrato de acordo com o método de Kunitz (1947). Para 1,9 ml de uma solução a 1% de caseína em 0,1 M Tris-HCl, pH 7,8, pré-incubados por 5 min à 37°C, foi adicionado 0,1 ml de lectina seguido de incubação na mesma temperatura por 20 min. A reação foi interrompida pela adição de 4 ml de TCA 5% e as amostras permaneceram em gelo por 30 min, após os quais foram centrifugadas e a absorbância do sobrenadante lida a 280 nm. Uma unidade de atividade foi definida como um aumento de 0,001 unidade de absorbância por minuto.

RESULTADOS

A Figura 11. mostra o perfil de eluição da lectina do veneno de *B. jararacussu* (BjcL) eluída de uma coluna de Sepharose 4B não-derivada usando solução de tyrode contendo lactose (0,1 M). A proteína purificada representa < 3 % do conteúdo proteico do veneno (baseado na absorção a 280 nm). Em eletroforese na presença de SDS-PAGE, a BjcL apresentou uma banda principal em torno de 28 kDa, e uma banda menor com peso molecular em torno de 14 kDa (Figura 12.). Na presença de β -mercaptoetanol (2 mM), apenas uma banda em torno de 14 kDa foi mostrada (resultado não mostrado), indicando que a lectina existe principalmente como um homodímero.

BjcL provoca aglutinação em hemáceas humanas fixadas com formaldeído em concentrações ≥ 19.5 ng/poço (195 ng/ml, n=7) o veneno de *B. jararacussu* produziu hemaglutinação em concentrações ≥ 2 μ g/poço (13,3 μ g/ml, n=3). A lactose (≥ 2 mM, n=7) e a EDTA (≥ 2 mM, n=7) inibiram a hemaglutinação provocada pela BjcL. A hemaglutinação foi fracamente inibida pela glucose e sucrose (>100 mM, n=3), mas não pela N-acetilglucosamina (200 mM). A BjcL não possui atividade hemolítica direta (baseado no exame das placas de hemaglutinação ao término do ensaio). A atividade hemaglutinante da lectina foi totalmente abolida pelo aquecimento a 65 °C por 1 minuto, mostrando que esta proteína é termosensível.

Na concentração de 90 μ g/ml, BjcL não agregou plaquetas humanas em PRP ou em PL (n=3 cada). A lectina (80 μ g/ml) não inibiu a agregação induzida por ADP (2 μ M, n=3 PRP) ou trombina (180 IU/ml, n=3 PL) (Figura 13.). A BjcL não apresentou atividades proteolíticas, fosfolipásica e hialuronidásica. Estes resultados mostram que o veneno de *B. jararacussu* contém uma proteína do tipo lectina cujas propriedades são parecidas com as lectinas do tipo C (Ca^{2+} dependente) já caracterizadas do veneno de várias espécies de serpentes da família Crotalidae (tabela 2.).

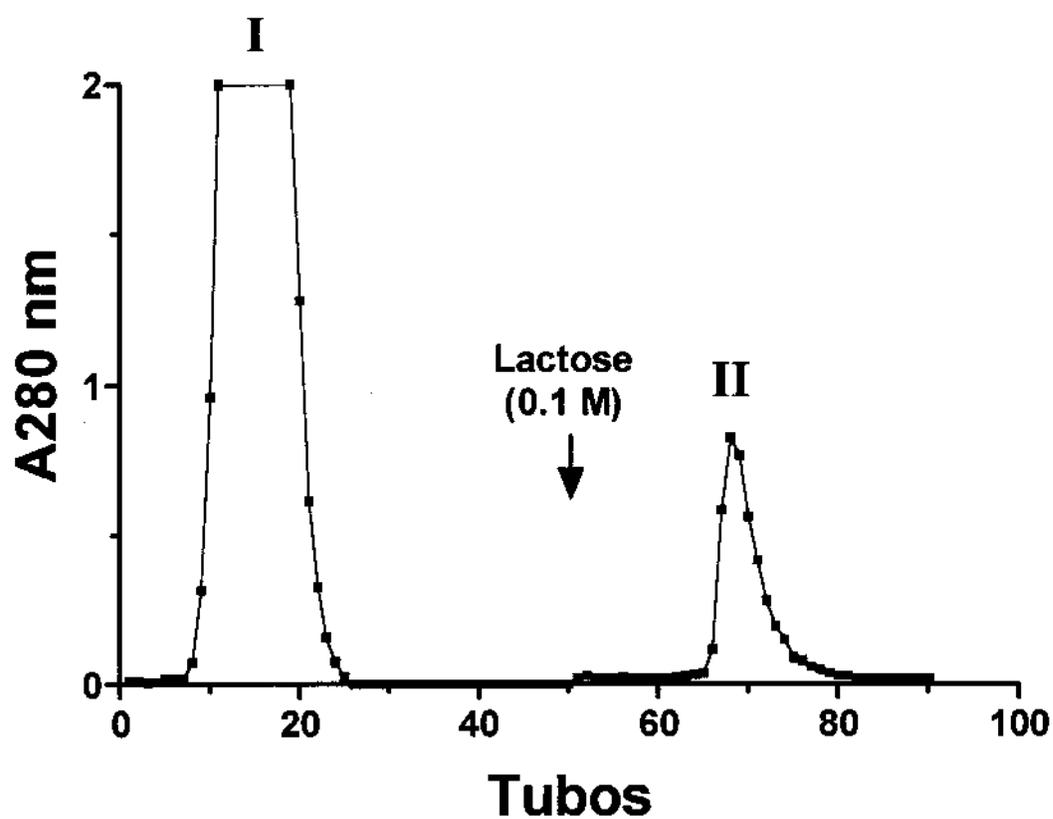


Figura 11. Perfil de eluição da lectina do veneno de *B. jararacussu* (BjcL) purificada em coluna de Sepharose 4B não derivada. A lectina foi eluída com solução de tyrode contendo lactose 0.1 M. O pico I representa o material não retido na coluna enquanto o pico II representa a lectina eluída.

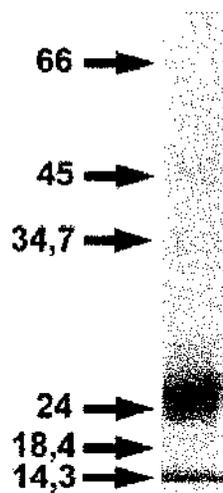


Figura 12. Perfil eletroforético da lectina purificada do veneno de *B. jararacussu* (BjcL). Os pesos moleculares são representados por kDa. As proteínas marcadoras são lisosima (14,3), β -globulina (18,4), tripsinogênio (24,0), pepsina (34,7), ovoalbumina (45,0) e BSA (66,0).

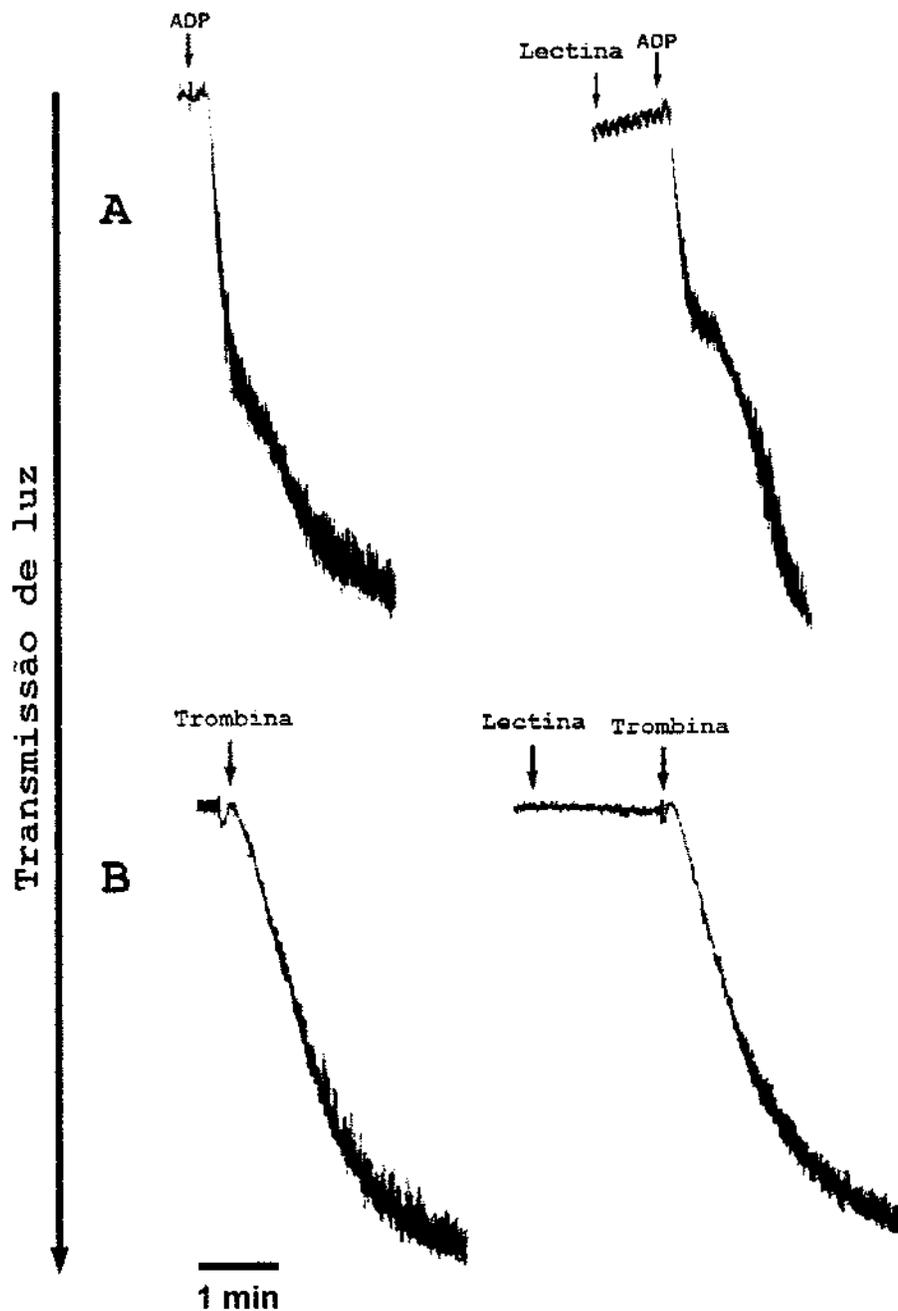


Figura 13. Ausência de efeito da lectina (BjcL) em agregação de plaquetas humanas m PRP (painel A) e em PL (painel B). BjcL (90 $\mu\text{g/ml}$ em A e 80 $\mu\text{g/ml}$ em B). Painel A, ADP (2 μM). Em em B, trombina (180 IU/ml).

Espécie	R (%)	PM	Inibição		Ag.Plaq.	Referências
			Lactose	EDTA		
Crotalidae						
<i>B. atrox</i>	0.24	28.000 (D)	+	+	Fraco	Gartner <i>e col.</i> (1990); Ogilvie and Gartner (1984); Ogilvie <i>e col.</i> (1989)
<i>B. godmani</i>	0.3	28.000 (D)	+	+	n.d	Lomonte <i>e col.</i> (1990)
<i>B. jararaca</i>	0.4	30.000 (D)	+	+	N	Ozeki <i>e col.</i> (1994)
<i>B. jararacussu</i>	>3	28.000 (D)	+	+	N	Este trabalho
<i>Crotalus atrox</i>	n.d.	32.000 (D)	+	+	Forte	Ogilvie and Gartner (1984); Ogilvie <i>e col.</i> (1989); Hirabayashi <i>e col.</i> (1991)
<i>Lachesis muta</i>	0.89	28.000 (D)	+	+	Forte	Ogilvie and Gartner (1984); Ogilvie <i>e col.</i> (1989)

Tabela 2. Algumas propriedades de lectinas de venenos de serpentes

D, dímero. M, monomero. N, não causa agregação. n.d., não determinado

CAPÍTULO 3

Discussão e Conclusões gerais

DISCUSSÃO GERAL

Os resultados obtidos através do ELISA indicam que, de modo geral, com exceção da peçonha de *B. neuwiedi*, os venenos botrópicos possuem um baixo conteúdo de proteínas imunologicamente relacionadas a crotoxina. Estes dados coincidem com aqueles observados em relação à atividade biológica determinada em aves, demonstrando a existência de paralelismo entre a atividade neuromuscular dos venenos ensaiadas e a reatividade frente ao anticorpo anti-crotoxina.

Dentro deste quadro, constitui exceção o veneno de *B. jararacussu*, apesar da atividade neurotóxica discutida por Rodrigues-Simioni *e col.* (1983), apresentou uma baixa reatividade anticrotoxínica. Apesar disso, persistem e as observações já firmadas (Brazil, 1909, 1911) que justificam a tentativa em demonstrar a presença de uma proteína imunologicamente parecida com a crotoxina no veneno de *B. jararacussu* e determinar suas características.

Durante o processo de caracterização dos venenos botrópicos tivemos a oportunidade de comparar diferentes técnicas. Embora com o immunoblotting, os componentes possam ser separados de acordo com seu peso molecular e sua reatividade frente ao anticorpo possa ser determinada e comparada (Ownby e Colberg, 1990) nossos resultados indicam que o teste do ELISA foi mais sensível do que o do immunoblotting para demonstrar a relação imunológica geral entre os venenos e o anticorpo.

De fato, em relação ao veneno total de *B. jararacussu*, a reação começa a ser positiva com 2 µg de veneno ou menos com o teste ELISA, enquanto que pelo immunoblotting, bandas positivas não foram observadas mesmo com 25 µg de veneno. Essa incapacidade do immunoblotting em detectar componentes crotoxina-símiles pode indicar um conteúdo muito baixo da proteína no veneno estudado.

Os resultados da cromatografia por imunoafinidade (seguida de eletroforese, immunoblotting e ELISA) indicam a existência de uma proteína imunologicamente relacionada com a crotoxina no veneno de *B. jararacussu* com duas bandas principais (30 e 100 kDa). Apesar desta proteína ter sido isolada a partir do anticorpo anti-crotoxina e apresentar bandas na região da crotoxina, a ausência de atividade neurotóxica e fosfolipásica mostra que a mesma não exibe as atividades biológicas ou enzimáticas da crotoxina.

Do ponto de vista imunológico, fica difícil afirmar com certeza a presença de proteínas relacionadas com a crotoxina no veneno de *B. jararacussu*, pois verificamos recentemente (dados não mostrados) que o anticorpo utilizado não era totalmente específico contra a crotoxina. Essa ausência de especificidade pode ser devido ao uso de preparações impuras de crotoxina durante a purificação por imunoafinidade em CNBr-Sepharose; ou à existência de um epitopo comum em várias toxinas do veneno de *C. d. terrificus*.

Nossos resultados deixam em aberto a explicação para as observações feitas por Brazil (1909; 1911) e Dos Santos *e col.*, (1992) com relação a maior capacidade do antissoro botrópico-crotálico em neutralizar as atividades do veneno de *B. jararacussu*. A proteína por nós purificada, sendo desprovida de atividade biológica, não pode ser responsabilizada pelas mesmas.

Por outro lado, a principal toxina (BthTx I) isolada do veneno de *B. jararacussu*, é responsável não só pela neurotoxicidade como pela miotoxicidade em animais de laboratório (Rodrigues-Simioni *e col.*, 1983), não reagiu com o anticorpo anti-crotoxina, embora seja também de natureza fosfolipásica (Cintra *e col.*, 1993; Rodrigues-Simioni *e col.*, 1995). É possível entretanto que esteja sendo neutralizada por outros anticorpos presentes no soro polivalente.

Nesta etapa de nossos estudos, reconhecemos a necessidade de reformular a proposta inicial. De fato, para detectarmos a existência de componente(s) com atividades antigênicas e biológicas no veneno de *B. jararacussu*, semelhantes a componentes presentes no veneno de *C. d. terrificus* precisaríamos não só preparar anticorpos monoclonais contra cada toxina do veneno de cascavel, como também assegurar-nos da especificidade dos anticorpos utilizados.

Em resumo, podemos afirmar que a partir dos objetivos propostos, iniciamos a busca de componente(s) crotoxina-símile(s) baseados não só na semelhança dos efeitos observados em animais e pacientes como também na eficácia do soro polivalente. É óbvio que tal busca baseava-se na suposição de que a produção dos mesmos efeitos, estaria ligada a presença de toxinas com estruturas semelhantes (convergência estrutural e funcional).

Neste sentido, das possíveis relações que podem ser estabelecidas entre diferentes toxinas, suas estruturas e funções, três merecem destaque (Menez, 1997)

- Em primeiro lugar, animais venenosos podem produzir toxinas com a mesma estrutura, mas atividades diferentes, sugerindo divergências funcionais sobre uma estrutura conservada, como por exemplo, a diversidade de funções observadas entre as fosfolipases A₂ (Ownby *e col.*, 1997; Lambeau *e col.*, 1997).
- Em segundo lugar, animais (mesmo de diferentes phyla) podem produzir toxinas com funções semelhantes mas diferentes estruturas, sugerindo uma convergência funcional, como por exemplo, a crotoxina (Gopalakrishnakone *e col.*, 1984) e a botropstoxina (BthTx I) (Rodrigues-Simioni *e col.*, 1983).
- Em terceiro lugar, animais (mesmo de diferentes phyla) podem produzir toxinas com estruturas e funções semelhantes sugerindo convergência funcional e estrutural. Além disso, toxinas podem estar presentes em outros tecidos além da glândula venenosa, onde usualmente exercem diferentes funções, como por exemplo, a fosfolipase pancreática.

Os resultados obtidos falam a favor de uma convergência apenas funcional. Quanto aos efeitos observados, em animais de laboratório após administração do veneno de *B. jararacussu* seriam todos causados pelo “pool 4” (fração do veneno que encerra a BthTx I mais PLA₂) como postulado por Rodrigues-Simioni *e col.* (1983). Portanto, nem o componente “crotoxina-símile” nem a lectina que isolamos e purificamos desempenhariam papel relevante neste envenenamento.

Por outro lado, a obtenção do componente “crotoxina-símile”, abre novas e interessantes perspectivas como a do sequenciamento de seus aminoácidos e seu alinhamento com os da crotoxina. Mesmo no caso da não existência de analogia primária, este fato poderia sinalizar a importância do aminoácido ou sequências ausentes para a expressão dos efeitos biológicos da crotoxina.

CONCLUSÕES GERAIS

- Os venenos botrópicos possuem um baixo conteúdo de proteínas imunologicamente relacionadas à crotoxina.
- A proteína purificada do veneno de *B. jararacussu* por imunoafinidade ocorre em baixa concentração (< 1%) no veneno. É de natureza básica com massa molecular em torno de 100 kDa que cai para 30 kDa em condições redutoras, sugerindo uma existência em forma multimérica. Imunologicamente relaciona-se com a crotoxina, mas não exibe a atividade neuromuscular desta toxina. Também não possui atividades fosfolipásica.
- Baseado na imunoreatividade, no ELISA, esta proteína não é a botropstoxina I e nem a proteína tipo lectina encontradas neste veneno.

SUMMARY

This thesis examines the distribution in *Bothrops* venoms of proteins immunologically related to crotoxin and describes the purification and partial characterization of one such protein from the venom of *Bothrops jararacussu*. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoblotting showed that *Bothrops* venoms generally possess few proteins that interact with anti-crotoxin antibodies. The ELISA was generally more useful than immunoblotting for investigating these relationships because of its greater sensitivity. Immunoaffinity chromatography of *B. jararacussu* venom on Sepharose 4B coupled to anti-crotoxin antibodies yielded a protein with a M_w of 100,000 by SDS-PAGE. Since in the presence of β -mercaptoethanol this M_w decreased to 30 kDa (approx. M_w of crotoxin), it seems likely that the protein normally exists in a multimeric form. The purified protein had no phospholipase activity nor did it produce neuromuscular blockade in the chick biventer cervicis preparation. This protein does not correspond to either bothropstoxin I or to a lectin isolated from this same venom since neither of the latter reacted with the anti-crotoxin antibody in the ELISA.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, C.F.S.; SILVA, O.A.; GODOY, P. and MIRANDA, D. (1985) - Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *Bothrops jararacussu* snake bite. *Toxicon*. **23**, 877-885.
- AMARAL, C.F.S., REZENDE, N.A., DA SILVA, O.A., RIBEIRO, M.M.F., MAGALHÃES, R.A., REIS, R.J., CARNEIRO, J.G. and CASTRO, J.R.S. (1986) Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópico e crotálico. Análise de 63 casos. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. **28**, 220-227.
- AMARAL, C.F.S.; DOURADO, H.V.; KOUYOUMDJIAN, J.A.; CARDOSO, J.R.; CAMPOS, J.A.; AZEVEDO-MARQUES, M. and LOPES, P.F.A. (1987) *Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes ofídicos*. Centro de Documentação do Ministério da Saúde, Brasília.
- ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; SAMPAIO, S.V.; CUNHA, O.A.B.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B. and GIGLIO JR. (1997) Isolation and characterization of a new clotting factor from *Bothrops jararacussu* (jararacuçu) venom. *Toxicon*. **35**, 1403-1052.
- ASSAKURA, M.T.; REICHL, A. P.; ASPERTI, M.C.A. and MANDELBAUM, F.R. (1985) Isolation of the major proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops moojeni* (caissaca). *Toxicon*. **23**, 691-706.
- AZEVEDO-MARQUES, M.M.; CUPO, P. and HERING, S.E. (1987) Evidence that *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) envenomation in humans causes myoeysis rather than hemolysis. *Toxicon*. **25**, 1163-1168.
- BARRIO A. (1954) Estudio electroforético del veneno de serpiente del cascabel. *Cien. Invest.* **10**, 368.

- BIEBER A.L.; MILLS, J.P.Jr.; ZIOLKOWSKI, C. and HARRIS, J. (1990) Rattlesnake neurotoxins: biochemical and biological aspects. *J. Toxin. Toxin Rev.* **9**, 285-306.
- BLUME, H., BEIER, H. and GROSS, H.J. (1987) An improved silver staining off-plant protein RNA and DNA in polyacrylamide cells. *Eletroforeses.* **8**, 93-99.
- BON, C.; BOUCHIER, C.; CHOUMET, V.; FAURE, G.; JIANG, M.S.; LAMBEZ, M.P.; RADVANYI, F. and SALIOU, B. (1989) Crotoxin. Half-century of investigations on a phospholipase A₂ neurotoxin. *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.* **39**, 439-448.
- BOQUET, P. (1979) Immunological properties of snake venoms. In: *Snake venoms. Handbook Experimental Pharmacology.* 52. (Lee, C.Y., ed). pp. 721-824. Springer-Verlag:Berlin.
- BRAZIL, V. (1909). Serumtherapia antiophidica. *Rev. Med. S. Paulo.* **12**, 293-307.
- BRAZIL, V. (1911) *La défense contre l'ophidism.* Pocaí & Weiss: São Paulo.
- BRAZIL O.V. (1966) Pharmacology of crystalline crotoxin. II. Neuromuscular blocking action. *Mem. Inst. Butantan.* **33**, 981.
- BRAZIL, O.V. and EXCELL, B.J. (1972) Action of crotoxin and crotactin from the venom of *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) on the frog neuromuscular junction. *J. Formosan Med. Assoc.* **71**, 394.
- CAMPBELL, J.A. and LAMAR, W.W. (1989) The venomous reptiles of Latin America. pp. 180-226. Comstock Publishing: Ithaca..
- CARROLL, S.B., THALLEY, B.S., THEAKSTON, R.D.G. and LAING, G. (1992) Comparison of the purity and efficacy of affinity purified avian antivenoms with commercial equine crotalid antivenoms. *Toxicon.* **30**, 1017-1025.
- CHAVEZ-OLÓRTEGUI, C., LOPES, C.S., CORDEIRO, F.D., GRANIER, C. and DINIZ, C.R. (1993) An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) that discriminates between *Bothrops atrox* and *Lachesis muta muta* venoms. *Toxicon.* **31**, 417-425.

CHIPPAUX, J.P., WILLIAMS, V. and WHITE, J. (1991) Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon*. **27**, 1397-1399.

CHOUMET, V., FAURE, G., ROBBE-VINCENT, A., SALIOU, B., MAZIÉ, J.C. and BON, C. (1992) Immunochemical analysis of a snake venom phospholipase A₂ neurotoxin, crotoxin, with monoclonal antibodies. *Mol. Immunol.* **29**, 871-882.

CHOUMET, V., JIANG, M.S., RADVANYI, F., OWNBY, C.L. and BON, C. (1989) Neutralization of lethal potency and inhibition of enzymatic activity of a phospholipase A₂ neurotoxin, crotoxin, by non-precipating antibodies (Fab). *FEBS Lett.* **244**, 167-173.

CHOUMET, V., JIANG, M.S., SPECKER, I. and BON, C. (1991) Immunological cross-reactivity of two phospholipase A₂ neurotoxins, agkistrodotoxin and crotoxin. *Toxicon*. **29**, 441-451.

CINTRA, A.C.O., MARANGONI, S., OLIVEIRA, B., GIGLIO, J.R. (1993) Bothropstoxin I: amino acid sequence and function. *J. Prot. Chem.* **12**, 57-64.

Di FERRANTE, N. (1956) Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and hyaluronidase activity. *J. Biol. Chem.* **220**, 303-306.

DEVI, A. (1968) The protein and nonprotein constituents of snake venoms In: *Venomous animals and their venoms*. Vol. 2 (Bucherl W, Buckley E, Deulofeu, V, eds.). Academic Press:New York.

DIAS DA SILVA, W., GUIDOLIN, R., RAW, I., HIGASHI, H.G., CARICATTI, C.P., MORAI, I.F., LIMA, M.L.S.T., YAMAGUCHI, I.K., NISHIKAWA, A.K., STEPHANO, M.A., MARCELINO, J.R., PINTO, J.R. and SANTOS, M.J. (1989) Cross-reactivity of horse monovalent antivenoms to venoms of ten *Bothrops* species. *Mem. Inst. Butantan.* **51**, 153-168.

DOS SANTOS, M.C., GONÇALVES, L.R.C., FORTES-DIAS, C.L., CURY, Y., GUTIÉRREZ J.M. and FURTADO, M.F.D. (1992) A eficácia do antiveneno botrópico-crotálico na neutralização das principais atividades do veneno de *Bothrops jararacussu*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* **34**, 77-83.

- ELLIOTT, W.B. (1978) Chemistry and immunology of reptilian venoms. In: *Biology of the Reptilia*. Vol. 8. (Gans C. and Gans K.A., eds). pp. 163-436. Academic Press: London.
- FURTADO, M. de F. D., COLLETO, G.M.D.D. and DIAS da SILVA, W.D. (1991) Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos. I. Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos de algumas espécies do gênero *Bothrops* e *Crotalus* usando amostras secas à temperatura ambiente ou liofilizadas. *Mem. Inst. Butantan*. **2**, 149-159.
- GARTNER, T.K., STOCKER, K. and WILLIAMS, D.C. (1980) Thrombolectin: a lectin isolated from *Bothrops atrox* venom. *FEBS Lett.* **117**, 13-16.
- GARTNER, T.K. and OGILVIE, M.L. (1984) Isolation and characterization of three Ca^{2+} dependent β -galactoside-specific lectins from snake venoms. *Biochem. J.* **224**, 301-307.
- GINSBORG, B.L. and WARRINER, J. (1960) The isolated chick biventer cervicis nerve muscle preparation. *Br. J. Pharmacol.* **15**, 410-411.
- GOMES, M.A. and ARAGON, F. (1986) Purification and some properties of the hemagglutinating protein mertina from bushmaster *Lachesis muta* snake venom. *Rev. Biol. Trop.* **34**, 49-53.
- GONÇALVES, J.M. and VIEIRA, L.G. (1950).- Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras. I. Análise electroforética. *An. Acad. Bras. Cien.* **22**, 141.
- GOPALAKRISHNAKONE, P., HAWGOOD, B.J. and THEAKSTON, R.D.G. (1981) Specific antibodies to the reconstituted crotoxin complex, from the venom of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*), using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and double immunodiffusion. *Toxicon.* **19**, 131-139.
- GOPALAKRISHNAKONE, P. and HAWGOOD, B.J. (1984) Morphological changes induced by crotoxin in murine nerve and neuromuscular junction. *Toxicon.* **22**, 791-804.

- GUTIÉRREZ, J.M., CHAVES, F., BOLANOS, R., CERDAS, L., ROJAS, E., ARROYO PORTILLA, E. (1981) Neutralización de los efectos locales del veneno de *Bothrops asper* por un antiveneno polivalente. *Toxicon*. **19**, 493-500.
- GUTIÉRREZ, J.M. and LOMONTE, B. (1989) Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. *Mem. Inst. Butantan*. **51**, 211-223.
- GUTIÉRREZ, J.M., OWNBY, C.L. and ODELL, G.V. (1984) Isolation of a myotoxin from *Bothrops asper* venom: partial characterization and action on skeletal muscle. *Toxicon*. **22**, 115-128.
- GUTIÉRREZ, J.M. and CERDAS, L. (1984) Mechanism of action of myotoxins isolated from snake venoms. *Rev. Biol. Trop.* **32**, 213-222.
- HAMES, B.D.(1990) One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In: Gel electrophoresis of proteins - A practical approach. (Hames B.D. and Rickwood D. eds). pp. 1-147. IRL Press Ltd.: London.
- HARRIS, J.B. and CULLEN, M.J. (1990) Muscle necrosis caused by snake venoms and toxins. *Electron Microsc. Rev.* **31**, 183-211.
- HENDERSON, J.T. and BIEBER, A.L. (1986) Antigenic relationships between Mojave toxin subunits, Mojave toxin and some crotalid venoms. *Toxicon*. **24**, 473-479.
- HENDON, R.A. and FRAENEL-CONRAT, H. (1971) Biological role of the two components of crotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **68**, 1560-1563.
- HIRABAYASHI, J., KUSUNOKI, T. and KASAI-K-i. (1991) Complete primary structure of a galactose-specific lectin from the venom of the rattlesnake *Crotalus atrox*: Homologies with Ca²⁺-dependent-type lectins. *J. Biol. Chem.* **266**, 2320-2326.
- HOFMANN, H. and BON, C. (1987) Blood coagulation induced by the venom of *Bothrops atrox*. Identification, purification and properties of two factor X activators. *Biochemistry*. **26**, 780-787.

- HOMSI-BRANDEBURGO, M.I., QUEIROZ, L.S., SANTO-NETO, H., RODRIGUES-SIMIONI, L. and GIGLIO, J.R. (1988) Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. *Toxicon*. **26**, 626-627.
- ITZHAKI, R.F. and GILL, M.D. (1964) A micro-biuret method for estimating proteins. *Anal. Biochem.* **9**, 401-410.
- IWANAGA, S. and SUZUKI, T. (1979) Enzymes in snake venoms In: *Snake venoms. Handbook of Experimental Pharmacology*. Vol. 52. (Lee C.Y., ed.). pp. 61-158. Springer-Verlag:Berlin.
- JUANG, R.H., CHANG, Y.D. and SUNG, J.C. (1984) Oven-drying method for polyacrylamide gel slab packed in cellophane sandwich. *Anal. Biochem.* **141**, 348-350.
- KAMIGUTI, A.S., THEAKSTON, R.D.G., DESMOND, H. and HUTTON, R. (1991) - Systemic haemorrhage in rats induced by a haemorrhagic fraction from *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon*. **29**, 1097-1105
- KOCOUREK J. (1986) Historical background. In: *Isolations lectins*. (Liener I.E., Sharon N. and Goldstein I.J. eds.). pp. 3-32. Academic. Press: Orlando.
- KOUYOUMDJIAN, J.A., POLIGELLI, C., LOBO, S.M.A. and GUIMARÃES, S.M. (1991) Fatal extradural haematoma after snakebite (*Bothrops moojeni*). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **85**, 552.
- KUNITZ, M. (1947) Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. *J. Gen. Physiol.* **32**, 291-310
- LAMBEAU G., ANCIAN P., BARHAIN J., BEIBOER S., NICOLAS JP., VERHEIGI H., ZWARITCH E., LIN Y., GELB M. and LAZDUNSKI M. (1997) A family of receptor for venom phospholipases A₂. 12th World Congress of the IST. México. Abstract 44.

- LATIFI, M. (1978) Commercial production of anti-snakebite serum (antivenin). In: *Biology of the Reptilia*. Vol. 8B. (Gans C and Gans, K.A.ed). pp. 561-588. Academic Press:London.
- LI Q., OWNBY, C. (1992) Evaluation of four different immunogens for the production of snake antivenoms. *Toxicon*. **30**, 1319-1330.
- LIS H. and SHARON N. (1986). Applications of lectins: In: *Isolations of lectins*. (Liener I.E., Sharon N. and Goldstein I.J. eds.) pp 293-370. Academic. Press: Orlando.
- LÔBO DE ARAÚJO, A. and RADVANYI, F. (1987) Determination of phospholipase A₂ activity by a colorimetric assay using a pH indicator. *Toxicon*. **25**, 1181-1188.
- LOMONTE, B., ROJAS, G., GUTIÉRRES, J.M. and RAMÍREZ, G. (1990) Isolation of a galactose-binding lectin from the venom of the snake *Bothrops godmani* (Godman's pit viper). *Toxicon*. **28**, 75-81.
- MANDELBAUM, F.R., ASSAKURA, M.T. and REICHL, A.P. (1984) Characterization of two hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops neuwiedi* (jararaca pintada). *Toxicon*. **22**, 193-206.
- MANDELBAUM, F.R., REICHL, A.P. and ASSAKURA, M.T. (1976) Some physical and biochemical characteristics of HF₂, one of the hemorrhagic factors in the venom of *Bothrops jararaca*. In: *Animal, plant and microbial toxins*. Vol.1, (Ohsaka A., Hayashi K. and Saway I., eds). pp 111-121. Plenum Press: London.
- MEBS, D., EHRENFELD, M. and SAMEJIMA, Y. (1983) Local necrotizing effect of snake venoms on skin and muscle: relationship to serum creatine-kinase. *Toxicon*. **21**, 393-404.
- MEBS, D. and OWNBY, C.L. (1990) Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. *Pharm. Ther.* **48**, 223-236.
- MELO, P.A., HOMSI-BRANDEBURGO, M.I., GIGLIO, J.R. and SUAREZ-KURTZ, G. (1993) Antagonism of the myotoxic effect of *Bothrops jararacussu* venom and bothropstoxin by polyanions. *Toxicon*. **31**, 285-291.

MELO, P.A. and SUAREZ-KURTZ, G. (1987) Interaction of *Bothrops* venoms and antivenin on the release of creatine kinase from skeletal muscle. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **20**, 821-824.

MELO, P.A. and SUAREZ-KURTZ, G. (1988) Release of sarcoplasmic enzymes from skeletal muscle by *Bothrops jararacussu* venom: antagonism by heparin and by the serum of South American marsupials. *Toxicon.* **26**, 87-95.

MÉNEZ, A. (1997) Functional architectures of toxic proteins: A clue for drug design ? 12th World Congress of the IST. México. Abstract. 42.

MIDDLEBROOK, J.L. and KAISER, I.I. (1989) Immunological relationships of phospholipase A₂ neurotoxins from snake venoms. *Toxicon.* **27**, 965-977.

MILANI, R., JORGE, M.T., FERRAZ DE CAMPOS, F.P., MARTINS, F.P., BOUSSO, A., CARDOSO, J.L.C., RIBEIRO, L.A., FAN, H.W., FRANÇA, F.O.S., SANO-MARTINS, I.S., CARDOSO, D., FERNANDEZ, I.C.O.F., FERNANDES, J.C., ALDRED, V.L., SANDOVAL, M.P., PUERTO, G., THEAKSTON, R.D.G. and WARRELL, D.A. (1997) Snake bites by the jararacuçu (*Bothrops jararacussu*): clinicopathological studies of 29 proven cases in São Paulo States, Brazil. *QJ Med.* **90**, 323-334.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL (1997) *Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos*. Brasília, D.F. (No prelo).

MOURA DA SILVA, A.M., DESMOND, H., LAING, G. and THEAKSTON, R.D.G. (1991) Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. *Toxicon.* **29**, 713-723.

MOURA DA SILVA, A.M., D'IMPÉRIO, M.R., NISHIKAWA, A.K., BRODSKYN, C.I., DOS SANTOS, M.C., FURTADO, M.F.D., DIAS DA SILVA, W. and MOTA, I. (1990) Antigenic cross-reactivity of venoms obtained from snakes of the genus *Bothrops*. *Toxicon.* **28**, 181-188.

NAHAS, L., KAMIGUTI, A.S. and BARROS, M.A.R. (1979) Thrombin-like and factor X activator components of *Bothrops* snake venoms. *Thromb. Haemost.* **41**, 314-328.

NOWAK, T.P., HAYWOOD, P.L. and BARONDES, S.H. (1976) Developmentally regulated lectin in embryonic chick muscles and a myogenic cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **68**, 650-657.

OVILGIE, M.L. and GARTNER, T.K. (1984) Identification of lectins in snake venoms. *J. Herpetol.* **18**, 285-290.

OVILGIE, M.L., DOCKTER, M.E. and GARTNER, T.K. (1986) Isolation and characterization of lactose-binding lectins from the venoms of the snakes *Lachesis muta* and *Dendroaspis jamesonii*. *J. Biochem. (Tokyo)*. **100**, 1425-1431.

OVILGIE, M.L., BYL, J.W. and GARTNER, T.K. (1989) Platelet aggregation is stimulated by lactose-inhibitable snake venom lectins. *Thromb. Haemos.* **62**, 704-707.

OHSAKA, A. (1979) Hemorrhagic, necrotizing and edema-forming effects of snake venoms. In: *Snake venoms Handbook of Experimental Pharmacology*. Vol. 52. (Lee CY, ed). pp. 480. Springer-Verlag:Berlin.

OWNBY, C.L., COLBERG, T. and SELISTRE, S.H. (1997) Phospholipase A2 toxins: Diversity in structure and function. 12th World Congress IST. México. Abstract. 46.

OZEKI, Y., MATSUI, T., HAMAKO, J., SUZUKI, M., FUJIMURA, Y., YOSHIDA, E., NISHIDA, S. and TITANI, K. (1994) C-type galactoside-binding lectin from *Bothrops jararaca* venom: Comparison of its structure and function with those of botrocetin. *Arch. Biochem. Biophys.* **308**, 306-310.

PRADO-FRANCESCHI J. (1970) - Estudo sobre a convulxina. Tese de mestrado, Instituto de Biologia, Unicamp, Campinas, São Paulo.

- QUEIROZ, L.S., SANTO-NETO, H., RODRIGUES-SIMIONI, L. and PRADO-FRANCESCHI, J. (1984) Muscle necrosis and regeneration after envenomation by *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon*. **22**, 339-346.
- RADOMSK, M.W. and MONCADA, S. (1983) An improved method for washing human platelets with prostacyclin. *Thromb. Res.* **30**, 383-387.
- RODRIGUES-SIMIONI, L., BORGESE, N. and CECCARELLI, B. (1983) The effects of *Bothrops jararacussu* venom and its components on the frog nerve-muscle preparations. *Neuroscience*. **10**, 475-489.
- RODRIGUES-SIMIONI, L., PRADO-FRANCESCHI, J., CINTRA, A.C.D., GIGLIO, J.R., JIANG, M.S. and FLETCHER, J.E. (1995) No role for enzymatic activity or dantrolene-sensitive Ca^{2+} stores in the muscular effects of bothrotoxin, a lys 49 phospholipase A_2 myotoxin. *Toxicon*. **33**, 1479-1480.
- ROSENFELD, G. (1971) Symptomatology, pathology and treatment of snakebites in South America. In: *Venomous animals and their venoms*. vol.2. (Bucherl, W., Buckley, E.E., and Deulofeu, V., eds.). pp. 345-384.. Academic Press: New York.
- SANCHEZ, E.F., FREITAS, T.V., FERREIRA-ALVES, D.L., VELARDE, D.T., DINIZ, M.R., CORDEIRO, M.N., AGOSTINI-COTTA, G. and DINIZ, C.R. (1992) Biological activities of venoms from South American snakes. *Toxicon*. **30**, 95-103.
- SELISTRE, H.S., QUEIROZ, L.S., CUNHA, O.A.B., DE-SOUZA, G.E. and GIGLIO, J.R. (1990) Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema-inducing toxins from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. *Toxicon*. **28**, 261-273.
- SHARON, S. and LIS, H. (1972) Lectins: cell-agglutinating sugar-specific proteins. *Science*. **177**, 949-959
- SILVA, M.A., SILVA, J.O., BUZIN, M.P., DONATO, J.L., PRADO-FRANCESCHI, J. and HYSLOP, S. (1997) Characterization of a lectin-like protein from the venom of *Bothrops*

jararacussu. XII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Caxambu, MG.

SJOSTROM, L., AL-ABDULLA, I.H., RAWAT, S., SMITH, D.C. and LANDON, J. (1994) A comparison of ovine and equine antivenoms. *Toxicon*. **32**, 427-433.

SLOTTA, K.H. and FRAENKEL-CONRAT, H. (1938) Estudos químicos sobre os venenos ofídicos. 4. Purificação e cristalização do veneno da cobra cascavel. *Mem. Inst. Butantan*. **12**, 505-512.

SVASTI, J. and PANIJAN, B. (1977) SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis: a simple explanation of why it works. *J. Chem. Educ.* **54**, 560-562.

VIDAL, J.C., MOLINA, H. and STOPANNI, A.O.M. (1972) A general procedure for the isolation and purification of phospholipase A isoenzymes from *Bothrops* venoms. *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.* **22**, 91-109.

WEINSTEIN, S.A. and SMITH, L.A. (1990) Preliminary fractionation of tiger rattlesnake (*Crotalus tigris*) venom. *Toxicon*. **28**, 1447-1455.

ZAGANELLI, G.L., ZAGANELLI, M.G.M., MAGALHAES, A., DINIZ, C.R. and LIMA, M.E. (1996) Purification and characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from the venom of jararacuçu (*Bothrops jararacussu*). *Toxicon*. **34**, 807-819.