

Toxicidade Comparada entre Peçonhas de Ofídios do Gênero *Bothrops* * Endêmicas das Regiões Sul e Sudeste do Brasil (*Serpentes, viperidae)

TERRA, Angelo Laurence Covatti, Mestre, Professor adjunto do curso de Medicina Veterinária CEULJI/ULBRA, Avenida Universitária, 762, bairro Aurélio Bernardi, CEP: 78961-970, Ji-Paraná- RO, Brasil. Fone/Fax: (69) 3416-3100 ramal: 3182. E-mail: angelolct@terra.com.br

As amostras de peçonha em forma de “pool”, extraídas de *B. alternatus*, *B. jararaca* foram submetidas à análise bioquímica. As amostras regionais, exclusivamente do Rio Grande do Sul, foram compostas de peçonhas, coletadas de diversas regiões do estado. Nas amostras do “pool” nacional peçonhas provenientes de São Paulo, Espírito Santo, Minas Gerais e Paraná. Neste trabalho, o objetivo foi determinar a Dose Letal Média (DL50 IP aguda), em camundongos (*Mus domesticus domesticus* Ruddy, 1772 (Muridae), ação proteolítica da caseína, ação enzimática fosfolipásica, efeito coagulatório sobre o plasma humano, perfil eletroforético e mensuração das bandas protéicas. Eletroforéticamente comparadas, apresentaram particularidades as amostras regionais, como a composição protéica da peçonha compartilhando miotoxinas fosfolipásicas com 14 KDa (KiloDalton), que são pouco presentes nas amostras do “pool” nacional, sugerindo ser esta maior concentração a responsável pela ação mais intensa do “pool” regional para estas peçonhas. Entretanto, presentes em todas as amostras observam-se outras proteínas com tamanhos compatíveis com as fosfolipases com atividade miotóxicas com peso molecular diferente (16KDa). Constatou-se maior atividade fosfolipásica e teor protéico nas amostras regionais. Quando comparado com o “pool” nacional, o “pool” regional teve diferenças nas atividades proteolítica e coagulante no plasma. Estes resultados sugerem ações regionais específicas para cada peçonha.

Palavras-chaves: *Bothrops alternatus*, *B. jararaca*, análise de peçonha, pool de antígenos, atividade de venenos.

ABSTRACT

Compared Toxicity among Snake Poisons of the Genus *Bothrops Endemic of the South and Southeast Regions of Brazil (*Serpents, Viperidae)**

The poison samples as pool, extracted from the *B. alternatus*, *B. jararaca* were submitted to biochemical analyses. The regional samples, especially from Rio Grande do Sul, were made of poison, gathered from several regions of the state. In the national samples, poison from São Paulo, Espírito Santo and Paraná. In this paper, the goal was to stipulate the Average Lethal Dose (LD50 IP acute) in mice (*Mus domesticus domesticus* Ruddy, 1772 (Muridae), proteolytic activity on casein, phospholipasic enzyme activity, coagulant effect on human plasma, electrophoretic patterns and measurement of protein bands. If compared electrophoretically, the regional samples present particularities as venom protein composition sharing phospholipasic miotoxins, with 14 KDa (Kilo Dalton), which are not present in the national pool, suggesting that this larger concentration is the responsible for the more intense action of the pool regional for these venoms. However, present in all the samples, were observed other proteins with compatible sizes with phospholipases with miotoxic activities with different molecular weight (16 KDa).

The biggest phospholipasic activity and protein quantity were verified in the regional samples. When compared with the national pool, the regional pool presented some differences in the proteolytic and coagulant activities in the plasma. These results suggest specific regional actions for each poison.

Key words: *Bothrops alternatus*, *B. jararaca*, venom analysis, antigen pools, venom activities.

INTRODUÇÃO

Segundo Furtado e Rocha (2007) no “pool” utilizado para imunizar os cavalos no Instituto Butantan, para obtenção de antiveneno botrópico, não estão presentes amostras de peçonhas coletados de animais oriundos do Rio Grande do Sul. Sugere-se então uma análise para reconhecer ações específicas destas peçonhas regionais do Rio Grande do Sul. Caracterizando as particularidades de cada peçonha, seria possível entender melhor a diferenciação e a evolução das espécies de *Bothrops*. Com base na análise biomolecular no DNA mitocondrial Grazziotin (2004), encontrou diferenças nas características dos genomas de exemplares procedentes de diferentes regiões do Brasil sugerindo divergências e diferenciação entre os exemplares de *B. jararaca*.

Ações regionalizadas das peçonhas podem ser observadas, por exemplo, no maior o caráter agudo de ação da peçonha de *B. insularis* em relação às serpentes do mesmo gênero encontradas no continente conforme afirma Souza (2007). Sua alimentação é exclusivamente de aves aquáticas, pois, este animal é endêmico da Ilha da Queimada Grande (São Paulo). Estas aves morrem antes de poder alçar vôo, pois, se morressem depois sobrevoando o oceano, seria inútil a investida em busca do alimento feita pelo ofídio (SOUZA, 2007).

Através dos experimentos realizados neste trabalho, foram mostradas as particularidades bioquímicas de cada peçonha o que ajudará a compreender melhor a diferença existente entre as espécies provenientes de regiões fisiográficas distintas.

MATERIAL E MÉTODOS

Peçonha de *Bothrops jararaca* e *Bothrops alternatus*. No “pool” RS foram secas a vácuo e procedentes de vários locais do Rio Grande do Sul. No “pool” BR, foram liofilizadas e coletadas de espécimes equivalentes dos estados de São Paulo, Paraná, Minas Gerais e Espírito Santo, cedidas pelo Instituto Butantan, São Paulo.

Para a avaliação da DL50 IP aguda, foram utilizados 120 exemplares de camundongos fornecidos pelo biotério da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), Porto Alegre. A autorização do comitê de ética da PUCRS: 934/05-CEP.

Com o objetivo de separar por tamanho as proteínas, cada amostra de peçonha (20 µl) foi colocada no gel de acrilamida, seguindo o método de Laemmli (1970). Para comparação utilizou-se o padrão de peso molecular (Pharmacia) que usa proteínas de 30 KDa a 94 KDa.. A quantificação das proteínas presentes nas amostras, seguiu os mesmos protocolos sugerido por Furtado e Rocha (2007). Para este experimento, cada amostra foi feita em duplicata (n=2) e a cada amostra de 1ml de peçonha O valor para leitura no espectrofotômetro foi de 660 nm. Os valores da dosagem de proteína foram obtidos por regressão linear do resultado médio (n=2) da leitura sobre a concentração de veneno e calculados em escala logarítmica.

Seguiu-se o método de Holzer e Mackessey (1996) para comparar quantitativamente a ação das fosfolipases presentes nas amostras. As amostras foram feitas em triplicata, sendo que a leitura no espectrofotômetro foi feita a 425 nm. A atividade foi expressa pela média (n=3) das leituras multiplicada pela constante (25,8) e dividida pela concentração da peçonha (0,3 mg/ml) para cada amostra de peçonha.

Conforme Lomonte e Gutiérrez (1983), usou-se, para cada 1 ml de cada amostra de peçonha, na concentração de 100 µg/ml sendo adicionado 1 ml de um substrato composto de uma solução de caseína 1%. Amostras em triplicata (n=3) foram incubadas por 30 minutos a 37°C. Seguiu-se centrifugando as amostras com as absorbâncias dos sobrenadantes lidas no espectrofotômetro a 280 nm.

Para determinar dose mínima coagulante no plasma (DMC-P), capaz de coagular em 60 seg, a 37°C, uma solução padronizada de plasma humano citratado, Theakston e Reid (1983) e Rocha e Furtado (2005) sugerem usar 1mg de peçonha seca diluído em 1ml de solução salina a 0,85%.São feitas 6 diluições seriadas (n=6) até chegar a 1:64 de concentração da solução original. Utilizou-se fibrômetro (Fibro System TM - modelo 5 marca BBL). Os valores da DMC-P foram obtidos por regressão linear do tempo de coagulação sobre a quantidade de veneno e calculados em escala logarítmica.

Seguindo o mesmo protocolo que Furtado e Rocha (2007), inocularam-se grupos de sete camundongos (n=7) por amostra de peçonha. Utilizaram-se doses crescentes de peçonha diluída em solução salina a 0,85%. Os animais foram observados por 24 e 48h, e contaram-se quantos animais morreram por grupo. Esta metodologia reduziu o número de animais que foram utilizados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise eletroforética

Na eletroforese, resultados variados, tendo na zona (Z1) forte presença de proteínas com mesmo tamanho que as proteínas hemorrágicas (Bothropasin e Alternagin, com 55 KDa) no “pool” nacional e em *B. alternatus* do RS, e fraca em *B. jararaca*, sugerindo diferenciação na peçonha. Rocha e Furtado (2005) citam que as enzimas inibidoras das serioproteinases da cascata de coagulação e proteolíticas tais como Botrocetin, Bothrojaracin, e Brothronbin tem 28 KDa, sendo que na zona (Z2),observou-se bandas fortes em *B. jararaca* de ambos os “pools” e pouco presente em *B.alternatus* de ambas as regiões sugerindo esta ação ser intra-específica para *B. jararaca*. Nesta zona também foram encontradas proteínas com tamanho compatível com Bothroalternin que é um inibidor protéico de trombina com 27 KDa, (ROCHA e FURTADO, 2005), mostrou bandas fortes em todas as amostras, sugerindo esta ação ser ainda compartilhada por ambas as espécies de *Bothrops* em várias regiões do país.

Na zona intermediária (Z Int.), foram encontradas proteínas com tamanho semelhante ao das fosfolipases com atividades miotóxicas (FURTADO e ROCHA, 2007), pois foram observadas bandas fortes nas amostras de *B.alternatus* de ambos os “pools” e fracas em ambas as amostras de *B. jararaca*, sugerindo esta ação intra-específica para *B. alternatus* em todas as regiões. Na última zona (Z4), onde foram encontradas proteínas com tamanho compatível com as fosfolipases de ação miotóxica (NISENBON et al, 1989), foram observadas bandas fortes em todas as amostras, mostrando que há o compartilhamento destas enzimas em ambas as espécies de todos os “pools”. Conforme figura 1.

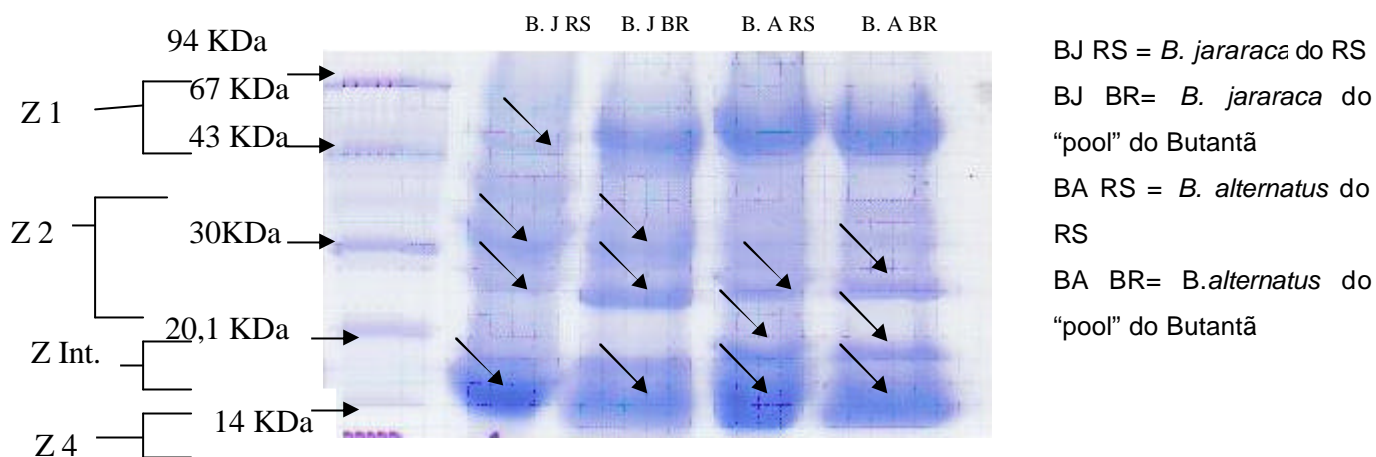


Figura 1: Perfil eletroforético mostrando as bandas presentes em cada zona do gel, dividido por pesos moleculares determinados. As setas indicam onde se localizam as bandas dentro de cada zona.

Análise quantitativa das proteínas

Verificaram-se valores mais altos na quantificação das proteínas presentes nas peçonhas do “pool” regional. Obtiveram-se valores de 200,5 µg para *B. jararaca* RS e 177,15 µg para *B. jararaca* BR ($P= 0,443$, teste t Student). Já para *B. alternatus* RS obteve-se 162,55 µg e para *B. alternatus* BR 136,43µg de proteína ($P= 0,410445$, teste t Student). Apesar de ter valores mais altos para o “pool” regional em ambas as espécies de *Bothrops*, estatisticamente não se obteve significativa diferença. (Tabela 1). Sugere-se que as ações das peçonhas “in vivo” são causadas pelas combinações entre as proteínas e não apenas pela proporção de quantidade entre elas.

Tabela 1: Expressa diretamente a relação entre os anéis aromáticos da albumina sérica bovina (BSA) usada para calibração da curva padrão de análise com 100 µg (padrão BSA) e a quantidade de anéis aromáticos presentes nas peçonhas.

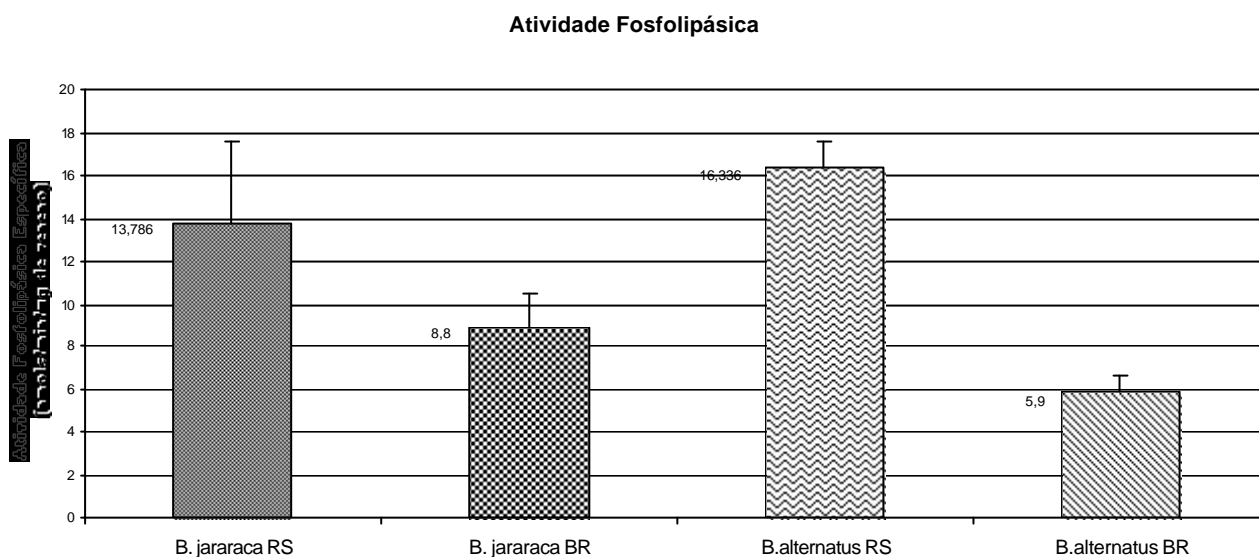
(BR - amostra nacional; RS - amostra regional)

Espécie	Dosagem de Proteína	Desvio
<i>Bothrops jararaca</i> RS	200,05 µg	74,45
<i>Bothrops jararaca</i> BR	177,15 µg	66,3
<i>Bothrops alternatus</i> RS	162,55 µg	22,15
<i>Bothrops alternatus</i> BR	136,43 µg	5,62

B. jararaca ($p= 0,443$) e *B. alternatus* ($p= 0,41044$)

Atividade Enzimática da Fosfolipase A2 específica:

Foi observada nas amostras regionais ação entre 13,786 e 16,336 nmol/min/mg de veneno, enquanto que nas amostras do "pool" nacional as ações ficaram entre 5,9 e 8,8 nmol/min/mg, Para *B. jararaca* há uma tendência de superioridade do "pool" regional em relação ao nacional, mas sem atingir significância estatística ($P = 0,055$, teste t Student). Já em *B. alternatus* há uma significativa superioridade do "pool" regional em relação ao nacional, ($P = 0,0095$, teste t Student). Figura 2. Sugere-se então, maior atividade fosfolipásica nas peçonhas regionais de *B. alternatus*.



B. jararaca ($p= 0,054958$) e *B. alternatus* ($p= 0,009487$)

Figura 2: Quantidade de substrato formado pela interação da enzima PLA2 com o substrato cromatogênico fornecido, foi expressa em nmol/min/mg de peçonha.

Atividade proteolítica sobre a caseína:

As amostras regionais precisaram de mais unidades de veneno para degradar a 1 mg de caseína durante o ensaio (Tabela 2), tanto quando comparadas entre as espécies quando entre regiões, com as do "pool" nacional. Para *B. jararaca* observou-se uma tendência de superioridade do "pool" regional em relação ao nacional, mas sem atingir significância estatística ($P = 0,0588$, teste t Student). Já em *B. alternatus* há uma significativa superioridade do "pool" regional em relação ao nacional, ($P = 0,011853$, teste t Student). (Tabela 2). Sugere-se que as enzimas proteolíticas das peçonhas regionais são mais ativas que as do "pool" nacional para ambas as *Bothrops* sendo intensamente mais ativas em *B. alternatus*.

Tabela 2: Relação entre a quantidade de unidades de peçonha (U) em cada amostra necessária para degradar 01 mg de caseína, presente na solução usada no ensaio.

(BR - amostra nacional; RS - amostra regional)

Espécie	Atividade caseínolítica	Desvio
<i>B. jararaca</i> RS	128,7 u/mg	3,3201
<i>B. jararaca</i> BR	119,8 u/mg	2,8160
<i>B. alternatus</i> RS	59,1 u/mg	3,0501
<i>B. alternatus</i> BR	38,9 u/mg	2,5482

B. jararaca (p= 0,05688) e *B. alternatus* (p= 0,011853)

Atividade de coagulação sobre o plasma humano:

Observou-se que as amostras regionais precisaram de maior quantidade de peçonha seca para coagular uma solução padronizada de plasma humano citratado, quando comparadas entre as espécies e entre as regiões, com as do “pool” nacional. Sugere-se então, que as amostras regionais têm menor atividade coagulante sobre o plasma humano citratado quando comparadas às do “pool” nacional. (Tabela 3)

Tabela 3: Quantidade de peçonha seca ou liofilizada/litro necessário para coagular 01 litro de solução teste, em 60 seg, a 37°C, para cada amostra que compões os “pools”.

(BR - amostra nacional; RS - amostra regional)

Espécie	Atividade Coagulante no Plasma
<i>B. jararaca</i> RS	19,3 mg/litro
<i>B. jararaca</i> BR	12,06 mg/litro
<i>B. alternatus</i> RS	37,5 mg/litro
<i>B. alternatus</i> BR	17,6 mg/litro

Determinação da DL50:

Observamos DL50 muito próximas, entre as espécies. A amostra de *B. alternatus* BR foi a mais alta (85,49 µg/camundongo) sugerindo tendência à superioridade de letalidade desta peçonha em relação às demais testadas neste ensaio. (Tabela 4) Sugere-se então, que a letalidade das peçonhas não foi significativa para diferenciar o grau de toxicidade entre as amostras.

Tabela 4: Dose mínima em µg de peçonha necessária para matar 50% da população de *M. domesticus domesticus* para cada amostra inoculada no ensaio.

(BR - amostra nacional; RS - amostra regional)

Espécie	Letalidade (DL 50)	Limite Superior	
		de Confiança 95%	Limite inferior de confiança 95%
<i>B. jararaca</i> RS	52, 40µg	66, 28	41, 42
<i>B. jararaca</i> BR	50, 84 µg	59, 38	43, 54
<i>B. alternatus</i> RS	68, 38µg	80, 39	58, 17
<i>B. alternatus</i> BR	85, 49 µg	103, 52	70, 61

CONCLUSÕES

As sugere-se que as diferenças observadas na composição química e a ação obtida “in vitro” são os fatores responsáveis pelas ações diferentes no caso de um acidente real.

Quando os dados foram comparados, concluiu-se que, apesar de compartilharem algumas ações, os venenos de *B. jararaca* e *B. alternatus* tem particularidades nas suas composições, pois se observam ações “in vitro” distintas. Isso implicaria em manifestações clínicas diferenciadas (quanto ao grau de danos ao organismo no caso de acidente) para cada espécie dentro das regiões testadas.

O alto custo de uma produção regional, a dificuldade de obter todas amostras pela grande extensão territorial, pela impossibilidade de envio dos animais e/ ou venenos aos órgãos que fazem os antivenenos, contamos unicamente com a soroneutralização cruzada que é obtida pela maioria dos “pools” de venenos botrópicos, agindo com eficácias diferentes, porém vitais no tratamento de acidentes com estes animais nas diversas regiões do país.

O ideal proposto neste trabalho seria que fossem incluídas amostras de peçonhas de animais de toda a área de ocorrência das espécies.

É sugerido ainda como forma complementar outros testes tais como: a cromatografia de troca iônica e a quantificação dos níveis séricos da enzima creatinaquinase (CK) para uma melhor caracterização das peçonhas do gênero *Bothrops*.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos aos pesquisadores do Instituto Butantã a Dra. Maria de Fátima Domingos Furtado e MSc. Marisa Maria Teixeira da Rocha; ao mestrando André Zelanis. Também agradecimentos à Moema Leitão de Araújo (NOPA-RS). A todos do Laboratório de Herpetologia da PUCRS, Prof. Dr. Thales de Lema; ao Prof. Dr. Marcos Di Bernardo (in memoriam), MSc. Márcia Ferret Renner. A toda equipe do Instituto de Toxicologia da PUCRS, Profa. Dra. Flávia Valadão Thiesen, pelo uso dos laboratórios; a Fernando Sagebin, responsável pelos laboratórios do Instituto antes citado. A CAPES pela bolsa que possibilitou que eu continuasse cursando o mestrado onde realizei estes experimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1-FURTADO M F, ROCHA M M T. Análise das atividades biológicas dos venenos de *Philodryas olfersii* (Lichtenstein) e *P. patagoniensis* (Girard) (Serpentes, Colubridae) Revista Brasileira de Zoologia 24 (2): 410–418, junho 2007
- 2-GRAZZIOTIN F G. Estudo filogeográfico de *B. jararaca* (Wied, 1824) baseado no DNA mitocondrial (Squamata: Serpentes: Viperidae). Dissertação. (Mestrado em Zoologia)-Instituto de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.
- 3-HOLZER M, MACKESSEY S P. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A2. *Toxicon*, v. 34, n. 10, p. 1149-1155, 1996.
- 4-LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, London, v. 227, p. 680-685, 1970.
- 5-LOMONTE B, GUTIÉRREZ J M. La actividad proteolítica de los venenos de serpientes de Costa Rica sobre la caseína. *Rev. Biol. Tropical*. V. 31, n.1, p. 37-40, 1983.
- 6-NISENBOM H E, PERAZZO J C, MONSERRAT AJ & VIDAL J C. Contribution of Phospholipase A2 to the lethal potency of *Bothrops alternatus* (víbora de la cruz) venom. *Toxicon*, London, 24(8): 807-817, 1989.
- 7-ROCHA M M T, FURTADO M F. Caracterização individual do veneno de *Bothrops alternatus* Duméril, Bibron & Duméril em função da distribuição geográfica no Brasil. *Rev. Bras. de Zoologia*, v. 22, n. 2, p. 383-393, jun., 2005.
- 8-SOUZA R C G. A Rare Accident. *Bull. Chicago Herp. Soc.* 42(10):161-163, 2007
- 9-THEAKSTON R D G, REID H A. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 61, n. 6, p. 949-956, 1983.