

ESTUDO ELETROFORÉTICO EM "CELLOGEL" DE VENENOS DO GÊNERO *BOTHROPS*

MEDARDO SILES VILLARROEL *

RAYMUNDO ROLIM ROSA **

REYNALDO SCHWINDT FURLANETTO ***

FLÁVIO ZELANTE *

RESUMO — Os autores, realizando a eletroforese de seis venenos de serpentes do gênero *Bothrops* Wagler, 1824, sobre membrana de "Cellogel" verificaram que a metodologia aplicada propicia uma melhor separação dos componentes desses venenos em menor tempo

de exposição do que as técnicas anteriormente utilizadas.

UNITERMOS — Eletroforese de venenos ofídicos sobre "cellogel"; eletroforese de venenos botrópicos.

INTRODUÇÃO

O estudo do ofidismo, entre nós, a partir dos trabalhos pioneiros de Brazil & Pestana (1909) vem merecendo, gradativamente, maiores atenções. Dentre as serpentes venenosas do Brasil, o gênero *Bothrops* é aquele responsável pelo maior número de acidentes. Rosenfeld (1969), atribui-lhe a responsabilidade de 90,8% do total dos acidentes ofídicos.

Tais observações contribuíram para despertar os nossos interesses para o estudo dos venenos botrópicos, principalmente em seus aspectos imunoquímicos. Tentativas a este respeito já têm sido realizadas, quer com a utilização de processos químicos, quer com a utilização de processos eletroforéticos.

Koenig (1937) demonstrara a possibilidade da separação eletroforética do veneno de *B. jararaca*. Seguiram-se os trabalhos de Polson et al (1946), Gonçalves & Polson (1947), Gonçalves (1948), Gonçalves & Vieira (1950). Esses autores utilizaram-se de papel de filtro, como suporte para a corrida eletroforética. Gonçalves S. Vieira (1950) loc. cit. obtiveram através desta técnica nove frações no veneno de *B. jararacussu*, quatro frações no veneno de *B. jararaca* e sete frações no veneno de *B. atrox*.

A partir dessa época, melhores técnicas de eletroforese foram introduzidas tais como a eletroforese em "Acetato da Celulose" (Afonso, 1961; Bartlett, 1963; Ritts, Jr. & Ondrick 1964) e, mais recentemente as técnicas que utilizam, como

* Professor Assistente Doutor do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P.

** Diretor do Serviço de Imunologia do Instituto Butantan e Professor Assistente Doutor do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P.

*** Professor Catedrático do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P.

suporte, membranas de "Cellogel" Paget & Coustenoble, 1965-1966; Colfs & Verheyden, 1967).

Decidimos pois utilizar membranas de "Cellogel" como suporte, para a corrida eletroforética de venenos de seis espécies de serpentes do Gênero *Bothrops* (*B. jararaca*, *B. alternatus*, *B. insularis*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. cotiara*), procurando revelar se esta técnica poderia oferecer maiores vantagens comparando os resultados obtidos com aqueles encontrados pelos autores anteriormente citados.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do presente trabalho, utilizamo-nos dos mesmos materiais e métodos descritos por Siles Villarroel (1972).

Venenos ofídicos:

Os venenos ofídicos utilizados, fornecidos pelo Instituto Butantan, foram obtidos por extração manual de numerosas serpentes adultas, cristalizados por secagem a vácuo e mantidos a 0-4°C. Utilizamo-nos de venenos das seguintes espécies: *B. jararaca* (Wied, 1824), *B. alternatus* Duméril, Bibron et Duméril, 1854, *B. insularis* Amaral 1921), *B. jararacussu* Lacerda, 1884, *B. moojeni* Hoge, 1965* e *B. cotiara* (Gomes, 1913).

De cada veneno cristalizado, foram preparadas soluções a 0,5%, 1%, 2% e 4%, em solução fisiológica (NaCl a 0,85%) e distribuídas em frascos contendo 2 ml de cada solução, hermeticamente fechados e mantidos a temperatura de -25°C (Furlanetto, 1965). No momento do uso, as soluções eram descongeladas e os excedentes desprezados.

Materiais e aparelhos utilizados:

- a) retificador de corrente, munido de miliamperímetro e voltímetro, regulável de 0 a 250 mA e de 0 a 1000 volts;
- b) cuba equipada com suporte, para eletroforese sobre "Cellogel", marca Chemetron;
- c) aplicador, com capacidade de 0,003 ml, marca Chemetron;
- d) tiras de "Cellogel", de 25 x 140 mm, marca Chemetron;
- e) solução tampão com pH 8,8 e força iônica 0,06;
- f) solução corante de amido Schwartz a 0,5%;

* A *Bothrops moojeni* Hoge, 1965, era, até essa data, classificada como *Bothrops atrox* (Linnaeus, 1758).

- g) solução descorante a base de metanol e ácido acético;
- h) desidratante metanol puro;
- i) solução de transparentização a base de metanol, ácido acético e glicerina.

Modelo experimental:

Realizamos numerosas provas preliminares a fim de determinar as melhores condições de contração das soluções dos venenos e de tempo de exposição, com a finalidade de obter uma melhor separação das várias frações constituintes dos venenos botrópicos. Conseguimos assim estabelecer as seguintes condições que oferecem melhores resultados:

- a) 4% de concentração das soluções de veneno;
- b) corrida eletroforética por 90 minutos e a 200 volts.

Após a eletroforese de cada veneno, nas condições expostas, procedíamos a coloração das tiras e em seguida, a decomposição das frações em Registrador de Extinção tipo II Zeiss, obtendo-se os respectivos eletroferogramas.

RESULTADOS

Com a utilização das condições de experimentação por nós padronizadas, obtivemos os resultados que são representados pelo número de frações eletroforéticas de cada veneno. A tabela I, apresenta os dados obtidos.

Tabela I

Comportamento eletroforético sobre "Cellogel"
dos seis venenos do gênero Bothrops, em solução
a 4%

Espécie de veneno	Número de frações
<i>B. jararaca</i>	15
<i>B. alternatus</i>	11
<i>B. insularis</i>	13
<i>B. jararacussu</i>	9
<i>B. moojeni</i>	9
<i>B. cotiara</i>	10

As tiras de cellogel, submetidas ao Registrador de Extinção possibilitaram os eletroferogramas que ilustram as figuras de 1 a 6.

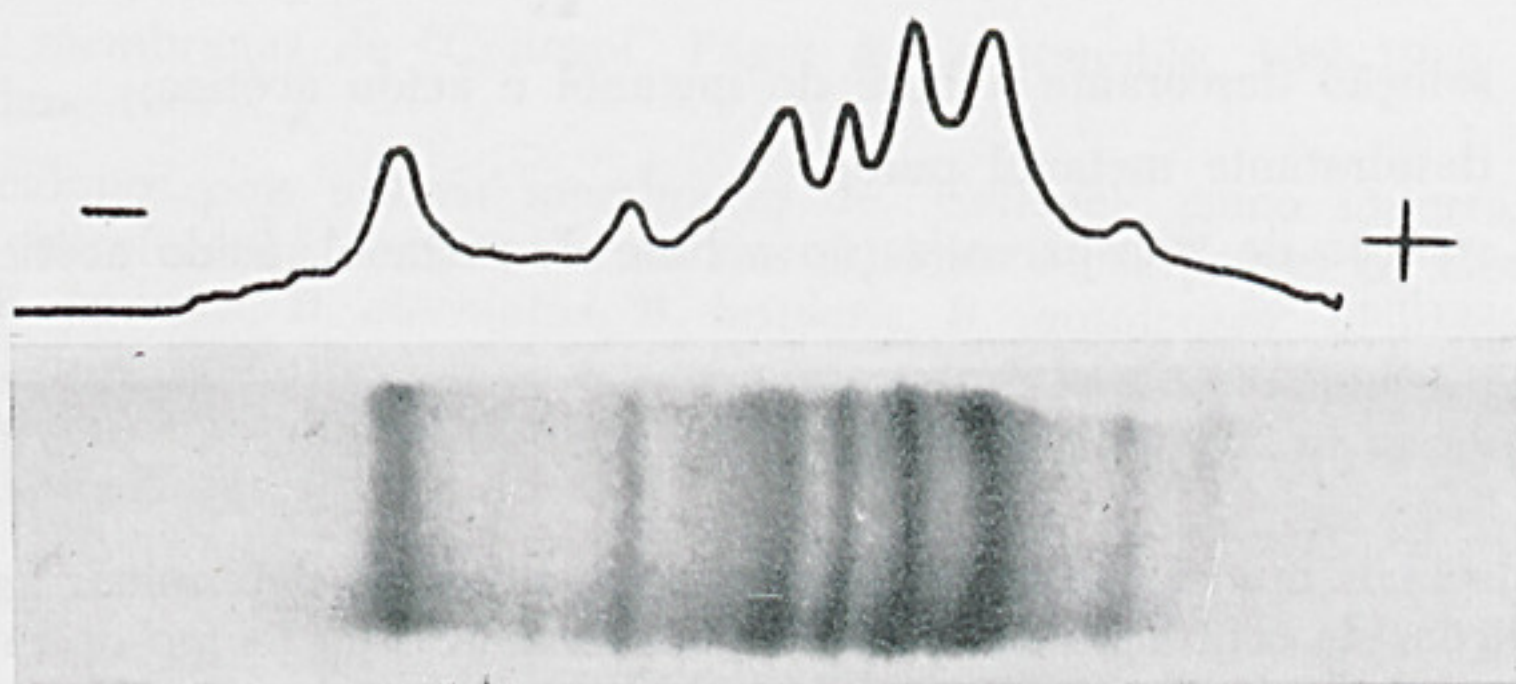


Fig. 1 — Comportamento eletroforético sobre “cellogel” do veneno de *B. jararaca*, em solução a 4%.

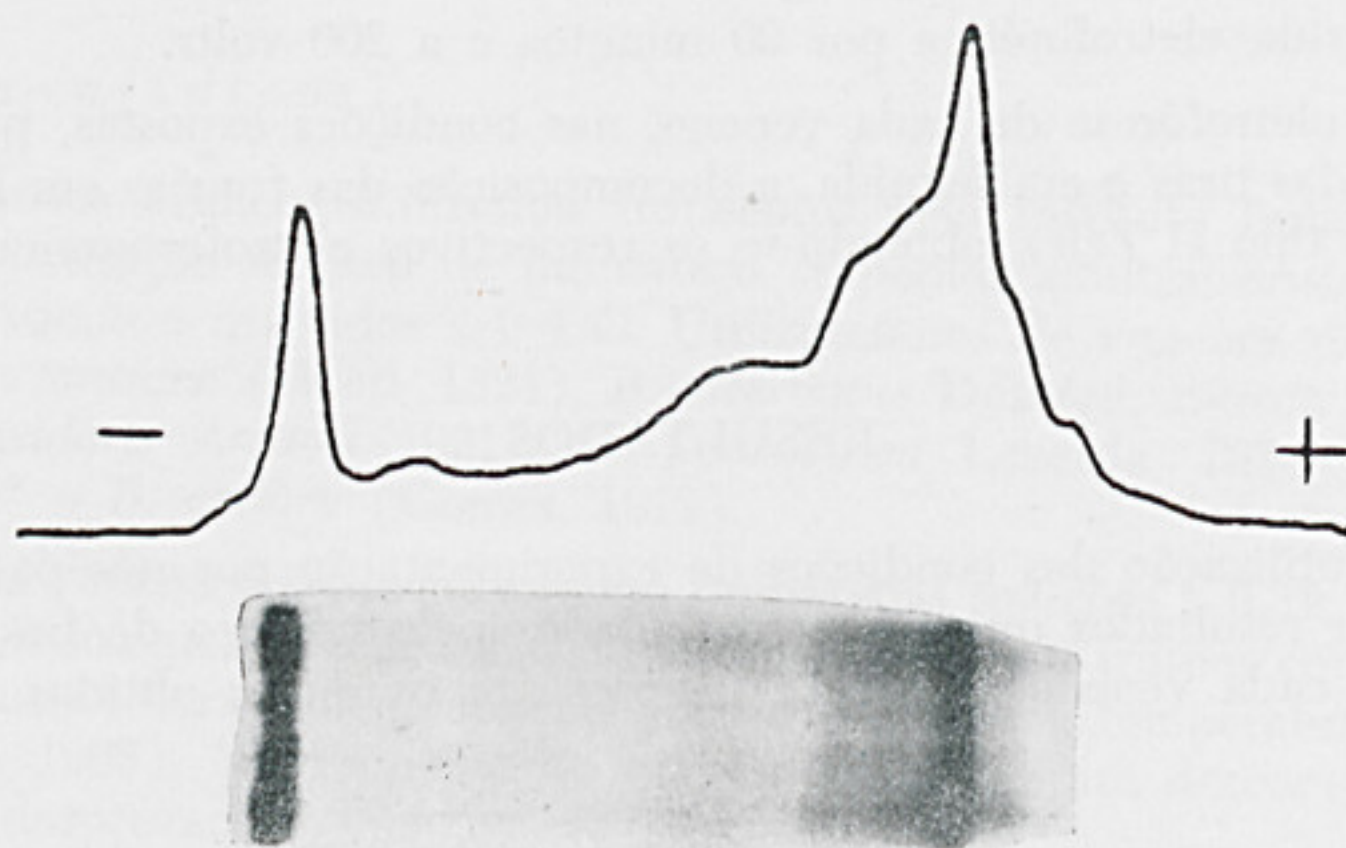


Fig. 2 — Comportamento eletroforético sobre “cellogel” do veneno de *B. alternatus*, em solução a 4%.

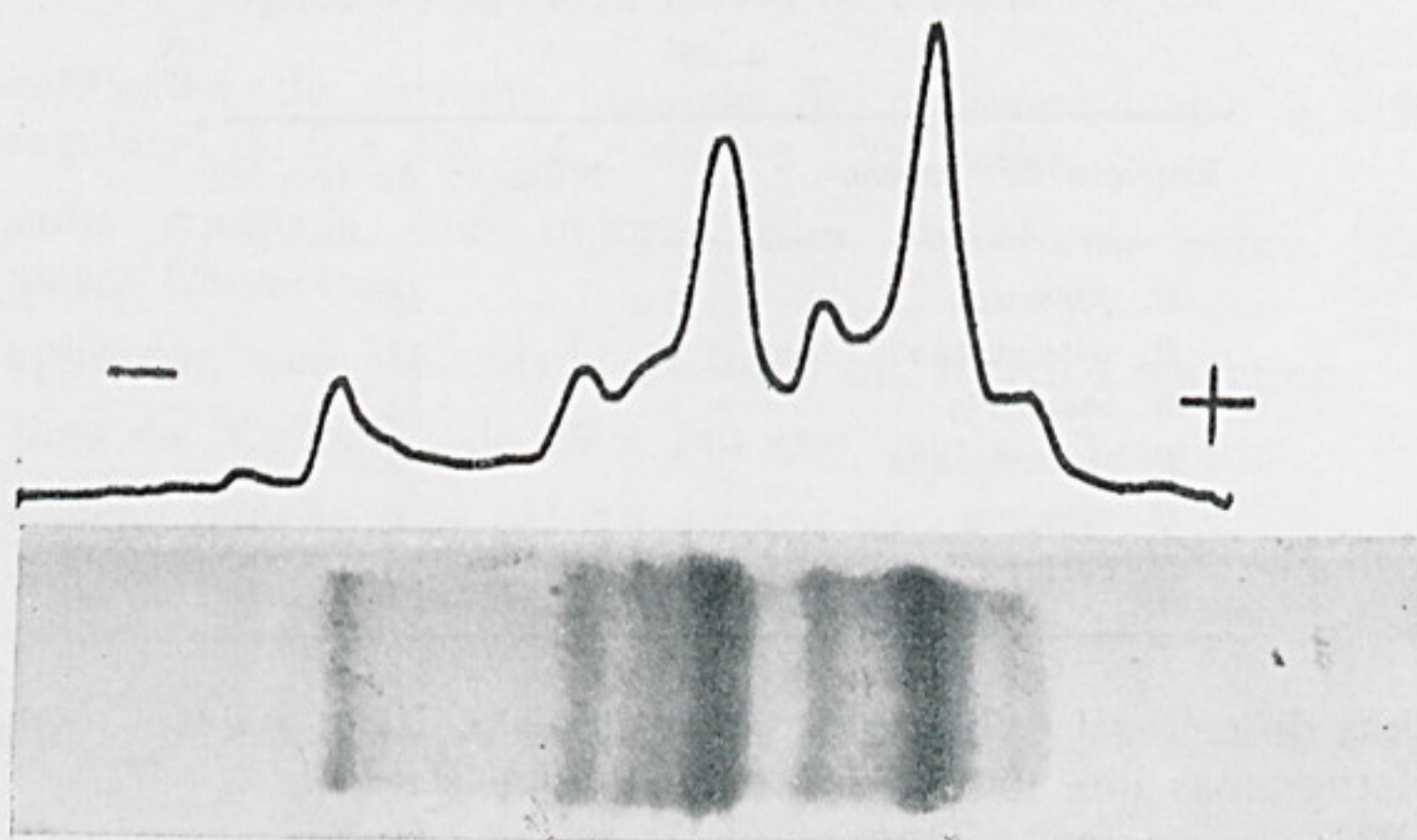


Fig. 3 — Comportamento eletroforético sobre “cellogel” do veneno de *B. insularis*, em solução a 4%.

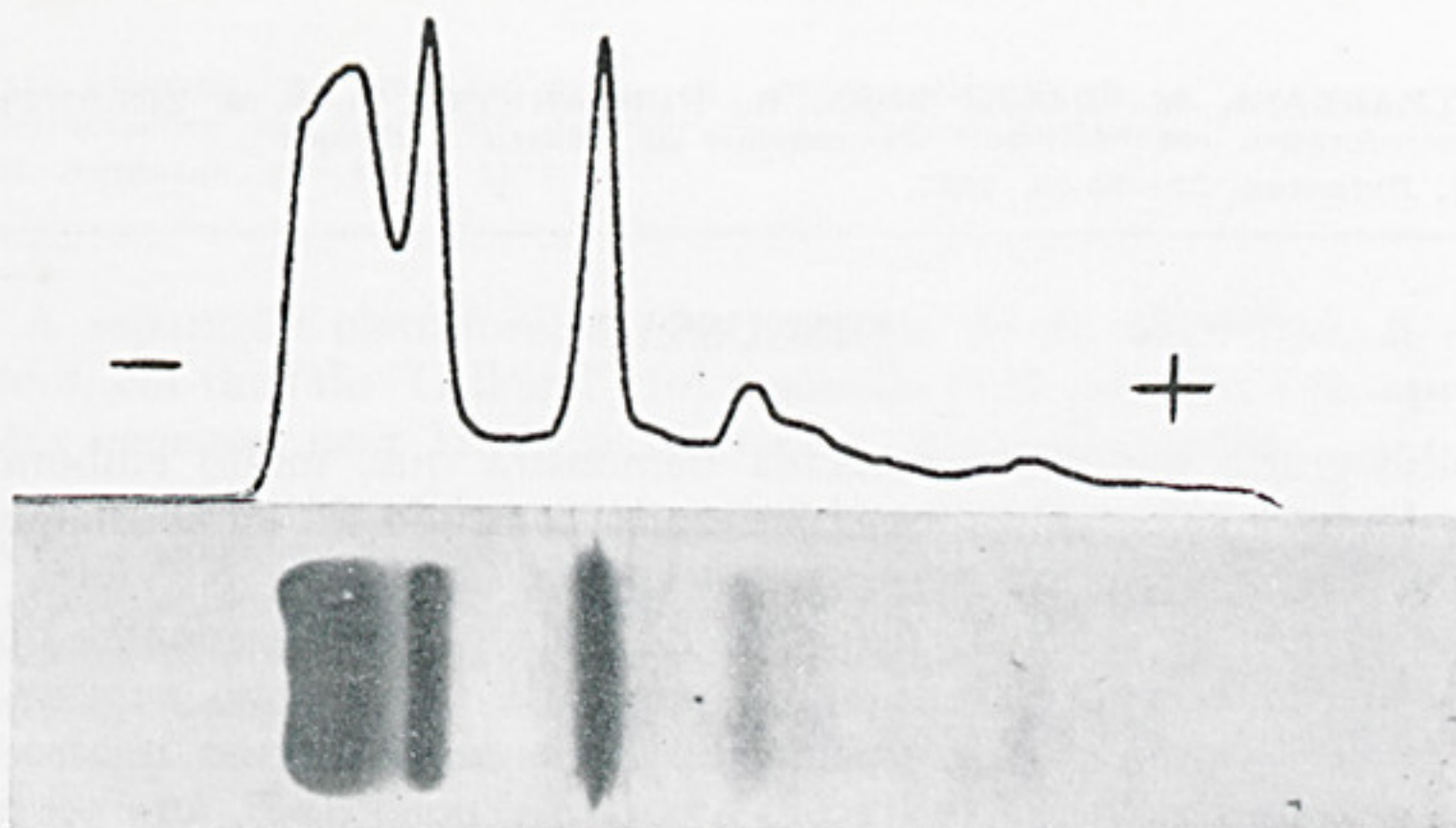


Fig. 4 — Comportamento eletroforético sobre “cellogel” do veneno de *B. jararacussu*, em solução a 4%.

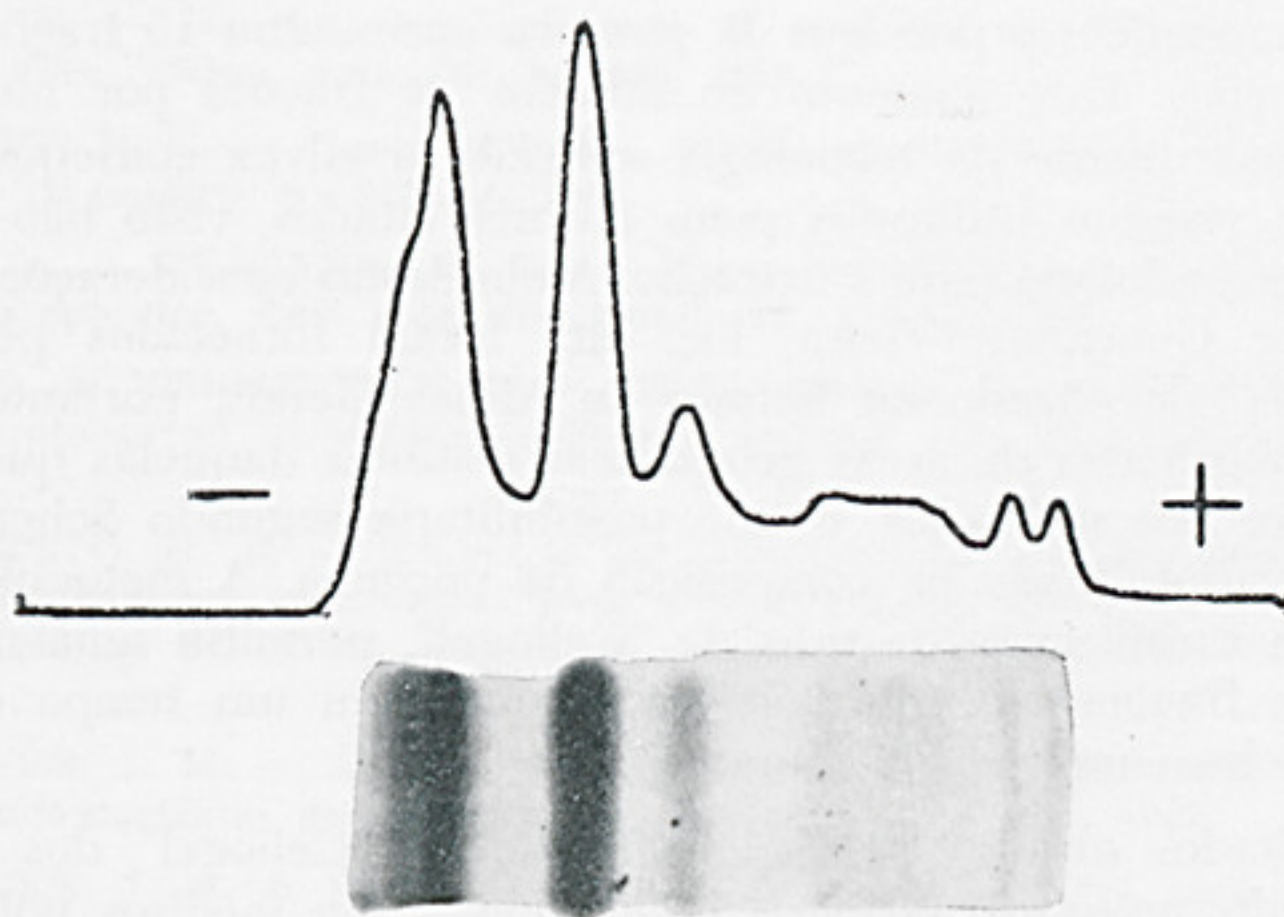


Fig. 5 — Comportamento eletroforético sobre “cellogel” do veneno de *B. moojeni*, em solução a 4%.

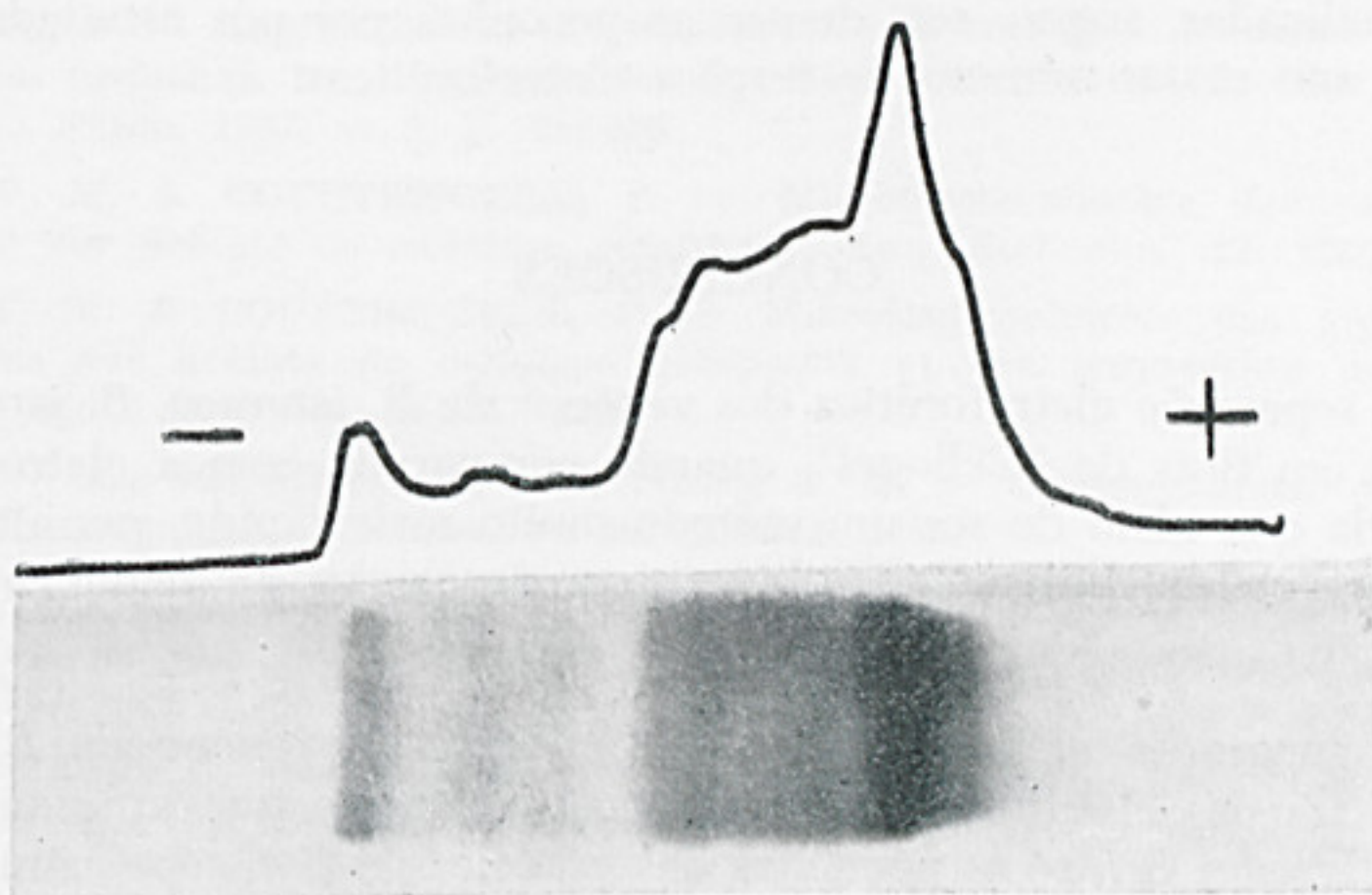


Fig. 6 — Comportamento eletroforético sobre “cellogel” do veneno de *B. cotiara*, em solução a 4%.

DISCUSSÃO

A bibliografia por nós consultada demonstra que, muito embora alguns trabalhos tenham sido realizados objetivando o estudo do comportamento eletroforético dos venenos de serpentes, somente Gonçalves & Vieira (1950), estudaram alguns aspectos de tres venenos botrópicos procedentes do Brasil; todavia, estes autores utilizando-se de papel de filtro como suporte para a eletroforese, obtiveram para o veneno de *B. jararaca*, apenas quatro frações; para o veneno de *B. atrox*, sete frações e para o veneno de *B. jararacussu*, nove frações. Os nossos resultados, foram concordes somente no que se refere ao veneno de *B. jararacussu*, pois também determinamos a existência de nove frações; para os outros dois venenos, determinamos a presença de maior número de componentes pois que *B. jararaca* apresentou 15 frações e *B. moojeni* nove frações. Este aumento do número de frações por nós encontrado parece ser consequente da tecnologia aplicada e talvez consequente também a origem dos venenos utilizados pelos autores citados, visto não terem esclarecido a técnica adotada para a extração. Além destas considerações, os venenos utilizados por Gonçalves Vieira, loc. cit., foram fornecidos pelo "Instituto Ezequiel Dias", localizado no Estado de Minas Gerais, portanto obtidos de serpentes provenientes de áreas geográficas distintas daquelas que forneceram o material por nós utilizados, o que possibilitaria segundo Schenberg (1958-1963), uma variabilidade na composição da peçonha. A metodologia por nós aplicada com a utilização de tiras de "Cellogel", permitiu uma melhor caracterização das frações constituintes dos venenos em um tempo de exposição eletroforética bem menor (90 minutos).

Os resultados obtidos pela eletroforese em "Cellogel" dos venenos das espécies *B. alternatus*, *B. insularis* e *B. cotiara*, são inéditos pois não consta na literatura qualquer trabalho relacionado com a eletroforese desses venenos.

O veneno da espécie *B. jararaca*, quando comparado com as outras 5 espécies analisadas, sugere ser, dentre as peçonhas por nós estudadas, aquela que possui um maior número de frações eletroforéticas.

CONCLUSÕES

1. A separação eletroforética dos venenos de *B. jararaca*, *B. jararacussu* e *B. moojeni* em tiras de "Cellogel", quando comparada com a eletroforese em papel, revela que além de ser um método muito mais rápido, permitiu melhor separação e, conseqüentemente, obtém-se a revelação de maior número de frações.

2. A separação eletroforética em "Cellogel" do veneno de *B. jararaca*, revelou 15 frações eletroforéticas sendo pois a espécie que apresentou maior número de frações dentre as peçonhas das espécies de *Bothrops* estudadas;

3. A separação eletroforética dos venenos de *B. alternatus*, *B. insularis* e *B. cotiara*, em tiras de "Cellogel", foi realizada pela primeira vez, apresentando-se estes venenos, com 11, 13 e 10 frações, respectivamente.

SUMMARY — Electrophoretic analysis of six samples of snake venom of the genus *Bothrops* Wagler, 1824, on "Cello-gel" membrane, demonstrated a better separation of the venom components in

lesstime of exposition, when compared with other techniques.

UNITERMS — Electrophoretic study of snake venoms on "Cellogel"; electrophoretic study on *Bothrops* venoms.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AFONSO, E. — On the electrophoresis of proteins on cellulose acetate membranes. *Clin. Chim. Acta.*, 6: 883-885, 1961.
2. BARTLETT, R. C. — Rapid cellulose acetate electrophoresis. I serum proteins. *Clinical Chemistry*, 9: 317-324, 1963.
3. BRAZIL, V. & PESTANA, B. R. — Nova contribuição ao estudo do envenenamento ophidico. *Rev. méd. São Paulo*, 12: 415-425, 1909.
4. COLFS, B. & VERHEYDEN, J. — Electrophoresis and sudan black staining of lipoproteins on gelatinised cellulose acetate. *Clin. chim. Acta.*, 18: 325-334, 1967.
5. FURLANETTO, R. S. — *Emprêgo de camundongos tratados com dose preparatória de venenos bothrópicos para a avaliação de DL50 desses venenos*. São Paulo, 1965, p. 8-9. [Tese Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.
6. GONÇALVES, J. M. — Análise eletroforética de serpentes brasileiras. In: Congresso Sudamericano de Química, 4º, Santiago do Chile, 1948.
7. GONÇALVES, J. M. & POLSON, A. — The electrophoretic analysis of snakes venoms. *Arch. Biochem.*, 13: 253-259, 1947.
8. GONÇALVES, J. M. & VIEIRA, L. G. — Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras. I. Análise eletroforética. *An. Acad. bras. Cienc.* 22: 141-150, 1950.
9. KÖENIG, P. — Aplicação da electrophorèse nos trabalhos químicos com quantidades pequenas. In: Congresso Sul-Americano de Química, 3º, Rio de Janeiro e São Paulo, 1937. v. 2, p. 334-336
10. PAGET, M. & COUSTENOBLE, P. — Microelectrophorèse des protéines du sérum sur acétate de cellulose gélatineux. *Ann. Biol. clin.*, 23: 1209-1219, 1965.
11. PAGET, M. & COUSTENOBLE, P. — Microélectrophorèse des glycoprotéides sériques sur acétate de cellulose gélatineux et sur polyacétate de cellulose. *Ann. Biol. clin.*, 24: 81-185, 1966.
12. POLSON, A.; JOUBERT, F. G. & HAIG, D. A. — Electrophoretic examination of cobra venoms. *Biochem. J.*, 40: 265-269, 1946.
13. RITTS, Jr. R. E. & ONDRICK, F. W. — Electrophoresis of serum proteins on cellulose acetate. *The American Journal of Clinical Pathology*, 41: 321-331, 1964.
14. ROSENFELD, G. — Acidentes por animais peçonhentos. In: VERONESI, R., ed. Doenças Infecciosas e parasitárias. 4a. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1969, p. 979-992.

SILES VILLARROEL, M., ROLIM ROSA, R., FURLANETTO, R. S. & ZELANTE, F. — Estudo eletroforético em "cellogel" de venenos do gênero *Bothrops*. *Mém. Inst. Butantan*, 37: 83-90, 1973.

15. SCHENBERG, S. — Estudo comparativo da composição do veneno de *Bothrops neuwiedi* em placas de Ouchterlony. *Ciência e Cultura*, 10: 163-164, 1958.
16. SCHENBERG, S. — Immunological (Ouchterlony method) identification of intrasubspecies qualitative differences in snake venom composition. *Toxicon*, 1: 67-75, 1963.
17. SILES VILLARROEL, M. — *Contribuição ao estudo de venenos de serpentes do gênero Bothrops (B. jararaca, B. alternatus, B. insularis, B. jararacussu, B. atrox e M. cotiara)*. São Paulo, 1972. [Tese — Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo]

Recebido para publicação em 16.VI.73.

Aceito para publicação em 12.X.73.