

ESTUDO HISTOQUÍMICO DE PROTEÍNAS NAS GLÂNDULAS VENENÍFERA E ACESSÓRIA DE *BOTHROPS JARARACA* (OPHIDEA, VIPERIDAE)

Ruberval A. LOPES*

José Renan V. da COSTA*

Silvio Maia CAMPOS*

Mariângela N. Maia CAMPOS*

RESUMO: Foram estudadas histoquimicamente as proteínas das glândulas venenífera e acessória da serpente jararaca (*Bothrops jararaca*). Baseados nos resultados, os autores concluíram que a porção protéica do produto de secreção das células principais da glândula venenífera é constituído de radicais α -amino, triptofano, tirosina e arginina; e que o das células mucoserasas da glândula acessória é constituído de radicais α -amino, cistina, triptofano, tirosina e arginina.

UNITERMOS: *Bothrops jararaca*, glândulas de veneno e acessória, histoquímica de proteínas.

INTRODUÇÃO

A primeira descrição correta da glândula de veneno de serpentes foi a de Fontana (1781), em *Vipera aspis* (cit. em 31). Entretanto, segundo Klauber¹², foram Redi em 1665 e Charas em 1673 quem primeiro noticiaram a ocorrência da glândula de veneno. A partir daí, outros trabalhos foram executados, dando mais importância à anatomia do aparelho de veneno do que à histologia, histofisiologia ou histoquímica do mesmo.

Só recentemente, a glândula de veneno foi objeto de estudos mais precisos quanto à histologia e histoquímica (revisão em 31), aos aspectos ultra-estruturais e radioautográficos (3, 17, 20, 21, 22, 28); e aos aspectos bioquímicos (revisão em 9).

A glândula acessória só foi distinguida da de veneno em 1875, por Emery (cit. em 31), e Zago³¹ fez uma revisão detalhada sobre a mesma sob os pontos de vista morfológico e histoquímico.

* Endereço para correspondência: Departamento de Ciências Patológicas. Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto — USP. 14.100 — Ribeirão Preto — SP.

A não ser o trabalho de Lopes et al.¹⁹, não se encontrou, na literatura, referência que tratasse dos aspectos histoquímicos de proteínas nessas glândulas da jararaca, sendo este, pois, o objetivo do presente trabalho.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizadas, neste trabalho, serpentes jararacas adultas de ambos os sexos. Os animais foram sacrificados por decapitação, sendo logo dissecadas as glândulas de veneno e acessória e imediatamente imersas em formol a 10%, durante 24 horas. Após a fixação, as peças foram incluídas em parafina.

Para a observação morfológica das glândulas foram utilizados os métodos da hematoxilina + eosina e tricrômico de Masson. Para melhor observar as células produtoras de muco utilizaram-se as técnicas do ácido periódico + reativo de Schiff e do azul de alcian ao pH = 2,5.

Para a detecção histoquímica das proteínas, utilizaram-se o método geral do azul de bromo-fenol², com a ação enzimática da tripsina, e métodos para a detecção dos seguintes radicais ativos: radical α -amino³⁰, radical guanidina encontrado na arginina⁵, radical p-hidroxi-fenila encontrado na tirosina (Millon modificado por Serra e Queiroz-Lopes, cit. em 18), radical beta-indolida encontrado no triptofano (Lison e Pinheiro, cit. em 18), radical sulfidrila encontrado na cisteína⁴ e radical dissulfeto encontrado na cistina¹.

RESULTADOS

As glândulas de veneno de *Bothrops jararaca* estão localizadas na superfície lateral da cabeça, próximas à pele, posteriormente aos olhos. Tem forma alongada e está recoberta de tecido conjuntivo denso e músculos. Na sua porção anterior, após um estrangulamento, há uma porção abalonada — a glândula acessória. O parênquima da glândula venenifera é formado por túbulos longos, secretores, que desembocam no ducto excretor, o qual pode ser dividido em dois segmentos: ducto primário que se localiza entre a glândula de veneno e a glândula acessória e ducto secundário, situado entre a glândula acessória e a bainha do dente de veneno.

Ao corte, o epitélio secretor da glândula de veneno apresentou dois tipos distintos de células: *células secretoras colunares*, seromucosas, as quais são o tipo celular principal do epitélio e as *células horizontais*, semelhantes às descritas por Wolter²⁹, Kochva e Gans¹⁵, Odor²¹, Zago³¹ e Warshansky et al.²⁸ todos em Viperidae, que se localizam entre a membrana basal e a base das células colunares (Figura 1).

A glândula acessória da jararaca é formada por túbulos longos, geralmente não ramificados, que desembocam obliquamente no ducto excretor. O epitélio dessa glândula é constituído de dois tipos celulares: mucoso e mucoseroso, semelhantes às descritas por Zago³¹ na cascavel e por Lopes et al.¹⁹ na própria jararaca (Figura 2).

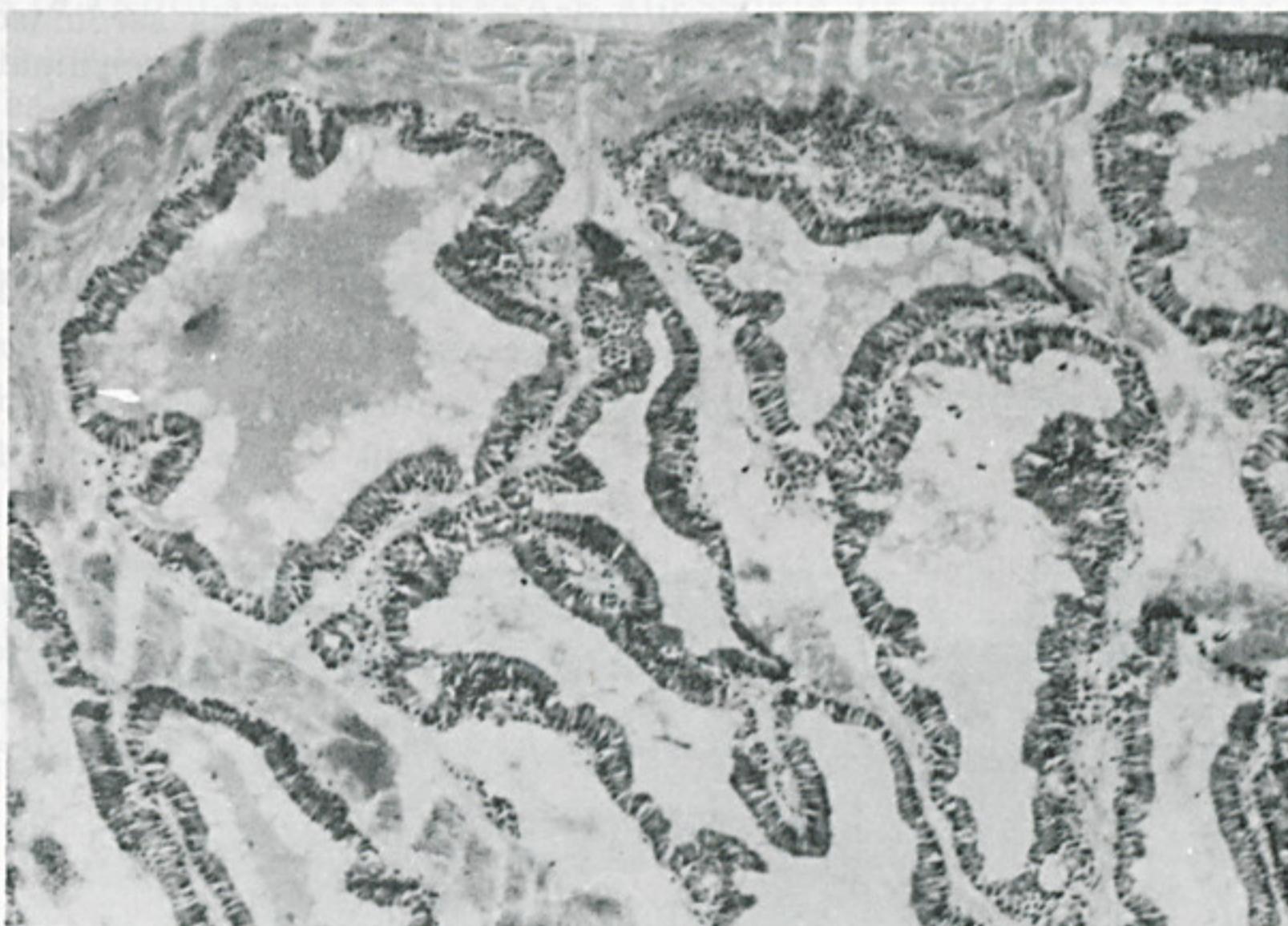


Fig. 1 — Aspecto histológico da glândula de veneno da jararaca, mostrando células colunares baixas, luz ampla e repleta de produto de secreção. Hematoxilina + eosina (200 X).

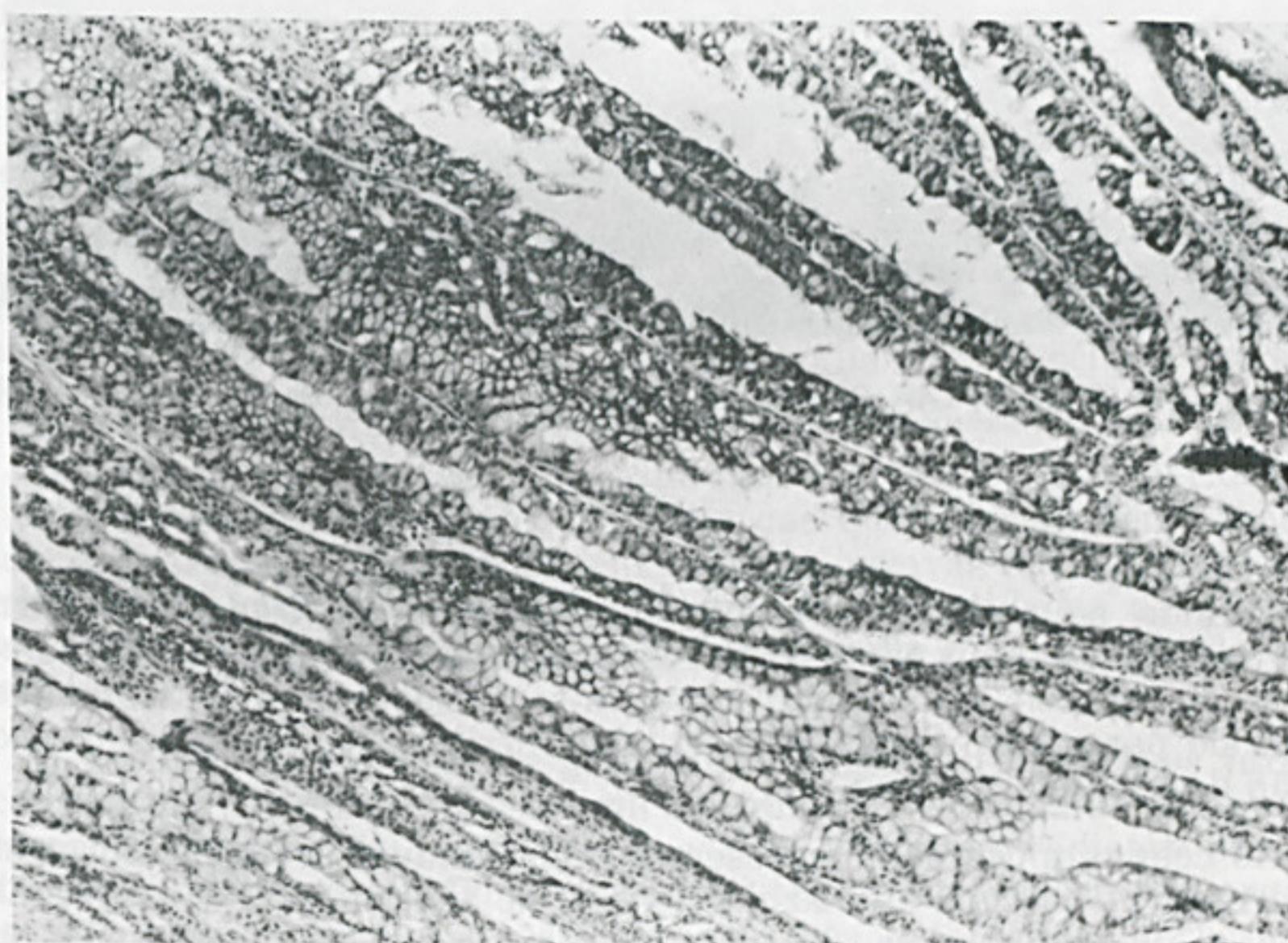


Fig. 2 — Aspecto histológico da glândula acessória da jararaca, evidenciando células mucosas (claras) e mucoserosas (escuras), após coloração pela hematoxilina + eosina (200 X).

Os resultados obtidos após a aplicação do método de azul de bromo-fenol demonstraram uma forte coloração azul nas células seromucosas da glândula de veneno e mucoseras da acessória. Após a ação enzimática da tripsina houve diminuição da coloração. Estas células coraram-se em vermelho, quando da reação da ninhidrina-Schiff, mas, quando se realizou a reação de ferricianeto férrico, elas não se coraram. Entretanto, somente as células mucoseras da glândula acessória apresentaram-se coradas em azul quando se executou o método do ácido perfórmico-azul de alcian (Figura 3).

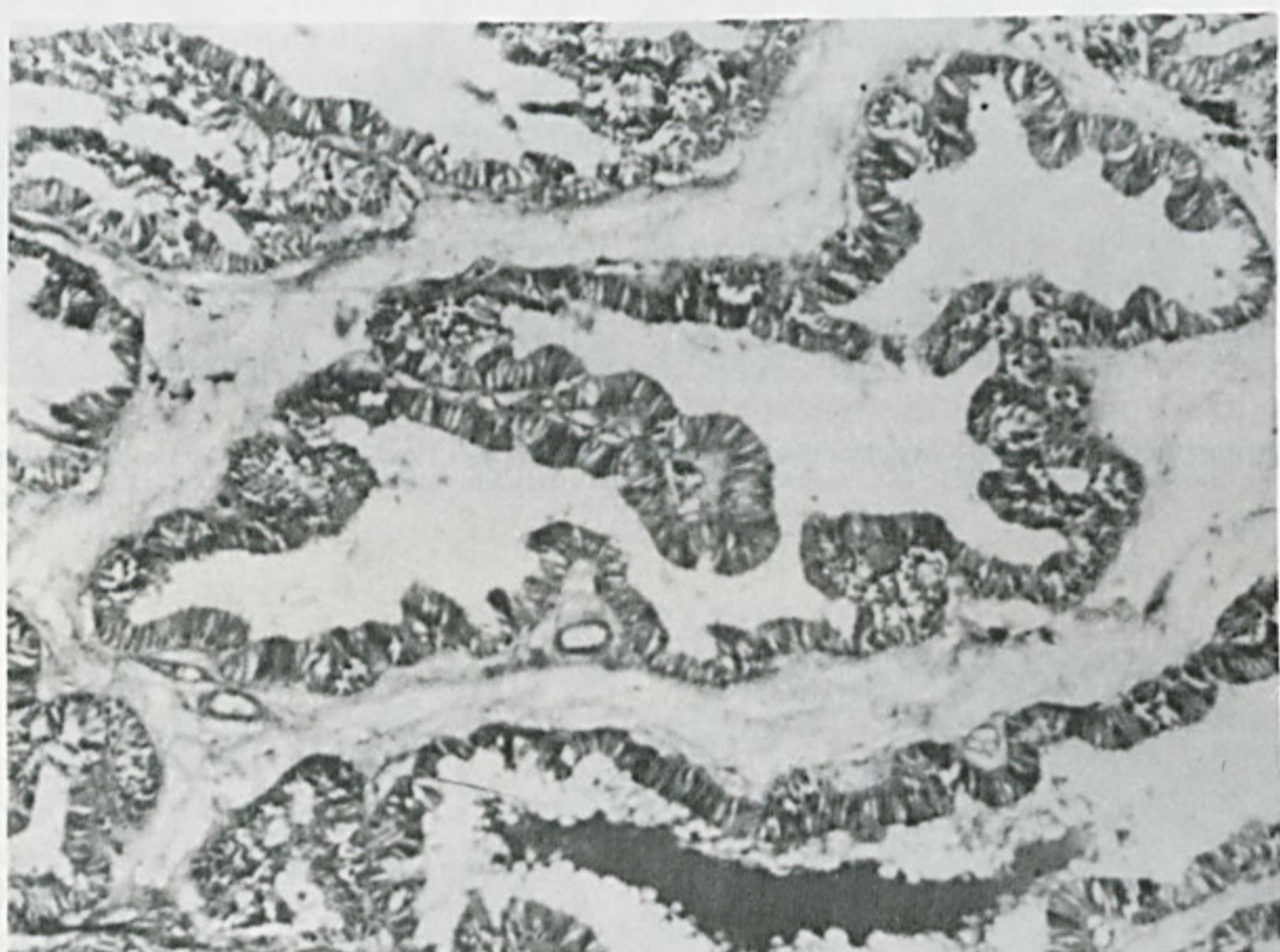


Fig. 3 — Aspecto histológico da glândula de veneno da jararaca, após coloração pelo azul de bromo-fenol, evidenciando proteínas em geral (200 X).

Quando se realizou a reação de Millon, modificada por Serra e Queiroz-Lopes, os dois tipos celulares de ambas glândulas estudadas coraram-se de amarelo-alaranjado; coraram-se em azul quando se realizou a reação do para-dimetilaminobenzoaldeído-nítrito e em amarelo quando da reação do amarelo naftol S.

As células mucosas e mucoseras da glândula acessória coraram-se de vermelho pelo PAS e de azul pelo azul de alcian a pH = 2,5, enquanto que a célula seromucosa da glândula de veneno se corou somente em vermelho pelo PAS. O resultado da detecção histoquímica de proteínas está expresso na tabela 1.

TABELA 1. RESULTADOS DA DETECÇÃO HISTOQUÍMICA DE PROTEÍNAS NAS GLÂNDULAS VENENÍFERA E ACESSÓRIA DE *BOTHROPS JARARACA*.

Reação	Glândula venenífera-célula principal sero-mucosa	Glândula acessória-célula mucoserosa
Azul de bromo-fenol (indicativa)	+++	+++
Chèvremont e Fréderic (cisteina)	-	-
Ninhidrina-Schiff (α -amino)	++	+
Ácido perfomico-azul de alcian (cistina)	-	\pm
Lison e Pinheiro (triptofano)	+	\pm
Millon, mod. por Serra e Queiroz-Lopes (Tirosina)	+	\pm
Amarelo naftol-S (arginina)	+	+

- = ausência de coloração; \pm = coloração atenuada; +++ = coloração intensa.

COMENTÁRIOS

As glândulas de veneno das serpentes são glândulas exócrinas que secretam complexos protéicos e glico-protéicos e que armazenam o seu produto de secreção na luz das unidades secretoras e do ducto excretor. Kochva e Gans^{14, 15, 16}, estudando a *Vipera palaestinae* e três espécies de Crotalinae, foram os primeiros a demonstrar a presença de um complexo carboidrato-proteína na glândula de veneno de Viperidae.

As unidades secretoras da glândula de veneno estão representadas por túbulos ramificados, revestidos por um epitélio secretor simples cuja atividade funcional está sob o controle da quantidade de veneno acumulada: quando a glândula está cheia, o epitélio secretor é cúbico baixo ou pavimentoso e o processo secretor é lento; quando a serpente utiliza o veneno ou quando o veneno é extraído manualmente, as células secretoras se hipertrofiam e o processo secretor é estimulado^{7, 13, 23, 25, 26}.

O produto de secreção das glândulas de veneno da Viperidae, tem um alto conteúdo de proteínas, algumas das quais foram bem caracterizadas e possuem propriedades enzimáticas nocivas ou neurotóxicas¹¹. Devido à sua capacidade e produzir grandes quantidades de proteínas, essa glândula possui características únicas e serve como modelo de estudo interessante.

O produto de secreção da glândula de veneno de *Bothrops jararaca* é constituído de um complexo glico-protéico¹⁹ constituído de mucopolissacarídeo neutro (PAS-positivo) e dos seguintes radicais protéicos, histoquimicamente detectáveis: α -amino, triptofano, tirosina e arginina. Enquanto que a glândula acessória apresenta, nas células mucoseras, além de mucopolissacarídeos neutro e ácido¹⁹, os seguintes radicais protéicos: α -amino, cistina, triptofano, tirosina e arginina.

Os diversos trabalhos que tratam da glândula de veneno de serpentes brasileiras restringem-se à cascavel (*Crotalus durissus terrificus*), a qual possui um alto conteúdo de proteínas, sendo que as duas principais toxinas (crotoxina e crotamina) representam cerca de 60 por cento das proteínas totais do veneno^{10, 27}. A caracterização bioquímica dos ácidos ribonucléicos da glândula de veneno da cascavel sul-americana foi feita por De Lucca e Imaizumi⁸ e De Lucca et al.⁹. Histoquimicamente, Zago³¹ detectou nas células seromucosas, da glândula de veneno da cascavel, os seguintes radicais protéicos: α -amino, triptofano, cisteína e cistina. Tais radicais também foram detectados nas células mucoseras e seromucosas da glândula acessória.

SUMMARY: The proteins of venom and accessory glands of *Bothrops jararaca* were studied histochemically. It is concluded: 1) the serous-mucous cells of the venom gland shows protein radicals α -amine, tyrosine, arginine and tryptophan; 2) the mucous-serous cells of the accessory gland shows protein radicals α -amine, cystine, tryptophan, tyrosine and arginine.

UNITERMS: *Bothrops jararaca*, venom and accessory glands, histochemistry of proteins.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAMS, C.W.M. & SCOPER, J.C. The hypothalamic elaboration of posterior pituitary principles in man, the rat and dog. Histochemical evidence derived from a performic acid-alcian blue reaction for cystine. *J. Endocr.*, 13: 221-228, 1956.
2. BONHAG, P.F. Histochemical studies of the ovarian nurse tissues and oocytes of the milkweed bug, *incopeltus fasciatus* (Dallas). I. Cytology, nucleic acids, and carbohydrates. *J. Morph.*, 96: 381-439, 1955.
3. BRASILEIRO, I.L.G. Investigações morfológicas sobre grânulos nas cisternas do retículo endoplasmático rugoso das células secretoras de veneno da cascavel sul-americana (*Crotalus durissus terrificus*), ao longo de um ano e durante o ciclo secretor. Ribeirão Preto, 1976 (Dissertação de mestrado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo).
4. CHÈVREMONT, M. & FRÉDERIC, J. Une nouvelle méthode histo chimique de mise en évidence des substances à fonction sulphydrique. Application à l'épiderme, au poil et à la levure. *Arch. Biol.*, 54:589-605, 1943.
5. DEITCH, A.D. An improved Sakaguchi reaction for microspectrophotometric use. *J. Histochem. Cytochem.*, 9: 477-483, 1961.
6. DE LUCCA, F. L. Estudos sobre os ácidos ribonucléicos da glândula venenifera e do fígado de *Crotalus durissus terrificus*. Ribeirão Preto, 1970 (Tese, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto — USP).
7. DE LUCCA, F.L., HADDAD, A., KOCHVA, E., ROTHSCHILD, A.M. & VALERI, V. Protein synthesis and morphological changes in the secretory epithelium of the venom gland of *Crotalus durissus terrificus* at different times after manual extraction of venom. *Toxicon*, 12: 361-368, 1974.
8. DE LUCCA, F.L. & IMAIZUMI, M.T. Synthesis of ribonucleic acid in the venom gland of *Crotalus durissus terrificus* (Ophidia, Reptilia) after manual extraction of the venom. *Biochem. J.*, 130:335-342, 1972.
9. DE LUCCA, F.L.; IMAIZUMI, M.T. & HADDAD, A. Characterization of ribonucleic acids from the venom glands of *Crotalus durissus terrificus* (Ophidia, Reptilia) after manual extraction of the venom. *Biochem. J.*, 139: 151-156, 1974.

10. GONÇALVES, J.M. & ARANTES, E.G. Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras. III — Determinação quantitativa de crotamina no veneno de cascavel brasileira. *Anais Acad. Bras. Ciênc.*, 28: 369-371, 1956.
11. GOSH, B.N. & SARKAR, N.K. Active principles of snake venom. In: *Venoms*, Washington, Am. Assoc. Advan. Sci., Vol. 44 (BUCKLEY, E.E. & PORGES, N. eds).
12. KLAUBER, L.M. Poison Apparatus. In: *Rattlesnakes*, Berkeley, Univ. California Press, vol. II, 1956.
13. KOCHVA, E. Regulação da secreção e injeção de veneno em serpentes Viperidae. *Ciênc. Cult.*, 25:867, 1973.
14. KOCHVA, E. & GANS, C. The venom gland of *Vipera palaestinae*. *Anat. Rec.*, 148: 302-303, 1964.
15. KOCHVA, E. & GANS, C. The venom gland of *Vipera palaestinae* with comments on the glands of some other viperines. *Acta Anat.*, 62:365-401, 1965.
16. KOCHVA, E. & GANS, C. Histology and histochemistry of the venom gland of some crotaline snakes. *Copeia*, 3: 506-515, 1966.
17. KOCHVA, E. & GANS, C. Salivary glands of snakes. *Clin. Toxicol.*, 3:363-387, 1970.
18. LISON, L. Histochemistry et cytochimie animales; principes et méthodes; 2^e éd., Paris, Gauthier-Villars, 1960.
19. LOPES, R.A.; OLIVEIRA, C.; MAIA CAMPOS, M.N.; MAIA CAMPOS, S. & BIRMAN, E.G. Morphological and histochemical study of cephalic glands of *Bothrops jararaca* (Ophidia, Viperidae). *Acta Zool.*, 55:17-24, 1974.
20. MARCHI, F. Estudo radioautográfico e bioquímico da secreção de proteínas na glândula de veneno da cascavel sul-americana *Crotalus durissus terrificus*. Ribeirão Preto, 1976 (Tese, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo).
21. ODOR, D.L. The poison gland of the cottonmouth moccasin, *Ancistrodon p. piscivorus*, as observed with the electron microscope. *J. Morph.*, 117: 115-134, 1965.
22. ODOR, D.L. & GENNARO, J.F. The poison gland of the cottonmouth moccasin, *Ancistrodon p. piscivorus*, as observed with the electron microscope. *Anat. Rec.*, 136: 343, 1960.
23. ORON, V. & BDOLAH, A. Regulation of protein synthesis in the venom gland of viperid snakes. *J. Cell Biol.*, 56: 177-190, 1973.
24. PEARSE, A.G.E. *Histochemistry: Theoretical and Applied* 3^a ed, London, Churchill, 1968.
25. ROTENBERG, D.; BAMBERGER, E.S. & KOCHVA, E. Studies on ribonucleic acid synthesis in the venom gland of *Vipera palaestinae* (Ophidia, Reptilia). *Biochem. J.*, 121:609-612, 1971.
26. SHAHAM, N. & KOCHVA, E. Localization of venom antigens in the venom gland of *Vipera palaestinae* using a fluorescent-antibody technique. *Toxicon*, 6:263-268, 1969.
27. SLOTA, K.H. & FRAENKEL-CONRAT, H. Two active proteins from rattlesnake venom. *Nature (Lond.)*, 142: 213, 1938.
28. WARSHAWSKY, H.; HADDAD, A.; GONÇALVES, R.P. VALERI, V. & DE LUCCA, F.L. Fine structure of the venom gland epithelium of the South American rattlesnake and radiographic studies of protein formation by the secretory cells. *Am. J. Anat.*, 138: 79-120, 1973.
29. WOLTER, M. Die Giftdrüse von *Vipera berus*. *Jen. Z. Naturw.*, 60: 305-362, 1924.

30. YASUMA, A. & ICHIKAWA, T. Ninhydrin-Schiff and alloxan-Schiff stain. A new histochemical staining method for protein. *J. Lab. Clin. Med.*, 41: 296-299, 1953.
31. ZAGO, D.A. Estudo morfológico e histoquímico de glândulas salivares relacionadas com a evolução da função venenosa nos ofídios. São Paulo, 1971 (Tese, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).