



Universidade Federal do Amazonas

Instituto de Ciências Biológicas

Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia

Propriedades Biológicas e Moleculares do Veneno da Serpente

Micrurus surinamensis (Cuvier, 1817; Elapidae)

FABIANA DA ROCHA OLIVEIRA

MANAUS

2008



Universidade Federal do Amazonas

Instituto de Ciências Biológicas

Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia

FABIANA DA ROCHA OLIVEIRA

Propriedades Biológicas e Moleculares do Veneno da Serpente

Micrurus surinamensis (Cuvier, 1817; Elapidae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração Ciências Biológicas.

Orientador: Prof^o. Dr^o. Jorge Luis López Lozano

MANAUS

2008

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Oliveira, Fabiana da Rocha

O48p Propriedades biológicas e moleculares do veneno da serpente
Micrurus surinamensis / Fabiana da Rocha Oliveira. - Manaus:
UFAM, 2008.

82 f.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) — Universidade
Federal do Amazonas, 2008.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luis López Lozano

1. *Micrurus surinamensis* 2. Toxinas – Propriedades biológicas
3. Neurotoxinas I. Lozano, Jorge Luis López II. Universidade Federal
do Amazonas III. Título

CDU 591.145(043.3)

FABIANA DA ROCHA OLIVEIRA

Propriedades Biológicas e Moleculares do Veneno da Serpente

Micrurus surinamensis (Cuvier, 1817; Elapidae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração Ciências Biológicas.

Aprovado em 15 de dezembro de 2008

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr^o. Jorge Luis López Lozano, Presidente
Universidade do Estado do Amazonas

Prof^o. Dr^o. Edmar Vaz de Andrade, Membro
Universidade Federal do Amazonas

Prof^o. Dr^o. Rosany Carvalho Piccolotto, Membro
Universidade Federal do Amazonas

A minha avó Ana Tereza,

Por seu carinho, grande amor e apoio em todos os momentos de minha vida. À senhora, minha amiga e conselheira, dedico esta Dissertação.

Vó, amo-te muito!

AGRADECIMENTOS

A minha família, por ser o motivo de tudo o que sou e do que conquistei.

Ao Prof^o. Dr^o. Paulo Friederich Bührnheim (*in memorian*), idealizador e fundador do Centro de Ofidismo – Centro de Excelência para o Estudo de Animais Peçonhentos da Amazônia.

Ao Prof^o. Dr^o. Jorge Luis López Lozano por abrir as portas do laboratório de Toxinologia Molecular do Centro de Ofidismo Prof^o. Paulo Friederich Bührnheim. Muito obrigada eterno mestre e amigo por essa oportunidade que, para mim, vale ouro!

À bióloga Maria das Dores Noronha pelo auxílio no laboratório e no manuseio com os animais de experimentação, sua competência foi essencial para este trabalho.

Aos amigos de bancada: André Higa, Emiro Muniz, João Paulo Catunda, Luiz Carlos Neto, Rebecca Tavares, Teddi Claro e Thiago Ferreira, companheiros de todas as horas.

Ao meu namorado Thomaz Gomes pelo companheirismo e disponibilidade em me ajudar nas horas mais necessárias.

A todos os meus amigos biólogos e cientistas pelo apoio e amizade.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal do Amazonas pela oportunidade.

À Universidade do Estado do Amazonas por ceder o laboratório de Genômica/Proteômica, muito útil para a continuidade desta pesquisa.

À FAPEAM, CNPq, FINEP e à Rede Proteômica do Amazonas pelo auxílio financeiro.

O mundo está cheio de mistérios. A vida
é um.

Haldane

RESUMO

A cobra coral aquática, *Micrurus surinamensis*, apresenta ampla distribuição na Amazônia. Seu veneno é neurotóxico para mamíferos e principalmente para peixes, alimento preferencial no seu habitat. Estudos básicos sobre as propriedades biológicas e potencial biotecnológico das toxinas do veneno dessa espécie são necessários, com o intuito de obter subsídios para a aplicação clínica, na soroterapia e/ou desenvolvimento de novas drogas. Neste trabalho, foram estudadas as toxinas do veneno de *M. surinamensis* por técnicas proteômicas, onde foram observados os efeitos neurotóxicos e as atividades biológicas do veneno, e avaliada a potência do soro antielapídico contra essas atividades. Utilizando-se eletroforese uni e bidimensional foram detectadas proteínas com massas moleculares de 7-70 kDa, 42 spots com massas moleculares de 12-70 kDa e pI 4-7, 38 spots com massas moleculares de 12-17 kDa e pI 7-11. O veneno apresentou, *in vitro*, baixa atividade PLA₂, que foi 100% inibida pelo soro antielapídico produzido no Instituto Butantan. Utilizando a técnica de zimograma não foi observada atividade proteolítica. Segundo o método de recalcificação *in vitro*, o plasma humano mostrou-se incoagulável com 80 µg do veneno, sugerindo a presença de toxinas inibidoras da cascata de coagulação. No entanto, testes *in vivo* (em camundongos) não revelaram a presença de hemorragia sistêmica ou sangue incoagulável. A DL₅₀ do veneno avaliada em camundongos, por via intravenosa, foi de 700 µg / kg. Ao inocular o veneno na região intracerebral, os animais manifestaram, segundos após a inoculação, sintomas como dificuldade respiratória, ptose palpebral uni e bilateral, pulos enérgicos, seguidos por períodos de imobilidade, espasmos nas patas posteriores e coceira compulsiva. Alguns apresentaram, com 4 µg do veneno, convulsão e morte instantânea. Estudos de interação competitiva toxina-anticorpo, realizados por western blotting, evidenciaram maior quantidade de anticorpos para as neurotoxinas de 14 kDa, porém, menor quantidade de anticorpos para as neurotoxinas < 10

kDa. A potência do soro antielapídico, do Instituto Butantan, para o veneno de *M. surinamensis* foi de 0,35 mg/mL, inferior ao do veneno de *M. frontalis* (1,5 mg/mL). Contudo, a maioria dos constituintes protéicos do veneno de *M. surinamensis* são toxinas com baixa massa molecular, principalmente de aproximadamente 7 kDa; o veneno é altamente neurotóxico para mamíferos (camundongos), afetando tanto o sistema nervoso periférico como o central; o soro antielapídico nacional mostrou, *in vivo*, baixa eficácia quanto à neutralização dos sintomas neurotóxicos causados pelo veneno. Devido à baixa potência do antiveneno, sugerem-se maiores estudos moleculares e clínicos para a inclusão ou não do veneno de *M. surinamensis* na produção dos soros antielapídicos.

Palavras-chave: *Micrurus surinamensis*, neurotoxinas, fosfolipases A₂, injeção intracranial, atividades biológicas.

ABSTRACT

Micrurus surinamensis, the aquatic coral snake species, has distribution in Amazonian rain forest. Your venom is neurotoxic to mammals and mainly fishes, principal natural feed. Studies about biological properties and biotechnological potential from *M. surinamensis* venom are necessities to obtain dates to medical and sorotherapy treatment applications and to new drugs development. Using uni and bidimensional electrophoresis techniques were detected proteins with 7-70 kDa molecular masses range, 42 spots (12-70 kDa) with pI 4-7 and 38 spots (12-17 kDa) with pI 7-11. *In vitro*, venom showed very low phospholipases A₂ activity that was inhibited 100% by Brazilian antielapidic Butantan Institute antivenom. Zymogram method not showed proteolytic activity in *M. surinamensis* venom. Plasma recalcification time with 80 µg venom suggests cascade coagulation inhibitors toxins in the venom, but *in vivo* test (in mice) venom not induced systemic hemorrhage and plasma anticoagulant activities. Venom LD₅₀ was 700 µg / kg. Intracranial injection of the venom showed in mice apnea, uni and bilateral palpebral ptosis, jumps with short periods of immobility, compulsive itch and spasmodic contractions, but with 4 µg venom doses was observed convulsion and death shock. Competitive antibody-antigen interaction studies by western blot test showed that Brazilian antielapidic Butantan Institute antivenom has high antibodies title against 14 kDa neurotoxins but very low antibodies title against < 10 kDa neurotoxins. Antivenom potency against *M. surinamensis* venom was 0,35 mg/mL, five times low to neutralizing *M. frontalis* venom (1,5 mg/mL). This result suggests more molecular and clinical studies to including or not venom of *M. surinamensis* for antielapidic antivenom production.

Key-words: *Micrurus surinamensis*, neurotoxins, phospholipases A₂, intracranial injection, biological activities.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1- Estrutura molecular da PLA ₂ do veneno da serpente elapídica <i>Naja naja atra</i>	21
Figura 2- Junção neuromuscular e o modo de ação das β-neurotoxinas e α-neurotoxinas.....	22
Figura 3- Estrutura molecular da α-cobratoxina do veneno da serpente elapídica <i>Naja naja siamensis</i>	24
Figura 4- <i>Micrurus surinamensis</i> (Cuvier, 1817).....	26
Figura 5- Perfil eletroforético Tris-Tricina do veneno de <i>M. surinamensis</i> em condições não redutoras e redutoras.....	44
Figura 6- Perfil eletroforético bidimensional (SDS-PAGE – 12,5%, <i>strip</i> pI 3-10 NL) do veneno de <i>M. surinamensis</i>	46
Figura 7- Perfil eletroforético bidimensional (SDS-PAGE – Gradiente 5-20%, <i>strip</i> pI 4-7 NL) do veneno de <i>M. surinamensis</i>	47
Figura 8- Perfil eletroforético bidimensional (SDS-PAGE – Gradiente 5-20%, <i>strip</i> pI 7-11 NL) do veneno de <i>M. surinamensis</i>	48
Figura 9- Atividade fosfolipásica A ₂ , em gel de agarose, do veneno de <i>Micrurus surinamensis</i>	54
Figura 10- Neutralização da atividade da PLA ₂ do veneno de <i>M. surinamensis</i> com os antivenenos.....	55
Figura 11- Neutralização da atividade da PLA ₂ do veneno de <i>M. surinamensis</i> com diferentes diluições do soro antielapídico.....	56
Figura 12- Imunoperfis com anticorpos policlonais do soro antielapídico e com o veneno de <i>M. surinamensis</i>	58

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1- Sintomas produzidos pelas toxinas de <i>Micrurus surinamensis</i> após injeção intracranial do veneno em camundongos (<i>Mus musculus</i>).....	50
Tabela 2- Sintomas produzidos pelas toxinas de <i>Micrurus surinamensis</i> após injeção intravenosa do veneno em camundongos (<i>Mus musculus</i>).....	52
Tabela 3- Atividade fosfolipásica (PLA ₂) no veneno de <i>Micrurus surinamensis</i>	54
Tabela 4- Neutralização da atividade fosfolipásica (PLA ₂) no veneno de <i>Micrurus surinamensis</i>	55
Tabela 5- Efeito do veneno de <i>M. surinamensis</i> no tempo de recalcificação em plasma humano.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	- Aminoácido
ACh	- Acetilcolina
ADP	- Adenosina Difosfato
ATP	- Adenosina Trifosfato
DE ₅₀	- Dose Eficaz 50%
DL ₅₀	- Dose Letal 50%
DTT	- Ditioneitol
H	- Hora
IgG	- Imunoglobulina G
LAO	- L-Aminoácido Oxidase
Min	- Minuto
OMS	- Organização Mundial da Saúde
pI	- Ponto Isoelétrico
PLA ₂	- Phospholipase A ₂
rpm	- Rotação por Minuto
SBH	- Sociedade Brasileira de Herpetologia
SNC	- Sistema Nervoso Central
SNP	- Sistema Nervoso Periférico

LISTA DE SÍMBOLOS

kDa	- KiloDalton
Ca ²⁺	- Cálcio
α	- Alfa
β	- Beta
<	- Menor
μ g	- Micrograma
g	- Grama
%	- Porcentagem
° C	- Grau Celsius
cm	- Centímetro
mA	- MiliAmper
NaCl ₂	- Cloreto de Sódio
mL	- Mililitro
mm	- Milímetro
μ L	- Microlitro
CaCl ₂	- Cloreto de Cálcio
V	- Voltagem
mg	- Miligrama
H ₂ O ₂	- Peróxido de Hidrogênio
±	- Mais ou Menos
>	- Maior
Kg	- Kilograma
≤	- Menor Igual

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 As Serpentes da Família Elapidae: Cobra Coral Verdadeira.....	18
1.2 Estudos das Toxinas das Serpentes Elapídicas.....	19
1.2.1 As Fosfolipases A ₂ – PLA ₂	19
1.2.2 As Neurotoxinas.....	21
1.3 Características dos Venenos das Serpentes do Gênero <i>Micrurus</i>	25
1.3.1 Coral aquática: <i>Micrurus surinamensis</i>	26
2 OBJETIVOS.....	28
2.1 Objetivo Geral.....	29
2.2 Objetivos Específicos.....	29
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 Animais e Veneno.....	31
3.2 Caracterização do Perfil Molecular.....	32
3.2.1 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE).....	32
3.2.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida TRIS-TRICINA.....	33
3.2.3 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Gradiente de 5-20%.....	34
3.2.4 Eletroforese Bidimensional.....	35
3.3 Avaliação e Soroneutralização <i>in vivo</i> das Atividades Biológicas.....	36
3.3.1 Injeção Intracranial em Mamífero (<i>Mus musculus</i>).....	36
3.3.2 Obtenção da Dose Letal 50% (DL ₅₀).....	36
3.3.3 Potência do Soro Antielapídico – Neutralização da Letalidade.....	37
3.3.4 Avaliação das Atividades Desfibrinogenante e Hemorrágica.....	37

3.4	Avaliação e Soroneutralização <i>in vitro</i> das Atividades Enzimáticas.....	38
3.4.1	Avaliação da Atividade Fosfolipásica A ₂ (PLA ₂).....	38
3.4.2	Imunoneutralização da Atividade Fosfolipásica A ₂ (PLA ₂).....	38
3.4.3	Avaliação da Atividade Proteolítica por Zimograma.....	39
3.5	Avaliação <i>in vitro</i> da Atividade Anticoagulante: Tempo de Recalcificação	40
3.6	Western Blotting – Interação Competitiva.....	40
3.7	Testes Estatísticos.....	42
4	RESULTADOS.....	43
4.1	Perfil Molecular das Proteínas do Veneno de <i>Micrurus surinamensis</i>	44
4.2	Atividades Biológicas das Toxinas do Veneno de <i>M. surinamensis</i>	49
4.3	Avaliação e Soroneutralização das Atividades Enzimáticas.....	54
4.3.1	Atividade da Fosfolipase A ₂	54
4.3.2	Atividade Proteolítica.....	56
4.4	Atividade Anticoagulante: Tempo de Recalcificação.....	57
4.5	Análise por Western Blotting – Interação Competitiva.....	58
5	DISCUSSÃO.....	59
6	CONCLUSÕES.....	70
7	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	72
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

1. INTRODUÇÃO



Evolutivamente as serpentes são os répteis mais diversificados, com treze famílias descritas e, aproximadamente, 3000 espécies. Surgiram durante o Cretáceo Inferior, há cerca de 100 a 120 milhões de anos, e permanecem até os dias atuais (Orr, 2001). Durante esse período, conquistaram os mais variados habitats como: aquáticos (marinhos ou de água doce), terrestres, fossoriais ou arborícolas; expandindo sua distribuição no mundo inteiro, principalmente nas zonas tropicais e temperadas (Hildebrand, 1995).

O Brasil, um país tropical com clima predominantemente quente e úmido, desfruta de uma enorme riqueza herpetofaunística. Segundo a Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH, 2008), 696 espécies de répteis já foram catalogadas. Dessa diversidade, mais de 50% são serpentes que, em todo o território brasileiro, estão distribuídas em nove famílias taxonômicas. Duas delas classificam as espécies peçonhentas: Família Elapidae (corais verdadeiras – gêneros *Leptomicrurus* Schmidt, 1937 e *Micrurus* Wagler, 1824) e Família Viperidae (jararacas – gêneros *Bothriopsis* Peters 1861, *Bothrocophias* Gutberlet & Campbell, 2001 e *Bothrops* Wagler, 1824; cascavéis - gênero *Crotalus* Linnaeus, 1758 e surucucus - gênero *Lachesis* Daudin, 1803).

As serpentes peçonhentas distinguem-se, principalmente, pela presença de um par de glândulas de veneno supralabiais, simetricamente localizadas na porção lateral da cabeça. Essas glândulas sintetizam o veneno, uma mistura heterogênea e complexa de substâncias orgânicas e íons que, após ser inoculado por meio de dentições especializadas, auxilia a imobilização e digestão da presa, ou a defesa contra predadores (Oliveira, 2004; Pough *et al.*, 2003).

Entre as substâncias orgânicas presentes nos venenos, em maior quantidade são representadas as proteínas, dotadas ou não de atividade enzimática, e em menor quantidade são encontrados aminoácidos livres, peptídeos, carboidratos, lipídios e aminas biogênicas. No

entanto, são as proteínas e alguns peptídeos que desencadeiam a toxicidade no organismo das presas naturais e também no dos humanos.

1.1 As Serpentes da Família Elapidae: Cobra Coral Verdadeira

As serpentes elapídicas são bastante distintas. Compreendem 40 gêneros, entre eles *Naja* (cobras), *Dendroaspis* (mambas), *Bungarus* (kraits), *Micrurus* (corais) e *Notechis* (cobras tigras), que estão distribuídos em quatro continentes: América, África, Ásia e Austrália (Orr, 2001).

Nas Américas ocorrem somente os gêneros *Micruroides* Schmidt, 1928 (América do Norte), *Leptomicrurus* Schmidt, 1937 (América do Sul) e *Micrurus* Wagler, 1824 (ampla distribuição por todo o continente) (Roze, 1982; Hoge & Romano-Hoge, 1978/79). Essas serpentes são popularmente conhecidas como corais verdadeiras e têm habitat fossorial ou aquático. São animais de pequeno porte, medindo de 20 centímetros a um pouco mais de 1 metro e apresentam presas inoculadoras de veneno fixas e relativamente curtas – do tipo proteróglifas. Em geral, não atacam, ocorrendo o acidente com essas cobras somente quando manuseadas ou pisoteadas (Dos Santos *et al.*, 1995).

A principal característica destas serpentes é a coloração da pele – com poucas exceções, pela presença de vários padrões de anéis vermelhos, pretos, brancos e/ou amarelos. Esses anéis coloridos têm função primordial na sinalização de advertência ou mimetismo para seus predadores (Savage & Slowinski, 1990).

Os acidentes causados pelas corais verdadeiras são raros em todo o Brasil (< 1%), porém, extremamente perigosos devido à elevada neurotoxicidade do veneno, que leva a uma rápida paralisação dos músculos dos membros, da face e do diafragma, podendo ocasionar morte por parada respiratória (Ministério da Saúde, 2008).

As neurotoxinas elapídicas apresentam, geralmente, baixa massa molecular (a partir de 6 kDa). Essas pequenas moléculas têm fácil transporte na corrente sanguínea e são rapidamente absorvidas no organismo, causando sinais e sintomas imediatos na vítima (Perkins & Tomer, 1995; Seligman, 1993).

Durante o envenenamento, essas toxinas provocam discreta dor, leve edema e moderada parestesia. Em casos graves, ocasionam fraqueza muscular progressiva, ptose palpebral uni e/ou bilateral, oftalmoplegia, mialgia, disfagia e disфонia (Manock *et al.*, 2008; Pinho & Pereira, 2001).

1.2 Estudos das Toxinas das Serpentes Elapídicas

Os estudos sobre toxinas mostram os principais mecanismos de ação dos polipeptídeos presentes nos venenos das serpentes elapídicas. Essas informações auxiliam não somente o entendimento da funcionalidade dessas proteínas como também podem ser bastante úteis para a investigação dos diversos processos fisiológicos a nível molecular, visando essas proteínas como ferramentas biológicas valiosas.

Os componentes mais estudados dos venenos elapídicos são: fosfolipases A₂ (PLA₂), neurotoxinas pré e pós-sinápticas e cardiotoxinas/citotoxinas (Bougis *et al.*, 1986).

1.2.1 As Fosfolipases A₂ – PLA₂

As PLA₂ são os principais constituintes dos venenos das serpentes elapídicas. São enzimas que precisam de íons Ca²⁺ (cálcio) para hidrolisarem as ligações de glicerofosfolipídios no carbono 2 (C-2) do glicerol, liberando ácidos graxos e lisofosfolipídios. Sua atividade catalítica resulta na liberação do ácido araquidônico, um precursor dos eicosanóides – responsáveis pelo desencadeamento das reações inflamatórias (Lehninger, 2006).

As PLA₂ (fosfatidil-acil-hidrolase, EC 3.1.1.4) podem ser de dois tipos: intracelulares (associadas à membrana e envolvidas no metabolismo dos fosfolipídios) ou extracelulares (presentes nos venenos de serpentes).

As PLA₂ extracelulares, além de executarem sua ação específica na digestão de lipídios de membrana também são tóxicas ao apresentarem alguns efeitos farmacológicos adicionais (dependentes ou não de sua função catalítica), como neurotoxicidade, miotoxicidade e atividade coagulante e/ou anticoagulante (Kini, 2005; Wickramaratna *et al.*, 2003; Carredano *et al.*, 1998; Clapp *et al.*, 1995). Elas contêm de 119-143 resíduos de aminoácidos (AAs). São proteínas pequenas, com massas moleculares de 12-15 kDa e altamente estáveis devido à presença de 5-8 pontes dissulfetos; podem formar homo ou heteromultímeros (Valentin & Lambeau, 2000; Arni & Ward, 1996).

Baseadas em suas seqüências de aminoácidos e no número e posição das pontes dissulfetos, as PLA₂ extracelulares dividem-se em classes (Arni & Ward, 1996):

- I: presentes nos venenos de serpentes das famílias Elapidae e Hydrophidae e no pâncreas de mamíferos;
- II: presentes nos venenos de serpentes da família Viperidae;
- III: presentes nos venenos de invertebrados (abelhas, águas-vivas e escorpiões) e vertebrados (lagartos).

As PLA₂ da classe I (elapídicas) possuem 115-120 resíduos de AAs e sete pontes dissulfetos, que estabilizam a sua estrutura molecular formada por: três estruturas α -hélices, uma β -folha, um loop de ligação do cofator Ca²⁺ e um loop elapídico (duas a três inserções de AAs na região 52-65) (Figura 1). A base estrutural dessas proteínas, conforme as diferenças nas seqüências de AAs que são determinantes para a sua estabilidade conformacional, irá definir quais os efeitos farmacológicos (neurotóxico, cardiotoxico, miotóxico, hemorrágico, etc.) da enzima em questão (Valentin & Lambeau, 2000; Arni & Ward, 1996). Estudos de

mutagênese sítio-dirigida auxiliaram o melhor entendimento da relação estrutura-função das PLA₂ (Kelley *et al.*, 1992).

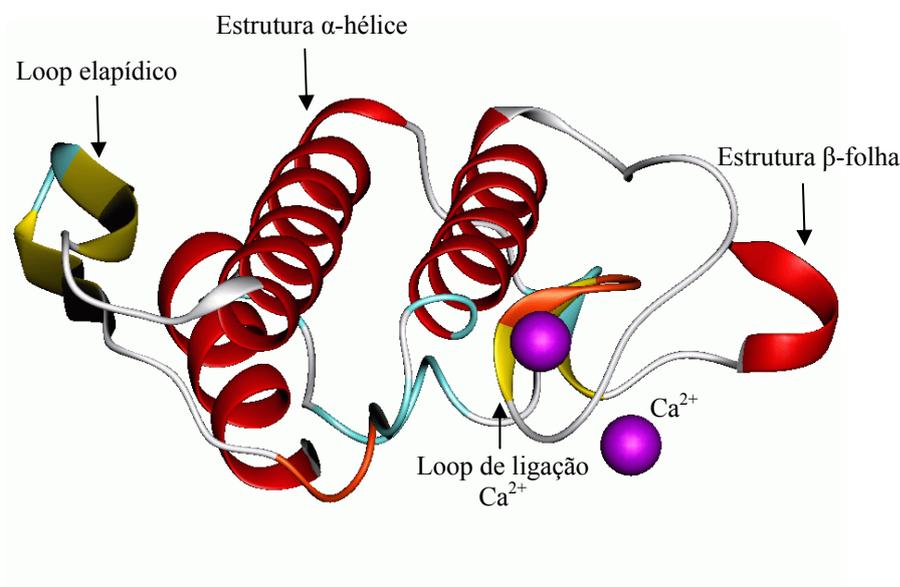


Figura 1 – Estrutura molecular da PLA₂ do veneno da serpente elapídica *Naja naja atra*, evidenciando três α -hélices, uma β -folha, loop de ligação do íon Ca^{2+} e loop elapídico, que se estabilizam por quatro pontes dissulfetos (não mostradas). (Fonte: <http://opm.phar.umich.edu/protein.php?pdbid=1poa>, site Orientations of Proteins in Membranes – Database).

1.2.2 As Neurotoxinas

As neurotoxinas elapídicas decompõem-se em: β -neurotoxinas (pré-sinápticas), α -neurotoxinas (pós-sinápticas), cardiotoxinas e neurotoxinas “fracas”. Esses componentes, com exceção das β -neurotoxinas, consistem de uma única cadeia polipeptídica, contendo geralmente de 60-75 resíduos de aminoácidos e 4-5 pontes dissulfetos. Apresentam baixa massa molecular (6-7 kDa) e estrutura terciária do tipo “três dedos” (*three fingers*) (Nirthanan *et al.*, 2003). Apesar da elevada homologia entre si, esses peptídeos exibem diferentes propriedades biológicas.

As neurotoxinas pré e pós-sinápticas atuam na junção neuromuscular, bloqueando os impulsos nervosos até a total paralisação do músculo esquelético (Vital Brazil, 1987; Hofling

et al., 1983/84). Esses polipeptídeos agem especificamente na fenda sináptica, entre a terminação dos axônios neurais (pré-sinapse) e das placas motoras (pós-sinapse) (Figura 2).

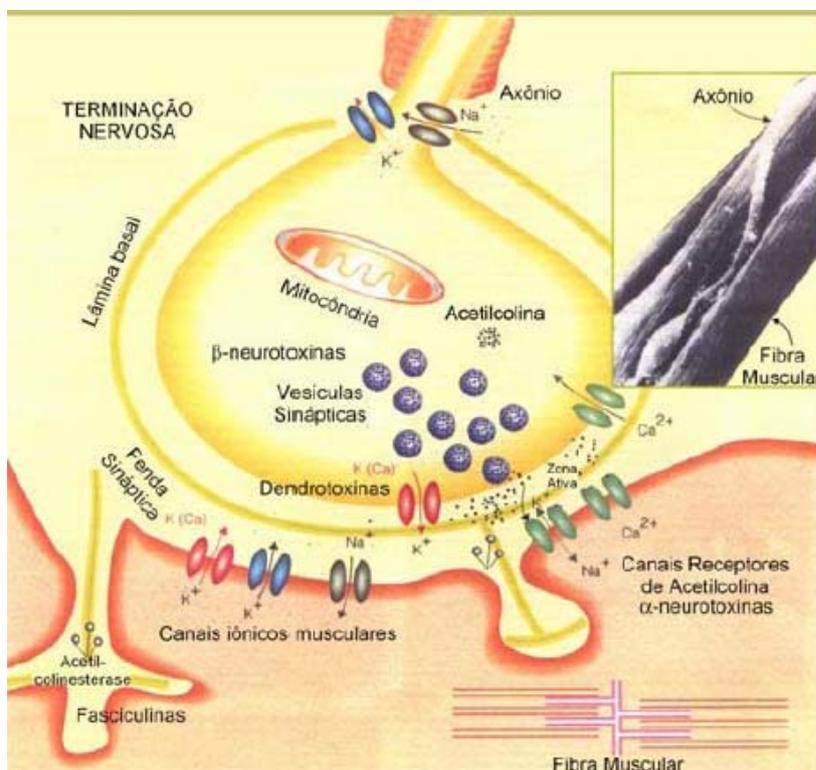


Figura 2 – Junção neuromuscular e o modo de ação das β-neurotoxinas e α-neurotoxinas. Na ausência de toxinas, o potencial de ação provoca a liberação de acetilcolina na fenda sináptica em uma ação dependente de íons Ca²⁺ extracelular. (Fonte: Purves *et al.*, 2005).

As β-neurotoxinas bloqueiam a liberação da acetilcolina (ACh) após os impulsos nervosos, impedindo a deflagração do potencial de ação. Algumas dessas toxinas apresentam funções enzimáticas, geralmente atividade fosfolipásica A₂ miotóxica, danificando vesículas sinápticas e nervos terminais (Vital Brazil, 1987; Vital-Brazil & Fontana, 1983/84).

As α-neurotoxinas competem com a ACh pelos receptores nicotínicos colinérgicos das placas motoras. Essas toxinas ligam-se com alta seletividade nos receptores específicos do neurotransmissor ACh (Huang *et al.*, 2008; Karlsson *et al.*, 2000; Jolkkonen *et al.*, 1995). Após a sua ligação aos receptores, bloqueiam os canais iônicos, interrompendo os impulsos nervosos e o desencadeamento do potencial de ação.

Uma terapêutica alternativa usada contra a ação das α -neurotoxinas é o uso de drogas anticolinesterásicas, como a neostigmina e o edrofônio, já que essas são as únicas toxinas que podem ser antagonizadas por tais drogas ao competirem pelo mesmo receptor da ACh, causando uma melhoria dos sintomas neurotóxicos (Bucarechi *et al.*, 2006; Vital-Brasil & Vieira, 1996; Watt *et al.*, 1986).

As cardiotoxinas são citotóxicas, basicamente peptídeos de membrana ativos. Elas causam despolarização e contração das células musculares e rompimento da membrana celular, além de danificarem eritrócitos e células epiteliais (Condrea, 1974). São altamente básicas ($pI > 9,5$) e as sutis variações em sua estrutura tridimensional mostram significativas diferenças em suas atividades biológicas (Kumar *et al.*, 1998).

As neurotoxinas “fracas” têm ação similar às α -neurotoxinas, porém, ao contrário destas, mostram baixa toxicidade. Por não causarem danos visíveis no organismo das vítimas, são usadas como ferramentas para o estudo de sua atuação nos receptores neuronais e para outros processos fisiológicos (Nirathanan *et al.*, 2003).

As α -neurotoxinas, cardiotoxinas e neurotoxinas “fracas” são caracterizadas por uma base formada por três loops adjacentes que emergem de um centro pequeno, globular e hidrofóbico, o qual é interligado por 4-5 pontes dissulfetos. São moléculas relativamente planas (em forma de folha), com uma leve concavidade e o plano formado por uma estrutura β -folha em multicamadas (Tsetlin, 1999; Kumar *et al.*, 1998) (Figura 3). Mesmo com pequenas variações em suas estruturas primárias e secundárias, podem obter uma extraordinária diversidade funcional e, ao interagirem sinergicamente com outros componentes do veneno, contribuem para uma maior toxicidade, podendo ser letais (Mukherjee, 2008; Chaim-Matyas *et al.*, 1995; Tan & Armugan, 1990; Bougis *et al.*, 1987).

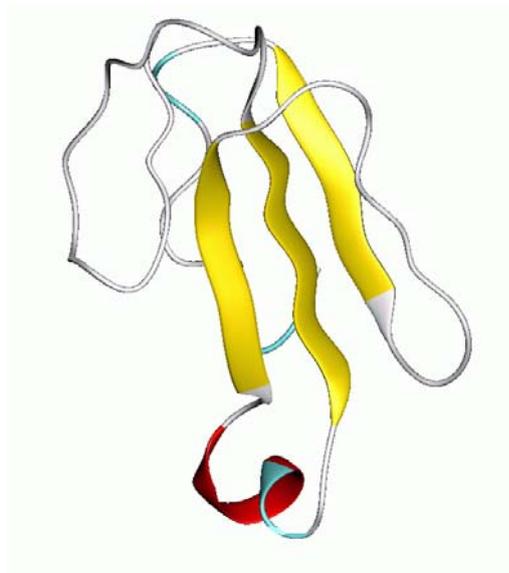


Figura 3 – Estrutura molecular da α -cobratoxina do veneno da serpente elapídica *Naja naja siamensis*, evidenciando os três loops adjacentes interligados por quatro pontes dissulfetos (não mostradas). (Fonte: <http://opm.phar.umich.edu/protein.php?pdbid=1ctx>, site Orientations of Proteins in Membranes – Database).

Além dos principais componentes citados, os venenos das serpentes da família Elapidae apresentam em sua composição enzimas como, L-aminoácido oxidases (LAO) capazes de induzir citotoxicidade (Ahn *et al.*, 1997), nucleotidases, atividades ATPase e ADPase (Sales & Santoro, 2008), peptídeo natriurético que causa vasodilatação local (Ho *et al.*, 1997; Schweitz *et al.*, 1992), acetilcolinesterases que inativam a acetilcolina durante a transmissão colinérgica (Frobert *et al.*, 1997) e proteases (serino e metaloproteases) que degradam proteínas do plasma sanguíneo (Jin *et al.*, 2007; Ward *et al.*, 1996). Também estão presentes alguns inibidores de proteases com estrutura molecular de peptídeos, com massa molecular de aproximadamente 7 kDa e cerca de 60 resíduos de aminoácidos (Chang *et al.*, 2001; Dunn & Broady, 2001; Tytgat *et al.*, 2001; Brillard-Bourdet *et al.*, 1998; Rudrammaji & Gowda, 1998; Joubert & Strydom, 1978).

Contudo, o veneno das serpentes apresenta uma enorme variedade de componentes moleculares capazes de provocar toxicidade ao organismo.

1.3 Características dos Venenos das Serpentes do Gênero *Micrurus*

Os venenos das serpentes do gênero *Micrurus* exibem, geralmente, grande similaridade com os dos elapídeos do Velho Mundo quanto à presença de neurotoxinas pré e pós-sinápticas e PLA₂ com diversos efeitos farmacológicos. A busca por novas moléculas presentes em alguns venenos das espécies de *Micrurus* já levou à identificação de mais de 49 proteínas de baixa massa molecular (Perkins & Tomer, 1995).

As toxinas dos venenos micrúricos são altamente letais em camundongos, podendo apresentar uma DL₅₀ < 1 µg/g (Francis *et al.*, 1997). São predominantemente neurotóxicas e miotóxicas em suas presas naturais (Urdaneta *et al.*, 2004; Serafim *et al.*, 2002; Gutiérrez *et al.*, 1980).

Segundo TAN & PONNUDURAI (1992), os venenos elapídicos exibem fraca atividade proteolítica, baixa atividade fosfodiesterase e 5'-nucleotidase e moderada a forte atividade PLA₂, sendo que algumas espécies exibem forte atividade acetilcolinesterase. A atividade L-aminoácido oxidase e hialuronidase dos venenos variam amplamente, com baixa, moderada e elevada atividades.

No Estado do Amazonas, no Centro de Ofidismo Prof. Paulo F. Bührnheim – Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, foram registradas seis espécies de cobras coral de importância médica: *Micrurus averyi*, *M. filiformes*, *M. hemprichii*, *M. lemniscatus*, *M. spixii* e *M. surinamensis*, com baixo índice de acidentes provocados por essas espécies (<1%) e ausência de óbitos (Noronha *et al.*, 2000; Bührnheim *et al.*, 1988).

Apesar da diversidade e da abundância de algumas espécies de corais verdadeiras em toda a região norte do Brasil, poucos são os estudos sobre a ecologia, fisiologia e comportamento, bem como os estudos bioquímicos dos venenos micrúricos.

1.3.1 Coral Aquática: *Micrurus surinamensis*

A Amazônia abrange uma enorme diversidade de cobras coral, entre elas *Micrurus surinamensis*, a qual morfológicamente apresenta escamas cefálicas vermelhas com bordas pretas e padrão de anéis vermelhos / pretos / amarelos; os anéis pretos estão dispostos em tríades perfeitamente distintas (Figura 4).



Figura 4 – *Micrurus surinamensis* (Cuvier, 1817). (Foto: Prof. Paulo F. Bürnheim, 1998).

Essa espécie vive em lugares alagados (igapós) e igarapés (em área de mata primária), alimenta-se preferencialmente de peixes e tem uma distribuição bastante ampla: sudeste da Venezuela, Guianas, regiões amazônicas da Colômbia, Equador, Peru, Brasil (Amapá, Amazonas, Pará, Maranhão e Mato Grosso) e Bolívia (Cunha & Nascimento, 1978; Hoge & Romano-Hoge, 1978/79; Schmidt, 1952).

As toxinas do veneno de *M. surinamensis*, geralmente, exibem baixa atividade L-aminoácido oxidase, nucleotidase e hialuronidase, elevada atividade leucina-aminopeptidase e ausência de atividade proteolítica e de acetilcolinesterase (Da Silva Jr. & Aird, 2001). Por causa de sua alimentação diferenciada das outras espécies de *Micrurus*, o veneno de *M. surinamensis* constitui um grupo distinto com base em sua composição enzimática (Da Silva Jr. & Aird, 2001).

Um estudo inédito sobre a análise molecular dos constituintes dos venenos de espécies micrúricas da Amazônia mostrou, por espectrometria de massa (MALDI/ToF/MS), que há uma similaridade do perfil protéico dos venenos na faixa de 14-76 kDa. No entanto, entre 5-8 kDa os venenos estudados revelaram diferentes perfis, sendo que o de *M. surinamensis* diferiu significativamente das demais espécies (López-Lozano, 2002).

Sabe-se que os venenos elapídicos são ricas fontes de neurotoxinas usadas como ferramentas em inúmeros estudos farmacológicos e fisiológicos. A disponibilização de novas neurotoxinas, caracterizadas estrutural e bioquimicamente, aumentará o grupo de substâncias para os estudos fisiopatológicos e para possíveis aplicações biotecnológicas.

Assim, o veneno de *Micrurus surinamensis*, espécie aquática e endêmica da Amazônia, poderia fornecer novas moléculas com potencial biotecnológico. Para isso é necessário, previamente, realizar estudos básicos da caracterização molecular e das atividades biológicas do veneno dessa espécie, bem como avaliar a capacidade neutralizante do soro antielapídico nacional sobre o efeito neurotóxico e letal do veneno.

2. OBJETIVOS



2.1 Objetivo Geral

Caracterizar o perfil molecular e as atividades biológicas do veneno de *Micrurus surinamensis*, de espécimes procedentes da região de Manaus, Brasil.

2.2 Objetivos Específicos

- Obter por técnicas proteômicas o perfil molecular do veneno de *M. surinamensis*;
- Avaliar as atividades biológicas do veneno de *M. surinamensis*;
- Observar os efeitos neurotóxicos do veneno de *M. surinamensis* por meio de injeção intracranial e intravenosa em camundongos;
- Verificar, *in vitro* e *in vivo*, a potência do soro antielapídico nacional contra o veneno de *M. surinamensis*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

+

3.1 Animais e Veneno

Camundongos (*Mus musculus*) albinos, pesando entre 18-22 g, foram fornecidos pelo Biotério Experimental do Laboratório de Toxinologia Molecular - Centro de Ofidismo Prof^o. Paulo Friederich Bührnheim. Os animais foram mantidos em gaiolas de plástico sob temperatura controlada de 22 - 25° C, com água e alimentação *ad libitum*.

O veneno, filtrado e liofilizado, de *Micrurus surinamensis* (pool de animais adultos) foi fornecido pelo banco de venenos do Laboratório de Toxinologia Molecular - Centro de Ofidismo Prof^o. Paulo Friederich Bührnheim e mantido a uma temperatura de - 20° C.

3.2 Caracterização do Perfil Molecular

3.2.1 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada segundo LAEMMLI (1970). Os géis foram feitos de modo descontínuo, apresentando gel de concentração de 4% e gel de separação de 12,5% ou de 15%.

As amostras do veneno de *Micrurus surinamensis* foram dissolvidas em tampão TRIS-HCl 0,05 M, pH 6,8 e aplicadas em uma concentração de 40 µg. A redução das amostras foi feita com DTT (ditiotreitól), em uma concentração final de 0,1 M. As toxinas do veneno de *Bothrops atrox* foram usadas como padrão de massa molecular (50, 23, 14 kDa), segundo LÓPEZ-LOZANO (2002).

A corrida eletroforética foi realizada com tampão de corrida (TRIS-HCl 0,025 M, Glicina 0,192 M com SDS a 0,1% pH 8,3) sob corrente constante de 20 mA por placa.

Os géis foram corados com *Coomassie Blue* R-250 0,2% em solução de ácido acético, metanol e água ultrapura na proporção de 1:4:5 (v/v) durante 5 horas. Os géis foram descorados em solução de ácido acético, metanol e água ultrapura na mesma proporção, para a revelação das proteínas.

3.2.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida TRIS-TRICINA

A eletroforese em gel de poliacrilamida pelo sistema Tris-Tricina foi realizada de acordo com a metodologia descrita por SCHÄGGER e VON JAGOW (1987).

O gel de Tris-Tricina compõe-se basicamente de três tipos de géis, sendo que a trama de polímeros existentes em cada tipo de gel vai ficando menor à medida que se avança a corrida eletroforética. O gel Tris-Tricina com glicerol é o mais indicado para proteínas com baixas massas moleculares (até 1 kDa), onde se obtém uma melhor resolução de pequenas proteínas e peptídios.

As amostras do veneno de *Micrurus surinamensis* foram dissolvidas em tampão TRIS-HCl 0,05 M, pH 6,8 e aplicadas em uma concentração de 20 µg. A redução das amostras foi feita com DTT (ditiotreitól), em uma concentração final de 0,1 M. As toxinas do veneno de *Bothrops atrox* foram usadas como padrão de massa molecular (50, 23, 14 kDa), segundo LÓPEZ-LOZANO (2002).

A corrida eletroforética foi desenvolvida em ambiente refrigerado com tampão catódico superior TRIS-TRICINA 0,1 M, SDS 0,1% pH 8,25 e tampão anódico inferior TRIS-HCl 0,2 M, pH 8,9, com duração aproximada de 3 horas sob corrente de 40 mA e 100 V.

A coloração e descoloração dos géis foram procedidas segundo o item 3.2.1.

3.2.3 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Gradiente de 5-20%

O gel de poliacrilamida foi preparado com gradiente de 5-20% e adição de sacarose (1% do volume final); a preparação dos géis foi de acordo com o item 3.2.1.

O gel por gradiente é feito utilizando diferentes níveis de polimerização do gel, em uma concentração do maior para o menor. A técnica auxilia a melhor separação das proteínas/peptídios, resultando em uma boa qualidade da resolução das bandas.

As amostras foram aplicadas nos géis na concentração de 50µg do veneno total de *M. surinamensis*. As toxinas do veneno de *Bothrops atrox* foram usadas como padrão de massa molecular (50, 23, 14 kDa), segundo LÓPEZ-LOZANO (2002).

A corrida eletroforética SDS-PAGE foi realizada em tampão de corrida (TRIS-HCl 0,025 M, Glicina 0,192 M com SDS a 0,1% pH 8,3) sob corrente descontínua de 20 mA a 60 mA por placa.

A coloração e descoloração dos géis foram procedidas segundo o item 3.2.1.

3.2.4 Eletroforese Bidimensional

- Primeira dimensão: focalização isoeétrica

Foram utilizadas amostras do veneno de *M. surinamensis* (500 µg ou 250 µg) diluídas em DTT e tampão IPG. Fitas de 24 cm com pI 3-10 NL ou fitas de 13 cm com pI 4-7 NL ou 7-11 NL foram hidratadas por 12 horas em tampão amostra. Após a hidratação, as proteínas foram focalizadas, guiando-se pelo sistema *IPG-Phor III*: para as fitas de 24 cm e pI 3-10 em um total de 7 horas e 40.000 volts/hora e para as fitas de 13 cm e pI 4-7 NL e 7-11NL em um total de 5 horas e 20.000 volts/hora. Depois da focalização isoeétrica, os sistemas foram equilibrados em solução de equilíbrio redutora com DTT (por 20 minutos) e, posteriormente, em uma solução de equilíbrio alquilante com iodoacetamida (por 20 minutos). Os sistemas foram colocados no gel de poliacrilamida para a separação por massa molecular.

- Segunda dimensão: eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Os géis de 12,5% foram preparados segundo o item 3.2.1 para as fitas de 24 cm com pI 3-10. Os géis de poliacrilamida com gradiente de 5-20%, segundo o item 3.2.3 foram confeccionados para as fitas de 13 cm com pI 4-7 ou 7-11. As toxinas do veneno de *B. atrox* (10 µg) foram utilizadas como marcador de massa molecular(50, 23, 14 kDa), segundo LÓPEZ-LOZANO (2002).

Todos os géis foram escaneados e analisados no sistema *ImageMaster 2D Platinum 6.0*, segundo manual de instrução do fabricante.

3.3 Avaliação e Soroneutralização *in vivo* das Atividades Biológicas

3.3.1 Injeção Intracranial em Mamífero (*Mus musculus*)

Camundongos (*Mus musculus*) albinos, pesando entre 18-22 g, foram utilizados para a padronização da técnica de injeção intracranial. O método foi utilizado para verificar a atuação das neurotoxinas do veneno de *M. surinamensis* no sistema nervoso central de mamíferos.

Quatro grupos de três camundongos receberam diferentes doses do veneno de *M. surinamensis*: 0,2 µg; 1 µg; 2 µg; 4 µg, diluídas em solução salina fisiológica (NaCl 0,15 M). As amostras foram incubadas em banho-maria a 37° C por 10 minutos. Foi usada como controle solução salina fisiológica.

Para a injeção intracranial (i.c.) foram utilizadas seringas para insulina de 1 mL, com 0,3 mm de calibre (BD Ultra-Fine II). O tamanho das agulhas foram modificadas para um comprimento de 3 mm - limite de inserção da agulha na caixa craniana dos animais de experimentação.

Os animais foram imobilizados, com suas cabeças mantidas em posição horizontal, e o veneno, em um volume final de 20 µL, foi inoculado na região dorsal do cérebro, no lobo frontal, atravessando a fissura longitudinal do crânio. Após a inoculação do veneno, os animais ficaram sob observação durante 48 horas, anotando-se os sintomas neurológicos e a letalidade.

3.3.2 Obtenção da Dose Letal 50% (DL₅₀)

A DL₅₀ foi avaliada em camundongos (*Mus musculus*) albinos, pesando entre 18-22 g. Oito grupos de quatro camundongos receberam diferentes doses do veneno de *M. surinamensis*: 1 µg; 2,5 µg; 5 µg; 7,5 µg; 10 µg; 12,5 µg; 15 µg; 20 µg. O veneno foi diluído em solução salina (NaCl 0,15 M) e injetado por via intravenosa (i.v.) em um volume final de 200 µL de cada dose. Após a inoculação do veneno, os animais ficaram sob observação durante 48 horas, anotando-se os sintomas e o número de mortos após este tempo.

A DL₅₀ foi calculada pelo método de análise de Probitos (Finney, 1971), usando-se o número de camundongos mortos por dose de veneno em 48 horas.

3.3.3 Potência do Soro Antielaipídico – Neutralização da Letalidade

Para calcular a potência do soro antielaipídico foi previamente determinada a dose eficaz 50% (DE₅₀), onde 50% do efeito letal de uma determinada concentração do veneno é neutralizado por 1 mL do antiveneno. Diferentes diluições do soro antielaipídico produzido no Instituto Butantan foram misturadas com 5DL₅₀ de veneno, de acordo com as recomendações da Organização Mundial da Saúde (World Health Organization, 1981). As diluições foram feitas nas proporções 1:1, 1:2 e 1:3 (veneno / soro).

Após a incubação por 30 minutos, a 37° C em banho-maria, a mistura (volume final 200 µL) foi injetada via i.v. em quatro grupos de três camundongos. Foi usado como controle 5DL₅₀ do veneno de *M. surinamensis*. Os animais ficaram sob observação por um período de 48 horas, anotando-se o número de mortos. A potência da neutralização do soro foi avaliada pela análise de Probitos (Finney, 1971).

3.3.4 Avaliação das Atividades Desfibrinogenante e Hemorrágica

Para avaliar o efeito desfibrinogenante do veneno de *M. surinamensis* foi empregado o método descrito por THEAKSTON & REID (1983), com algumas alterações. Três grupos de quatro camundongos receberam diferentes doses de veneno: 10 µg, 15 µg e 20 µg. O veneno foi diluído em solução salina (NaCl 0,15 M) e injetado por via intravenosa (i.v.) em um volume final de 200 µL de cada amostra. Uma hora após a inoculação, os animais foram anestesiados com éter e sangrados por punção cardíaca. As amostras de sangue, 1 mL, foram deixadas em tubos de hemólise, à temperatura ambiente e a incoagulabilidade sangüínea foi avaliada.

Um animal de cada grupo foi separado para detecção de atividade hemorrágica. Duas horas após a inoculação do veneno os animais foram anestesiados e sacrificados. A cavidade torácica foi aberta para avaliar a presença de hemorragia.

3.4 Avaliação e Soroneutralização *in vitro* das Atividades Enzimáticas

3.4.1 Avaliação da Atividade Fosfolipásica (PLA₂)

A atividade da PLA₂ foi detectada em gel de agarose 1%, utilizando 3% de gema de ovo como fonte do substrato fosfatidilcolina, em tampão PBS 0,04 M, pH 8,1, segundo metodologia descrita por DE HAAS *et al.* (1968). A solução de agarose e gema de ovo foram homogeneizadas e a mistura foi aplicada em uma placa de plástico, deixada à temperatura ambiente para gelificar. No gel foram feitos oito poços (4 mm de diâmetro cada), formando quatro colunas da seguinte maneira: na coluna 1 foi aplicado o controle da atividade PLA₂, o veneno de *B. atrox* (10 µg do veneno / 20 µL de solução salina fisiológica); na coluna 2, 3 e 4 foi aplicado o veneno de *M. surinamensis*, nas respectivas concentrações de 10, 20 e 40 µg do veneno / 20 µL de solução salina fisiológica.

As placas com as amostras foram incubadas a 37° C em câmara úmida, por 24 horas. Após a incubação, as áreas que surgiram formando um halo transparente foram medidas, em milímetros, com um paquímetro digital. O halo evidencia a presença da atividade PLA₂.

3.4.2 Imunoneutralização da Atividade Fosfolipásica (PLA₂)

A neutralização da atividade PLA₂ foi detectada em placas com gel de agarose 1%, utilizando 3% de gema de ovo como fonte do substrato fosfatidilcolina, em tampão PBS 0,04 M, pH 8,1, segundo o item 3.4.1.

Foram utilizados os antivenenos produzidos no Instituto Butantan: antielapídico, trivalente (antibotrópico, anticrotálico e antilaquétrico), antilonômico, antiaracnídico e antiescorpiônico, na proporção de 1:1 (µg do veneno / µL soro), para verificar a existência de inibição da atividade PLA₂ presente no veneno. O soro antielapídico foi usado em diferentes proporções em relação ao veneno de *M. surinamensis* (1:1; 1:0,75; 1:0,50; 1:0,25; 1:0,10; 1:0,05) para verificar a eficácia neutralizante do soro para essa atividade enzimática.

A mistura veneno / soro foi incubada em banho-maria 37°C, por 30 minutos. O veneno de *M. surinamensis* (20 µg / µL) e o de *B. atrox* (10 µg / µL), sem o soro antiofídico, foram utilizados como controle da atividade PLA₂.

Foram aplicados 20 µL das soluções (veneno + soro) em cada poço do gel, em seguida as placas foram incubadas a 37° C em câmara úmida, por 24 horas. Após a incubação, as áreas foram analisadas quanto à presença ou não de atividade fosfolipásica, em relação a cada soro. O diâmetro do halo (mm), que sugeriu atividade PLA₂, foi medido com um paquímetro digital. A atividade inibitória do soro foi quantificada em porcentagem pela diferença da atividade do grupo experimental com relação ao grupo controle. Fórmula aplicada para a porcentagem de inibição: % Inibição = 100 -

$$\left(\frac{\text{Diâmetro da Atividade PLA}_2 \times 100}{\text{Diâmetro da Atividade PLA}_2 \text{ do Controle}} \right)$$

3.4.3 Avaliação da Atividade Proteolítica por Zimograma

A avaliação da atividade proteolítica, por zimograma, foi realizada segundo HEUSSEN & DOWDLE (1980). Primeiramente foi preparado o gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15%, segundo o item 3.2.1 e, antes de induzir sua polimerização, foi adicionado 1% (p/v) dos substratos caseína, fibrinogênio ou gelatina em cada gel. Após a corrida eletroforética, os géis foram colocados em tampão glicina pH 8,3 (géis com os substratos caseína ou fibrinogênio) e tampão collagenase pH 7,5 (gel com o substrato gelatina) na estufa a 37°C, por 24 horas.

As amostras do veneno de *M. surinamensis* foram dissolvidas em tampão TRIS-HCl 0,05 M, pH 6,8 e aplicadas em uma concentração de 40 µg. A redução das amostras foi feita com DTT (ditiotreitól), em uma concentração final de 0,1 M. As toxinas do veneno de *Bothrops atrox* (30 µg) foram usadas como controle da atividade proteolítica e como marcador de massa molecular.

3.5 Avaliação *in vitro* da Atividade Anticoagulante: Tempo de Recalcificação

A atividade anticoagulante do veneno foi avaliada pelo tempo de recalcificação do plasma humano, segundo STOCKER & MEIER (1988). O sangue com citrato de sódio 3,8%, na proporção 1:9, foi centrifugado a 4000 rpm por 15 min; o plasma foi separado e mantido refrigerado a 4° C.

Foram aplicados 200 µL de plasma humano em tubos de hemólise e mantidos em banho-maria a 37° C. As amostras foram preparadas contendo 20 µg, 40 µg e 80 µg do veneno de *M. surinamensis*, diluídas em solução salina fisiológica (NaCl 0,15 M). Foram aplicados, separadamente, nos tubos contendo plasma humano, 20 µL de solução de cada amostra de veneno. Com as concentrações previamente determinadas, homogeneizou-se a

mistura e, em seguida, foram adicionados 20 μL de CaCl_2 (cloreto de cálcio) 0,4 M. Foram feitas triplicatas das amostras e observado o tempo de início da recalcificação (formação de coágulo).

O controle foi feito utilizando somente o plasma com 20 μL de CaCl_2 0.4 M, anotando-se o tempo de início da recalcificação para a comparação com as amostras do veneno de *M. surinamensis*.

3.6 Western Blotting – Interação Competitiva

A metodologia foi procedida para verificar possíveis interações antígeno-anticorpo de modo semi-quantitativo. A técnica foi obtida de acordo com TOWBIN *et al.* (1979) com algumas modificações. Primeiramente as amostras foram previamente submetidas à eletroforese SDS-PAGE, com gradiente de 5-20%, segundo o item 3.2.3. Após a corrida eletroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose com tampão de transferência, sob corrente constante de 260 mA e 60 V por 2:30 horas. A membrana de nitrocelulose foi corada com Ponceau S para verificar a eficiência da transferência das bandas do gel para a membrana e foi cortada em tiras. Depois, foi lavada abundantemente com água destilada para tirar o excesso de corante. Logo após, as tiras de membrana de nitrocelulose foram tratadas com solução de bloqueio (5g de leite desnatado, dissolvidos em 100 mL de tampão Tris-Salina e Tween 20) por duas horas, para bloquear sítios inespecíficos de ligação.

Para verificar a interação antígeno-anticorpo de modo a quantificar os anticorpos capazes de se ligarem às toxinas do veneno, foram incubados, previamente em banho-maria a 37° C, por 30 min: 5 μg , 20 μg ou 80 μg do veneno de *M. surinamensis* com 4 μL do soro antielapídico em 5 mL de TBS (Tampão Tris-Salina) e, após a incubação, cada sistema com as diferentes concentrações do veneno (5 μg , 20 μg ou 80 μg) foi aplicado a uma tira de

membrana de nitrocelulose, respectivamente e incubado por 1:30 h. Como controle, em uma tira de membrana de nitrocelulose foi adicionado somente o soro antielapídico diluído 1:1000 em TBS (Tampão Tris-Salina) e incubado por 1:30 h à temperatura ambiente.

O conjugado imunoenzimático (anti IgG de cavalo com peroxidase) foi diluído na proporção 1:2000 em solução TBS e incubado com as membranas de nitrocelulose (contendo a mistura veneno / soro e somente soro) por 1:30 h à temperatura ambiente.

Após a incubação, as tiras da membrana de nitrocelulose foram lavadas, e a reação de detecção das bandas de proteína foi desenvolvida com adição do substrato para a peroxidase (1,5 mg 4- α -cloro-1-naftol + 24 μ L H₂O₂ + 0,5 mL Metanol + 17,5 mL TBS) para verificar a capacidade de ligação antígeno-anticorpo por interação competitiva.

3.7 Testes Estatísticos

Conforme necessário, os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão da média ou usado o teste “t” de Student, com níveis significantes de probabilidade menores que 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS



4.1 Perfil Molecular das Proteínas do Veneno de *Micrurus surinamensis*

A eletroforese Tris-Tricina, em condições não redutoras, possibilitou a visualização de proteínas acima de 50 kDa, entre 23 a 40 kDa, uma de aproximadamente 20 kDa e proteínas intensas com e abaixo de 14 kDa até, aproximadamente, 7 kDa. Em condições redutoras, foi observada uma única banda protéica >50 kDa, proteínas fortemente coradas entre 14 e 23 kDa e também abaixo de 14 kDa (Figura 5).

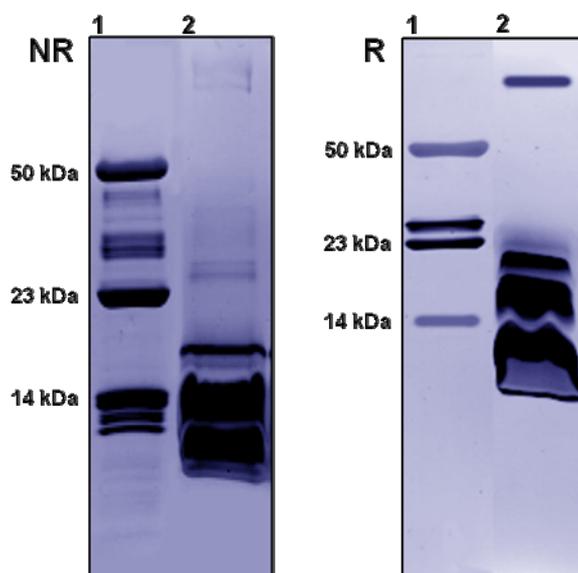


Figura 5 – Perfil eletroforético Tris-Tricina do veneno de *M. surinamensis* (2), em condições não-redutoras (NR) e redutoras (R). Marcadores de massa molecular das toxinas do veneno de *Bothrops atrox* (1). Géis corados com Comassie Blue R-250.

O veneno de *M. surinamensis*, sob condições redutoras, foi submetido à análise do perfil eletroforético bidimensional, em gel de poliacrilamida a 12,5% e em gel com gradiente de 5-20%.

Nos géis de 24 cm, com pI de 3-10 NL, foram detectados 43 spots - 22 distribuídos na região ácida e 21 spots na região básica. Vinte e seis spots apresentaram massa molecular

entre 12-20 kDa. Acima de 50 kDa (até ~70 kDa) foram revelados 17 spots com, aproximadamente, a mesma massa molecular, porém, com diferentes pIs (Figura 6).

Os géis de 13 cm, com pI de 4-7 NL, mostraram 42 spots, sendo que a maioria deles apresentou o pI entre 5-6. Quatorze spots apresentaram massa molecular em torno de 12-30 kDa e 28 com massa molecular acima de 50 kDa (até ~70 kDa). Pode-se observar que a maioria das proteínas presentes nessa faixa de pH (ácido) apresentou alta massa molecular, e suas massas foram bastante semelhantes (Figura 7).

Nos géis de 13 cm, com pI de 7-11 NL, foram detectados 38 spots. Suas frações protéicas distribuíram-se nessa faixa de pH e apresentaram baixa massa molecular, de 12-17 kDa (Figura 8).

Sistema ImageMaster 2D-Platinum 6.0

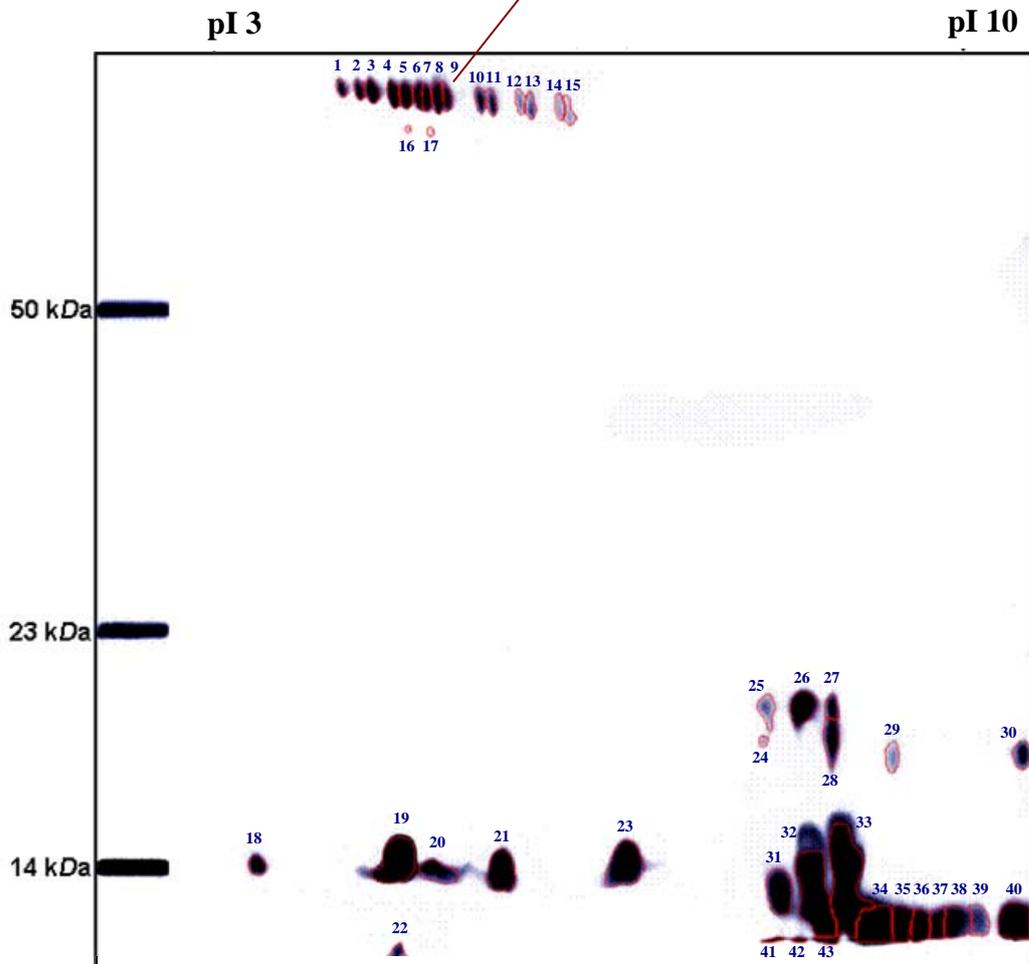
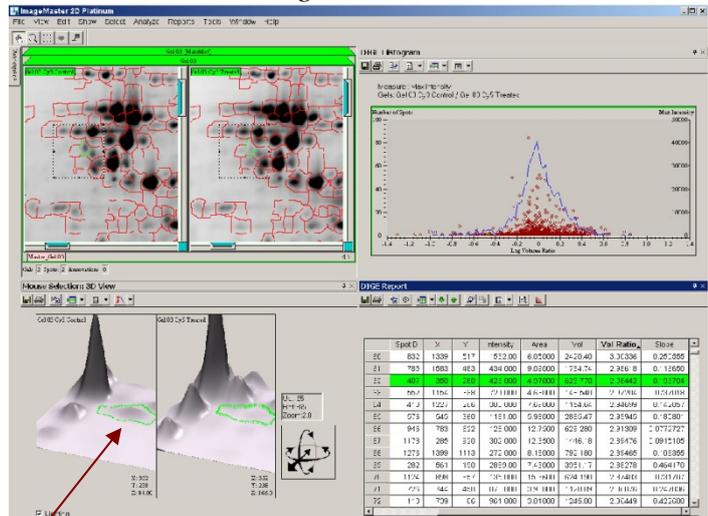


Figura 6 – Perfil eletroforético bidimensional (SDS-PAGE – 12,5%, *strip* pI 3-10 NL) do veneno de *M. surinamensis*. Spots analisados no sistema *ImageMaster 2D Platinum 6.0*. Marcadores de massa molecular das toxinas do veneno de *Bothrops atrox*. Gel corado com Comassie Blue R-250.

Sistema ImageMaster 2D-Platinum 6.0

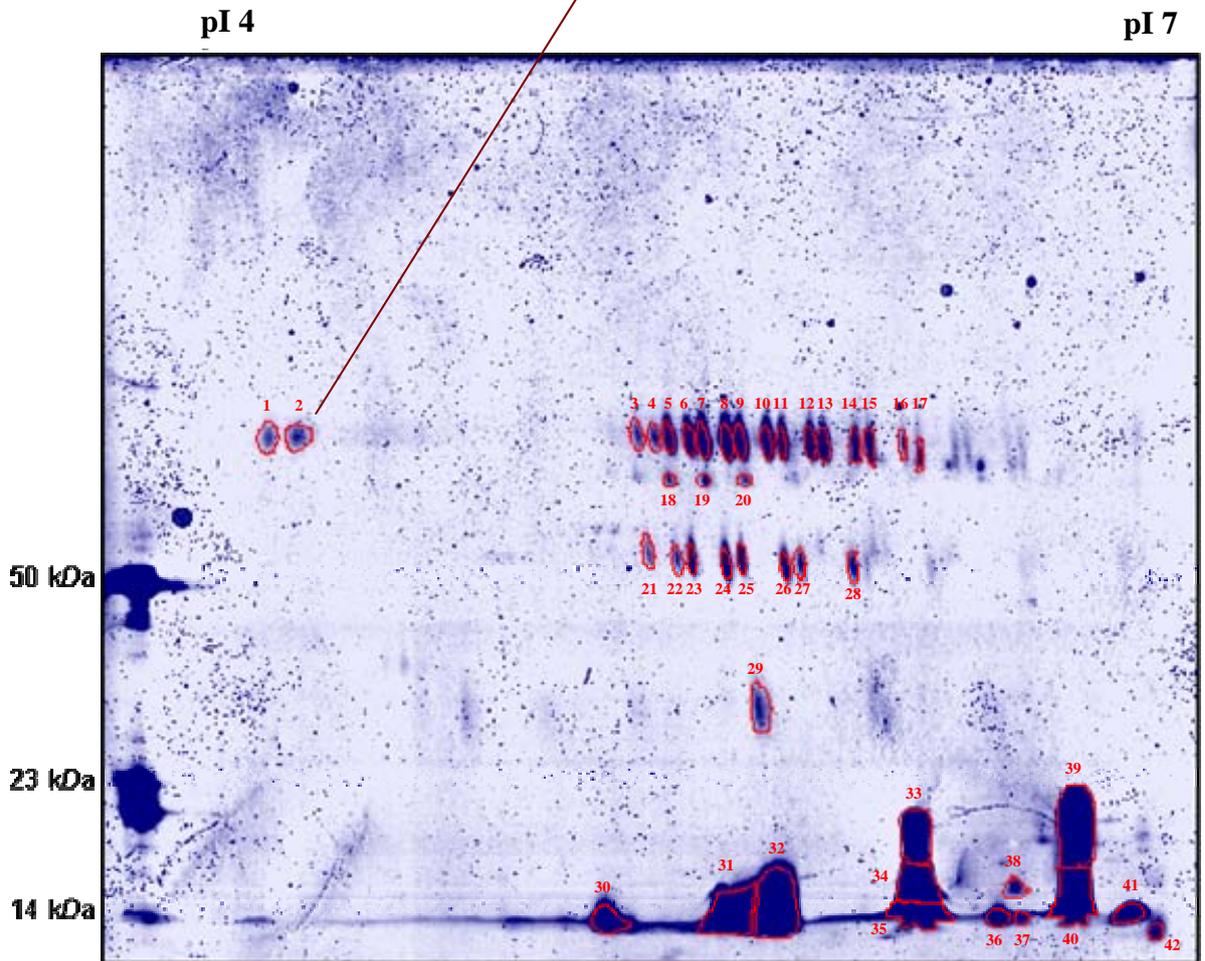
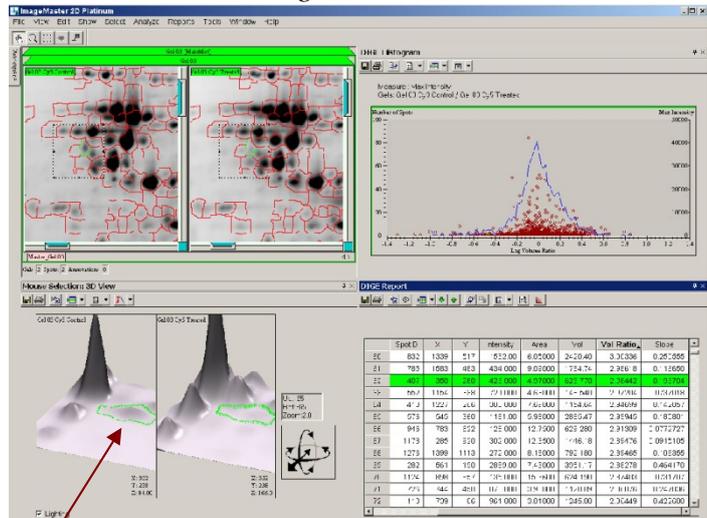


Figura 7 – Perfil eletroforético bidimensional (SDS-PAGE – Gradiente 5-20%, *strip* pI 4-7 NL) do veneno de *M. surinamensis*. Spots analisados no sistema *ImageMaster 2D Platinum 6.0*. Marcadores de massa molecular das toxinas do veneno de *Bothrops atrox*. Gel corado com Coomassie Blue R-250.

Sistema ImageMaster 2D-Platinum 6.0

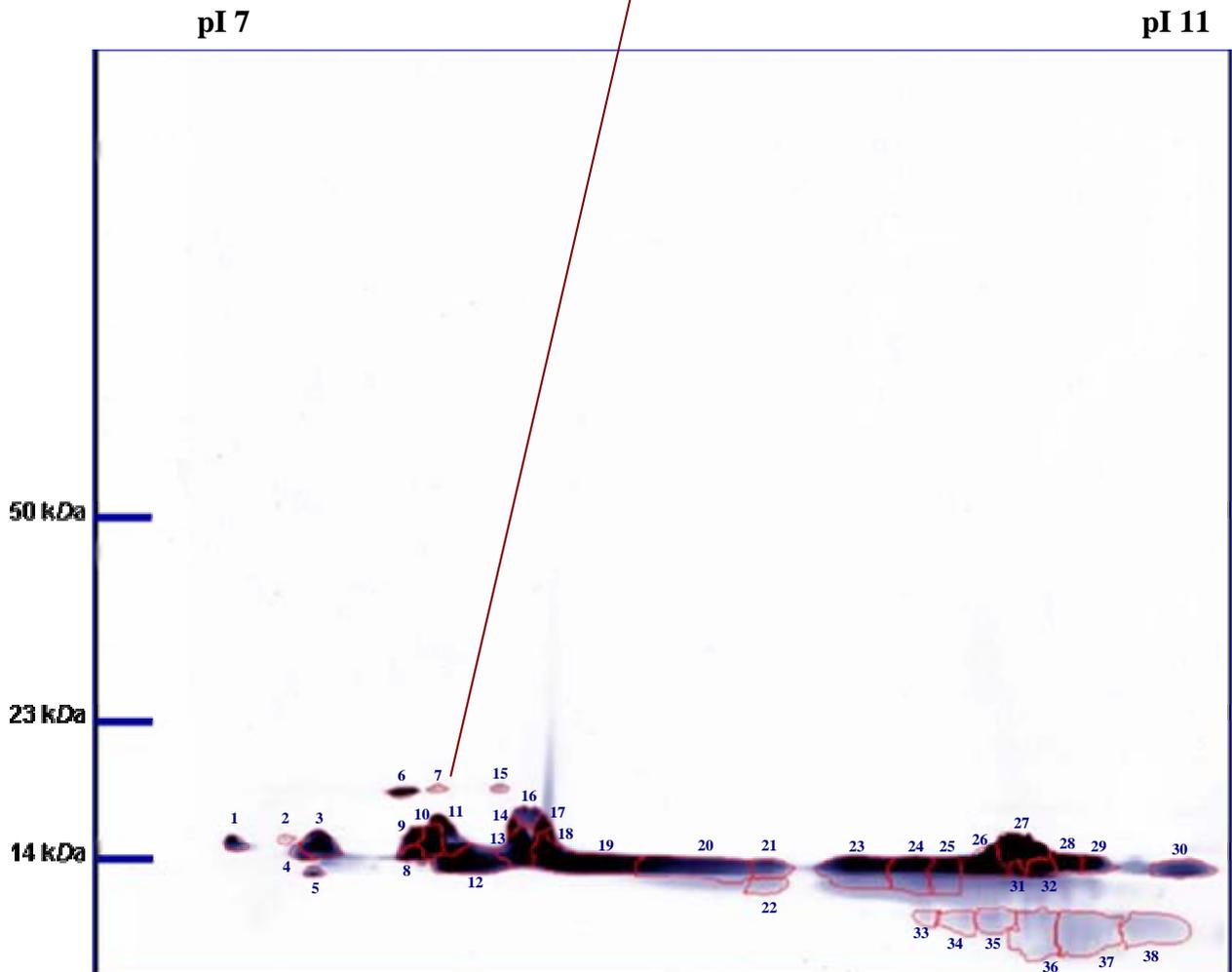
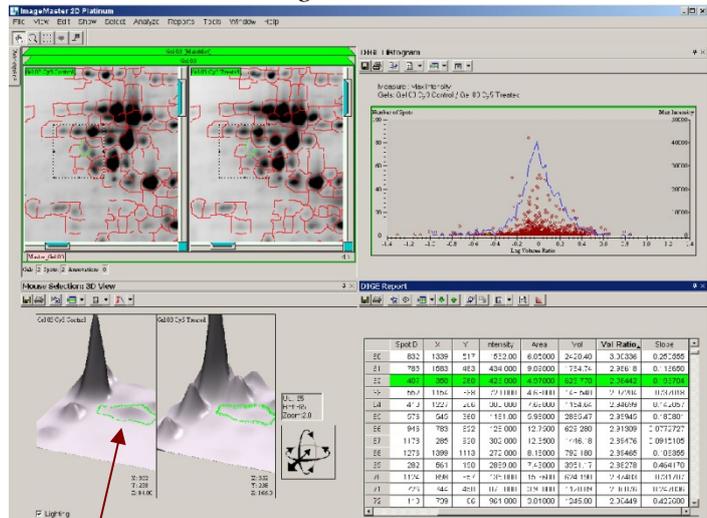


Figura 8 – Perfil eletroforético bidimensional (SDS-PAGE – Gradiente 5-20%, *strip* pI 7-11 NL) do veneno de *M. surinamensis*. Spots analisados no sistema *ImageMaster 2D Platinum 6.0*. Marcadores de massa molecular das toxinas do veneno de *Bothrops atrox*. Gel corado com Comassie Blue R-250.

4.2 Atividades Biológicas das Toxinas do Veneno de *Micrurus surinamensis*

O veneno de *M. surinamensis* apresentou letalidade bastante elevada quando inoculado pela via intravenosa (i.v.) e intracranial (i.c.).

Os animais que receberam diferentes doses do veneno por via intracranial ficaram sob observação para verificar possíveis atividades das toxinas no sistema nervoso central (SNC).

Os sintomas provocados pela inoculação intracranial de 0,2 µg, 1 µg, 2 µg e 4 µg do veneno da espécie em estudo e o tempo de atuação das toxinas no SNC dos camundongos estão descritos na Tabela 1.

Os sintomas provocados pela inoculação intracranial de 20 µL de solução salina fisiológica (controle para a atividade) foram respiração ofegante e apatia. Manifestações que desapareceram após 10 min da inoculação de solução salina fisiológica. Não houve morte.

Tabela 1 – Sintomas produzidos pelas toxinas de *Micrurus surinamensis* após injeção intracranial do veneno em camundongos (*Mus musculus*).

Dose (μg)	Tempo	Comportamento/Sintomas
0,2	< 1 min	Paralisia muscular total e dificuldade respiratória.
	30 min	Pulos enérgicos, sensibilidade ao tato e à audição, coceira compulsiva.
	1 h	Períodos de imobilidade, apatia.
	2:30 h	Recuperação dos sintomas normais. Todos os animais ficaram vivos após 24 horas.
1	< 1 min	Paralisia muscular total e dificuldade respiratória.
	25 min	Pulos enérgicos, sensibilidade ao tato e à audição, coceira compulsiva.
	35 min	Períodos de imobilidade, apatia.
	2:30 h	Recuperação dos sintomas normais. Todos os animais ficaram vivos após 24 horas.
2	< 1 min	Paralisia muscular total, dificuldade respiratória, leves espasmos nas patas posteriores.
	30 min	Convulsão seguida de morte.
4	< 1 min	Corpo estirado com a cabeça erguida para o alto, paralisia muscular total, dificuldade respiratória, leves espasmos.
	5 min	Pulos enérgicos, sensibilidade ao tato e à audição, espasmos nas patas posteriores, períodos de imobilidade e apatia.
	15 min	Convulsão seguida de morte.

De acordo com o teste de *Probitos*, o veneno mostrou uma DL_{50} intravenosa de 14 μg (16,8 – 11,3) por 20g do peso do animal (700 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

A capacidade de neutralização dos efeitos neurotóxicos do veneno de *M. surinamensis* pelo soro antielapídico nacional foi muito baixa, mostrando uma potência de 0,3 (0,5 – 0,02) mg/mL (veneno/soro). Já o soro antielapídico distribuído pelo Ministério da Saúde apresenta para o veneno de *M. frontalis* uma potência de 1,5 mg/mL .

Os sintomas provocados pela inoculação intravenosa de 1 μg , 10 μg , 15 μg e 20 μg do veneno de *M. surinamensis* e o tempo de atuação das toxinas no organismo dos camundongos estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Sintomas produzidos pelas toxinas de *Micrurus surinamensis* após injeção intravenosa do veneno em camundongos (*Mus musculus*).

Dose (µg)	Tempo	Comportamento/Sintomas
1	30 min	Ptose palpebral uni e bilateral, olhos lacrimejantes e apatia.
	1 h	Dificuldade respiratória, hipotonia muscular, leves espasmos nas patas posteriores.
	1:30 h	Coceira compulsiva (patas, genitália, cauda, cabeça, focinho e olhos), estiramento muscular das patas posteriores.
	2:30 h	Recuperação dos sintomas normais. Todos os animais ficaram vivos após 24 horas.
10	10 min	Dificuldade respiratória, hipotonia muscular, ptose palpebral uni e bilateral.
	1:30 h	Coceira compulsiva (patas, genitália, cauda, cabeça, focinho e olhos), estiramento muscular das patas traseiras.
	> 14 h	Hipotonia muscular, ptose palpebral uni e bilateral.
	24 h	Recuperação dos sintomas normais. Todos os animais ficaram vivos após 24 horas.
15	10 min	Dificuldade respiratória, hipotonia muscular, ptose palpebral uni e bilateral.
	30 min	Morte por parada respiratória.
20	< 1 min	Dificuldade respiratória, hipotonia muscular e exoftalmia.
	< 5 min	Morte por parada respiratória.

Foi verificada ausência de hemorragia na cavidade torácica, fossas nasais e genitálias dos animais que receberam 7,5 µg, 10 µg e 13 µg do veneno por via intravenosa. O sangue desses animais, após ser coletado, tornou-se coagulável no intervalo de tempo normal de coagulabilidade sangüínea dos camundongos (< 60 segundos).

Os animais que receberam doses altas do veneno (15 µg e 20 µg), imediatamente após o óbito, foram necropsiados e também não mostraram nenhuma atividade hemorrágica na cavidade torácica nem em outros locais visíveis do corpo, como nos órgãos genitais externos e no focinho.

O veneno mostrou-se altamente neurotóxico, causando a morte dos camundongos em poucos minutos. As toxinas do veneno, quando inoculadas *in vivo*, foram extremamente letais em doses maiores que 20 µg, causando paralisia muscular e respiratória imediatas.

4.3 Avaliação e Soroneutralização das Atividades Enzimáticas

4.3.1 Atividade da Fosfolipase A₂

Na concentração de 10 µg, o veneno de *M. surinamensis* apresentou, segundo a metodologia utilizada, atividade PLA₂; duas vezes menor que a atividade fosfolipásica A₂ do veneno de *Bothrops atrox* (10 µg do veneno utilizado como controle). No entanto, usando-se maiores concentrações do veneno de *M. surinamensis* foi observada similar atividade ao controle (Figura 9, Tabela 3).

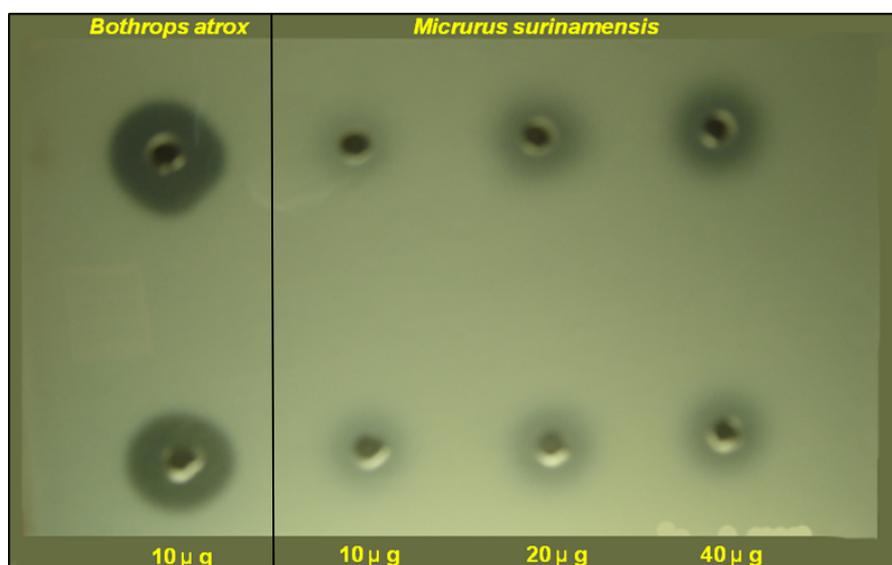


Figura 9 – Atividade fosfolipásica A₂, em gel de agarose, do veneno de *Micrurus surinamensis*: duplicata de 10 µg, 20 µg e 40 µg / 20 µL do veneno. Controle: 10 µg veneno de *Bothrops atrox*.

Tabela 3 – Atividade fosfolipásica (PLA₂) no veneno de *Micrurus surinamensis*.

Veneno (µg)	Halo (mm)	% Atividade PLA ₂
Controle*	11,25 ± 1,25	100
10	6,5 ± 1	57,7
20	8 ± 0	71,1
40	9 ± 1	80

*10 µg do veneno de *Bothrops atrox*.

O soro antielapídico, na proporção de 1:1, foi o único que inibiu 100% a atividade da PLA₂ do veneno de *M. surinamensis*. O soro trivalente, na mesma proporção, inibiu aproximadamente 30% a atividade desta enzima. Os demais soros, antiaracnídico, antilonômico e antiescorpiônico, na proporção de 1:1, não inibiram significativamente a atividade da PLA₂ do veneno de *M. surinamensis* (Figura 10, Tabela 4).

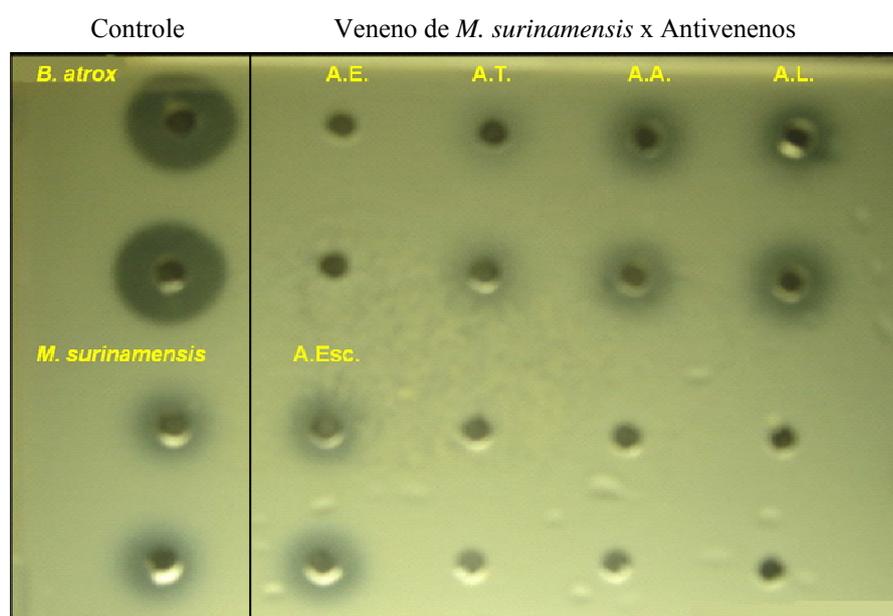


Figura 10 – Neutralização da atividade da PLA₂ do veneno de *M. surinamensis* com os antivenenos: antielapídico (A.E.), trivalente (A.T.), antiaracnídico (A.A.), antilonômico (A.L.) e antiescorpiônico (A.Esc.). Veneno/soro 1:1 em duplicatas. Controles: 10 µg do veneno de *Bothrops atrox* e 20 µg do veneno de *M. surinamensis* (duplicatas).

Tabela 4 – Neutralização da atividade fosfolipásica (PLA₂) no veneno de *Micrurus surinamensis*.

Soros	Halo (mm)	% Neutralização da Atividade PLA ₂
-	9,25 ± 0,25	0
Antielapídico	0	100
Trivalente	6,5 ± 1	29,7
Antiaracnídico	8,5 ± 0,5	8,1
Antilonômico	9 ± 0	2,7
Antiescorpiônico	8 ± 0,5	13,5

(-): controle positivo: 20 µg do veneno de *M. surinamensis*.

O soro antielapídico mostrou elevada eficácia quanto à neutralização da atividade PLA₂ (Figura 11). Em diferentes doses utilizadas do soro antielapídico (dose máxima de 20 µL e dose mínima de 1 µL) foi inibida 100% a atividade da PLA₂, segundo o sistema testado.

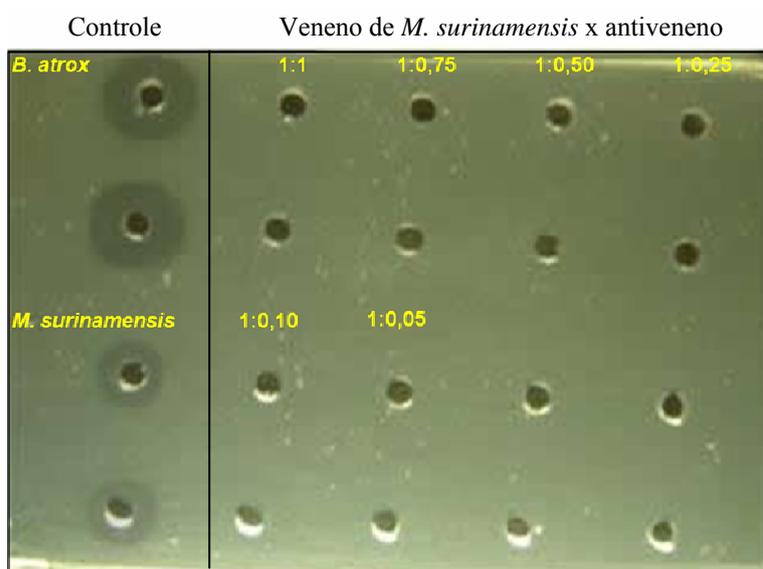


Figura 11 – Neutralização da atividade da PLA₂ do veneno de *M. surinamensis* com diferentes diluições do soro antielapídico (veneno/soro) em duplicata. Controles: 10 µg do veneno de *B. atrox* e 20 µg do veneno de *M. surinamensis* (duplicatas).

4.3.2 Atividade Proteolítica

Em relação à avaliação da atividade proteolítica no veneno de *M. surinamensis*, segundo o método utilizado - por zimograma, não foi detectada a presença de proteases caseinolíticas, fibrinolíticas e/ou gelatinolíticas no veneno da espécie estudada (dados não apresentados).

4.4 Atividade Anticoagulante: Tempo de Recalcificação

O veneno de *M. surinamensis* apresentou atividade anticoagulante *in vitro*, pois houve retardo no tempo de início da coagulação em relação ao controle. O plasma humano apresentou a formação de coágulo após 10 min para a menor dose do veneno (20 µg) e após 30 min para a maior dose (80 µg) (Tabela 5).

Tabela 5 – Efeito do veneno de *M. surinamensis* no tempo de recalcificação em plasma humano, utilizando como ativador da cascata de coagulação 20 µL de CaCl₂ 0,4 M.

Concentração do Veneno (µg)	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3	Média/DP
-	5'	7'	8'	6,6' ± 1,52
20	10'	12'	12'	11,33' ± 1,15
40	13'	16'	18'	15',66 ± 2,51
80	> 30'	> 30'	> 30'	30' ± 0

(-): somente CaCl₂ utilizado como controle. DP: desvio padrão.

4.5 Análise por Western Blotting - Interação Competitiva

Para esse teste foi usado o veneno branco de *M. surinamensis*, onde a proteína acima de 50 kDa não foi detectada, somente as toxinas com massa molecular < 20 kDa.

Segundo a figura 12, o controle para a análise por western blotting com o soro antielapídico revelou, com baixa intensidade, proteínas de 7-20 kDa (reação-cruzada antígeno-anticorpo). A detecção com o sistema antiveneno (4 μ L) x veneno (5 μ g, 20 μ g e 80 μ g), previamente incubado a 37°C por 30 min, revelou apenas a banda de aproximadamente 14 kDa, porém com diferentes intensidades. As proteínas foram somente detectadas após uma hora da reação com o substrato para a peroxidase.

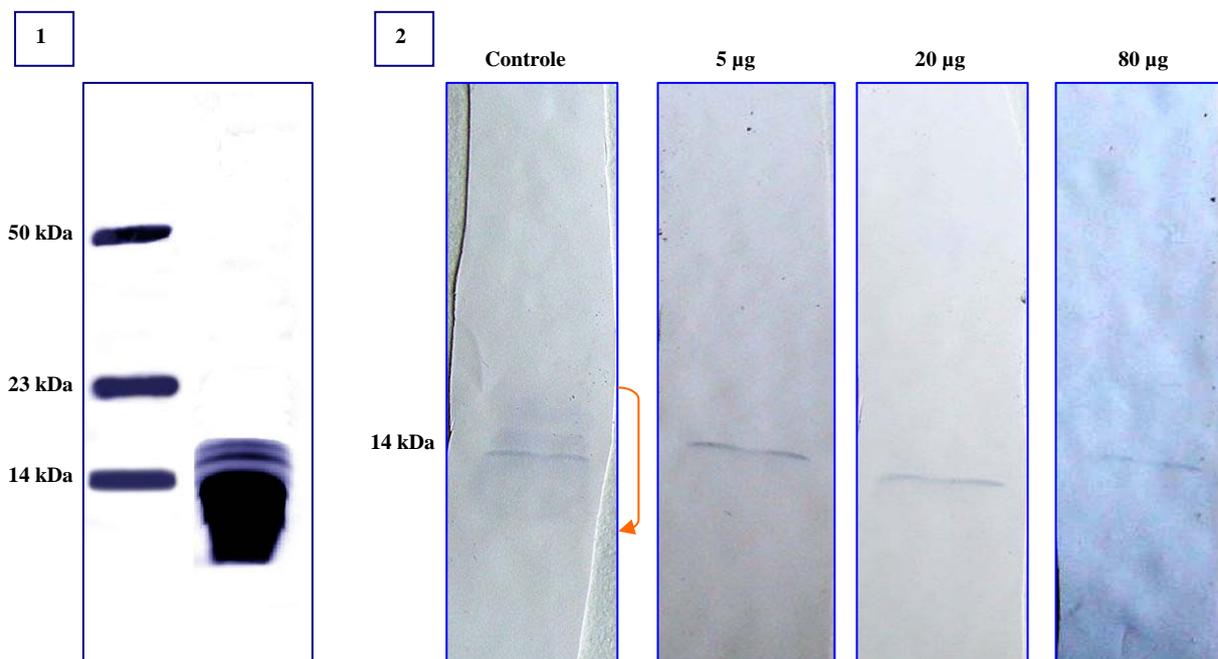


Figura 12 – Perfil eletroforético SDS-PAGE com Gradiente de 5-20% (1) com 20 μ g do veneno de *M. surinamensis*, em condições não-redutoras. Immunoperfis com anticorpos policlonais do soro antielapídico (2): controle, detecção com o sistema antiveneno (4 μ L) x veneno (5 μ g, 20 μ g e 80 μ g) previamente incubado a 37° C por 30 min. Marcadores de massa molecular das toxinas do veneno de *Bothrops atrox* à esquerda. Gel corado com Comassie Blue R-250.

5. DISCUSSÃO

O veneno das serpentes da família Elapidae é constituído por uma mistura complexa de proteínas, onde cerca de 90-95% desses componentes protéicos são neurotoxinas com massas moleculares entre 6-9 kDa (Perkins & Tomer, 1995; Perkins *et al.*, 1993).

DA SILVA JR. *et al.* (1991) verificaram que as proteínas dos venenos de diferentes espécies do género *Micrurus* apresentam massa molecular de 6,4-10,3 kDa e 101-140 kDa, sendo que *M. surinamensis* diferiu das demais por apresentar, em sua maioria, peptídeos com massas moleculares entre 6,1-7,5 kDa e 12,1-13,5 kDa. De acordo com MORAES *et al.* (2003) e ALAPE-GIRÓN *et al.* (1994a), os perfis eletroforéticos das proteínas dos venenos micrúricos são bastante semelhantes, pois mostram, em geral, bandas distribuídas entre 7-84 kDa: <12 kDa (43%), 14-32 kDa (47%) e >50 kDa (10%).

O perfil molecular das proteínas do veneno de *M. surinamensis*, do presente trabalho, exibiu principalmente bandas com massas moleculares entre aproximadamente 7-20 kDa, sendo que a banda com maior massa molecular apresentou cerca de 70 kDa.

Os nossos resultados revelam similaridade aos descritos pelos autores citados, onde as proteínas com massa molecular abaixo de 14 kDa foram em maior número e em maior intensidade, confirmando também com os estudos de ALAPE-GIRÓN *et al.* (1994b).

É bastante comum a semelhança no modelo SDS-PAGE (reduzido e não-reduzido) entre as espécies de *Micrurus*, assim como entre os diferentes gêneros da família Elapidae do Novo e Velho Mundo (Kulkeaw *et al.*, 2007; Tan & Ponnudurai, 1992). E a analogia entre os constituintes moleculares pode estar associada também aos sintomas provocados pelas toxinas dos venenos elapídicos.

Um estudo previamente realizado por LÓPEZ-LOZANO (2002), sobre a análise proteômica do veneno de *M. surinamensis*, mostrou que os principais constuintes protéicos foram aqueles com massa molecular entre 6-14 kDa. A seqüência N-terminal dos aminoácidos (AAs) de alguns desses peptídeos de baixa massa molecular (≤ 15 kDa) presentes no veneno

dessa espécie mostram alta similaridade com: metaloproteases, neurotoxinas, precursores de L-aminoácido oxidase (LAO), toxinas “fracas” e PLA₂ (Olamendi-Portugal *et al.*, 2008).

A metodologia utilizada por OLAMENDI-PORTUGAL *et al.* (2008), com o uso de fitas de focalização isoeétrica de 7 cm, possibilitou a visualização de apenas 30 spots na faixa de pI 3-10 NL. Por análise proteômica foram detectadas neurotoxinas, citotoxinas e PLA₂ (abaixo de 15 kDa); e um único spot detectado acima de 50 kDa sugere tratar-se de uma enzima LAO.

No sistema bidimensional (SDS-PAGE 12,5%), pI 3-10 NL, do presente trabalho foram visualizados 43 spots no veneno de *M. surinamensis*, distribuídos uniformemente nessa faixa de pH. A maioria dos spots apresentaram baixa massa molecular (12-20 kDa), podendo tratar-se de neurotoxinas (evidenciados também em pH básico - pI 7-11). O único spot acima de 50 kDa visualizado no estudo anterior, pode ser, no presente trabalho, evidenciado por 17 spots com aproximadamente a mesma massa molecular e diferentes pIs, sugerindo possíveis isoformas protéicas. Possíveis isoformas foram também detectadas na faixa de pH ácido (pI 4-7), onde mais de 60% das proteínas apresentaram alta massa molecular.

Esses resultados mostram que é necessário um estudo mais aprofundado sobre a análise das proteínas do veneno de *M. surinamensis*, já que este revelou um maior número de spots tanto em pH ácido como em pH básico, que até o momento não foram identificados.

O proteoma do veneno de uma espécie elapídica asiática (*Naja kaouthia*) mostrou similaridade com o de *M. surinamensis*, porém com um número menor de spots detectados (24 spots). As proteínas entre 7-20 kDa foram identificadas como PLA₂, neurotoxinas, citotoxinas/cardiotoxinas, toxinas “fracas”, entre outros (Kulkeaw *et al.*, 2007).

Ainda não está claro se as enzimas acima de 50 kDa do veneno de *M. surinamensis* são realmente LAO. No veneno de *M. spixii*, por exemplo, as enzimas com elevada massa molecular (>70 kDa) foram identificadas com atividade fosfatase alcalina e acetilcolinesterase

(Remuzgo *et al.*, 2002). A acetilcolinesterase apresenta-se em maior quantidade nos venenos elapídicos do Velho Mundo (Frobert *et al.*, 1997), entretanto, muitas dessas espécies possuem altos níveis de fasciculinas (peptídeos que inibem reversivelmente a atividade da acetilcolinesterase).

Constam também nos venenos elapídicos proteínas com múltiplas isoformas. Foram isoladas, de algumas espécies, isoenzimas com pH básico e massa molecular de 8-13 kDa que expressam as mais variadas atividades biológicas: cardiotoxícas, neurotóxicas, PLA₂, hemorrágica, algumas denotam letalidade com hemoptose e hemoglobinúria (Chang *et al.*, 2000; Francis *et al.*, 1997; Takasaki *et al.*, 1990). Por outro lado, as possíveis isoformas presentes no veneno da espécie do presente trabalho apresentam massa molecular acima de 50 kDa e pH ácido (pI 4-7). É preciso identificar quais são estas isoenzimas e quais suas atividades biológicas *in vivo* e *in vitro*.

As atividades biológicas *in vivo* das toxinas do veneno de *M. surinamensis*, no presente trabalho, revelaram ausência de hemorragia e presença dos sintomas comuns para esse gênero: ptose palpebral uni e/ou bilateral, hipotonia muscular, espasmos, insuficiência respiratória, algumas vezes foi evidenciada exoftalmia, porém, possivelmente ocasionada pela asfixia. O veneno exibiu elevada neurotoxicidade (DL₅₀ = 700 µg/kg), causando morte por paralisia respiratória em poucos minutos após a inoculação do veneno. A DL₅₀ foi semelhante à de SOBRINHO (2000), que foi de 739 µg/kg.

SOBRINHO (2000) revelou alguns sintomas provocados pelas toxinas de *M. surinamensis* que não foram detectados no atual trabalho, como: cianose da cauda, focinho e patas, além de hemorragia local, nas narinas, genitálias, tórax e pulmões, e incoagulabilidade sangüínea. No entanto, esses sintomas foram evidentes devido às doses elevadas do veneno (15-20µg) inoculadas em um volume de 500 µL por via intravenosa. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) e o Conselho de Ética quanto ao uso de camundongos em

experimentos *in vivo*, somente o conteúdo de 200 µL podem ser inoculados por essa via, pois um valor maior provocaria um excesso de líquido na corrente sanguínea, que equivale a duas vezes a quantidade normal de líquido na circulação. Esse excesso poderia ter gerado sintomas incomuns, talvez não provocados pelas toxinas do veneno dessa espécie, como hemorragia generalizada, ocasionada possivelmente pelo rompimento dos vasos sanguíneos ou colapso das válvulas do coração.

As toxinas dos venenos das espécies do gênero *Micrurus*, geralmente, não ocasionam hemorragia local nem sistêmica e induzem leve mionecrose (Gutiérrez *et al.*, 1980).

Segundo estudos de BARROS *et al.* (1994), o veneno de *M. surinamensis* revelou ausência de miotoxicidade, hemorragia e edema, o que comprovam os estudos de GUTIÉRREZ *et al.* (1983).

Em elevadas concentrações, o veneno de *M. altirostris* não induz hemorragia, dermonecrose ou atividade coagulante (Moraes *et al.*, 2003). Por outro lado, o veneno da espécie amazônica *M. averyi*, em uma concentração de 100µg/animal, apresenta atividade hemorrágica (Barros *et al.*, 1994).

Muitas vezes não somente o veneno total, mas também toxinas isoladas, como PLA₂, induzem severa hemorragia nos pulmões e mioglobinúria (Francis *et al.*, 1997). Portanto, não são todos os venenos elapídicos que provocam hemorragia nos órgãos vitais das presas (Shashidharamurthy & Kemparaju, 2006). Geralmente, por causa da enorme letalidade das neurotoxinas, esses sintomas não são evidenciados.

As proteases dos venenos de serpentes, serino e metaloproteases, são enzimas que degradam proteínas do tecido de mamíferos no local da picada e clivam algumas proteínas do plasma sanguíneo. Essas enzimas podem apresentar ambas as atividades fibrinolítica (anticoagulante) e fibrinogenolítica (coagulante = trombina-like), podendo ser ativadoras ou inibidoras da coagulação sanguínea, fibrinólise e agregação plaquetária (Jin *et al.*, 2007; Kini,

2005; Kini & Evans, 1991). Essas enzimas proteolíticas são as que provocam lesões bastante graves no organismo das vítimas, como hemorragia nos órgãos vitais e impedimento da circulação sanguínea por meio de formações de coágulos, causando necrose.

No veneno de *M. spixii* foi encontrada baixa concentração de um fator procoagulante (42,2 kDa), que produz coagulação sanguínea em plasma humano, além de baixa atividade proteolítica (Remuzgo *et al.*, 2002).

Os venenos de algumas espécies do gênero *Naja*, *Bungarus* e *Micrurus* não apresentam atividades proteolíticas sobre gelatina, caseína e fibrinogênio e são capazes de induzir coágulo sobre fibrinogênio bovino e sobre plasma humano (Zhang *et al.*, 1995; Tambourgi *et al.*, 1994). O veneno da espécie do presente estudo também não apresentou tais atividades proteolíticas *in vitro* sobre esses substratos, além de evidenciar ausência de atividade desfibrinogenante, confirmando assim, os estudos feitos com os venenos de espécies de corais amazônicas ao revelarem a ausência de atividade coagulante no veneno de *M. surinamensis* (Barros *et al.*, 1994).

No presente estudo, uma quantidade elevada do veneno de *M. surinamensis* foi capaz de provocar, *in vitro*, um aumento no tempo de coagulação do plasma humano, sugerindo atividade anticoagulante por inibição dos fatores da cascata de coagulação do sangue, possivelmente pela presença de algumas toxinas com essa atividade presentes no veneno desta espécie.

Algumas fofolipases A₂ inativam os fatores da coagulação sanguínea, impedindo o mecanismo da cascata de coagulação. Uma PLA₂ fortemente anticoagulante do veneno de *Naja nigricollis*, por exemplo, liga-se com especificidade ao fator Xa da coagulação, competindo com o fator Va e bloqueando a formação do complexo protrombinase, por meio de mecanismos não-enzimáticos (Kerns *et al.*, 1999).

Há também a presença de proteases com potente inibição da agregação plaquetária mesmo na ausência de fibrinogênio no plasma (Kini & Evans, 1991).

Os venenos de algumas espécies micrúricas, no entanto, mostram atividade anticoagulante e PLA₂ (Cecchini *et al.*, 2005; Tan & Ponnudurai, 1992), o que foi observado em *M. surinamensis* do presente estudo, que apresentou também atividade anticoagulante (até 30 min em elevada concentração do veneno) e baixa atividade PLA₂, a qual foi eficientemente inibida pelo soro antielapídico (1 µL do soro foi capaz de inibir 20 µg do veneno com atividade PLA₂).

Além dessas enzimas, foram detectados nos venenos elapídicos inibidores de serinoproteases com estrutura similar a α -neurotoxinas, com baixa massa molecular (7 kDa) (Chang *et al.*, 2001; Tytgat *et al.*, 2001), que justifica, possivelmente, que algumas toxinas presentes no veneno de *M. surinamensis* possam estar inibindo as serinoproteases que participam no processo de coagulação do plasma humano e, dessa forma, retardam o tempo de início da coagulação.

As toxinas do veneno de *M. surinamensis* são, em sua maioria, neurotoxinas extremamente letais em camundongos. A diferença na composição enzimática de suas toxinas sugere uma diferente história evolutiva em relação às outras espécies do gênero, pois a biologia dessa serpente é diferente de todas as outras (Aird & Da Silva Jr, 1991).

As neurotoxinas afetam diretamente o sistema nervoso. Por isso, quando os humanos são envenenados, considera-se um caso emergencial e os antivenenos são usados como tratamento terapêutico.

As α -neurotoxinas e as PLA₂ neurotóxicas são as responsáveis pela letalidade do veneno em camundongos, e quando inoculadas diretamente no sistema nervoso central (SNC), por via intracranial, tornam-se dez vezes mais letais. Assim, mesmo não apresentando

toxicidade no sistema nervoso periférico (SNP), desenvolvem notável toxicidade em quantidades bem menores no SNC (Rosso *et al.*, 1996).

Essas neurotoxinas ocasionam extensas lesões na região rostrocaudal do cérebro, como no córtex cerebral e proeminentes injúrias na substância branca dos hemisférios, no corpo caloso e no fórnix. Além de danos no hipocampo (Clapp *et al.*, 1995).

Quatro frações protéicas (7-22 kDa), com atividade PLA₂ neurotóxica, isoladas do veneno de *M. lemniscatus* induziram severos sintomas de intoxicação no SNC de camundongos. Em pequenas doses (1, 1,4 e 2,1 µg/µL) foi possível detectar, nas primeiras 3 horas após a inoculação, uma variedade de sintomas: espasmos, coceira compulsiva, pulos enérgicos, vocalização, inquietos (andando em círculo e correndo), imobilização das patas posteriores com estiramento dos músculos da parte anterior do corpo, dificuldade respiratória, salivação, convulsão límbica, curta descarga epiléptica no córtex e no hipocampo, dispnéia, episódios de convulsão presentes até mesmo após 24h da inoculação do veneno, seguida de morte (80% dos animais). Na maior dose (4,5 µg/µL), os animais apresentaram severa intoxicação, com atividade motora reduzida, hipersensibilidade ao tato e audição, agressividade e morte. A análise histológica mostrou lesões caracterizadas por uma massiva perda neuronal na região do hipocampo (Oliveira *et al.*, 2008).

O presente trabalho mostrou que o veneno de *M. surinamensis* tem elevada neurotoxicidade tanto no SNP como no SNC e muitos dos sintomas neurológicos foram similares aos de OLIVEIRA *et al.* (2008), sugerindo que há toxinas no veneno das cobras corais que atuam em células do SNC, mostrando possível afinidade molecular a determinadas regiões do cérebro, como o córtex e o hipocampo, que afetam de maneira drástica o controle motor e a memória, respectivamente.

Porém, análises histopatológicas e por eletroencefalograma são necessárias para comparar possíveis diferenças e/ou analogias quanto à ação das neurotoxinas dos venenos

micrúricos nas células cerebrais, ou seja, onde especificamente as toxinas estão ligando-se e também para averiguar quais as regiões do cérebro que estão sendo prejudicadas.

O córtex cerebral, região em que foi inoculado o veneno, constitui a superfície dos hemisférios cerebrais. As áreas corticais e respectivas funções são divididas em: córtex motor (localizado na face medial do hemisfério, no lobo frontal) com funções motoras; e os centros sensitivos de projeção, que são as áreas corticais nas quais terminam as fibras sensitivas de projeção que trazem impulsos visuais, acústicos, olfatórios e das sensações gerais superficiais e profundas (Erhart, 1974). Contudo, funções específicas não podem ser atribuídas apenas a determinadas áreas isoladas, pois o sistema nervoso age sempre como um todo.

Micrurus surinamensis é a única espécie que apresenta significativa diferença em seu perfil imunológico, a qual seus componentes tóxicos pouco reagem com o soro antielapídico (Alape-Girón *et al.*, 1994a).

No presente trabalho, o soro antielapídico reagiu, com pouca intensidade, com as neurotoxinas < 10 kDa. Portanto, a banda de aproximadamente 14 kDa foi eficientemente reconhecida pelo soro. Pode-se observar que, quando há um aumento na concentração de antígenos presentes no sistema testado, os anticorpos que reconhecem tais toxinas de baixa massa molecular são esgotados, ou seja, sugere-se que haja uma escassa quantidade de anticorpos capazes de neutralizar tais atividades neurotóxicas.

Nossas análises *in vivo* mostraram baixa eficácia do soro antielapídico em neutralizar as neurotoxinas do veneno de *M. surinamensis*, já que 1 mL do antiveneno inibiu apenas 0,3 mg do veneno dessa espécie. Mas, mesmo havendo essas diferenças, muitas vezes altas concentrações do antiveneno são capazes de neutralizar completamente a atividade neurotóxica dos venenos (Fry *et al.*, 2001).

No entanto, os anticorpos que reconheceram as proteínas de aproximadamente 14 kDa do veneno de *M. surinamensis* estão presentes em abundância e possivelmente podem ser enzimas PLA₂, pois estas foram eficientemente neutralizadas pelo soro antielapídico nacional.

Um estudo sobre a análise por western blot 2D-SDS-PAGE do veneno de *Naja* revelou reação-cruzada do soro antielapídico somente com as PLA₂ e algumas proteínas de alta massa molecular (Kulkeaw *et al.*, 2007).

Devido à enorme variação regional entre as diversas espécies micrúricas, há uma acentuada variabilidade na composição enzimática dos venenos dessas serpentes, o que leva muitas vezes à ineficiência do soro antielapídico polivalente em neutralizar os efeitos neurotóxicos dos venenos. O soro antielapídico, frequentemente, reconhece os diferentes componentes dos venenos micrúricos, principalmente aqueles entre 29-84 kDa, entretanto, bandas com massa molecular abaixo de 29 kDa são fracamente coradas (Moraes *et al.*, 2003).

A variação geográfica, a dieta, a filogenia e as mutações implicam a diversidade na composição do veneno das serpentes peçonhentas. O estudo dessa variação é importante para um adequado tratamento das vítimas acidentadas por esses animais, com a utilização de um antiveneno capaz de neutralizar todos os efeitos enzimáticos e farmacológicos das toxinas. Segundo DALTRY *et al.* (1996), a preferência na dieta é o principal fator nas diferenças da composição do veneno. Porém, outras forças evolutivas por seleção natural podem explicar a grande variação dos componentes dos venenos, como possíveis mutações entre os alelos para uma mesma enzima (substituições aleatórias de AAs), causando modificações estruturais nas proteínas (Sasa, 1999).

M. surinamensis, por ser uma espécie que se alimenta preferencialmente de peixes, apresenta considerável distinção na composição enzimática do seu veneno em relação às outras espécies (da Silva Jr. & Aird, 2001). Possivelmente associado a mudanças estruturais nas suas toxinas, apresentando epítomos imunogênicos espécie-específicos. Isso pode implicar

a baixa eficácia neutralizante do soro contra esses componentes, observado no presente trabalho. O que leva à diferença na composição de anticorpos produzidos pelo veneno de *M. frontalis* (usado para a produção do soro antielapídico) em relação ao veneno de *M. surinamensis*.

Estudos *in vitro* de SILVA *et al.*(2001) mostraram que o soro antielapídico é capaz de reconhecer as principais bandas do veneno de *M. surinamensis*. No entanto, estudos *in vivo* revelam que o antiveneno polivalente apresenta baixa eficácia neutralizante dos efeitos neurotóxicos do veneno dessa espécie, e que de todas as espécies estudadas, esta foi a única que mostrou baixa relação imunológica com os demais venenos testados (Bolaños *et al.*, 1978).

Há sugestões na literatura de que a capacidade de neutralização de determinado antiveneno pode ser aprimorada pela inclusão de um largo espectro de espécies de *Micrurus* no pool de venenos usados no protocolo de imunização (Higashi *et al.*, 1995).

Embora o antiveneno antielapídico produzido pelo Instituto Butantan apresente razoável reatividade cruzada com os componentes de baixa massa molecular do veneno de *Micrurus surinamensis*, esse antiveneno foi pouco eficaz na neutralização da letalidade em camundongos. Sugerem-se mais estudos básicos e clínicos para a produção ou não de um antiveneno monovalente ou a inclusão do veneno dessa espécie no *pool* de venenos utilizados para a produção do antiveneno comercial; e também estudos moleculares para a busca de toxinas com possíveis potenciais biotecnológicos.

6. CONCLUSÕES



Os estudos realizados com as toxinas do veneno de *Micrurus surinamensis* permitem concluir que:

- ✓ A maioria dos constituintes protéicos do veneno são toxinas de baixa massa molecular, abaixo de 14 kDa, principalmente de 7 kDa;
- ✓ As proteínas com pI ácido foram em maior número;
- ✓ Há possíveis isoformas protéicas com elevada massa molecular (>50 kDa);
- ✓ O veneno é altamente neurotóxico e apresenta acentuada letalidade (DL₅₀ 700 µg/kg);
- ✓ As neurotoxinas do veneno afetam o sistema nervoso periférico (por via intravenosa) e o sistema nervoso central (por via intracranial). Essas toxinas, ao ligarem-se a alvos específicos, causam paralisia muscular e morte por asfixia, seguida de convulsão instantânea;
- ✓ O veneno apresenta baixa atividade PLA₂, que é eficientemente inibida pelo soro antielapídico;
- ✓ Não foram detectadas enzimas proteolíticas no veneno pelo teste *in vitro* por zimograma;
- ✓ Atividade anticoagulante *in vitro* foi evidenciada;
- ✓ Não foi detectada atividade hemorrágica nos órgãos vitais de camundongos;
- ✓ O soro antielapídico reconheceu, com pouca intensidade, as proteínas de baixa massa molecular (<20 kDa), sendo que as de aproximadamente 14 kDa foram detectadas em maior quantidade. No entanto, *in vivo*, o soro mostrou baixa eficácia quanto à neutralização dos sintomas neurotóxicos causados pelo veneno.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS



Este trabalho pode ser complementado com os seguintes estudos:

- ✓ Seqüenciamento completo tridimensional das principais neurotoxinas para a realização da homologia comparativa com outras neurotoxinas elapídicas;
- ✓ Estudo histopatológico e eletroencefalograma para averiguar com exatidão quais áreas do cérebro as neurotoxinas estão ligando-se ou atuando;
- ✓ Realizar a análise de cristalografia de algumas neurotoxinas e o uso de bioinformática como ferramenta para um maior entendimento na relação estrutura-função;
- ✓ Isolar e caracterizar bioquímica e farmacologicamente as neurotoxinas de baixa massa molecular (<14 kDa) para a possível produção de soros monoclonais/policlonais específicos contra a neurotoxicidade do veneno em mamíferos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

+

- AHN, M.Y.; LEE, B.M.; KIM, Y.S. Characterization and Cytotoxicity of L-Amino Acid Oxidase from the Venom of King Cobra (*Ophiophagus hannah*). *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v. 29, n. 6, p. 911-919, 1997.
- AIRD, S.D.; DA SILVA Jr., N.J. Comparative Enzymatic Composition of Brazilian Coral Snake (*Micrurus*) Venoms. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 99B, n. 2, p. 287-294, 1991.
- ALAPE-GIRÓN, A.; GUSTAFSSON, B.; LOMONTE, B.; THELESTAM, M.; GUTIÉRREZ, J.M. Immunochemical Characterization of *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus* Venom with Monoclonal and Polyclonal Antibodies. *Toxicon*, v. 32, n. 6, p. 695-712, 1994a.
- ALAPE-GIRÓN, A.; LOMONTE, B.; GUSTAFSSON, B.; DA SILVA, N.J.; THELESTAM, M. Electrophoretic and Immunochemical Studies of *Micrurus* Snake Venoms. *Toxicon*, v. 32, n. 6, p. 713-723, 1994b.
- ARNI, R.K.; WARD, R.J. Phospholipase A₂ – A structural review. *Toxicon*, v. 34, n. 8, p. 827-841, 1996.
- BARROS, A.C.S.; FERNANDES, D.P.; FERREIRA, L.C.L.; SANTOS, M.C. Local effects induced by venoms from five species of genus *Micrurus* sp. (coral snakes). *Toxicon*, v. 32, n. 4, p. 445-452, out. 1994.
- BOLAÑOS, R.; CERDAS, L.; ABALOS, J.W. Venenos de las serpientes coral (*Micrurus* spp.): informe sobre um antiveneno polivalente para las Americas. *Bol. Of. Sanit. Panam.*, v. 84, n. 2, p. 128-133, fev. 1978.
- BOUGIS, P.E.; MARCHOT, P.; ROCHAT, H. *In vivo* synergy of cardiotoxin and phospholipase A₂ from the elapid snake *Naja mossambica mossambica*. *Toxicon*, v. 25, n. 4, p. 427-431, 1987.
- BOUGIS, P.E.; MARCHOT, P.; ROCHAT, H. Characterization of Elapidae snake venom components using optimized reverse-phase high-performance liquid chromatographic conditions and screening assays for α -neurotoxin and phospholipase A₂ activities. *Biochemistry*, v. 25, p. 7235-7243, 1986.
- BRILLARD-BOURDET, M.; NGUYÊN, V.; FERRER-DI MARTINO, M.; GAUTHIER, F.; MOREAU, T. Purification and Characterization of a New Cystatin Inhibitor from Taiwan Cobra (*Naja naja atra*) Venom. *Biochem. J.*, v. 331, p. 239-244, 1998.

- BUCARETCHI, F.; HYSLOP, S.; VIEIRA, R.J.; TOLEDO, A.S.; MADUREIRA, P.R.; CAPITANI, E.M. Bites coral snakes (*Micrurus* spp.) in Campinas, state of São Paulo, southeastern Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, v. 48, n. 3, p. 141-145, maio/jun. 2006.
- BÜHRNHEIM, P.F.; LIMA, H.C.L.; OLIVEIRA, M.E.E.S. Ocorrência de serpentes peçonhentas na Amazônia e acidentes ofídicos no Amazonas. Livro de resumos XXIV Congresso da Sociedade de Medicina Tropical, 119, 1988.
- CARREDANO, E.; WESTERLUND, B.; PERSSON, B.; SAARINEN, M.; RAMASWAMY, S.; EAKER, D.; EKLUND, H. The three-dimensional structures of two toxins from snake venom throw light on the anticoagulant and neurotoxic sites of phospholipase A₂. *Toxicon*, v. 36, n. 1, p. 75-92, 1998.
- CECCHINI, A.L.; MARCUSSI, S.; SILVEIRA, L.B.; BORJA-OLIVEIRA, C.R.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; AMARA, S.; STÁBELI, R.G.; GIGLIO, J.R.; ARANTES, E.C.; SOARES, A.M. Biological and enzymatic activities of *Micrurus* sp. (coral) snake venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, v. 140, p. 125-134, 2005.
- CHAIM-MATYAS, A.; BORKOW, G.; OVADIA, M. Synergism between cytotoxin P4 from the snake venom of *Naja nigricollis nigricollis* and various phospholipases. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 110B, n. 1, p. 83-89, 1995.
- CHANG, L.S.; CHUNG, C.; HUANG, H.B.; LIN, S.R. Purification and Characterization of a Chymotrypsin Inhibitor from the Venom of *Ophiophagus hannah* (King Cobra). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 283, p. 862-867, 2001.
- CHANG, L.S.; HUANG, H.B.; LIN, S.R. The Multiplicity of Cardiotoxins from *Naja naja atra* (Taiwan Cobra) Venom. *Toxicon*, v. 38, p. 1065-1076, 2000.
- CLAPP, L.E.; KLETTE, K.L.; DECOSTER, M.A.; BERNTON, E.; PETRAS, J.M.; DAVE, J.R.; LASKOSKY, M.S.; SMALLRIDGE, R.C.; TORTELLA, F.C. Phospholipase A₂-induced neurotoxicity *in vitro* and *in vivo* in rats. *Brain Research*, v. 693, p. 101-111, 1995.
- CUNHA, O.R.; NASCIMENTO, F.P. Ofídios da Amazônia X: as cobras da região leste do Pará. Museu Paraense Emílio Goeldi, 1978.
- DA SILVA Jr, N.J.; AIRD, S.D. Prey specificity, comparative lethality and compositional differences of coral snake venoms. *CBP Part C*, v. 128, p. 425-456, 2001.

- DA SILVA Jr., N.J.; GRIFFIN, P.R.; AIRD, S.D. Comparative Chromatography of Brazilian Coral Snake (*Micrurus*) Venoms. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 100B, n. 1, p. 117-126, 1991.
- DALTRY, J.C.; WÜSTER, W.; THORPE, R.S. Diet and snake venom evolution. *Nature*, v. 379, p. 537-540, 1996.
- DE HASS, G.H.; POSTEMA, N.M.; NIEUWENHUIZEN, W.; VAN DEENEN, L.L.M. Purification and properties of phospholipase A from porcine pancreas. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 159, 103-110, 1968.
- DOS SANTOS, M.C.; MARTINS, M.; BOECHAT, A.L.; NETO, R.P.S.; OLIVEIRA, M.E. Serpentes de Interesse Médico da Amazônia: Biologia, Venenos e Tratamento de Acidentes. Manaus: UA/SESU. 1995. 70p.
- DUNN, R.D.; BROADY, K.W. Snake inhibitors of phospholipase A2 enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1533, p. 29-37, 2001.
- ERHART, E.A. *Neuranatomia*. 5. ed. Editora Ateneu, São Paulo, 1974. 429 p.
- FINNEY, D.J. *Probit analysis*. 3. ed. Cambridge University Press, 1971. 356 p.
- FRANCIS, B.R.; DA SILVA, N.J.; SEEBART, C.; SILVA, L.L.C.; SCHIMIDT, J.J.; KAISER, I.I. Toxins isolated from the venom of the brazilian coral snake (*Micrurus frontalis frontalis*) include hemorrhagic type phospholipases A₂ and postsynaptic neurotoxins. *Toxicon*, v. 35, n. 8, p. 1193-1203, 1997.
- FROBERT, Y.; CRÉMINON, C.; COUSIN, X.; RÉMY, M.H.; CHATEL, J.M.; BON, S.; BON, C.; GRASSI, J. Acetylcholinesterases from Elapidae snake venoms: biochemical, immunological and enzymatic characterization. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1339, p. 253-267, 1997.
- FRY, B.G.; WICKRAMARATNA, J.C.; JONES, A.; ALEWOOD, P.F.; HODGSON, W.C. Species and regional variations in the effectiveness of antivenom against the *in vitro* neurotoxicity of Death adder (*Acanthophis*) venoms. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 175, p. 140-148, 2001.
- GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B.; PORTILLA, E.; CERDAS, L.; ROJAS, E. Local effects induced by coral snake venoms: evidence of myonecrosis after experimental inoculations of venoms from five species. *Toxicon*, v. 21, n. 6, p. 777-783, 1983.

- GUTIÉRREZ, J.M.; CHAVES, F.; ROJAS, E.; BOLAÑOS, R. Efectos locales inducidos por el veneno de la serpiente coral *Micrurus nigrocinctus* em ratón blanco. *Toxicon*, v. 18, p. 633-639, jun. 1980.
- HEUSSEN, C.; DOWDLE, E. B. Eletrophoretic analisys of plasminogen activators in poliacrilamide gels containg sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal. Biochem.*, v. 102, n. 1, p. 196-202, Fev. 1980.
- HIGASHI, H.G.; GUIDOLIN, R.; CARICATI, C.P.; FERNANDES, I.; MARCELINO, J.R.; MORAIS, J.F.; YAMAGUSHI, I.K.; STEPHANO, M.A.; DIAS-DA-SILVA, W.; TAKEHARA, H.A. Antigenic cross-reactivity among components of Brazilian Elapidae snake venoms. *Braz. J. Méd. Biol. Res.*, v. 28, p. 767-771, 1995.
- HILDEBRAND, M. Análise da Estrutura dos Vertebrados. Editora Atheneu: São Paulo. 1995. 480 p.
- HO, P.L.; SOARES, M.B.; MAACK, T.; GIMENEZ, I.; PUORTO, G.; FURTADO, M.F.D.; RAW, I. Cloning of na unusual natriuretic peptide from the South American coral snake *Micrurus corallinus*. *Eur. J. Biochem.*, v. 250, p. 144-149, 1997.
- HOFLING, M.A.C.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; VITAL-BRAZIL, O. Ultrastructural changes in neuromuscular junctions of mouse diaphragm caused by the venom of the coral snake *Micrurus corallinus*. *Mem. Inst. Butantan*, v. 47/48, p. 95-105, 1983/84.
- HOGUE A.R.; ROMANO-HOGUE, S.A.R.W.L. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil (2° ed.). *Mem. Inst. Butantan*, v. 42-43, p. 373-496, 1978/79.
- HUANG, L.F.; ZHENG, J.B.; XU, Y.; SONG, H.T.; YU, C.X. A Snake Venom Phospholipase A₂ with High Affinity for Muscarinic Acetylcholine Receptors Acts on Guinea Pig Ileum. *Toxicon*, v. 51, p. 1008-1016, 2008.
- JIN, Y.; LEE, W.H.; ZHANG, Y. Molecular Cloning of Serine Proteases from Elapid Snake Venoms. *Toxicon*, v. 49, p. 1200-1207, 2007.
- JOLKKONEN, M.; GIERSBERGEN, P.L.M.V.; HELLMAN, U.; WERNSTEDT, C.; ORAS, A.; SATYAPAN, N.; ADEM, A.; KARLSSON, E. Muscarinic Toxins from the Black Mamba *Dendroaspis polylepis*. *Eur. J. Biochem.*, v. 234, p. 579-585, 1995.

- JOUBERT, F.J.; STRYDOM, D.J. Snake Venoms: The Amino-Acid Sequence of Trypsin Inhibitor E of *Dendroaspis polylepis polylepis* (Black Mamba) Venom. Eur. J. Biochem., v. 87, p. 191-198, 1978.
- KARLSSON, E.; JOLKKONEN, M.; MULUGETA, E.; ONALI, P.; ADEM, A. Snake Toxins with High Selectivity for Subtypes of Muscarinic Acetylcholine Receptors. Biochimie, v. 82, p. 793-806, 2000.
- KELLEY, M.J.; CROWL, R.M.; DENNIS, E.A. Renaturation of cobra venom phospholipase A₂ expressed from a synthetic gene in *Escherichia coli*. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1118, p. 107-115, 1992.
- KERNS, R.T.; KINI, R.M.; STEFANSSON, S.; EVANS, H.J. Targeting of Venom Phospholipases: The Strongly Anticoagulant Phospholipase A₂ from *Naja nigricollis* Venom Binds to Coagulation Factor Xa to Inhibit the Prothrombinase Complex. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 369, n. 1, p. 107-113, 1999.
- KINI, R.M. Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A₂ enzymes from snake venoms. Toxicon, v. 45, p. 1147-1161, 2005.
- KINI, R.M.; EVANS, H.J. Inhibition of platelet aggregation by a fibrinogenase from *Naja nigricollis* venom is independent of fibrinogen degradation. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1095, p. 117-121, 1991.
- KULKEAW, K.; CHAICUMPA, W.; SAKOLVAREE, Y.; TONGTAWE, P.; TAPCHAISRI, P. Proteome and Immunome of the Venom of the Thai Cobra, *Naja kaouthia*. Toxicon, v. 49, p. 1026-1041, 2007.
- KUMAR, T.K.S.; PANDIAN, S.K.; SRISAILAM, S.; YU, C. Structure and Function of Snake Venom Cardiotoxins. J. Toxicol. – Toxin Reviews, v. 17, n. 2, p. 183-211, 1998.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage off structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Princípios de Bioquímica, 3ª edição. Editora Sarvier: São Paulo. 2006. 975p.
- LÓPEZ-LOZANO, Jorge Luis. Venenos de serpentes da Amazônia – Propriedades e relações moleculares, fisiológicas e taxonômicas. 2002. 180f. Tese de Doutorado – Biologia Molecular, Universidade Federal de Brasília, Brasília.

- MANOCK, S.R.; SUAREZ, G.; GRAHAM, D.; AVILA-AGUERO, M.L.; WARRELL, D.A. Neurotoxic envenoming by South American coral snake (*Micrurus lemniscatus helleri*): case report from Ecuador and review. *Trans. R. Soc. Trop. Méd. Hyg.* 2008.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes ofídicos. Brasília, Centro de Documentação do Ministério da Saúde, 2008.
- MORAES, F.V.; SOUSA-E-SILVA, M.C.C.; BARBARO, K.C.; LEITÃO, M.A.; FURTADO, M.F.D. Biological and immunochemical characterization of *Micrurus altirostris* venom and serum neutralization of its toxic activities. *Toxicon*, v. 41, p. 71-79, 2003.
- MUKHERJEE, A.K. Phospholipase A₂-interacting weak neurotoxins from venom of monocled cobra *Naja kaouthia* display cell-specific cytotoxicity. *Toxicon*, v. 51, p. 1538-1543, 2008.
- NIRTHANAN, S.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; GWEE, M.C.E.; KHOO, H.E.; KINI, R.M. Non-conventional toxins from Elapid venoms. *Toxicon*, v. 41, p. 397-407, 2003.
- NORONHA, M.D.N.; SOUZA, A.R.B.; BÜHRNHEIM, P.F. Estudo epidemiológico dos acidentes ofídicos atendidos na FMT/AM, de janeiro de 1995 a outubro de 1999. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 33, p. 162-163, 2000.
- OLAMENDI-PORTUGAL, T.; BATISTA, C.V.F.; RESTANO-CASSULINI, R.; PANDO, V.; VILLA-HERNANDEZ, O.; VARGAS, A.Z.M.; SALAS-ARRUZ, M.C.; VEGA, R.C.R.; BECERRIL, B.; POSSANI, L.D. Proteomic Analysis of the Venom from the Fish Eating Coral Snake *Micrurus surinamensis*: Novel Toxins, their Function and Phylogeny. *Proteomics*, v. 8, p. 1919-1932, 2008.
- OLIVEIRA, D.A.; HARASAWA, C.; SEIBERT, C.S.; CASAS E SILVA, L.L.; PIMENTA, D.C.; LEBRUN, I.; SANDOVAL, M.R.L. Phospholipases A₂ isolated from *Micrurus lemniscatus* coral snake venom: Behavioral, electroencephalographic and neuropathological aspects. *Brain Research Bulletin*, v. 75, p. 629-639, 2008.
- OLIVEIRA, A. Serpentes venenosas. *Cad. Téc. Vet. Zootec.*, n. 44, p. 7-10, 2004.
- ORR, Robert T. *Biologia dos Vertebrados*. 5ª edição. Editora ROCA: São Paulo. 2001. 560 p.
- PERKINS, J.R.; TOMER, K.B. Characterization of the lower-molecular-mass fraction of venoms from *Dendroaspis jamesoni* and *Micrurus fulvius* using capillary-electrophoresis electrospray mass spectrometry. *Eur. J. Biochem.*, v. 233, p. 815-827, 1995.

- PERKINS, J.R.; PARKER, C.E.; TOMER, K.B. The Characterization of Snake Venoms Using Capillary Electrophoresis in Conjunction with Electrospray Mass Spectrometry: Black Mambas. *Electrophoresis*, v. 14, p. 458-468, 1993.
- PINHO, F.M.O.; PEREIRA, I.D. Ofidismo. *Rev. Ass. Méd. Brasil*, v. 47, n. 1, p. 24-29, 2001.
- POUGH, F. H.; JANIS, C.M.; HEISER, J.B. *A Vida dos Vertebrados*. 3^o edição. Editora Atheneu: São Paulo. 2003. 699 p.
- PURVES, D.; AUGUSTINE, G.J.; FITZPATRICK, D.; KATZ, L.C.; LAMANTIA, A.S.; MCNAMARA, J.O.; WILLIAMS, S.M. *Neurociências*. 2. ed. Editora Artmed, Porto Alegre, 2005. 728 p.
- REMUZGO, C.; ALVAREZ, M.P.; RODRIGUEZ, E.; LAZO, F.; YARLEQUE, A. *Micrurus spixii* (peruvian coral snake) venom – preliminary biochemical and enzymatic characterization. *J. Venom. Anim. Toxins*, v. 8, n. 1, p. 1-6, 2002.
- ROSSO, J.P.; VARGAS-ROSSO, O.; GUTIÉRREZ, J.M.; ROCHAT, H.; BOUGIS, P.E. Characterization of α -neurotoxin and phospholipase A₂ activities from *Micrurus* venoms: Determination of the amino acid sequence and receptor-binding ability of the major α -neurotoxin from *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus*. *Eur. J. Biochem.*, v. 238, p. 231-239, 1996.
- ROZE, J.A. New world coral snakes (Elapidae): A taxonomic and biological summary. *Mem. Inst. Butantan*, v. 46, p. 305-338, 1982.
- RUDRAMMAJI, L.M.S.; GOWDA, T.V. Isolation and Characterization of an Endogenous Inhibitor of Phospholipase A₂ from Indian Cobra (*Naja naja naja*) Venom. *Toxicon*, v. 36, n. 4, p. 639-644, 1998.
- SALES, P.B.V.; SANTORO, M.L. Nucleotidase and Dnase Activities in Brazilian Snake Venoms. *CBP, Part C*, v. 147, p. 85-95, 2008.
- SASA, M. Diet and snake venom evolution: Can local selection alone explain intraspecific venom variation. *Toxicon*, v. 37, p. 249-252, 1999.
- SAVAGE, J.M.; SLOWINSKI, J.B. A simple consistent terminology for the basic colour patterns of the venomous coral snakes and their mimics. *Herpetological Journal*, v. 1, p. 530-532, 1990.

- SBH. 2008. *Brazilian reptiles – List of species*. Accessible at <http://www.sbherpetologia.org.br>. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Acessado em 10/08/2008.
- SCHÄGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, v. 166, p. 368-379, 1987.
- SCHMIDT, K.P. The surinam coral snake. *Fieldiana Zoology*, v. 34, n. 4, p. 25-34, 1952.
- SCHWEITZ, H.; VIGNE, P.; MOINIER, D.; FRELIN, C.; LAZDUNSKI, M. A New Member of the Natriuretic Peptide Family is Present in the Venom of the Green Mamba (*Dendroaspis angusticeps*). *The Journal of Biological Chemistry*, v. 267, n. 20, p. 13928-13932, 1992.
- SELIGMAN, R. Acidente por *Micrurus frontalis*: Primeiro relato de envenenamento elapídico no Rio Grande do Sul. *Mem. Inst. Butantan*, v. 55, n. 2; p. 65-68, 1993.
- SERAFIM, F.G.; REALI, M.; CRUZ-HOFLING, M.A.; FONTANA, M.D. Action of *Micrurus dumerilii carinicauda* coral snake venom on the mammalian neuromuscular junction. *Toxicon*, v. 40, p. 167-174, 2002.
- SHASHIDHARAMURTHY, R; KEMPARAJU, K. A neurotoxic phospholipase A₂ variant: Isolation and characterization from eastern regional Indian cobra (*Naja naja*) venom. *Toxicon*, v. 47, p. 727-733, 2006.
- SILVA, A.R.B.P.; YAMAGUSHI, I.K.; MORAIS, J.F.; HIGASHI, H.G.; RAW, I.; HO, P.L.; OLIVEIRA, J.S. Cross reactivity of different specific *Micrurus* antivenom sera with homologous and heterologous snake venoms. *Toxicon*, v. 39, p. 949-953, 2001.
- SOBRINHO, N.F.H. Ação da peçonha de *Micrurus surinamensis* na junção neuromuscular e no músculo esquelético. 2000. 74f. Tese de Doutorado – Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica, Universidade de Campinas, Piracicaba.
- STOCKER, K.; MEIER J. Hemostasis and Animal Venoms (Pirkle, H. & Markland, F.S. eds.). Ed. Marcel Dekker, New York, vol. 7, p. 67-84, 1988.
- TAKASAKI, C.; SUZUKI, J.; TAMIYA, N. Purification and properties of several phospholipases A₂ from the venom of Australian king brown snake (*Pseudechis australis*). *Toxicon*, v. 28, n. 3, p. 319-327, 1990.

- TAMBOURGI, D.V.; DOS SANTOS, M.C.; FURTADO, M.F.D.; FREITAS, M.C.W.; DA SILVA, W.D.; KIPNIS, T.L. Pro-inflammatory Activities in Elapid Snake Venoms. *Br. J. Pharmacol.*, v. 112, p. 723-727, 1994.
- TAN, N.H.; PONNUDURAI, G. The Biological Properties of Venoms of Some American Coral Snakes (Genus *Micrurus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 101B, n. 3, p. 471-474, 1992.
- TAN, N.H.; ARMUGAN, A. *In vivo* Interactions Between Neurotoxin, Cardiotoxin and Phospholipases A₂ Isolated from Malayan Cobra (*Naja naja sputatrix*) Venom. *Toxicon*, v. 28, n. 10, p. 1193-1198, 1990.
- THEAKSTON, R.D.G. & REID, H.A. Development of simple standart assay procedures for the characterization of snake venoms. *Bull. W.H.O.*, 61: 949-956, 1983.
- TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 76, p. 4350-4354, 1979.
- TSETLIN, V. Snake venom α -neurotoxins and other three-finger proteins. *Eur. J. Biochem.*, v. 264, p. 281-286, 1999.
- TYTGAT, J.; VANDENBERGHE, I.; ULENS, C.; BEEUMEN, J.V. New Polypeptide Components Purified from Mamba Venom. *FEBS Letters*, v. 491, p. 217-221, 2001.
- URDANETA, A.H.; BOLAÑOS, F.; GUTIÉRREZ, J.M. Feeding behavior and venom toxicity of coral snake *Micrurus nigrocinctus* (Serpentes: Elapidae) on its natural prey in captivity. *CBP Parte C*, v. 138, p. 485-492, 2004.
- VALENTIM, E.; LAMBEAU, G. What can venom phospholipases A₂ tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases A₂? *Biochimie*, v. 82, p. 815-831, 2000.
- VITAL-BRAZIL, O.; VIEIRA, R.J. Neostigmine in the treatment of snake accidents caused by *Micrurus frontalis*: report of two cases. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 38, n. 1, p. 61-67, jan/fev 1996.
- VITAL-BRAZIL, O. Coral snake venoms: Mode of action and pathophysiology of experimental envenomation. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 29, n. 3, p. 119-126, maio/jun 1987.

VITAL-BRAZIL, O.; FONTANA, M.D. Ações pré-juncionais e pós-juncionais da peçonha da cobra coral *Micrurus corallinus* na junção neuromuscular. Mem. Inst. Butantan, v. 47/48, p. 13-26, 1983/1984.

WARD, C.M.; ANDREWS, R.K.; SMITH, A.I.; BERNDT, M.C. Mocarhagin, a Novel Cobra Venom Metalloproteinase, Cleaves the Platelet von Willebrand Factor Receptor Glycoprotein Iba: Identification of the Sulfated Tyrosine/Anionic Sequence Tyr-276-Glu-282 of Glycoprotein Iba as a Binding Site for von Willebrand Factor and α -thrombin. Biochemistry, v. 35, p. 4929-4938, 1996.

WATT, G.; THEAKSTON, R.D.G.; HAYES, C.G.; YAMBAO, M.L.; SANGALANG, R.; RANOA, C.P.; ALQUIZALAS, E.; WARREL, D.A. Positive response to edrophonium in patients with neurotoxic envenoming by cobras (*Naja naja philippinensis*). The New England Journal of Medicine, v. 315, p. 1444-1448, 1986.

WICKRAMARATNA, J.C.; FRY, B.G.; AGUILAR, M.I.; KINI, R.M.; HODGSON, W.C. Isolation and pharmacological characterization of a phospholipase A₂ myotoxin from the venom of the Irian Jayan death adder (*Acanthophis rugosus*). British Journal of Pharmacology, v. 138, p. 333-342, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms. Geneva, W.H.O. n. 58, 1981.

ZHANG, Y.; XIONG, Y.L.; BOM, C. An Activator of Blood Coagulation Factor X from the Venom of *Bungarus fasciatus*. Toxicon, v. 33, n. 10, p. 1277-1288, 1995.

<http://opm.phar.umich.edu/protein.php?pdbid=1poa>, site Orientations of Proteins in Membranes – Database.

<http://opm.phar.umich.edu/protein.php?pdbid=1ctx>, site Orientations of Proteins in Membranes – Database