

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

**“Estudo da ação neuromuscular de variadas concentrações de
peçonha da colubrídea opistóglifa *Philodryas patagoniensis* em
preparações musculares de aves e mamíferos”.**

Luiz Prudêncio Santos

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas, como complementação dos
créditos necessários para obtenção do
título de Mestre em Ciências Biológicas.

São José dos Campos, SP
2004

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

**“Estudo da ação neuromuscular de variadas concentrações de
peçonha da colubrídea opistóglifa *Philodryas patagoniensis* em
preparações musculares de aves e mamíferos”.**

Luiz Prudêncio Santos

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas, como complementação dos
créditos necessários para obtenção do
título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Cogo

Co-orientador: Prof. Dr. Stephen Hyslop

São José dos Campos, SP
2004

S236e

Santos, Luiz Prudêncio

Estudo da ação neuromuscular de variadas concentrações de peçonha da colubrídea opistóglifa *Philodryas patagoniensis* em preparações musculares de aves e mamíferos/ Luiz Prudêncio Santos. São José dos Campos: UniVap, 2004.

53p: il.; 31cm.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2004.

1. Venenos de cobra 2. Serpentes 3. Junção neuromuscular
4. Peçonhas I. Cogo, José Carlos, Orient. II. Hyslop, Stephen, Co-Orient. III. Título

CDU:616-001.49

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processo fotocopiador ou transmissão eletrônica.

Assinatura do aluno:

Data:

“Estudo da ação neuromuscular de variadas concentrações de peçonha da colubrídea opistóglifa *Philodryas patagoniensis* em preparações musculares de aves e mamíferos”.

Luiz Prudêncio Santos

Banca Examinadora

Prof. Dr. Rodrigo Álvaro Martins Lopes (UNIVAP) _____

Prof. Dr. José Carlos Cogo, (UNIVAP) _____

Prof. Dr^a. Cristina Pacheco Soares (UNIVAP) _____

Prof. Dr^a. Maria de Fátima Furtado (INST. BUTANTAN) _____

Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco

Diretor do IP&D

São José dos Campos, 10 de maio de 2004

Á minha esposa **Maria Gorete** e
aos nossos filhos **Matheus** e
Marcella, pela compreensão
em todos os momentos.

Agradeço:

Primeiramente, a Deus que me permitiu receber os ensinamentos que hoje concluo.

Ao meu orientador, professor Dr. José Carlos Cogo, pela oportunidade, amizade, ensinamentos oferecidos e confiança em mim depositada.

Especial agradecimento ao grande amigo José Roberto de Alvarenga, sem cuja ajuda me seria impossível a conclusão desse curso.

Ao Dr. Stephen Hyslop pela tradução ao inglês e grande auxílio no desenvolvimento do presente trabalho.

Aos Drs. Wellington Ribeiro e Rodrigo Martins pelo auxílio na confecção e montagem do trabalho.

Ao prof. Benedito Paulo Nogueira por sua inestimável ajuda na correção orto-gramatical deste trabalho.

Aos mestres Antônio C. Prianti Jr. por sua colaboração, Rodrigo Labat e Gustavo Neves pela amizade e companheirismo, em especial à mestra Ana Maria Barbosa, que muito me ajudou na montagem do trabalho.

Às amigas de 'lutas' no Laboratório de Fisiologia e Farmacodinâmica, Elisa Celeste Dreux e Ednalva Cristina pelo companheirismo que demonstraram.

As secretárias: Dona Ivone V. Monteiro e Cláudia H. Barbosa e Rebeca Barbosa por sua disposição em ajudar, sem esquecer da dedicada bibliotecária Rosângela Taranger.

Ao competente técnico de laboratórios da Unicamp, Sr. José Ilton que muito me auxiliou nos experimentos lá desenvolvidos.

Aos amigos do IP&D e Serpentário: Sabrina, Silvio, Airton, Edvana, Valéria, Luciana Pires, Juciara, Andréa Dellú, Rosane Busanello, Luciano Ramos e Carli pelo coleguismo.

Enfim a todos, que de uma forma ou de outra, colaboraram para realização deste trabalho.

“O senhor é o meu pastor, nada
me faltará.

Ainda que eu andasse pelo
vale da sombra da morte não
temeria mal algum, porque tu
estás comigo...”.

Salmo 23; 1-4

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo analisar as atividades bioquímicas e farmacológicas da peçonha da serpente opistóglifa *Philodryas patagoniensis* da família Colubridae. A peçonha de *P. patagoniensis* mostrou atividade esterásica e fosfolipásica semelhante à de *Philodryas olfersii*, mas menor que os níveis observados nas peçonhas de *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus terrificus* usadas para comparação. Por outro lado, a atividade proteolítica das peçonhas de *Philodryas* foi 3 a 5 vezes maior que nas outras duas espécies. A eletroforese das peçonhas por SDS-PAGE mostrou que a maioria das proteínas das peçonhas de *P. patagoniensis* localizava-se na faixa de 30 a 80 kDa, faixa esta que também foi observada com a peçonha de *P. olfersii*. Por outro lado, os perfis eletroforéticos das peçonhas de *Philodryas* divergiram marcadamente daqueles obtidos com as peçonhas de *B. jararaca* e *C. d. terrificus*. As peçonhas de *P. patagoniensis* e *P. olfersii* mostraram reatividade cruzada com soro antibotrópico e anticrotálico, tanto no imunoblot como no ELISA, sugerindo que estas possuem proteínas imunologicamente parecidas com as de peçonhas botrópicas e crotálicas. A atividade neuromuscular da peçonha foi estudada *in vitro* em preparações de junção neuromuscular de pintainho e camundongo as concentrações de 1, 5, 10 e 40 µg da peçonha/ml. A peçonha não afetou a neurotransmissão em nervo-frênico diafragma de camundongo, porém, causou bloqueio neuromuscular que foi concentração- e tempo-dependente na preparação *biventer cervicis* de pintainho. Nesta preparação, a maior concentração de peçonha testada (40 µg/ml) reduziu significativamente ($p < 0,05$) as respostas à acetilcolina e ao K^+ após 120 min; os efeitos nas concentrações menores não foram consistentes e significativos. A incubação de preparações *biventer cervicis* com peçonha resultou na liberação de creatinoquinase (CK) de forma concentração- e tempo-dependente. O dano tecidual sugerido pela liberação de CK foi confirmado por análise histológica que mostrou contratura muscular em baixas concentrações de peçonha e lesões teciduais (mionecrose) em altas concentrações. Estes resultados indicam que a peçonha de *P. patagoniensis*: 1) possui toxinas com massa molecular entre 30 e 80 kDa, 2) possui alta atividade proteolítica, 3) causa bloqueio neuromuscular, e 4) causa lesões teciduais levando à mionecrose, talvez devido à sua alta atividade proteolítica. Estas observações indicam que esta peçonha se assemelha muito à de *P. olfersii*.

Palavras-chave: Serpentes; Peçonhas; Venenos; Junção neuromuscular.

ABSTRACT

In this study, we examined the biochemical and pharmacological activities of venom from the back-fanged colubrid *Philodryas patagoniensis*. The esterase and phospholipase A activities of *P. patagoniensis* venom were similar to those of *Philodryas olfersii* but much lower than those of *Bothrops jararaca* and *Crotalus durissus terrificus* venoms. In contrast, the proteolytic activity of the two *Philodryas* venoms was 3-5 times greater than in the two crotalid species. SDS-PAGE showed that most proteins in *P. patagoniensis* venom had a molecular mass of 30-80 kDa, which was similar to that of *P. olfersii* venom. The electrophoretic profiles of these two venoms differed markedly from those of *B. jararaca* and *C. d. terrificus* venoms. Both *Philodryas* venoms cross-reacted with antiothropic and anticrotalic antivenoms in immunoblots and in ELISA, indicating that they contained proteins immunologically related to those of *Bothrops* and *C. d. terrificus* venoms. *Philodryas patagoniensis* venom had no effect on mouse phrenic nerve-diaphragm preparations but caused concentration- and time-dependent neuromuscular blockade in chick biventer cervicis preparations at concentrations of 1, 5, 10 and 40 µg/ml. This blockade was not reversible by washing. In these preparations, the highest concentration of venom tested (40 µg/ml) significantly reduced ($p < 0.05$) the contractures caused by acetylcholine and K^+ after 120 min; lower concentrations of venom had no consistent or significant effect on these responses. A concentration- and time-dependent release of creatine kinase (CK) was seen in preparations incubated with venom for up to 120 min. The tissue damage suggested by the CK release was confirmed by histological analysis which showed muscle contracture at low venom concentrations and myonecrotic lesions at high concentrations. These results show that *P. patagoniensis* venom: 1) contains toxins with a molecular mass of 30-80 kDa, 2) has high proteolytic activity, 3) causes neuromuscular blockade, and 4) causes tissue lesions that result in myonecrosis, perhaps as a result of the high proteolytic activity. These findings also indicate that the composition and biological activities of *P. patagoniensis* venom are similar to those of *P. olfersii* venom.

Key words: Snakes; Venoms; Poisson; Neuromuscular junctions

Sumário

1. Introdução	01
1.1 A família Colubridae e a glândula de Duvernoy	01
1.2 Toxinologia de peçonhas da família Colubridae	03
1.3 Ação neuromuscular de peçonhas da família Colubridae	04
1.4 Aspectos clínicos de envenenamento pelo gênero Philodryas	06
2. Objetivo	08
3. Material e métodos	09
3.1 Reagentes	09
3.2 Animais	09
3.3 Peçonhas	09
3.4 Comitê de Ética em Pesquisa	10
4. Ensaio biológico	11
4.1 Atividade neuromuscular	11
4.1.1 Preparação nervo frênico-diafragma de camundongo	11
4.1.2 Preparação bívter cervicis de pintainho	12
4.2 Atividade miotóxica	12
4.2.1 Dosagem de creatinoquinase (CK ou CQ)	12
4.3 Análise morfológica	13
5. Ensaio enzimático	14
5.1 Atividade enzimática	14
5.1.1 Proteolítica	14
5.1.2 Fosfolipásica A ₂	14
5.1.3 Esterásica	14
5.2 Eletroforese em géis de poliacrilamida contendo dodecil-sulfato de sódio (SDS)	15

6. Estudo bioquímico	16
6.1 Análise imunológica	16
6.1.1 Ensaio imunoenzimático de fase sólida (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)	16
6.1.2 Imunoblot	16
6.2 Quantificação de proteínas	17
6.3 Análise estatística	17
7. Resultados	18
7.1 Ação neuromuscular	18
7.1.1 Efeito sobre as respostas contráteis	18
7.1.2 Respostas à acetilcolina e ao potássio	24
7.1.3 Dosagem de CK (ou CQ)	25
7.2 Atividades enzimáticas	28
7.3 Eletroforese	29
7.3.1 Imunoblot	29
7.3.2 ELISA	32
7.4 Análise morfológica	32
8. Discussão	36
9. Conclusões	39
Referências	41

Lista de figuras

Figura 1 – Miografia controle e doses de 1 e 5 µg/mL	19
Figura 2 – Miografia controle e doses de 10 e 40 µg/mL	20
Figura 3 – Gráfico de resposta contrátil músculo <i>biventer cervicis</i> para controle e doses de 1 e 5 µg/mL	21
Figura 4 – Gráfico de resposta contrátil músculo <i>biventer cervicis</i> para controle e doses de 10 e 40 µg/mL	22
Figura 5 – Miografia controle e dose de 40 µg/mL – 15V	23
Figura 6 – Gráfico dos níveis de liberação de CK de preparações musculares controle e doses de 1 e 5 µg/mL	26
Figura 7 – Gráfico dos níveis de liberação de CK de preparações musculares controle e doses de 10 e 40 µg/mL	27
Figura 8 – Perfís eletroforéticos das peçonhas de <i>P. patagoniensis</i> , <i>P. olfersii</i> , <i>Bothrops jararaca</i> e <i>C. d. terrificus</i>	30
Figura 9 – <i>Imunoblot</i> das peçonhas de <i>P. patagoniensis</i> , <i>P. olfersii</i> , frente aos soros antibotrópico e anticrotálico	31
Figura 10 – Imunorreatividade das peçonhas de <i>P. patagoniensis</i> , <i>P. olfersii</i> com soros antibotrópico e anticrotálico	33
Figura 11 – Histologia de músculo de aves controle e dose 1 µg/mL	34
Figura 12 – Histologia de músculo de aves doses de 5 e 40 µg/mL	35

Lista de tabelas

Tabela 1 – Quadro comparativo de contraturas musculares produzidas por acetilcolina e potássio após 120 min.	24
Tabela 2 – Quadro comparativo de atividades enzimáticas	28

1. INTRODUÇÃO

1.1 A família Colubridae e a glândula de Duvernoy

Historicamente, tem-se considerado como serpentes peçonhentas as espécies pertencentes às famílias Elapidae (representada pelo gênero *Micrurus* na América do Sul), Hydrophidae (serpentes marinhas) e Viperidae, esta com as subfamílias Crotalinae (na América do Sul, incluem as jararacas do gênero *Bothrops*, as cascavéis do gênero *Crotalus*, e a surucucu do gênero *Lachesis*) e Viperinae (víboras do Velho Mundo). Porém, durante a segunda metade do século passado, numerosos trabalhos relataram que serpentes de várias espécies da família Colubridae, sem ou com dentes maxilares posteriores aumentados, isto é, áglifas ou opistóglifas, respectivamente, frequentemente consideradas inócuas, eram capazes de causar envenenamento grave e até fatal em humanos (GANS, 1978; MCKINSTRY, 1978; DE LISLE, 1982; JAUME, 1983; HARDING, 1984; SLYPVEN, 1984; MINTON, 1976, 1979, 1990, 1996; MACKESSY, 2002a; PRADO-FRANCESCHI; HYSLOP, 2002).

A família Colubridae corresponde a 65% das aproximadamente 2.700 espécies de serpentes conhecidas atualmente. Cerca de 1.560 espécies desta família possuem a glândula de Duvernoy, que é histologicamente homóloga às verdadeiras glândulas de peçonha das famílias Elapidae, Hydrophidae e Viperidae, uma vez que se deriva do mesmo tecido embrionário que as glândulas de peçonha destas famílias (KOCHVA, 1978, 1987).

Em seu livro “Serpentes da Bahia e do Brasil”, Freitas (1999) designa as serpentes da família Colubridae como semi-peçonhentas, quando diz textualmente: “... 2) Serpentes semi-peçonhentas, que são as que possuem dentes do mesmo tamanho, mas que, na parte superior e posterior, possuem um par de presas fixas e sulcadas, dentição essa chamada de tipo OPISTÓGLIFA; produzem veneno, ou peçonha, e são capazes de injetar esse veneno, desde que a serpente consiga morder com os dentes de trás, sendo esses venenos, de forma geral, não muito fortes, quase sempre só causando efeitos locais; no Brasil, as serpentes semi-peçonhentas do gênero *Philodryas* têm causado acidentes de proporções notáveis, com alguns casos graves. Como exemplos

dessas espécies, poderemos citar: cobras-verdes, cordeiras, corais-falsas, cobras-pretas, etc”.

Notoriamente, algumas dessas colubrídeas apresentam uma glândula produtora de peçonha. Taub (1967) encontrou a glândula de Duvernoy em cerca de 250 de 300 espécies estudadas, e Mckinstry (1983) listou 177 gêneros de colubrídeas com a glândula de Duvernoy e/ou dentes maxilares posteriores aumentados (sulcados ou não) e que poderiam representar algum risco de envenenamento para humanos.

A glândula de Duvernoy é caracteristicamente uma glândula composta, tubular e ramificada, cujo parênquima é constituído exclusivamente ou predominantemente de células serosas. Não é observado nessas glândulas um grande reservatório extracelular de peçonha como ocorre com as verdadeiras glândulas de peçonha (TAUB, 1967; KOCHVA, 1987; WEINSTEIN; KARDONG, 1994). A peçonha produzida por esta glândula chega à cavidade oral por um simples ducto que se abre perto de uma ou mais presas posteriores do maxilar superior. Esse ducto abre-se em um espaço definido por um botão de epitélio oral ao redor da presa. Como não há reservatório, há menos peçonha pronta para ser injetada na hora da picada, o que é refletido na necessidade de, na maioria, as espécies colubrídeas segurarem a vítima enquanto a peçonha é lentamente injetada através de um processo que envolve a mastigação (WEINSTEIN; KARDONG, 1994). Este mecanismo de estocagem e injeção de peçonha também representa uma das principais dificuldades para a obtenção de peçonha de muitas espécies em quantidades suficientes para o estudo do seu modo de ação e sua caracterização bioquímica (WEINSTEIN; KARDONG, 1994; MACQESSY, 2002b). Há vários métodos descritos para a obtenção de peçonhas de colubrídeas (WEINSTEIN; KARDONG, 1994; HILL; MACQESSY, 1997, 2000; MACQESSY, 2002b), um dos quais envolve a colocação de tubos capilares (~1 mm de diâmetro) nas presas da serpente, seguida de massagem das glândulas com suave compressão para estimular a liberação da peçonha (SOUZA-FILHO *et al.*, 1999). Este processo pode ser facilitado com a administração de ketamina (sedativo) e pilocarpina (agonista muscarínico, para estimular a liberação da peçonha) (HILL; MACQESSY, 1997, 2000).

1.2 Toxinologia de peçonhas da família Colubridae

Em comum com peçonhas de serpentes das famílias Elapidae, Hydrophidae e Viperidae, as da família Colubridae possuem algumas enzimas (acetilcolinesterase, fosfatases, fosfodiesterase, proteases), porém em muitas destas peçonhas as atividades enzimáticas comuns em peçonhas de outras famílias de serpentes peçonhentas (p. ex. arginina esterases, fosfolipase A₂, hialuronidase, L-amino-ácido-oxidase e serinoproteases do tipo calicreína, fibrino(geno)lítica e trombina) são escassas ou presentes em níveis bastante reduzidos (WEINSTEIN; KARDONG, 1994; MACKESSY, 2002b).

Em termos de atividade biológica, as peçonhas de colubrídeas mostram uma variedade de atividades biológicas, incluindo edema, dor, hemorragia, necrose e neurotoxicidade (MACKESSY, 2002b; JANSEN, 1987). Segundo Prianti *et al.* (2003), o veneno de *Philodryas patagoniensis* (popularmente conhecida como **parelheira**) possui atividade neuromuscular, ocasiona bloqueio irreversível por lavagens em preparações *biventer cervicis* de ave em estimulação indireta e provoca danos às fibras musculares, o que sugere que a peçonha contém componentes neurotóxicos e miotóxicos semelhantes àqueles descritos para a peçonha de *Philodryas olfersii* (PRADO-FRANCESCHI *et al.* 1996, 1998).

Em conformidade com Martins (1917), os estudos verificaram a semelhança entre os efeitos dos envenenamentos causados pelas colubrídeas *P. olfersii* e *P. patagoniensis*. Salomão *et al.* (1990) caracterizaram a alta atividade hemorrágica, fibrinogenolítica e edematosa da peçonha de *P. olfersii* e destacaram a altíssima atividade proteolítica dessa peçonha quando comparada à de *B. jararaca*. Do estudo de Peichoto *et al.* (2003) resultou que a toxicidade (LD₅₀) dos venenos de *P. olfersii* e *P. patagoniensis* é comparável à de várias espécies do gênero *Bothrops* (aproximadamente 3 mg/kg). Entretanto, fica ressaltado que a atividade proteolítica é muito superior (WEINSTEIN; KARDONG, 1994). Ruiz de Torrent *et al.* (2001) demonstraram que quando são comparadas as atividades proteolíticas dos venenos de *P. patagoniensis* (143 U/mg) e *B. alternatus* (20 U/mg) se torna evidente o diferencial entre eles.

Como em outras serpentes peçonhentas, a toxicidade da peçonha de colubrídeas varia entre os gêneros e as espécies e apresenta certa similaridade à variação observada em peçonhas de outras famílias de serpentes peçonhentas (CHIPPAUX *et al.*, 1991). É provável que, como em outras serpentes peçonhentas, existam variações inter e intraespecíficas, bem como ontogenéticas e geográficas, que podem influenciar as propriedades e atividades das secreções (WEINSTEIN; KARDONG, 1994).

1.3 Ação neuromuscular de peçonhas da família Colubridae

Entre as atividades biológicas da peçonha de colubrídeas, a capacidade de interferir com a neurotransmissão tem sido investigada para várias espécies. Assim, Levison *et al.* (1976) observaram que, em preparação neuromuscular ciático-sartório de rã (*Rana temporaria*), a peçonha de *Boiga blandingi* (50-100 µg/mL) reduziu ou aboliu o potencial de placa terminal e aboliu as contrações musculares por estímulos indiretos em apenas 2 minutos. Este bloqueio foi irreversível, uma vez que não pôde ser revertido por diversas lavagens da preparação. O fracionamento da peçonha através de gel-filtração resultou na purificação parcial de uma toxina de 7,1-8,5 kDa, que correspondia a aproximadamente 5% do peso seco da peçonha. O mecanismo de ação desta(s) neurotoxina(s) consiste, principalmente, no bloqueio dos receptores colinérgicos nicotínicos da membrana pós-sináptica da junção neuromuscular, de maneira semelhante à α -bungarotoxina. Estudo posterior usando FPLC e colunas de Mono S identificou uma proteína básica tóxica de 13,5 kDa nesta mesma peçonha, e que foi capaz de causar os sinais típicos de neurotoxicidade em animais de laboratório (WEINSTEIN; SMITH, 1993). Investigações posteriores demonstraram que a peçonha dessa espécie, bem como as de *Boiga dendrophila* e *Boiga irregularis*, aparentemente contém dois tipos de neurotoxinas pós-sinápticas diferentes (alta e baixa afinidades), cuja ligação aos receptores nicotínicos da acetilcolina é inibida por α -cobrotoxina e α -bungarotoxina de forma competitiva (WEINSTEIN *et al.*, 1993; BROADERS *et al.*, 1999). No caso da *B. irregularis*, observou-se certa variação no conteúdo das neurotoxinas e na toxicidade da peçonha entre serpentes jovens e adultas (WEINSTEIN *et al.*, 1993).

Em experimentos realizados com a peçonha de *Heterodon platirhinos* na concentração de 100 µg/mL na preparação neuromuscular ciático-gastrocnêmio de rã (*Rana pipiens*), Young (1992) relatou que ocorreu bloqueio total das contrações musculares em 120 minutos, e que esse bloqueio era irreversível (por lavagem), podendo, entretanto, ser abolido pela presença da fisostigmina, inibidor da acetilcolinesterase. Ao contrário destas observações, a peçonha de *Dispholidus typus* é destituída de ação nessa preparação de anfíbio (em concentrações até 100 µg/mL), em que seus efeitos não são aparentes na frequência contrátil, embora os efeitos coagulopáticos sejam bem documentados. Essa peçonha estimula a contração de músculo liso não-vascular por um mecanismo sensível à atropina (YOUNG, 1996).

Comparado aos trabalhos com outras colubrídeas, é pouco o que se sabe da capacidade das peçonhas das colubrídeas sul-americanas, e especialmente das brasileiras, em produzir efeitos neuromusculares em animais experimentais ou em humanos envenenados acidentalmente. No início do século passado, Martins (1917) e Brazil e Vellard (1926) avaliaram a ação neurotóxica de várias espécies brasileiras, observando que algumas delas possuíam ação potente sobre a neurotransmissão. Mais recentemente, Fontana *et al.* (1996) relataram ação neurotóxica potente na peçonha da jararacussu do brejo (*Mastigodryas* (= *Dryadophis*) *bifossatus bifossatus*) quando testada em preparação *biventer cervicis* de pintainho. Essa atividade era termoestável, insensível à acetilcolina e carbacol, e não foi antagonizada pela neostigmina ou 4-aminopiridina, sugerindo assim um sítio de ação pós-sináptica. A toxina responsável por essa atividade possui uma massa molecular em torno de 12 kDa (HELENO *et al.*, 1997).

Estudos com peçonha de *P. olfersii* demonstraram que tanto uma fração semipurificada da mesma (PRADO-FRANCESCHI *et al.*, 1996) bem como uma miotoxina isolada dessa peçonha (PRADO-FRANCESCHI *et al.*, 1998) eram ativas na junção neuromuscular de *biventer cervicis* de pintainho, levando à inibição da neurotransmissão. A neurotoxina responsável pelo bloqueio observado com a fração semipurificada ainda não foi caracterizada. Prado-Franceschi *et al.* (1996) estudaram os efeitos da secreção da glândula de Duvernoy de *P. olfersii* em camundongos e aves *in vivo*, bem como em preparações nervo frênico-diafragma e *biventer cervicis* respectivamente, quando a peçonha total aplicada ao banho em concentrações de 20 e

40 µg/mL não produziu efeito na preparação nervo frênico-diafragma de camundongo, mas causou efeito de queda da cabeça (*head drop*) em pintainhos *in vivo* e nas preparações *biventer cervicis* levou a bloqueio irreversível quando sob estímulo evocado indireto. Esta ausência de efeito da peçonha de *P. olfersii* em preparações neuromusculares de mamíferos (nervo frênico de camundongo) também foi observada com a peçonha de *M. bifossatus* (FONTANA *et al.*, 1996), sugerindo uma seletividade para certo tipo de presa na dieta destas serpentes.

1.4 Aspectos clínicos de envenenamento pelo gênero *Philodryas*

Araujo e Santos (1997), em estudo de envenenamentos ocasionados por *P. olfersii* e *P. patagoniensis*, apontam a progressividade do edema com possível supuração, linfopatia nodular, perda de sensibilidade tátil e de certos movimentos por algum tempo. De modo semelhante, Peichoto *et al.* (2003) comentam que o envenenamento por serpentes do gênero *Philodryas* tem a característica de, em acidentes com humanos, produzir edema, equimose e sangramento no local da picada, bastante similar àqueles causados por acidentes com serpentes do gênero *Bothrops*. Também foi observado que a sintomatologia usual pode ser resumida em dor local, edema, eritema, equimose, linfadenopatia regional e sangramento. Assacura *et al.* (1994) e Jorge e Ribeiro (1990) mostram que a equimose sugere um processo hemorrágico muito parecido com aquele observado em acidentes envolvendo espécies de *Bothrops*. Tudo isso pode levar o clínico à má interpretação da sintomatologia, o que poderá dar origem a um tratamento sorológico inadequado.

Anualmente, segundo o Hospital Vital Brazil do Instituto Butantan (HVB-IB), o percentual de acidentes causados pela *P. olfersii* é de 1% dos 500 casos atendidos (SILVA; BUONONATO, 1983/1984). Assim sendo, essa espécie tem sido mais bem estudada, entretanto, acidentes com outras espécies desse gênero ocorrem em humanos. Ribeiro *et al.* (1999), em seu estudo clínico e epidemiológico de 43 casos de picadas produzidas em humanos pela *P. olfersii*, concluíram que a maioria dos casos (58,1%) ocorreu durante a tarde (12-18 h) e (27,9%) pela manhã (6-12 h), enquanto os acidentados trabalhavam ou manipulavam a serpente. Assim, as épocas e horários das ocorrências foram coincidentes com as dos gêneros *Crotalus* e *Bothrops*, sugerindo

picos de incidência dependentes da variação sazonal da atividade humana. A região corporal mais afetada foi a mão ou dedos, com 72,1%, enquanto os pés foram afetados em 20,9% dos casos. A sintomatologia apresentada foi de dor local em 37,2% dos casos, edema em 34,9%, eritema em 18,6% e equimose em 9,3%.

2. OBJETIVO

O objetivo do presente projeto foi caracterizar bioquímica e farmacologicamente a peçonha de *P. patagoniensis*, comparando-a com a da *P. olfersii*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Acetilcolina, albumina de soro bovino, anticorpo anti-cavalo de coelho conjugado à peroxidase, caseína bovina e os substratos para os ensaios enzimáticos foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO. EUA). Os reagentes para a eletroforese e a membrana PVDF (0,45 µm) para imunoblot foram obtidos da Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, EUA). As microplacas de 96 poços foram compradas da Corning (Corning, MA, EUA). Os outros reagentes eram de grau PA obtidos de fornecedores nacionais.

3.2 Animais

Foram utilizados camundongos machos Swiss (18-24 g) fornecidos pelo laboratório ANILAB e mantidos no Centro de Estudos da Natureza (UNIVAP), e pintainhos da linhagem HY-LINE W36 (4-8 dias) fornecidos pela Granja Ito S/A (Campinas). Os animais foram mantidos em gaiolas abastecidas com água e ração *ad libitum*. Os exemplares de *P. olfersii* e *P. patagoniensis* foram capturados no campus da UNIVAP e mantidos no serpentário do CEN. Foram alimentados com camundongos a cada 15 dias.

3.3 Peçonhas

As peçonhas de *P. olfersii* e *P. patagoniensis* foram obtidas de 4 a 5 exemplares adultos de cada espécie, enquanto a de *C. d. terrificus* foi de um *pool* de 30 serpentes. Todas estas serpentes foram capturadas na Região de São José dos Campos (Vale do Rio Paraíba, SP) e foram mantidas no Serpentário do Centro de Estudos da Natureza (CEN), UNIVAP (IBAMA nº 21104.001079/89-76). A extração das peçonhas de *P. olfersii* e *P. patagoniensis* foi efetuada mensalmente essencialmente conforme descrito

por Souza-Filho *et al.* (1999), com intervalo de pelo menos 15 dias depois da última alimentação. Após a extração, a peçonha foi liofilizada e estocada -20°C. A peçonha de *B. jararaca* foi cedida do Instituto Butantan (São Paulo, SP).

3.4 Comitê de Ética em Pesquisa

Os procedimentos utilizados neste projeto foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP (Protocolo: L004/2004/CEP, em anexo).

4. ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.1 Atividade neuromuscular

4.1.1 Preparação nervo frênico-diafragma de camundongo (estímulo indireto)

Após anestesia com cloridrato de ketamina (Dopalen injetável; 1mL/kg, i.p.) e sedação com cloridrato de xilazina (Virbaxyl 2% injetável; 0,1mL/kg; i.p.), os camundongos foram sacrificados com halotano e o músculo diafragma foi retirado essencialmente conforme descrito por Bülbring (1946), para ratos. Essa técnica consiste em dissecar a pele ao nível do tórax e cuidadosamente isolar o diafragma juntamente com o nervo frênico, tomando-se cuidado para não lesar nem o músculo, nem o nervo. Após o isolamento da preparação, em tempo não superior a 10 minutos, a mesma foi montada, sob tensão constante de 2g/cm, em suporte adequado colocado numa cuba (4 mL de capacidade) com solução de Tyrode (composição, mM: NaCl 137; KCl 2,7; CaCl₂ 1,8; MgCl₂ 0,49; NaH₂PO₄ 0,42; NaHCO₃ 11,9 e glicose 11,1). A cuba foi mantida à temperatura constante de 37°C e aerada com carbogênio (mistura de 95% O₂ e 5% CO₂) para manter o pH em 7,4. A força de contração muscular em resposta a estímulos elétricos foi registrada em fisiógrafo Gemini 7070 (Ugo Basile, Itália) usando-se um transdutor isométrico BG 25 GM Kulite. O músculo foi estimulado indiretamente através de seu nervo-motor usando-se eletrodo bipolar com pulsos maximais de 0,2 mseg de duração e 0,2 Hz de frequência. Todas as preparações foram submetidas a um período de estabilização não inferior a 20 minutos previamente à adição da peçonha (40µg/mL). As respostas contráteis do músculo foram registradas durante até 60 minutos após a adição da peçonha. Nos experimentos-controle, foram adicionados à preparação 0,02mL de solução de Krebs.

4. 1. 2 Preparação *biventer cervicis* de pintainho (estímulo de campo)

Após anestesia com ketamina (0,2mL/kg) e sedação com xilazina (0,1mL/kg) por via intra-abdominal, os pintainhos foram sacrificados com halotano e a preparação *biventer cervicis* foi isolada e montada de acordo com o método descrito por Ginsborg e Warriner (1960). O músculo foi suspenso em 4mL de solução de Krebs (composição, em mM: NaCl 118,6; KCl 4,69; CaCl₂ 1,88; KH₂ PO₄ 1,17; NaHCO₃ 14,99 e glicose 11,65; pH 7,4), aerado e mantido a 37°C. O músculo foi submetido a uma tensão constante de 1,0 g e estimulado através de eletrodos bipolares posicionados na região entre o tendão e o músculo, de modo a produzir uma estimulação de campo. A preparação, através de estimulador GRASS S4, sofreu estímulos supramaximais de 0,2 Hz de frequência e 0,2 mseg de duração, e as contrações musculares foram registradas durante 120 minutos em fisiógrafo Gemini 7070 (Ugo Basile, Itália) através de transdutor isométrico BG-25 GM Kulite da Semiconductor Products Inc. Os efeitos da peçonha nesta preparação foram avaliados testando-se concentrações de 1, 5, 10 e 40µg/mL, por um intervalo de tempo de 120 minutos. As amplitudes das contrações musculares foram medidas e analisadas em programa estatístico (ANOVA), tendo sido considerado como significativo $p < 0,05$. Nos experimentos-controle, foram adicionados à preparação 0,02mL de solução de Krebs.

4.2 Atividade miotóxica

4.2.1 Dosagem de creatinoquinase (CK ou CQ)

A quantificação da enzima CK liberada pela preparação *biventer cervicis* foi usada como indicador da ação miotóxica da peçonha sobre as fibras musculares. Durante os experimentos para registro das contrações musculares (ver acima), alíquotas de 0,02 mL do meio nutritivo foram retiradas do banho durante o período de repouso (estabilização da preparação) e 20, 40, 80 e 120 minutos após a adição de peçonha (concentrações variadas de 1, 5, 10 e 40µg/mL). Para o grupo-controle, amostras de 0,02mL foram retiradas do banho nos tempos acima indicados, sem a adição de peçonha (completando-se, no entanto, o volume da cuba com solução de Krebs). A atividade da CQ foi dosada com *kit* comercial CK NAC (Laborlab S/A, São Paulo, SP).

4.3 Análise morfológica

As alterações morfológicas foram avaliadas em músculo que foi incubado com a peçonha, nas concentrações variadas já definidas, durante um período de tempo equivalente a 120 minutos. Terminado o tempo de incubação, os tecidos foram fixados em formol 10% e em seguida, seguimos os procedimentos de rotina para desidratação e inclusão em paraplast para confecção das lâminas histológicas. Secções de 7µm foram obtidas em micrótomo e montadas em lâminas de microscopia, tendo sido, então, coradas com hematoxilina e eosina (HE). As lâminas assim obtidas foram observadas e fotografadas em microscópio óptico (Laboratório de Células do IP&D-I, UNIVAP).

5. ENSAIOS ENZIMÁTICOS

5.1 Atividade enzimática

5.1.1 Proteolítica

A atividade proteolítica foi avaliada usando-se a caseína como substrato, de acordo com o método descrito por Botes e Viljoen (1979). Para 1,9mL de uma solução de substrato a 1% em Tris-HCl 0,1 M, pH 7,8, contendo CaCl_2 5 mM, pré-incubada por 5 min a 37°C, foi adicionado 0,1mL de veneno (solução 1mg/mL) seguido por incubação durante 20 min a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de 4mL de TCA 5% e as amostras incubadas em gelo por 30 minutos prévios à centrifugação (1000 g, 15 min). A absorbância do sobrenadante foi determinada a 280nm. Uma unidade de atividade foi definida como um aumento de 0,001 na unidade de absorbância/min.

5.1.2 Fosfolipásica A2

A atividade da enzima fosfolipásica A₂ foi avaliada essencialmente conforme descrito por Beghini *et al.* (2000) usando-se como substrato ácido 4-nitro-3-(octanoiloxi) benzóico em tampão Tris-HCl, pH 8,0. As amostras de peçonha (20µl de solução 1mg/mL) foram aplicadas em duplicata na placa ELISA e o aumento na absorbância a 420nm foi monitorado a cada 5 minutos durante 30 minutos, a 37°C. Salina (20µl) foi usada como controle. A atividade foi expressa em aumento de absorbância a 420nm/mg.

5.1.3 Esterásica

A atividade esterásica foi determinada conforme descrito por Botes *et al.* (1979), usando-se como substrato TAME 1mM em tampão Tris-HCl. Para 1,4mL de tampão Tris-HCl, 0,1 M, pH 7,8, acrescido de 1,5mL de substrato TAME, foi adicionado 0,1mL de peçonha (1mg/mL), seguido de incubação à temperatura ambiente por 10 minutos.

As amostras foram levadas ao espectrofotômetro e registrados os aumentos de absorbância em 253nm por 10 minutos, com leituras a cada 30 segundos. Uma unidade de atividade foi definida como um aumento de 0,001 na A_{253} nm/minuto.

5.2 Eletroforese em géis de poliacrilamida contendo dodecil-sulfato de sódio (SDS)

A eletroforese das peçonhas foi realizada em géis de 12% de poliacrilamida, usando-se um sistema de eletroforese Mighty Small SE260 (Hoefer-Pharmacia), essencialmente conforme descrito por Laemmli (1970). As amostras foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 6,8, contendo EDTA 2 mM, SDS 5%, e azul de bromofenol 0,01%, e fervidas durante 5-10 minutos. Alíquotas de 20µl foram aplicadas aos poços de gel. A corrida foi feita em temperatura ambiente a 100 V (constante) até o bromofenol atingir 0,5 cm do final do gel. Em seguida, os géis foram fixados, corados com prata e fotografados. Foram corridas concomitantemente proteínas marcadoras de massa molecular conhecida.

6. ESTUDO BIOQUÍMICO

6.1 Análise imunológica

6.1.1 Ensaio imunoenzimático de fase sólida (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

A imunorreatividade da peçonha frente a antisoros comerciais foi avaliada pelo método de ELISA. Inicialmente, os poços de microplacas foram sensibilizados durante 18 horas com peçonha (2µg/poço, diluído em tampão carbonato 0,05 M, pH 9,6). Após lavagem e bloqueio (1 hora) com NaCl 0,9% (w/v) contendo Tween 20 0,5%, foi adicionado o soro antibotrópico ou anticrotático diluído em tampão fosfato-salina 0,15 M, pH 7,4 contendo Tween 20 0,5% (PBS-T) seguido de incubação à temperatura ambiente durante 1 hora. Terminada esta incubação, os poços foram lavados com PBS-T e foi então adicionado o conjugado peroxidase-IgG anti-cavalo de coelho (diluído 1:1.500) seguida por outra incubação de 1 hora. Após mais uma série de lavagens, foi adicionado o substrato (100µL de uma mistura de H₂O₂ e ortofenilenodiamina (OPD) 0,02% em tampão citrato pH 5,0. Após 15 minutos à temperatura ambiente, a reação foi interrompida adicionando-se 50µl de H₂SO₄ a 5%. A absorbância resultante foi lida a 492nm em leitor de placas Multiskan MS (Labsystems, Finlândia).

6.1.2 Imunoblot

Em alguns experimentos, terminada a corrida eletroforética conforme descrita acima, as proteínas foram transferidas para membrana PVDF Hybond-P usando um sistema de transferência Mighty Small TE-22 (Hoefer-Pharmacia) (TOWBIN et al., 1979). Após a transferência, os sítios não específicos da membrana foram bloqueados durante incubação de 2 horas com solução de leite desnatado 5% e Tween 20 0,05%. Após seis lavagens com tampão Tris-salina (TBS, pH 7,6) a membrana foi incubada de um dia para o outro à temperatura ambiente com soro antibotrópico ou anticrotático diluído 1:800 em TBS. Terminada esta incubação, a membrana foi lavada três vezes

com TBA e incubada durante 2 horas a 20°C com IgG de coelho anti-cavalo conjugado à peroxidase (1:1500 em TBS). Após a última série de lavagens, as bandas imunorreativas foram reveladas com 4-cloro-1-naftol (500µl de uma solução de 3% em etanol adicionada a 50mL de Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, contendo H₂O₂ 0,03%).

6.2 Quantificação de proteínas

A concentração das proteínas foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951), usando-se BSA (albumina de soro bovina) como padrão.

6.3 Análise estatística

Conforme necessário, os resultados foram expressos como média $\pm$ erro-padrão da média (EPM). A significância das diferenças entre os grupos-controle e tratados com as diversas concentrações de peçonha foi determinada com o teste t de Student, ou por ANOVA seguida pelo teste Tukey-Kramer de comparações múltiplas. Foram considerados estatisticamente significativos valores com $p < 0,05$.

7. RESULTADOS

7.1 Ação neuromuscular

7.1.1 Efeito sobre as respostas contráteis

Testamos a peçonha de *P. patagoniensis* sobre a preparação nervo frênico-músculo diafragma de camundongo (estimulado indiretamente) por um período de tempo de 60 minutos, tempo suficiente para verificação de sua atividade. A peçonha, na concentração de 40µg/mL, não causou alterações miográficas de importância nesta preparação.

Entretanto, quando testamos a atividade da peçonha em preparações utilizando o músculo *biventer cervicis* de pintainho, observamos que o mesmo promove bloqueio das contrações musculares, após o período de estabilização da preparação. Nos músculos estimulados em até 8V, observamos que nas concentrações utilizadas, o bloqueio teve início aproximadamente após 20 minutos. Na concentração de 1µg/mL (n=4) o bloqueio atingiu aproximadamente 60% aos 120 minutos. Já nas concentrações maiores, 5 (n=3), 10 (n=5) e 40 (n=5) µg/mL, o bloqueio foi mais intenso atingindo 100% após 60 minutos (Figuras 1 a 4).

Em todas as preparações observamos o aparecimento de contratura que foi mais evidente quanto maior era a concentração da peçonha (Figuras 1 e 2). Quando o músculo foi estimulado com 15V (40µg de peçonha/mL; n=3) observamos que as contrações musculares também foram bloqueadas (Fig. 5). O bloqueio atingiu 100% aos 40 minutos aproximadamente.

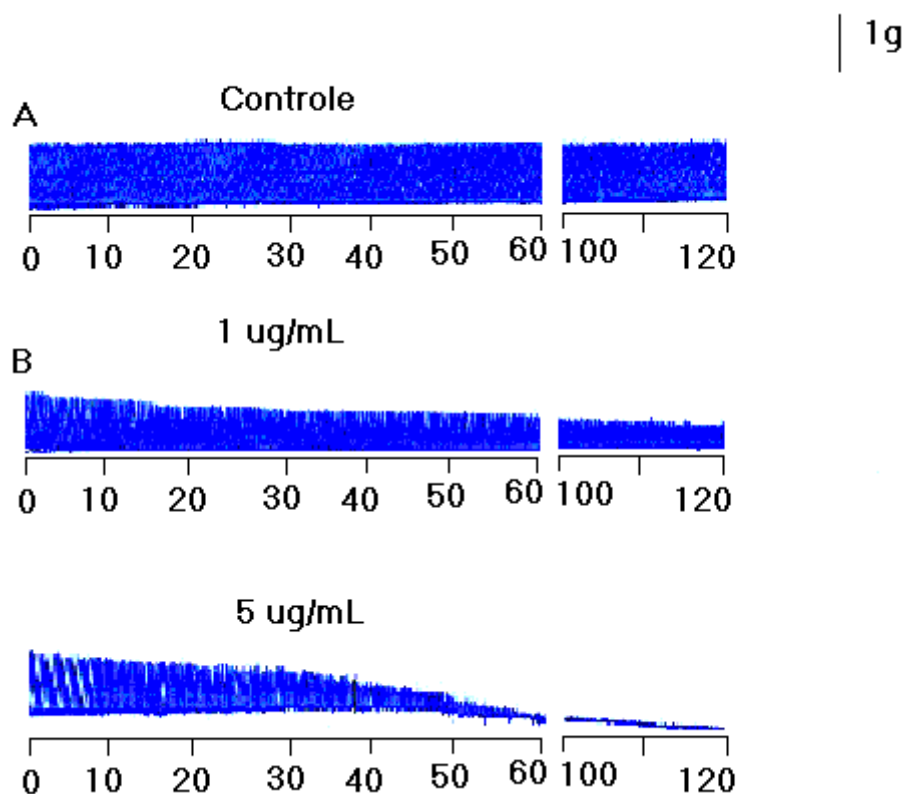


Fig. 1 – Resposta muscular com estímulo de campo (8V) evocado em preparações de *biventer cervicis* de aves. (A) Controle – apenas com solução de Krebs; (B) e (C) com a adição de 1µg/mL e 5µg/mL, respectivamente, de veneno total de *Philodryas patagoniensis* no banho. Observar bloqueio das contrações musculares e contratura com a dose de 5µg/mL.

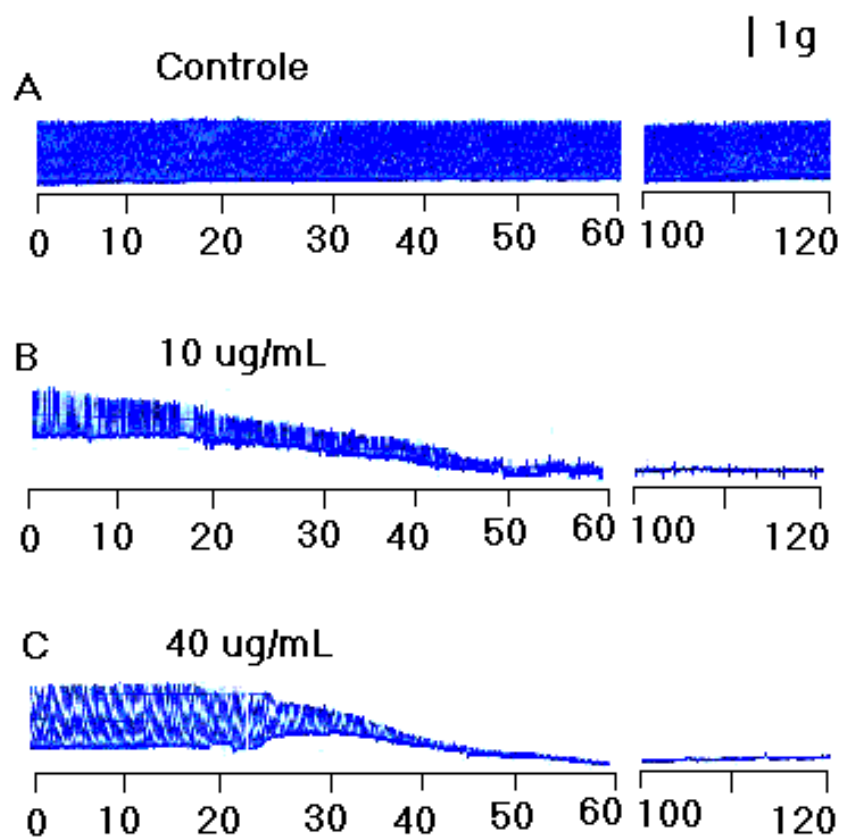


Fig. 2 – Resposta muscular com estímulo de campo (8V) evocado em preparações de *biventer cervicis* de aves. (A) Controle – apenas com o uso de solução de Krebs; (B) e (C) com a adição de 10µg/mL e 40µg/mL, respectivamente, de peçonha de *Philodryas patagoniensis* no banho.

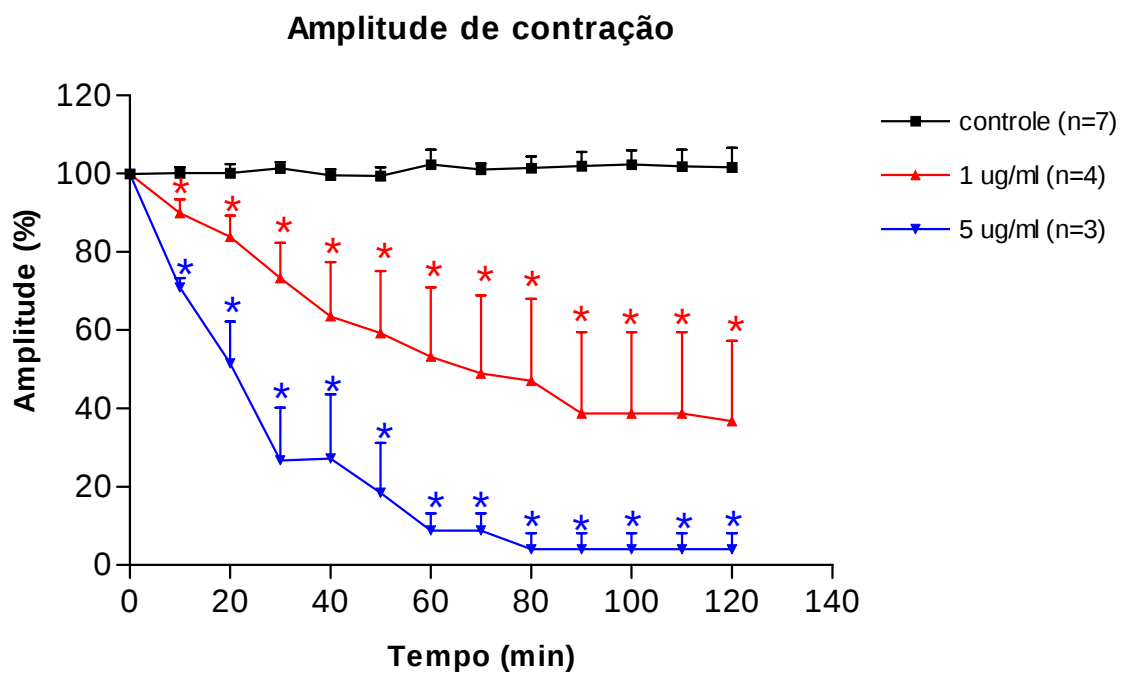


Fig. 3 - Resposta contrátil média em preparações de *biventer cervicis* de ave tratadas com peçonha de *Philodryas patagoniensis*. As preparações foram montadas e estimuladas conforme descrito no item 2 de Ensaio Biológicos. Os pontos representam a média $\pm$ a média do erro padrão do número de experimentos indicados. ANOVA; *p<0,05.

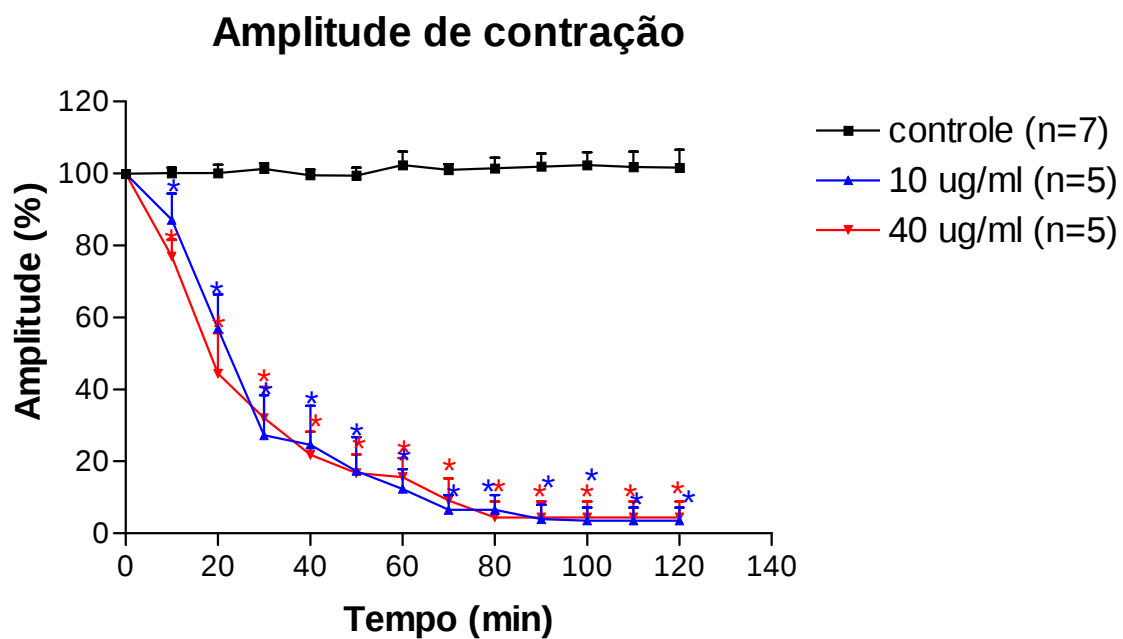


Fig. 4 - Resposta contrátil média em preparações de *biventer cervicis* de ave tratadas com peçonha de *Philodryas patagoniensis*. As preparações foram montadas e estimuladas conforme descrito no item 2 de Ensaio Biológicos. Os pontos representam a média $\pm$ a média do erro padrão do número de experimentos indicados. ANOVA; *p<0,05.

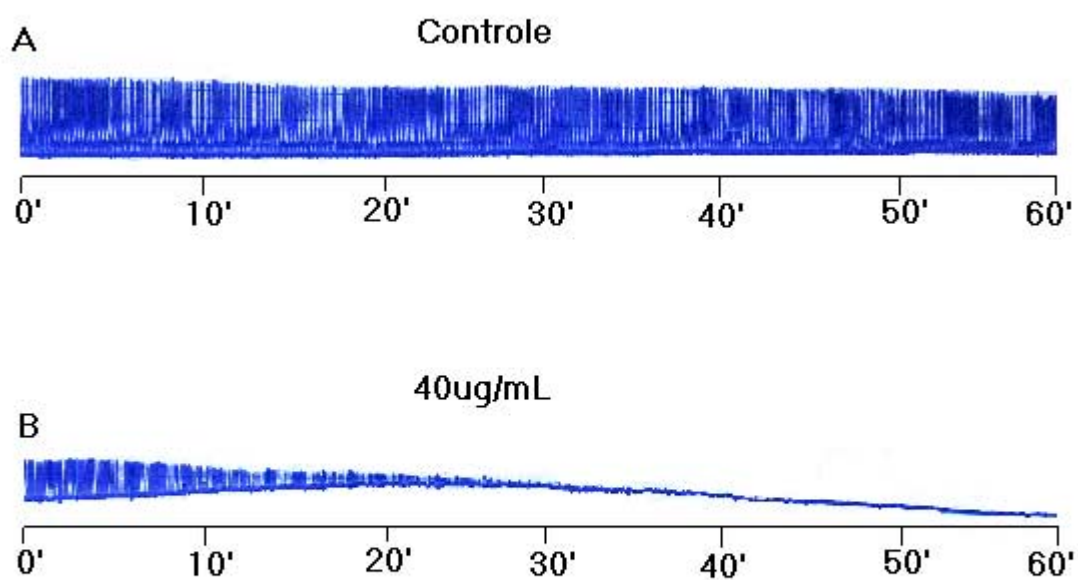


Fig. 5 – Resposta muscular com estímulo de 15V evocado em preparações de *biventer cervicis* de aves. (A) Controle – apenas com solução de Krebs; (B) com a adição de 40 μ g/mL de veneno total de *Philodryas patagoniensis* ao banho. Observar bloqueio das contrações musculares e contratura com esta dose.

7.1.2 Respostas à acetilcolina e ao potássio

A tabela 1 mostra que nas concentrações menores (1µg/mL, 5µg/mL e 10µg/mL) não foi observada mudança estatisticamente significativa nas amplitudes das contraturas evocadas pela acetilcolina (55 µM e 110 µM) após incubação das preparações com peçonha. Entretanto, para a concentração de 40µg de peçonha/mL (n=5), observamos um bloqueio na resposta de 76.2±19.4% (55 µM) e 89.2±6.8 (110 mM), sendo estes valores estatisticamente diferentes em relação ao controle.

Para o potássio, se observa o mesmo fato, ou seja, nas concentrações menores de peçonha (1µg/mL, 5µg/mL e 10µg/mL), a contratura promovida por este íon não foi afetada, enquanto que na concentração de 40µg/mL (n=5), observamos bloqueio de 85±7.2% na amplitude da contração (Quadro 1).

Droga	Peçonha (µg/ml)	N	Contratura após peçonha (%)
ACh (55 µM)	0 (C)	7	111,1±8,0
	1	3	89,3±5,3
	5	3	123±23,1
	10	5	111,6±21,8
	40	5	23,8±19,4 *
ACh (110 µM)	0 (C)	7	99,5 ± 5,2
	1	3	51,0 ± 13,5
	5	3	101,6 ± 15,1
	10	5	68,3 ± 14,3
	40	5	10,8 ± 6,8 *
K ⁺ (13,4 mM)	0 (C)	7	112,8 ± 9,0
	1	3	133,0 ± 12,1
	5	3	115,3 ± 13,3
	10	5	74,5 ± 16,8
	40	5	15,0 ± 7,2 *

Tabela 1 – Efeito da peçonha de *P. patagoniensis* sobre as contraturas musculares produzidas por acetilcolina (ACh) e potássio (K⁺) em preparações *biventer cervicis*. Os valores são a média ± EPM da porcentagem de bloqueio da contratura 120 minutos após a adição de peçonha comparada aos valores antes da adição (100%). (C) = controle. ANOVA; *p<0,05.

7.1.3 Dosagem de CK (ou CQ)

A dosagem da quantidade da enzima creatinoquinase liberada ao meio é freqüentemente usada como indicador do grau de lesão muscular *in vivo* e *in vitro*. As Figuras 6 e 7 mostram a liberação desta enzima ao longo dos experimentos com diferentes concentrações de peçonha. Na concentração de 1µg/mL (n=4), a peçonha já causou liberação desta enzima, a qual foi aumentando conforme a concentração.

Dosagem de C K

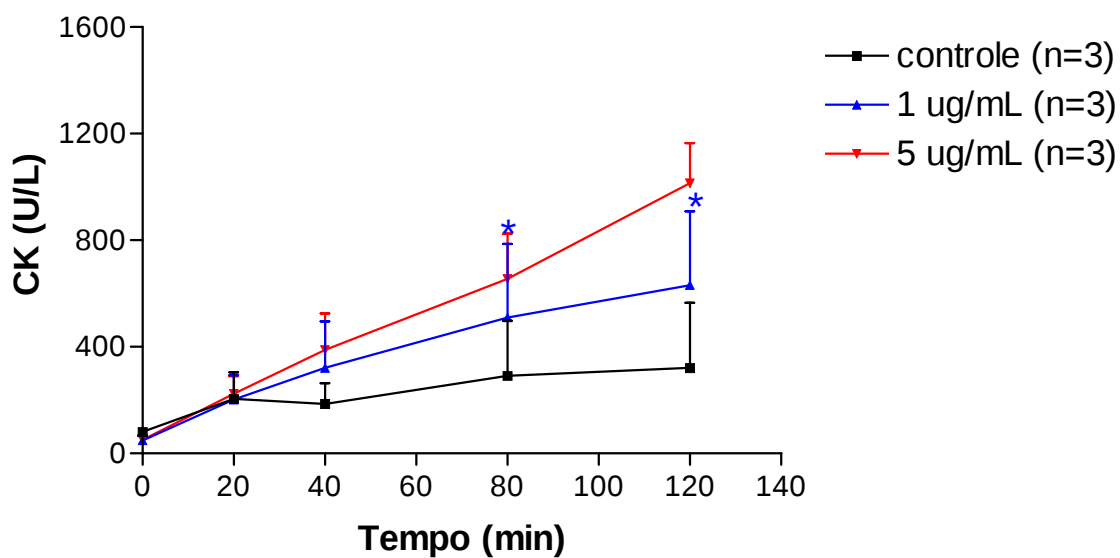


Fig. 6 - Liberação de CK (creatinoquinase) em preparações de *biventer cervicis* de pintainho incubadas com peçonha de *Philodryas patagoniensis*. As preparações e os níveis de CK foram, respectivamente, montadas e determinados conforme descrito no item 3 de Ensaaios Biológicos. Os pontos representam a média $\pm$ a média do erro-padrão do número de experimentos indicados. ANOVA; * $p < 0,05$.

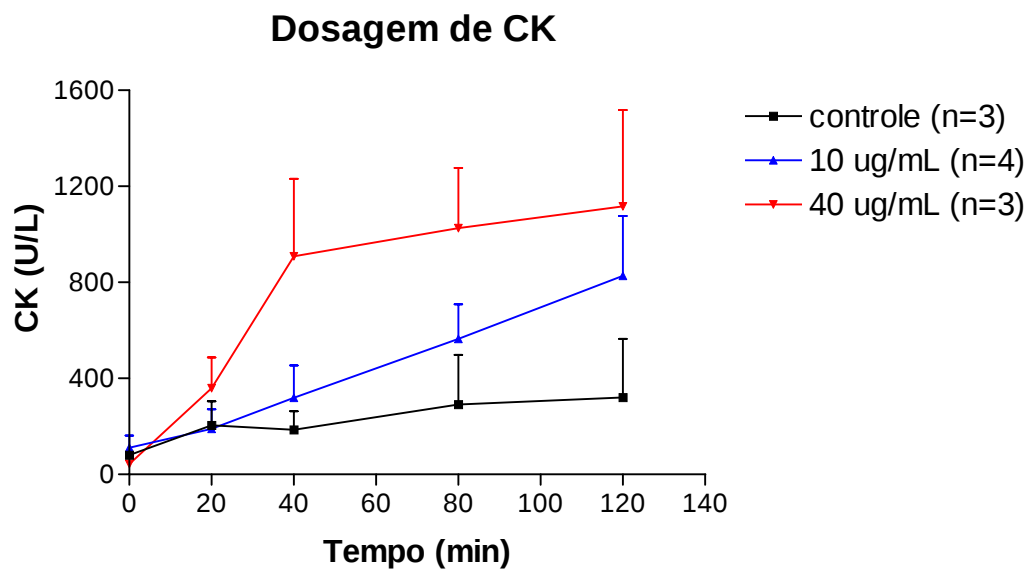


Fig. 7 - Liberação de CK (creatinoquinase) em preparações de *biventer cervicis* de ave incubadas com peçonha de *Philodryas patagoniensis*. As preparações e os níveis de CK foram, respectivamente, montadas e determinados conforme descrito no item 3 de Ensaio Biológicos. Os pontos representam a média $\pm$ a média do erro padrão do número de experimentos indicados.

7.2 Atividades enzimáticas

As fosfolipases A₂ são enzimas encontradas em peçonhas de serpentes, e que agem no segundo carbono da cadeia fosfolipídica onde hidrolisam fosfolipídeos da membrana na posição éster C2 (HANANHAN, 1971 *apud* COGO, 1995). A tabela 2 mostra que a atividade fosfolipásica da peçonha de *P. patagoniensis* e *P. olfersii* foi menor do que aquela apresentada pela peçonha de *C. d. terrificus*, sendo também inferior à atividade apresentada pelo veneno de *B. jararaca*.

No caso da atividade esterásica, as peçonhas de *P. olfersii* e *P. patagoniensis* mostraram atividade bem menor em relação às de *B. jararaca* e *C. d. terrificus*. Já a atividade proteolítica das peçonhas de *P. olfersii* e *P. patagoniensis* era bem maior que as de *B. jararaca* e *C. d. terrificus*.

	<i>C. d. terrificus</i>	<i>B. jararaca</i>	<i>P. olfersii</i>	<i>P. patagoniensis</i>
Fosfolipásica (A₄₂₀/mg)	453 ± 89,4	124 ± 26,3	18 ± 0,7	17 ± 0,5
Esterásica (U/mg)	58 ± 5,1	49 ± 4,5	7 ± 0,0	5 ± 0,5
Proteolítica (U/mg)	8,6 ± 0,9	47 ± 0,9	162,3 ± 1,3	217,5 ± 1,0

Tabela 2 – Atividades enzimáticas das peçonhas de *P. olfersii* e *P. patagoniensis* comparadas às de *B. jararaca* e *C. d. terrificus*. Os valores são a média ± E.P.M. de quatro determinações.

7.3 Eletroforese

A figura 8 mostra os perfis eletroforéticos das peçonhas de *P. olfersii* e *P. patagoniensis* comparados aos de *B. jararaca* e *C. d. terrificus*. Para ambas as peçonhas de *Philodryas*, a maioria das proteínas tinham massa molecular entre 30 e 80 kDa. Ambas as peçonhas também tinham duas bandas de coloração bastante fraca acima de 119 kDa e duas fracas abaixo de 19 kDa (setas pretas na figura). As diferenças entre os perfis das duas *Philodryas* eram quantitativas (bandas semelhantes, porém com intensidades diferentes), e também qualitativas, sendo que a peçonha de *P. olfersii* tinha pelo menos três proteínas (~31, 40 e 46 kDa) que não foram vistas na de *P. patagoniensis* (setas brancas na figura) enquanto que a de *P. patagoniensis* tinha duas bandas fracas (vistas principalmente com a quantidade maior de peçonha usada) que estavam ausentes em *P. olfersii* (setas abertas na figura). Houve pouca semelhança entre os perfis das peçonhas das duas *Philodryas* quando comparadas às peçonhas de *B. jararaca* e *C. d. terrificus*.

7.3.1 Imunoblot

A Figura 9 mostra a imunorreatividade das peçonhas de *P. olfersii* e *P. patagoniensis* frente aos soros antibotrópicos e anticrotálicos. De modo geral, as duas peçonhas interagiram de maneira semelhante com os dois soros, com perfis similares àqueles observados na eletroforese. É possível que não tenham aparecido mais bandas imunorreativas nas duas peçonhas devido à quantidade menor usada no *blot* comparada à eletroforese (10 µg e 25-50 µg, respectivamente), o que também poderia explicar a baixa reatividade da peçonha de *C. d. terrificus*. De qualquer forma, estes resultados demonstram que as peçonhas de *Philodryas* compartilham componentes que são imunologicamente semelhantes a componentes presentes nas peçonhas de *B. jararaca* e *C. d. terrificus*, embora ficou claro que os perfis de imunorreatividade das peçonhas de *Philodryas* são diferentes das de *B. jararaca* e *C. d. terrificus*.

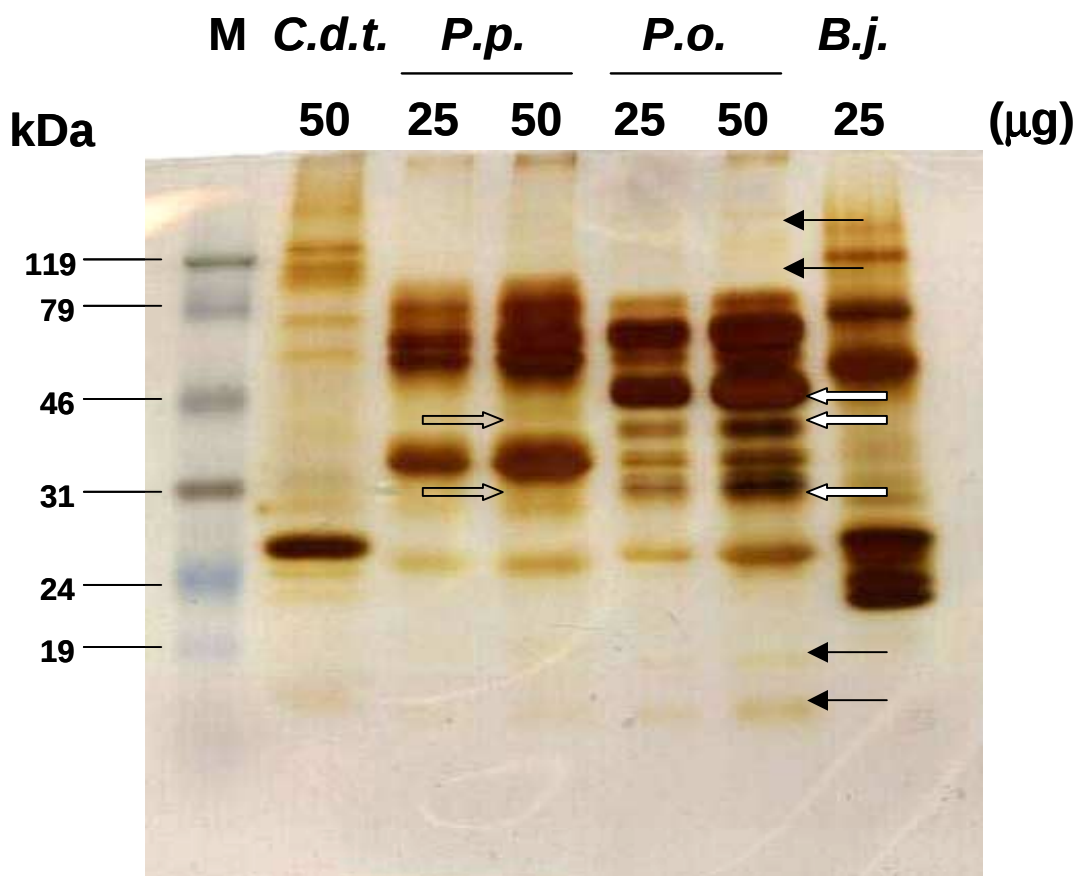


Fig. 8 - Os perfis eletroforéticos das peçonhas de *P. patagoniensis* (*P.p.*), *P. olfersii* (*P.o.*), *B. jararaca* (*B.j.*) e *C. d. terrificus* (*C.d.t.*). A corrida eletroforética foi feita em SDS-PAGE conforme descrito nos métodos e o gel foi corado com prata. As quantidades de peçonha aplicadas (em µg) estão indicadas. As setas pretas indicam bandas com coloração fraca em ambas as peçonhas e as setas brancas indicam bandas de proteínas observadas exclusivamente na peçonha de *P. olfersii*.

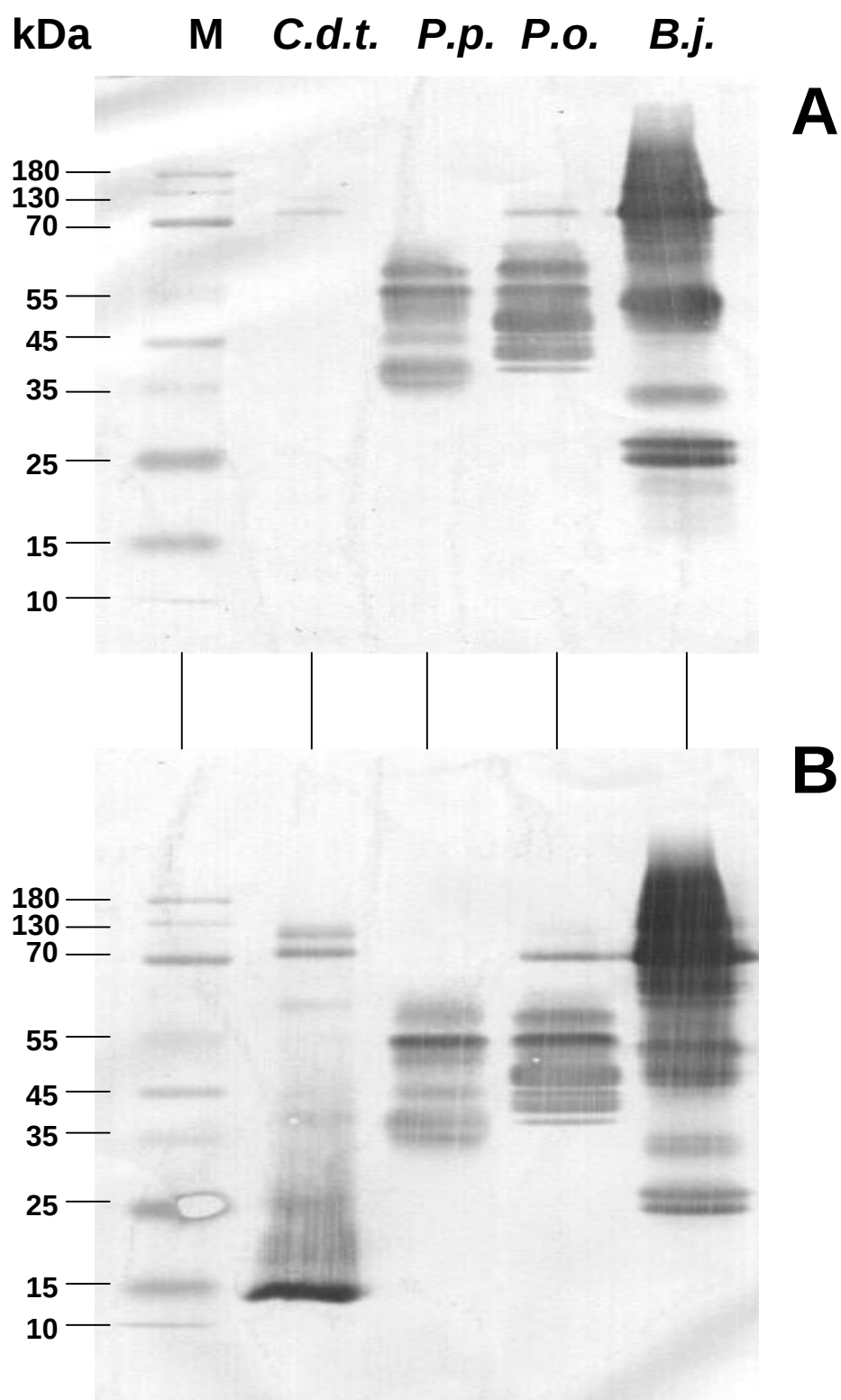


Fig. 9 - *Imunoblot* das peçonhas de *P. olfersii* e *P. patagoniensis* frente ao soro antitropical (A) e soro antivenomático (B). As peçonhas de *B. jararaca* e *C. d. terrificus* estão mostradas para comparação. Foram aplicados 10 µg de cada peçonha. Os *blots* foram revelados conforme descrito nos Métodos.

7.3.2 ELISA

A Figura 10 mostra a reatividade das peçonhas de *P. olfersii* e *P. patagoniensis* com os soros antibotrópico (A) e anticrotático (B) comparadas às peçonhas de *B. jararaca* e *C. d. terrificus*. A reatividade de ambas as peçonhas de *Philodryas* foram bem parecidas frente a cada soro. Com o soro antibotrópico estas duas peçonhas foram mais ativas que a peçonha de *C. d. terrificus* sugerindo uma semelhança imunológica maior com peçonhas botrópicas que a peçonha de *C. d. terrificus*. Já com o soro anticrotático, as duas *Philodryas* mostraram-se bem menos reativas que a peçonha de *B. jararaca*. Estes achados indicam uma proximidade imunológica maior das *Philodryas* com as peçonhas botrópicas de que com a peçonha de *C. d. terrificus*. Curiosamente, esta divergência na imunorreatividade total das peçonhas de *Philodryas* com os dois soros difere dos perfis obtidos no *imunoblot* onde as peçonhas mostraram reatividades semelhantes com os soros (ver Figura 9).

7.4 Análise morfológica

Os músculos *biventer cervicis* controles incubados com solução de Krebs durante 120 minutos mostraram estruturas normais, como por exemplo, as fibras organizadas em feixes paralelos longitudinais, núcleos periféricos alinhados, diâmetro das fibras musculares normais e similares e membrana celular sem rupturas (Fig. 11). Nos músculos *biventer cervicis* incubados com peçonha de *P. patagoniensis* observou-se lesões que se tornaram mais evidentes nas concentrações mais altas de peçonha. Na concentração de 1 µg/mL (n=4), grande parte das fibras musculares apresentavam-se íntegras, e as fibras estavam intactas quanto a lesões nas membranas. Porém, muitas delas apresentavam-se onduladas e contorcidas. As estrias transversais desapareceram em muitas fibras, estando, porém, presentes em muitas outras (Fig. 11). Os músculos incubados com 5 (n=3) e 10 (n=5) µg/mL apresentaram alterações estruturais mais acentuadas. Além de fibras contorcidas, observamos também rupturas de fibras. Estes achados indicam necrose dessas fibras, comprometendo a contração muscular (Fig. 12).

Na concentração de 40 µg/mL (n=5), as alterações descritas anteriormente mostraram-se mais evidentes. Além de células rompidas, observamos também que os

diâmetros das mesmas estavam aumentados, mostrando que a peçonha induz edema intracelular. Mesmo assim, muitas fibras estavam intactas mostrando as estrias formadas pelas miofibrilas (Fig. 12).

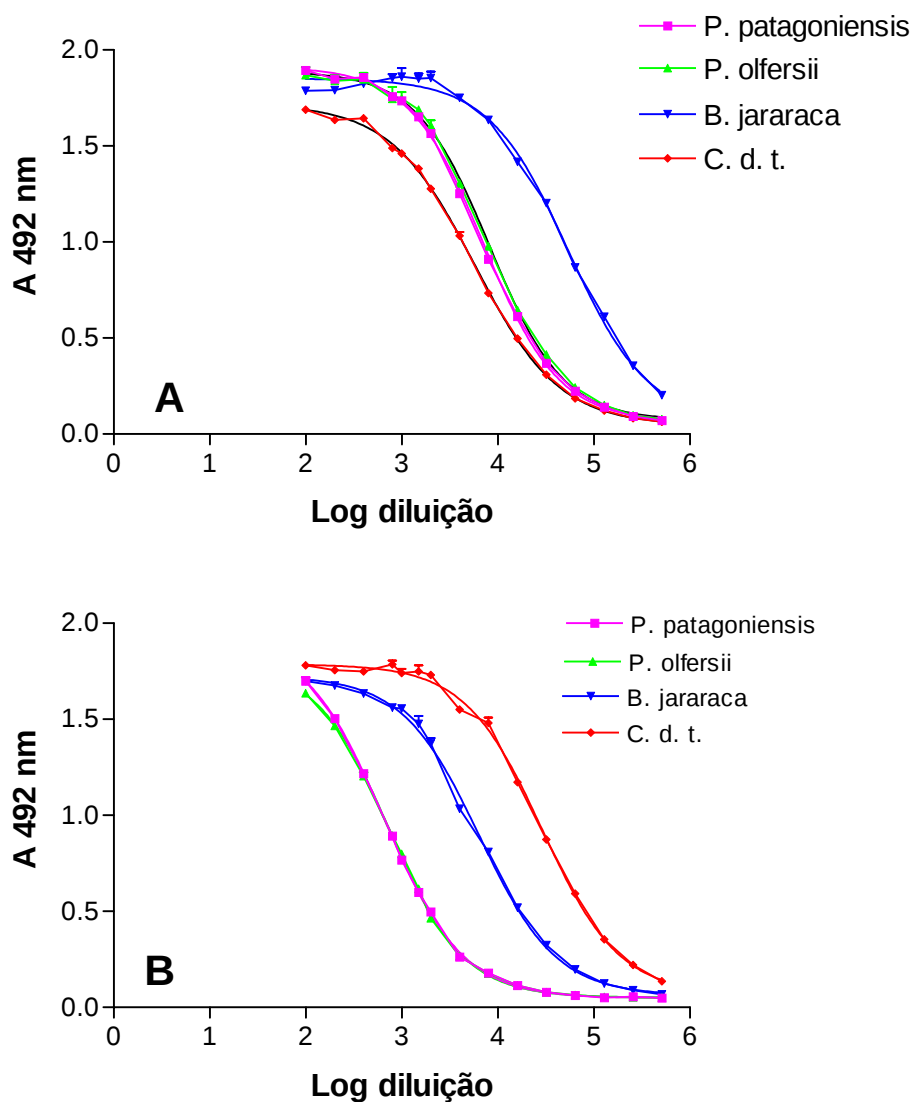
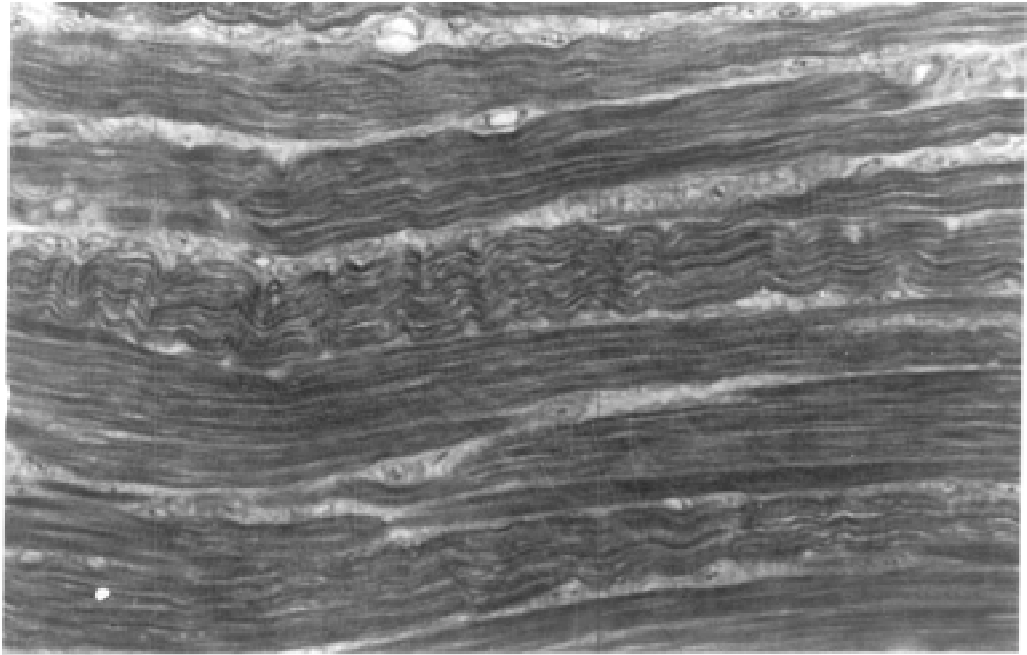


Fig.10 - Imunorreatividade das peçonhas de *P. olfersii* e *P. patagoniensis* com os soros antibotrópico (A) e anticrotálico (B) comparadas às peçonhas de *B. jararaca* e *C. d. terrificus*. Os pontos representam a média $\pm$ E.P.M. de três determinações (na maioria dos casos, as barras são menores que os símbolos). Os ensaios foram feitos conforme descrito nos Métodos.

A



B

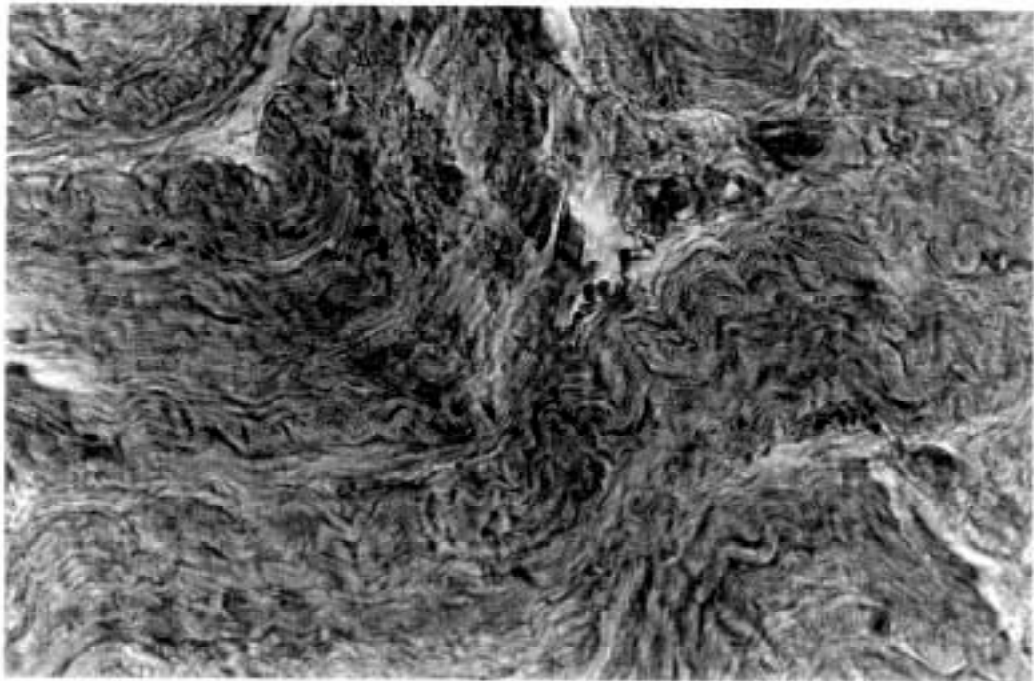


Fig. 11: Morfologia do músculo *biventer cervicis* de pintainho incubado com peçonha de *P. patagoniensis* durante 120 minutos. **A:** Controle: músculos incubados com solução de Krebs apenas. As fibras musculares mostram-se normais, com estrias características e núcleos periféricos. H.E. 400X. **B:** músculos incubados com peçonha na concentração 1 μ g/ml. Observamos que existem regiões de fibras altamente contorcidas. H.E. 400X.

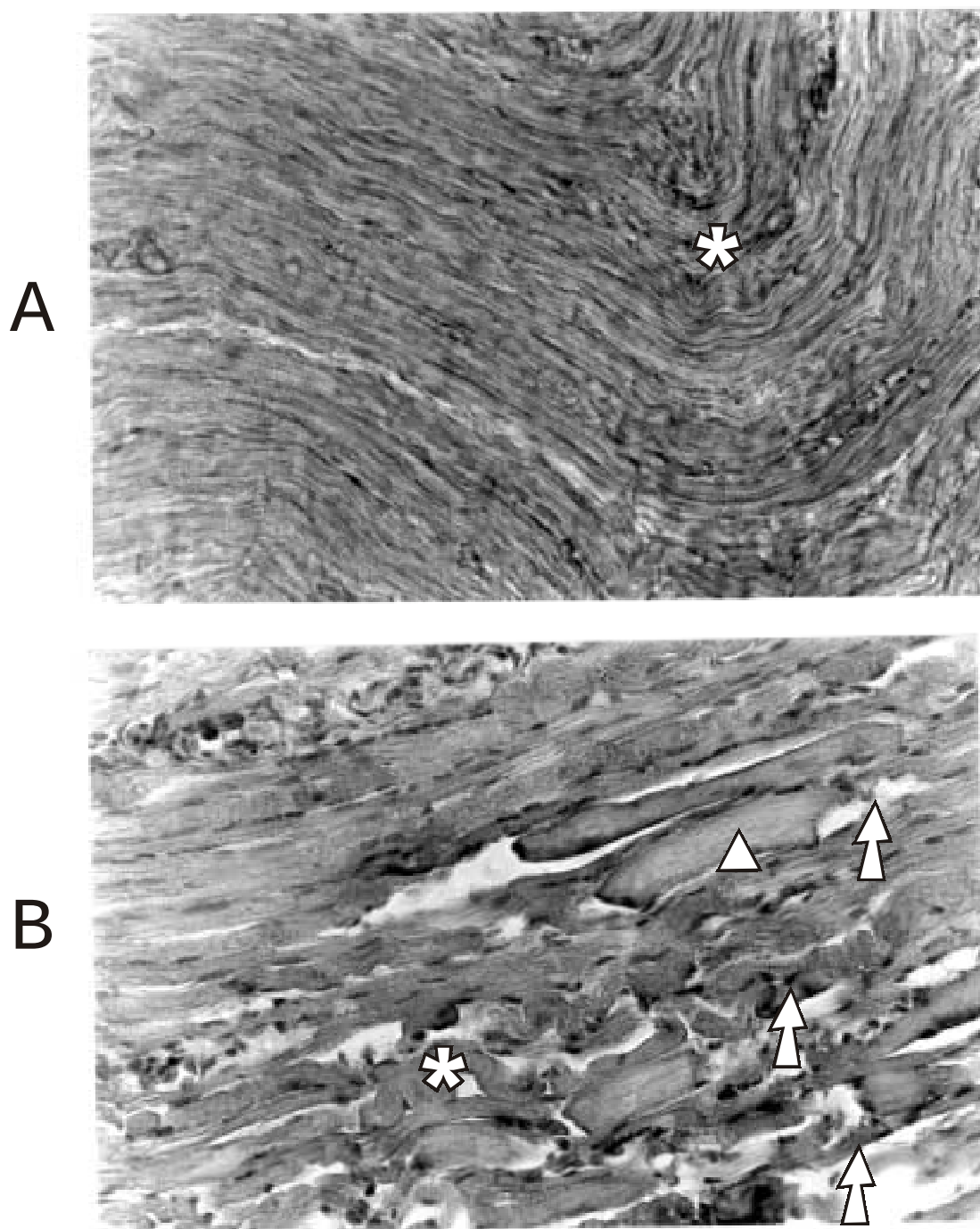


Figura 12: Morfologia do músculo *biventer cervicis* de pintainho incubado com peçonha de *P. patagoniensis* durante 120 minutos. **A:** músculos incubados com 5 µg/ml. Observamos fibras altamente contorcidas (asterisco) e de aspecto frouxo. H.E. 400X. **B:** Na concentração de 40 µg/ml, observamos fibras rompidas (setas), contorcidas (asterisco) e com diâmetro aumentado. Em algumas regiões o aspecto estriado do músculo foi perdido. H.E. 400X.

8. DISCUSSÃO

O gênero *Philodryas* possui 15 espécies distribuídas ao redor da América do Sul. Embora freqüentemente consideradas como serpentes não peçonhentas, várias espécies deste gênero são capazes de causar envenenamento em humanos (PRADO-FRANCESCHI; HYSLOP, 2002). Diferentemente de serpentes como a *B. jararaca*, a *C. d. terrificus* e outras, a incidência de acidentes causados por serpentes do gênero *Philodryas* é baixa, talvez devido à anatomia de seu aparato inoculador, onde a injeção da peçonha fica dificultada por se tratarem de serpentes opistóglifas, ou ainda pelo fato de serem serpentes de hábitos relativamente não agressivos. Acosta *et al.* (2003) relatam a presença de equimoses no local da picada, muito semelhante aos envenenamentos causados por serpentes do gênero *Bothrops* e, em acordo com Araujo e Santos (1997), apontam a má-interpretação dos sintomas locais como principal fator que leva à aplicação inadequada de tratamento com a administração do soro antiofídico.

Embora a maioria dos estudos clínicos e toxinológicos ter sido relacionada à espécie *P. olfersii* (ASSAKURA *et al.*, 1994; PRADO-FRANCESCHI *et al.*, 1996, 1998; RIBEIRO *et al.*, 1999), a *P. patagoniensis* também é capaz de causar acidentes em humanos. A sintomatologia do envenenamento por esta espécie inclui edema progressivo com supuração em alguns casos, aparecimento de linfopatia nodular após 48 horas, perda de sensibilidade tátil e paresia, além de sensação de peso no membro atingido (ARAÚJO e SANTOS, 1997). Martins (1901-1917), aponta para a existência de grandes semelhanças entre os envenenamentos ocasionados por *P. patagoniensis* e *P. olfersii*.

O estudo comparativo procedido por Rocha *et al.* (2003) demonstrou que a maioria dos componentes das peçonhas de *P. olfersii* e *P. patagoniensis* são glicoproteínas, e que apresentam atividades similares, com variações na intensidade e na cinética das ações. Acosta *et al.* (2003) mencionam que a toxicidade (LD₅₀) das peçonhas destas duas espécies de *Philodryas* é comparável à de várias espécies do gênero *Bothrops*; destaca ainda a grande diferença verificada ao se comparar a atividade proteolítica destas peçonhas com as botrópicas (143 U/mg de peçonha de *P. patagoniensis* e 20 U/mg de peçonha de *B. alternatus*). A alta atividade proteolítica das

peçonhas de *Philodryas* tem sido comprovada por outros (PEICHOTO *et al.*, 2003; RUIZ *et al.* 2001). Os resultados obtidos no nosso estudo estão de acordo com estes autores. Por outro lado, observamos que as peçonhas de *Philodryas* possuíam baixos níveis de esterase e fosfolipase quando comparadas à peçonha botrópica e crotálica. Esta baixa atividade esterásica e fosfolipásica é comum em peçonhas de colubrídeos de modo geral (WEINSTEIN; KARDONG, 1994; MACKESSY, 2002b).

A peçonha da *P. patagoniensis* não afetou as respostas miográficas nas preparações nervo frênico-diafragma de camundongo, fato este também relatado para *P. olfersii* (PRADO-FRANCESCHI *et al.*, 1996) e *Mastigodryas bifossatus* (FONTANA *et al.*, 1997). Por outro lado, a peçonha induz bloqueio das respostas contráteis em preparação *biventer cervicis* de pintainho de forma muito semelhante ao efeito relatado para *P. olfersii* (PRADO-FRANCESCHI *et al.*, 1996, 1998). Esta diferença na ação sobre espécies diferentes poderia estar ligada a uma seletividade para certo tipo de presa na dieta dessas serpentes.

Lavagens sucessivas com solução de Krebs não reverteram o bloqueio da resposta muscular, fato esse sugestivo de que a peçonha age de forma irreversível sobre o músculo *biventer cervicis* de aves. Interessante notar a proximidade das curvas traçadas entre as concentrações de 5 (n=3), 10 (n=5) e 40 (n=5) µg/mL, sugerindo que dosagens superiores pouco poderão influenciar no bloqueio das respostas contráteis do músculo, a não ser quanto ao tempo de início destas alterações de bloqueio.

Nas concentrações de 1, 5 e 10 µg/mL, a musculatura é levada a bloqueio, contratura e alterações que podem ser notadas nas miografias e nas dosagens de CQ, enquanto a histologia mostrou fibras com alto índice de contorção, entretanto, as contraturas induzidas pelo acetilcolina (ACh) e pelo íon potássio (K⁺) não demonstraram diferenças estatisticamente significantes. A concentração de 40 µg/mL induziu a ocorrência de contratura e mionecrose com destruição de fibras musculares. Esses fatos foram observados na histologia, nas medidas de CQ, nas miografias e nas alterações estatisticamente significantes das contraturas induzidas pelo ACh e K⁺. A contratura se diferencia da contração muscular normal por ser um encurtamento de fibras musculares cuja despolarização ocorre de forma sustentada e lenta, não se propagando, enquanto que o normal seria a despolarização rápida da placa terminal

gerando um potencial de ação que se propaga por toda a fibra muscular dando origem a uma contração (MARTINS, 2004).

No que concerne às contraturas musculares produzidas pela adição do neurotransmissor acetilcolina e do íon potássio ao banho, de relativa importância é o fato de que apenas nas concentrações mais elevadas de peçonha é que foi notada uma diminuição das respostas contráteis. Assim, nas menores concentrações de peçonha, a resposta à ACh (55 μ M e 110 μ M) não foi alterada, fato sugestivo de que nessas concentrações de peçonha, os receptores nicotínicos não estão sendo afetados. Entretanto, em concentração mais elevada (40 μ g/mL), ocorreu diminuição das contraturas, esse fato nos leva a considerar a possibilidade da peçonha começar agindo diretamente nas fibras musculares.

O mesmo resultado é observado ao se utilizar o íon potássio (13,4 mM) para evocar contraturas, desse fato podemos depreender que em menores concentrações de peçonha as lesões que ocorrem nas membranas das fibras musculares não as impossibilitam de contrair, entretanto, nas concentrações maiores, o bloqueio das contraturas é constantemente observado.

As alterações estruturais provocadas pela peçonha de *P. patagoniensis* se mostraram acompanhadas de elevação na concentração de creatinoquinase (CK ou CQ) na solução do banho das preparações musculares. De modo geral, a liberação de CK foi proporcional à concentração de peçonha. As lesões observadas no estudo histológico explicam a liberação de CK, embora em doses menores de peçonha não tenha sido observada mionecrose. É possível que o bloqueio observado esteja relacionado à mionecrose e ao rompimento das fibras musculares. É possível também que a alta atividade proteolítica da peçonha tenha contribuído tanto para o bloqueio neuromuscular como para a mionecrose e dano tecidual.

Conforme mostrado pelo perfil eletroforético, as principais toxinas da peçonha têm massa molecular entre 30 e 80 kDa, faixa semelhante àquela observada para *P. olfersii*. A imunorreatividade vista com os soros antibotrópico e anticrotálico indicam que a peçonha de *P. patagoniensis* compartilha com as peçonhas botrópicas e crotálicas várias proteínas que são imunologicamente parecidas. Esta reatividade cruzada também sugere que estes soros poderiam neutralizar as atividades biológicas da peçonha, embora

isso não tenha sido investigado aqui. Caso esta hipótese seja comprovada, o soro antibotrópico pode ser útil em casos de envenenamento grave por esta espécie.

9. CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos neste estudo podemos concluir que:

1. A peçonha de *P. patagoniensis* induz importantes alterações miográficas e morfológicas sobre a preparação muscular de aves, sem demonstrar alterações importantes em preparações musculares de mamíferos;
2. O bloqueio total das respostas contráteis do músculo de aves mostrou-se concentração-dependente em doses menores, fato que não se repetiu para concentrações maiores;
3. O bloqueio também se mostrou irreversível mediante lavagens sucessivas das preparações;
4. As alterações induzidas pela peçonha de *P. patagoniensis* foram acompanhadas por elevação dos níveis da enzima creatinoquinase na solução do banho;
5. Em baixas concentrações, a peçonha induz bloqueio muscular, mas não produz mionecrose, estando, portanto, ainda não compreendida a origem desse bloqueio, a resposta ao ACh e ao K^+ ainda permanecem, mostrando que a peçonha não agiu sobre os receptores nicotínicos colinérgicos, pois devido à resposta do K^+ temos que a fibra muscular continua íntegra;
6. A atuação da peçonha em altas doses sobre a fibra muscular parece ser a causa mais provável do bloqueio observado nas preparações musculares de aves tendo como principal motivo a presença de enzimas proteolíticas, e as contraturas produzidas pelo ACh e K^+ estão diminuídas demonstrando degradação geral da fibra muscular;
7. A peçonha possui alta atividade proteolítica e baixas atividades esterásica e fosfolipásica quando comparada à peçonha botrópica e crotálica.
8. Baseada na eletroforese, a peçonha possui toxinas com massa molecular de varia de 30 a 80 kDa.
9. Em testes de ELISA e *imunoblot* a peçonha mostrou imunorreatividade cruzada com soros antibotrópico e anticrotálico, sendo que o ELISA sugeriu uma

afinidade maior para peçonhas botrópicas de que para crotálicas. Entretanto, com ambos os soros, as bandas de reatividade vistas no *imunoblot* foram muito parecidas.

10. Estes achados indicam que a peçonha de *P. patagoniensis* se assemelha muito à de *P. olfersii* quanto a algumas atividades bioquímicas e farmacológicas.

REFERÊNCIAS

ACOSTA, O.; PEICHOTO, M.E., LEIVA, L.C.; MARUNAK, S.; TEIBLER, P.; REY, L. Hemorrhagic activity of the Duvernoy's gland secretion of the xenodontine colubrid *Philodryas patagoniensis* from the north-east region of Argentina. **Toxicon** v.41, p.1007-1112, 2003.

ALBERTS, B *et al.* **Biologia molecular da célula**. 3.ed., Porto Alegre : Artes Médicas. 1997, p. 609, G-11.

ARAUJO, M.E.; DOS SANTOS, A C.M.C.A. Cases of human envenoming caused by *Philodryas olfersii* and *Philodryas patagoniensis* (serpentes; Colubridae). **Rev.Soc.Bras.Med.Trop.** v.30 n.6 nov-dec. p.517-519.1997.

ASSAKURA, M.T.; REICHEL, A P.; MANDELBAUM, F.R Isolation and characterization of five fibrin(ogen)olytic enzymes from the venom of *Philodryas olfersii* (green snake). **Toxicon** v.32,p. 819-831. 1994.

BEGHINI, D.G.; TOYAMA, M.H.; HYSLOP, S.; SODEK, L.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S. Enzymatic characterization of a novel phospholipase A₂ from *Crotalus durissus cascavella* rattlesnake (maracambóia) venom. **J. Protein Chem.** v.19, p.603-607.2000.

BOTES, D.P.; VILJOEN, C.C. Influence of pH on the kinetic and spectral properties of phospholipase A₂ from *Bitis gabonica* (gaboon adder) snake venom. **Toxicon.** v.17,n.1,p. 77-87. 1979.

BOTES, D.P.; MEEHAN, C.M.; VILJOEN, C.C. Separation of *Bitis gabonica* (gaboon adder) venom arginine esterases into kinin-releasing, clotting and fibrinolytic factors. **Toxicon.** v.17, n.2,p. 145-154. 1979.

BRAZIL, O; VELLARD , J. Contribuição ao estudo das glândulas das serpentes aglyphas. *Mem. Inst. Butantan* v.3, p.301-325. 1926.

BROADERS, M.; FARO, C.; RYAN, M.F. Partial purification of acetylcholine receptor binding components from the Duvernoy's secretion of Blanding's treesnake (*Boiga blandingi*) and the mangrove snake (*Boiga dendrophila*). *J. Nat. Toxins* v.8, p.155-166. 1999.

BÜLBRING, E. Observation on the isolated phrenic nerve diaphragm preparation of the rat. *Br. J. Pharmacol.* v.1, p.38. 1946.

COCO, J.C. **Estudo da fração fosfolipásica A₂ isolada do veneno de *Bothrops insularis* na junção neuromuscular.** Tese (Doutorado)- Instituto de Biologia - Unicamp. 1995.

CHIPPAUX, J.P.; WILLIAMSEG, V.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon* v.11, p.1279-1303. 1991.

DE LISLE, H.F. Venomous colubrid snakes. *Bull. Chicago Herp. Soc.* v.17, p.1-17.1982.

FONTANA, M.D.; HELENO, M.G.; VITAL BRAZIL, O. Mode of action of Duvernoy's gland extracts from the colubrid *Dryadophis bifossatus* in the chick biventer cervicis nerve-muscle preparation. *Toxicon* v.34, p. 1187-1190. 1996.

FREITAS, M.A. **Serpentes da Bahia e do Brasil.** Feira de Santana : Dall, 1999. p. 5.

GANS, C. Reptilian venomseg: some evolutionary considerations. In: **Biology of the Reptilia**, London: Academic Press, 1978. Physiology B, v. 8, p. 1-41.

GINSBORG, B.L.; WARRINER, J. The isolated chick biventer cervicis nerve muscle preparation. *Br. J. Pharmacol.* v.15, p.410-415. 1960.

H. TOWBIN, T. Staehelin, J. Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 4350-4354

HARDING, K.A A brief review of colubrid snakebite. *ASRA J.* 2, p.65-72.1984.

HELENO, M.G.; GRÉGIO, A M.; HYSLOP, S.; FONTANA, M.D.; VITAL BRAZIL O . Partial purification of a neurotoxic component from a Duvernoy's gland extract of the aglyphous *Mastigodryas bifossatus*. *J. Anim. Venom. Toxins* n.3, poster 64.1977.

HILL, R.E.; MACKESSY, S.P. Venom yields from several species of colubrid snakes and differential effects of ketamine. *Toxicon* v.35,p. 671-678.1997.

_____. Characterization of venom (Duvernoy's secretion) from twelve species of colubrid snakes and partial sequence of four venom proteins. *Toxicon* v.38, p.1663-1687.2000.

JANSEN, D.W. The myonecrotic effect of Duvernoy's gland secretion of the snake *Thamnophis elegans vagrans*. *J. Herpetol.* v.21, p.81-83. 1987.

JAUME , M.L Notas sobre mordeduras toxicas de serpientes (Reptilia – Serpentes – Colubridae). *Rev. Cub. Med. Trop.* v.35, p. 224-230. 1983.

JORGE, M.T.; RIBEIRO, L.A . Acidentes por serpentes peçonhentas do Brasil. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v.36, p.: 66-77, 1990.

KOCHVA, E Oral glands of the Reptilia. In: **Biology of the Reptilia**, New York: Academic Press, 1978. *Physiology B* , v.8, p. 43-161

_____. The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. *Toxicon* v.25, p.65-106. 1987.

LEIVA, L.C.; PEICHOTO, M.E.; MARUNAK, S.; TEIBLER, P.; ACOSTA, O.; REY, L. Actividad hemorrágica Del veneno de *Philodryas patagoniensis* (characterization of hemorrhagic activity of the *Philodryas patagoniensis* venom). JORNADAS INTERDISCIPLINARIAS DE TOXICOLOGÍA, 22., Disponível em: www.ataonline.org.ar/002/jornadas/trabajos/otras/04.htm, Acesso: 10 jan. 2004.

LEVINSON, S.R.; EVANS, M.H.; GROES, F. A neuromuscular component of the Duvernoy's secretion from Blanding's tree snake (*Boiga blandingi*). *Toxicon* v.14, p.307-312. 1976.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A. L.; RANDALL, R.J Protein measurements with Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* v.193, p.265-275. 1951.

MACKESSY, S.P. Toxinology of colubrid snakes: biology, venomseg, and envenomation. *J. Toxicol. – Toxin Rev.* v.21, p.1-201. 2002a

_____. Biochemistry and pharmacology of colubrid snake venomseg. *J. Toxicol. – Toxin Rev.* v.21, p. 33-63. 2002b.

MARTINS, N. **Das opisthoglyphas brasileiras e seu veneno.** Coletânea de Trabalhos do Instituto Butantan, p. 427-496, 1917.

MARTINS, T.D. **Estudo do mecanismo de ação da procainamida sobre a junção neuromuscular.** Dissertação (Mestrado) – FCM, Unicamp. 2004.

MCKINSTRY, D.M Evidence of toxic saliva in some colubrid snakes of the United States. *Toxicon* v.16, 523-534. 1978.

_____. Morphological evidence of toxic saliva in colubrid snakes. A checklist of world genera. *Herpetol. Rev.* v.14, p. 12-15. 1983.

MINTON, S.A A list of colubrid envenomations. *Ky. Herpet.* v.7, p.4-5.1976.

_____. Beware: nonpoisonous snakes. *Clin. Toxicol.* v.15, p.259-265. 1979.

_____. Venomous bites by nonvenomous snakes: an annotated bibliography of colubrid envenomation. *J. Wild. Med.* v.1, p. 119-127. 1990.

_____. Are there any nonvenomous snakes? An update on colubrid envenoming. *Adv. Herpetoculture* v.4, p. 127-134. 1996.

PEICHOTO, M.E.; LEIVA, L.C.; ACOSTA, O; MARUNAK, S.; RUÍZ, R.; TEIBLER P. **Caracterización del veneno de *Philodryas patagoniensis* del nordeste de Argentina.** Universidad Nacional del Nordeste: Comunicaciones científicas y tecnológicas 2003. Resumen: E-068.

PRADO-FRANCESCHI, J.; HYSLOP, S. South American colubrid envenomations. *J. Toxicol. – Toxin. Rev.* v.21, p. 87-113. 2002.

PRADO-FRANCESCHI, J.; HYSLOP, S.; COGO, J.C.; ANDRADE, A L.F.; ASSAKURA, M.T.; CRUZ-HÖFLING, M.A ; RODRIGUES-SIMIONI, L. The effects of Duvernoy's gland secretion from the xenodontine colubrid *Philodryas olfersii* on striated muscle and the neuromuscular junction: partial characterization of a neuromuscular fraction. *Toxicon* v.34, p. 459-466. 1996.

_____. Characterization of a myotoxin from the Duvernoy's gland secretion of the xenodontine colubrid *Philodryas olfersii* (green snake): effects on striated muscle and the neuromuscular junction. *Toxicon* 36, 1407-1421. 1998.

PRIANTI JUNIOR, A.C.G; COGO, J.C.; Effect of *Bothrops leucurus* venom in chick *biventer cervicis* preparations. *Toxicon* v.41, p.595-603, 2003.

RIBEIRO, L A ; PUORTO, G.; JORGE, M.T Bites by the colubrid snake *Philodryas olfersii*: a clinical and epidemiological study of 43 cases. *Toxicon*, v.37 ,p. 943-948, 1999.

ROCHA, M.M.T.; FURTADO, M.F. Comparative study of venom of *Philodryas olfersii* and *Philodryas patagoniensis* (Serpentes: colubridae). *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, v. 9,n. 2, p.368. 2003.

RUIZ, D.E .;TORRENT, R.; LEIVA, L.C.A Y.;, ACOSTA DE PÉREZ, O, Efecto proteolitico de venenos de serpientes del género *Bothrops* (yará) de la Argentina y su neutralización por un antiveneno bivalente. *Acta Toxicol. Argent.* v.9 , n.1,p. 9-12. 2001.

SALOMÃO, M.G.; PUORTO, G.; FURTADO, F.; SAWAYA, P. *Philodryas olfersii*: morphological, histochemical studies of Duvernoy's gland venom extraction. In: SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TOXINOLOGIA,. PEÇONHAS E ENVENENAMENTO NO BRASIL. 1., São Paulo. **Resumos...** São Paulo: Instituto Butantan, p.8, 1990.

SILVA, M.V.; BUONONATO, M.A Relato clínico de envenenamento humano por *Philodryas olfersii*. In: Memórias do Instituto Butantan v.47/48, p. 121-126, 1983/1984.

SLYPEN, F. Venomous or not? *Litt. Serpentarium* v.4, p. 42-56. 1984.

SOUZA FILHO ,S.P.; COGO, J.C.; PUORTO, G Obtenção do veneno de serpentes não peçonhentas opistóglifas. In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 3., São José dos Campos. **Resumos...**, v. 1, p. 86. 1999.

TAUB , A M Comparative studies on Duvernoy's gland of colubrid snakes. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* n 138, p.1-50. 1967.

U.K. LAEMMLI, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄, *Nature* 227 (1970) 680-685.

WEINSTEIN, S.A; KARDONG, K.V. Properties of Duvernoy's secretion from opisthoglyphous and aglyphous colubrid snakes. *Toxicon* v.32, p. 1161-1185. 1994.

WEINSTEIN, S.A ; SMITH, L.A Chromatographic profiles and properties of Duvernoy's secretions from some boigine and dispholidine colubrids. *Herpetologica* v.49, p.78-94. 1993.

WEINSTEIN, S.A; STILES, B.G.; MCOID ,M.J.; SMITH, L.A; KARDONG, K.V Variation of lethal potencies and acetylcholine receptor binding activity of Duvernoy's secretions from the brown tree snake, *Boiga irregularis* Merrem. *J. Nat. Toxins* v.2, p.198-198.1993.

YOUNG, R.A Effects of Duvernoy's gland secretion from the eastern hognose snake, *Heterodon platyrhinos*, on smooth muscle and neuromuscular junction *Toxicon* v. 30, p.775-779. 1992.

_____. *In vitro* activity of Duvernoy's gland secretions from the African boomslang, *Dispholidus typus*, on nerve-muscle preparations. *J. Venom. Anim. Toxins* v.2, p.52-58. 1996.