

Perfil eletroforético das proteínas séricas de serpentes *Crotalus durissus terrificus* (cascavel) criadas em cativeiro¹

Joandes Henrique Fonteque^{2*}, Aguemi Kohayagawa³, Regina Kiomi Takahira³, Ednelson Henrique Bianchi⁴, André Luís Cherubini⁴, Adriana Piccinin⁵, Edson Marcelo Bruder⁵ e Paulo Roberto Rodrigues Ramos⁵

ABSTRACT.- Fonteque J.H., Kohayagawa A., Takahira R.K., Bianchi E.H., Cherubini A.L., Piccinin A., Bruder E.M. & Ramos P.R.R. 2009. [Serum protein electrophoresis profile of the rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* kept in captivity.] Perfil eletroforético das proteínas séricas de serpentes *Crotalus durissus terrificus* (cascavel) criadas em cativeiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 29(6):457-460. Departamento de Medicina Veterinária, Hospital de Clínica Veterinária, Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Av. Luiz de Camões 2090, Lages, SC 88520-000, Brazil. E-mail: fonteque@cav.udesc.br

The poisonous snakes of the genera *Crotalus* and *Bothrops* have been kept in captivity with the purpose of extracting poison for the production of immunobiological. Knowledge of the physiology of these animals and serum proteins concentration changes are important for early identification of major diseases which lead to states of hypoproteinemia and hyperproteinemia. The objective was to determine the concentration of total protein and serum protein electrophoresis profile of *Crotalus durissus terrificus* (rattlesnake) in captivity. Blood samples were taken from the ventral coccygeal vein of 21 adult and healthy snakes divided into groups: Group 1 with 12 males, weighing in average 588.89±193.55g, and Group 2 with nine females, weighing in average 708.33±194.04g. The total serum concentration of protein was determined by the method of refractometry and agarose gel electrophoresis. The total protein values in the serum for females was 4.82±0.72, for males 4.51±0.50 and males and females 4.64±0.61, identified by four fractions (g/dL): albumin, a, b and g-globulin. Additionally the albumin/globulin ratio was calculated. The female snakes showed higher values for the variables, albumin and the albumin/globulin (AG) differed significantly ($P<0.05$) from the group of male snakes, but there was no clinical significance.

INDEX TERMS: Protein fractions, albumin, alpha, beta and gamma-globulin, sex, agarose gel.

RESUMO.- As serpentes peçonhentas dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* têm sido mantidas em cativeiro visando à extração de venenos para a produção de

imunobiológicos. O conhecimento da fisiologia desses animais e as alterações na concentração de proteínas e suas frações séricas são importantes para a identificação precoce de importantes enfermidades que cursam com estados de hipoproteinemia e hiperproteinemia. O objetivo do trabalho foi determinar a concentração de proteína total e o perfil eletroforético das proteínas séricas de serpentes *Crotalus durissus terrificus* (cascavel) criadas em cativeiro. Foram colhidas amostras de sangue da veia coccígea ventral de 21 serpentes adultas e sadias, divididas em dois grupos: Grupo 1 de 12 machos com peso médio de 588,89±193,55g, e Grupo 2 de nove fêmeas com peso médio de 708,33±194,04g. A proteína total sérica foi determinada pelo método de refratometria e a eletroforese em gel de agarose. Obtiveram-se valores da

¹ Recebido em 17 de novembro de 2008.

Aceito para publicação em 9 de abril de 2009.

² Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Av. Luiz de Camões 2090, Lages, SC 88519-000, Brasil. *Autor para correspondência: fonteque@cav.udesc.br

³ Departamento de Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Unesp, Distrito de Rubião Jr s/n, Botucatu, SP 18618-000, Brasil.

⁴ Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos, CEVAP, Unesp, Botucatu, SP.

⁵ Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Unesp, Botucatu, SP.

proteína total sérica (g/dL) de $4,51 \pm 0,50$ para machos e de $4,82 \pm 0,72$ para fêmeas, e para machos e fêmeas de $4,64 \pm 0,61$. Foram identificadas pela eletroforese quatro frações protéicas (g/dL): albumina, a, b, g-globulinas e calculada a relação albumina:globulina. As serpentes fêmeas apresentaram maiores valores para as variáveis, albumina e para a relação albumina/globulina (AG) diferindo significativamente ($P < 0,05$) do grupo de machos, porém sem significado clínico.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Frações protéicas, albumina, alfa, beta e gama-globulinas, sexo, gel de agarose.

INTRODUÇÃO

O envenenamento causado por serpentes constitui um dos problemas mais importantes na Medicina e Medicina Veterinária nos países tropicais, devido a sua alta incidência, gravidade e seqüelas das lesões (Sgarbi et al. 1995, Berrocal et al. 1998, Pinho et al. 2000, Sangiorgio et al. 2008). Na América do Sul os gêneros *Bothrops* e *Crotalus* são responsáveis pela maioria dos acidentes ofídicos envolvendo seres humanos e animais (Dourado et al. 1988, Kouyoumdjian 1990, Sorensen 1990, Barraviera 1991, Ribeiro 1991, Méndez & Riet-Correa 1995, Sgarbi et al. 1995, Pinho et al. 2000). O gênero *Crotalus* da família Crotalidae e sua subespécie *Crotalus durissus terrificus* são a segunda mais importante causa de acidentes no Brasil (Nogueira et al. 2007).

As serpentes do gênero *Crotalus* encontradas no Brasil são facilmente identificadas por possuírem na porção terminal da cauda um gizo ou chocalho característica peculiar da espécie (Pinho et al. 2000). Essas serpentes normalmente são encontradas em campos abertos, áreas secas, arenosas e pedregosas e são raras nas faixas litorâneas (Pinho et al. 2000, Tokarnia & Peixoto 2006).

A criação em cativeiro de serpentes peçonhentas dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* tem sido realizada com sucesso e visa a obtenção, cristalização e liofilização do veneno para fins de pesquisa e desenvolvimento biotecnológico, produção experimental de subprodutos biológicos, além do conhecimento da bioecologia e reprodução (Serapicos & Merusse 2002, CEVAP 2008). O conhecimento da fisiologia desses animais criados em cativeiro é importante para estabelecer o estado de saúde, possibilitando a identificação precoce de importantes enfermidades que cursam com hipoproteinemia e hiperproteinemia (Mader 1996, Machado et al. 2005, Kaneko 2008).

Existe um grande número de métodos empregados na separação eletroforética das proteínas séricas, os quais diferem basicamente no tipo do meio de suporte usado. O acetato de celulose ainda é utilizado, entretanto, seu uso vem sendo suplantado pelo gel de agarose, como o meio de escolha dos laboratórios clínicos (Kaneko 2008). O amplo uso da eletroforese é justificado pela variedade de alterações que ocorrem nas frações protéicas nos vários estados fisiológicos e nas diversas enfermidades

(Naoum 1990). Somente pequenas mudanças no padrão eletroforético não podem ser consideradas como diagnóstico de uma doença específica, porém os resultados da eletroforese quando devidamente interpretados, podem ser úteis como prognóstico e diagnóstico auxiliar na avaliação clínica (Kaneko 2008).

Devido à importância do conhecimento do padrão eletroforético, a escassa literatura sobre serpentes mantidas em cativeiro e a ausência de trabalhos relacionados ao padrão eletroforético em cascavéis, os objetivos do trabalho foram determinar a concentração de proteína e o perfil eletroforético das proteínas séricas de serpentes do gênero *Crotalus durissus terrificus* (cascavel) criadas em cativeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido no Laboratório Clínico Veterinário Aguemí Kohayagawa da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e no Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP) da FMVZ-Unesp, Campus de Botucatu, SP.

Foram utilizadas 21 serpentes *Crotalus durissus terrificus* (cascavel) adultas e clinicamente sadias mantidas em cativeiro, criadas em baias externas e pertencentes ao CEVAP. As serpentes foram contidas por método físico e colhidas amostras de sangue total da veia coccígea ventral (veia caudal ventral) utilizando-se agulha 22G e seringas plásticas descartáveis de 1,0mL sem anticoagulante. Os animais foram divididos dois grupos, sendo Grupo 1 de 12 machos, com peso de médio de $588,89 \pm 193,55$ g, e Grupo 2 de nove fêmeas, com peso médio de $708,33 \pm 194,04$ g. As amostras de sangue foram centrifugadas e o soro congelado a temperatura de menos 20°C até o momento do processamento das amostras.

A proteína total sérica foi determinada pelo método da refratometria (Refratômetro, Attago), segundo Kaneko (2008).

A eletroforese foi realizada em géis de agarose (Celmigel, Companhia Equipadora de Laboratórios Modernos, Barueri, São Paulo, Brasil), utilizando-se tampão Veronal, EDTA 0,05M em pH 8,6, ácido acético 5% e corados com Negro de Amido 0,2%. O tempo de permanência na cuba foi de 40 minutos, com a finalidade de melhorar a visualização e a separação das frações protéicas. A leitura do filme foi realizada por densitometria (Densitômetro Digital DS-35 CEL Companhia Equipadora de Laboratórios Modernos, Barueri, São Paulo, Brasil) em 520nm. Os valores de mobilidade relativa (rfs) das bandas foram calculados dividindo-se a distância percorrida pela molécula protéica, desde o ponto de aplicação da amostra até a linha de frente, sendo o resultado multiplicado por 100 conforme a fórmula $R_f = (d/D) \times 100$, onde: d = distância percorrida pela molécula; D = distância percorrida pelo corante (controle) segundo Alfenas et al. (1991).

Para a comparação entre os grupos machos G1 e fêmeas G2 foi realizado o Teste *t* de Student ao nível de 5% de significância ($P < 0,05$) (Curi 1997).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores referentes à concentração de proteína total sérica (Quadro 1) foram semelhantes às observadas por Cubas et al. (2006) em serpentes *Crotalus durissus*

Quadro 1. Valores médios, desvios-padrão (x±s), mínimos (Mín.) e máximos (Máx) da concentração de proteínas totais séricas, albumina, α-globulina, β-globulina, γ-globulina e relação albumina/globulina de serpentes *Crotalus durissus terrificus* (cascavel) criadas em cativeiro dos Grupos 1 (machos) e Grupo 2 (fêmeas)

Grupos	Globulinas (g/dL)					
	PTS (g/dL)	Albumina (g/dL)	α (Alfa)	β (Beta)	γ (Gama)	A/G
G1 (machos)	4,51±0,50 ^a 3,80-5,40	1,16±0,21 ^a 0,70-1,50	0,57±0,07 ^a 0,50 - 0,70	1,79±0,30 ^a 1,30-2,30	0,96±0,178 ^a 0,60-1,20	0,35±0,07 ^a 0,23-0,50
G2 (fêmeas)	4,82±0,72 ^a 3,40-5,40	1,47±0,27 ^b 1,10-1,90	0,62±0,11 ^a 0,40-0,70	1,76±0,38 ^a 1,20-2,30	0,97±0,27 ^a 0,50-1,30	0,45±0,07 ^b 0,32-0,56
G1 e G2	4,64±0,61 3,40-5,40	1,29±0,28 0,70-1,90	0,59±0,09 0,40-0,70	1,78±0,33 1,20-2,30	0,96±0,21 0,50-1,30	0,39±0,08 0,23-0,56

^a Para cada variável médias de grupos seguidas de letras iguais não diferem significativamente (P<0,05).

terrificus (cascavel) criadas em cativeiro no Instituto Butantan que variaram de 1,9-7,1g/dL e albumina 0,4-3,83g/dL. A concentração de proteína total específica para machos e fêmeas (Quadro 1) não foram observadas na literatura, porém seus valores concordaram com os descritos por Cubas et al. (2006) para cascavéis e para répteis de 3,0-7,0mg/dL segundo Thrall (2006) e outras serpentes do mesmo gênero por Dessauer (1970) e Mader (1996): Gênero *Crotalus* de 2,9 a 5,2g/dL e para espécies específicas como *Crotalus atrox* 5,2mg/dL, *Crotalus horridus* 3,5mg/dL, *Crotalus ruber* 5,2mg/dL e *Crotalus viridis* 2,9mg/dL.

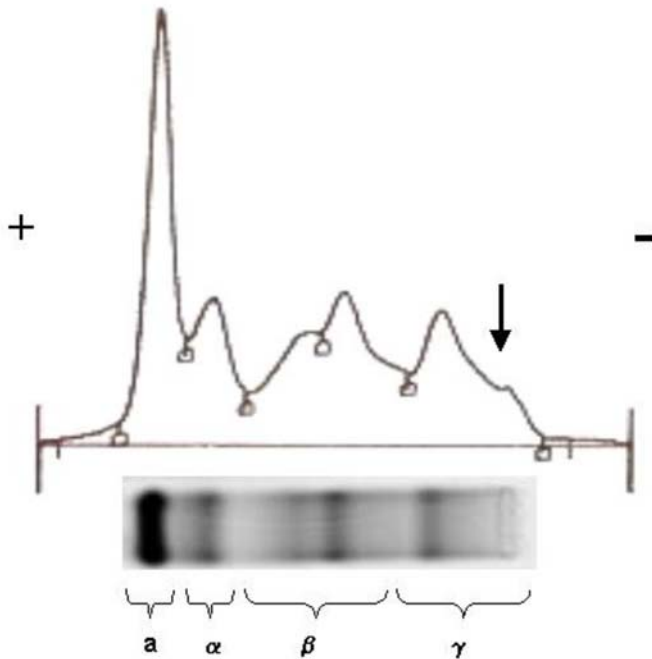


Fig.1. Representação gráfica da leitura em espectrofotômetro das proteínas séricas em gel de agarose e as respectivas frações albumina (a), α-globulina (a), β-globulina (b) e γ-globulina (g) de serpentes *Crotalus durissus terrificus* (cascavel) criadas em cativeiro. Os sinais negativo e positivo determinam o sentido da corrida eletroforética e a seta, o ponto de aplicação da amostra no gel.

O fracionamento eletroforético em gel de agarose permitiu a diferenciação de 10 bandas com diferentes valores de mobilidades relativas (rfs) que variaram entre 30 a 90. Para uma melhor avaliação dos resultados, as frações protéicas foram agrupadas em albumina, a, e g-globulina (Fig.1 e 2). Seniów (1963) observou seis frações eletroforéticas em papel (a1, a2, a3, b1, b2 e g) analisando o soro de serpentes *Natrix natrix* ("grass snake").

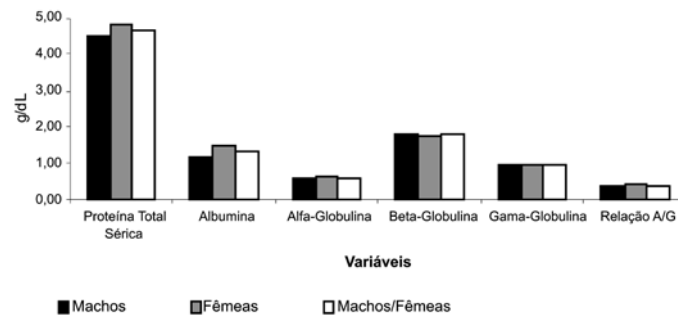


Fig.2. Representação gráfica dos valores médios e desvios-padrão (x±s) da concentração de proteínas totais séricas, albumina, α-globulina, β-globulina, γ-globulina e relação albumina/globulina (A/G) de serpentes *Crotalus durissus terrificus* (cascavel) criadas em cativeiro, do Grupo 1 (machos) e Grupo 2 (fêmeas).

Observaram-se diferenças significativas (P<0,05) entre serpentes machos e fêmeas *Crotalus durissus terrificus* (cascavel) para a concentração de albumina e relação albumina/globulina, porém sem significado clínico (Quadro 1). As proteínas totais representam o equilíbrio entre o anabolismo e catabolismo protéico, e as alterações são importantes na determinação de enfermidades relacionadas com a hipoproteïnemia e hiperproteïnemia. Considera-se hiperproteïnemia valores acima de 7g/dL e pode ocorrer em consequência de desidratação ou hiperglobulinemia associada à doença inflamatória crônica. As globulinas a, b e g podem estar aumentadas nos casos de doenças infecciosas. A hipoproteïnemia, valores inferiores a 3mg/dL, está associada à má nutrição crônica. Porém, devem-se considerar outras causas como má absorção, má digestão, enteropatias com perda de prote-

ínas, hemorragia grave e doença hepática ou renal crônica (Thrall 2006, Kaneko 2008). As frações a, b e g-globulinas, podem elevar-se em doenças infecciosas, sendo que os anticorpos migram primariamente na fração g. A fração a-globulina pode aumentar em decorrência da necrose tecidual e diminuir com severa doença hepática, má nutrição e má absorção (Mader 1996).

CONCLUSÕES

Conclui-se que a eletroforese em gel de agarose das proteínas séricas de serpentes *Crotalus durissus terrificus* (cascavel) permite a observação de várias frações protéicas, porém para uma melhor avaliação e determinação dos valores de referência estas foram agrupadas em quatro frações (albumina, a, b e g-globulina).

As serpentes fêmeas apresentaram maiores valores para as variáveis, albumina e para a relação albumina/globulina (AG) quando comparadas ao grupo de serpentes macho, porém sem significado clínico.

O conhecimento da concentração de proteína total e das principais frações protéicas séricas é de grande importância no estudo da fisiologia das serpentes, pois além de determinar valores de referência, podem ser utilizados como indicadores da saúde dos animais, auxiliando clínicos para diagnósticos e prognósticos mais acurados, e permitindo o acompanhamento da evolução de doenças em serpentes criadas em cativeiro.

Agradecimentos.- Ao Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP) e ao Laboratório de Biofísica do Instituto de Biociências das Unesp, Campus de Botucatu, SP.

REFERÊNCIAS

- Alfenas A.C., Peters I., Brune W. & Passador G.C. 1991. Eletroforese de Proteínas e Isoenzimas de Fungos e Essências Florestais. Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG. 243p.
- Barraviera B., Bonjorno J.R. & Arakaki D. 1989. A retrospective study of 40 victims of *Crotalus* snake bites: Analysis of the hepatic necrosis observed in one patient. *Revta Soc. Bras. Med. Trop.* 22:5-12,
- Barraviera B. & Pereira P.C.M. 1991. Acidentes por serpentes dos gêneros *Bothrops*, *Lachesis* e *Micrurus*. *Arq. Bras. Med.* 65:345-355,
- Berrocal A., Gutierrez J.M. & Estrada R. 1998. Snake envenomation in bovine. *Large Anim. Pract.* 19(4):26-27.
- CEVAP. 2008. Emergências Veterinárias. Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos. Disponível em: www.cevap.org.br. Acessado em 15 out. 2008.
- Cubas Z.S., Silva J.C.R. & Catão-Dias J.L. 2006. Tratado de Animais Selvagens: medicina veterinária. Roca, São Paulo. 1354p.
- Curi P.R. 1997. Metodologia e Análise da Pesquisa em Ciências Biológicas. Tipmic, Botucatu. 263p.
- Dessauer H.C. 1970. Blood chemistry of reptiles: Physiological and evolutionary aspects, p.1-72. In: Gans C. & Parsons T.C. (Eds), *Biology of the Reptilia*. Academic Press, New York.
- Dourado H.V., Buhnheim P.F. & Souza I.S. 1988. Ofidismo no Amazonas. XXI Congr. Bras. Soc. Bras. Med. Tropical, *Revta Bras. Med. Trop.* (Supl.1):119.
- Kaneko J.J. 2008. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Academic Press, San Diego. 932p.
- Kouyoumdjian J.A., Polizelli C., Lobo S.M.A. & Guimarães S.M. 1990. Acidentes ofídicos causados por *Bothrops moojeni* na região de São José do Rio Preto, São Paulo. *Arq. Bras. Med.* 64:167-171.
- Machado C.C., Silva L.F.N., Ramos P.R.R. & Takahira R.K. 2005. Influência sazonal sobre os valores bioquímicos, hematológicos e de eletroforese de hemoglobinas de jibóias: *Boa constrictor amarali* (Linnaeus, 1758). *Anais I Workshop Bras. Hematol. Répteis, Vila Velha, ES*, p.11.
- Mader D.R. 1996. *Reptile Medicine and Surgery*. W.B. Saunders, Philadelphia. 512p.
- Méndez M.C. & Riet-Correa F. 1995. Snakebite in sheep. *Vet. Human Toxicol.* 37:62-63.
- Naoum P.C. 1997. Eletroforese: técnicas e diagnósticos. 2ª ed. Livraria Santos, São Paulo. 147p.
- Nogueira R.M.B., Sakate M., Sangiorgio F., Laposy C.B. & Melero M. 2007. Experimental envenomation with *Crotalus durissus terrificus* venom in dogs treated with antiophidic serum. Part I. Clinical evaluation, hematology and myelogram. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 13(4):800-810.
- Pinho F.O., Vidal E.C. & Burdman E.A. 2000. Atualização em insuficiência renal aguda: insuficiência renal aguda após acidente crotálico. *J. Bras. Nefrol.* 22(3):162-168.
- Ribeiro L.A. 1991. Estudo epidemiológico de acidentes por serpentes peçonhentas no Estado de São Paulo atendidos no Hospital Vital Brasil, 1988. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Saúde Pública, USP, São Paulo. 104p.
- Sangiorgio F., Sakate M., Nogueira R.M.B., Araújo Jr J.P. & Chavez-Olortegui C. 2008. Kinetic of venom and antivenom serum levels, clinical evaluation and therapeutic effectiveness in dogs inoculated with *Crotalus durissus terrificus* venom. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 14(1):100-112.
- Sgarbi L.P.S., Ilias M., Machado T., Alvarez L. & Barraviera B. 1995. Human envenomations due to snakebites in Marília, State of São Paulo, Brazil: A retrospective epidemiological study. *J. Venom. Anim. Toxins* 1(2):70-78.
- Seniów A. 1963. Paper electrophoresis of serum proteins of the grass-snake, *Natrix natrix* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 9:137-140.
- Serapicos E.O. & Merusse J.L.B. 2002. Variação de peso e sobrevivência de *Micrurus corallinus* sob diferentes condições de alimentação em biotério (serpentes, *Elapidae*). *Iheringia, Sér. Zool.* 92(4):105-109.
- Sorensen B. 1990. *Animais Peçonhentos*. Ateneu, São Paulo. 138p.
- Tokarnia C.H. & Peixoto P.V. 2006. A importância dos acidentes ofídicos como causa de mortes em bovinos no Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 26(2):55-68.
- Thrall M.A. 2006. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. Roca, São Paulo. 582p.