

## SÔBRE O FATOR HEMOLÍTICO DOS VENENOS OFÍDICOS

K. SLOTTA & P. BORCHERT

(Depto. Científico da Ind. Farm. Endochimica S/A, com a colaboração do Instituto Butantan).

A capacidade de produzir hemólise parece uma propriedade muito generalizada nos venenos dos insetos e serpentes, embora eles revelem no particular grandes diferenças qualitativas e quantitativas. Os venenos botrópicos até agora examinados possuem muito pouca, enquanto os crotálicos possuem acentuada ação hemolítica. Até agora não se conseguiu isolar destes venenos de solenóglifas uma proteína pura que possua somente a ação hemolítica. A crotoxina (1), proteína cristalizada, quimicamente uniforme e pura, isolada do veneno de *Crotalus terrificus*, mostra, além desse princípio hemolítico, um outro de natureza enzimática (hialuronídase) (2) e, principalmente, a totalidade do componente tóxico do veneno cru.

Já há muito tempo temos conseguido desvendar algo do mecanismo da ação hemolítica de uma maneira geral e, conseqüentemente, da crotoxina. Esta remove o ácido oléico da lecitina, formando lisolecitina que, por sua vez, exerce ação forte sobre os eritrócitos (3).

Apesar de a crotoxina revelar também os outros efeitos mencionados, usa-se agora esta proteína tóxica em estudos enzimicos como a mais pura "lecitinase A" (4).

Nos venenos das proteróglifas também se acha um fator hemolítico, a "hemolisina", que na Índia foi isolada de dois venenos. Conseguiu-se separá-la da neurotoxina, da cardiotoxina e da colinestérase, também contidas nêstes venenos. Os cristais das hemolisinas assim isoladas possuem atividades hemolíticas muito grandes e qualitativamente iguais. Porém, quantitativamente, apresentam-se grandes diferenças: a hemolisina cristalizada do veneno de *Naja naja* contém, pêso por pêso, exatamente o dôbro do efeito dos cristais isolados do veneno de *Bungarus fasciatus* (5).

---

Recebido, para publicação, em 22.IV.1954.

Das experiências fragmentárias até agora publicadas, tem-se a impressão de que nos venenos de certas proteróglifas, como *Denisonia superba* (6) e *Naja naja* (7), ocorre, fora da "lecitínase A" também chamada "hemolisina", ainda um fator hemolítico direto. Êste fator é que destroi os eritrócitos lavados mesmo que não se adicione lecitina à suspensão.

A substância hemolítica dos venenos dos insetos, principalmente das abelhas, a qual tem certa semelhança com os venenos ofídicos, é mais parecida com êste fator hemolítico direto visto que também hemolisa diretamente os eritrócitos. Aliás, nêste sentido, devem ser mencionados trabalhos recentes que provaram existir, no veneno de abelha, além da substância diretamente hemolisante, uma outra, que age sòmente em presença da lecitina (8). O ataque das suas frações hemolisantes, eletroforêticamente separáveis, contra os eritrócitos também se processa, à luz dêsses estudos, de modo diferente e o resultado é bem diverso, como pôde ser verificado ao microscópio eletrônico (9).

Êste breve resumo dos fatos conhecidos sôbre a ação direta e indireta dêstes ênzimos mostra como são rudimentares ainda os nossos conhecimentos nêste campo. A razão disso reside principalmente numa dificuldade que surge nas pesquisas dos venenos protéicos. Os venenos de bactérias, insetos e serpentes compõem-se principalmente de misturas de proteínas quimicamente bem semelhantes, mas com ações fisiológicas bem diferentes. Por exemplo, o mesmo veneno pode conter o princípio hemocoagulante bem como o fator anticoagulante. A maior parte destas proteínas nos venenos tem as propriedades características dos ênzimos: atividade em quantidades mínimas, sensibilidade contra aquecimento, dependência do pH e grande especificidade. Outras não mostram atividades enzimicas diretas, mas são extremamente tóxicas no sentido clássico da farmacologia. Assim é que foi isolado do veneno da abelha uma toxina sem ação enzimica provada (9).

#### MATERIAL E MÉTODO

A questão primordial na investigação científica dêstes venenos protéicos consiste, por isso, na separação de diferentes proteínas quimicamente uniformes e na possibilidade de associar cada diferente atividade fisiológica a cada uma destas substâncias.

Depois da elaboração da cromatografia e da eletroforese em papel, pareceu conveniente aproveitar êstes métodos para a separação destas misturas de proteínas.

Já há alguns anos dois grupos de cientistas elaboraram, independentemente um do outro, uma técnica simples para a localização de ênzimos separados por meio de cromatografia (10) e de electroforese em papel (11). A proteinase foi localizada por meio da digestão da gelatina da camada de um filme fotográfico. O amido

de uma solução pulverizada sobre a tira foi desdobrado pela amilase, verificando-se a sua localização por tingimento com iodo. O lugar da lipase e fosfatase foi determinado por estearato de p-nitro-fenol e fosfato de fenolftaleína. Estas técnicas podem ser úteis também para a localização da proteínase e fosfatase nos venenos ofídicos. Porém, infelizmente não é fácil usar um método tão simples, que determine o lugar nas tiras de papel depois da electroforese onde se acha a proteína dotada da ação hemolítica.

Finalmente conseguimos resolver o problema com um aparelho que talvez também possa ser útil para a determinação de outros enzimas, usando substratos adequados. Este nos permitiu localizar rápida e perfeitamente a fração hemolítica nas tiras de papel de electroforese dos venenos, o que facilita decisivamente as pesquisas subseqüentes.

### DESCRIÇÃO DO APARELHO

(Figuras 1 e 2)

O aparelho consiste de três placas de "Plexiglass", A, B e C (255 x 68 x 6 mm) juntadas firmemente por meio de 14 parafusos. Na placa B há 32 furos de 35 x 4 mm com intervalos de 2 mm entre si. Cada célula tem aproximadamente um volume de 840 mm<sup>3</sup>. Na parede traseira da placa B (entre A e B) está colocada uma tira de celuloide D (filme de Raio-X, livre da camada gelatinosa) com uma cola especial: 2 partes de celuloide 20% em acetona + 1 parte de cavacos de "Plexiglass" 3% em acetona + 1 parte de clorofórmio. Atrás da tira de celuloide fica uma marcação em material transparente E (celuloide ou celofane) cujos números de 1 a 32 correspondem às células. Para a montagem do aparelho veja a figura 2.

### DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Colocam-se as placas A e B uma sobre a outra, enfiando os parafusos nos furos apropriados, unta-se o lado anterior da placa B, que terá contato com a placa C, com vaselina ou melhor ainda com uma graxa especial, p. ex. "Nevastane X Heavy" (da Keystone Lubricating Co., Philadelphia, Pa.), e enchem-se as células com 0,6 cc. da solução usada para a determinação (suspensão de lecitina e de eritrócitos).

Uma tira (40 x 400 mm) da eletroforese é cortada em sentido longitudinal em três partes iguais; uma destas é colocada sobre a placa B com a marcação da linha de aplicação exatamente no centro de uma das células, convenientemente situada (célula 5 nas figuras 3, 4 e 5; célula 2 na figura 6). Esta tira de

13 mm de largura que cobre um pouco mais de um terço do comprimento das células, fica naquela metade, onde não há graduação. Coloca-se a placa C e parafusa-se firmemente, fechando o blóco. Após girar várias vezes o aparelho para misturar bem o líquido, coloca-se na estufa de cultura, de tal maneira, que a tira de papel fique totalmente em contato com o líquido. Experiências repetidas mostraram que não há difusão apreciável entre as células quando se apertam bem os parafusos (\*). Sòmente depois de 5 a 10 horas, tempo bem maior ao necessário para a conclusão da determinação do poder hemolítico, a difusão começaria a intervir.

Aquela parte da tira que contém substâncias hemolíticas deixa, depois de 5 a 120 minutos, dependendo da quantidade e do poder hemolítico, transparecer os números das células correspondentes. Na hemólise total a marcação torna-se perfeitamente visível, enquanto, em sua falta, a opacidade da suspensão não permite a leitura dos números.

#### LOCALIZAÇÃO

Guiando-se pelo gráu da transparência e comparando com uma outra tira ou com um outro terço da mesma tira, mas tingida com "Amidoschwarz 10 B" pode-se localizar a fração ou as frações que têm poder hemolítico. Para documentar o desenvolvimento cronológico da hemólise, pode-se fotografar o aparelho em intervalos de tempo determinados.

#### EXEMPLOS DA DETERMINAÇÃO QUALITATIVA DA HEMÓLISE

As três tiras das figuras 3, 4 e 5, com venenos ofídicos, foram tratadas da mesma maneira, correndo paralelamente na electroforese.

Quantidade aplicada: — 1 a 2 mg, perto do anodo.

Tampão: — ácido cítrico + NaOH; pH 5, 18.

Fôrça iônica calculada: — 0,13.

Corrente: — 110 V; 0,25 mA por cm de largura da tira.

Tempo de duração: — 48 horas.

Temperatura: — 20-25°C.

Papel: — Whatman 1.

A tira com veneno crú de abelha, figura 6, foi obtida nas seguintes condições:

---

(\*) Uma prova feita com tira de papel limpa e com algumas células isoladas cheias de solução de  $\text{KMnO}_4$  N/10, enquanto as células restantes estão com água, mostrou, depois de 24 horas, uma difusão fraquíssima para as células imediatas àquelas ao permanganato.

Quantidade aplicada: — 2mg, perto do ânodo.  
Tampão: — Biftalato de potássio + NaOH; pH 4,27.  
Força iônica calculada: — 0,21.  
Corrente: — 110 V; 0,25 mA por cm de largura da tira.  
Tempo de duração: — 63 horas.  
Temperatura: — 20 a 25°C.  
Papel: — Whatman 1.

As tiras usadas nas determinações do poder hemolítico foram secas numa corrente de ar à temperatura ambiente (\*\*), cortadas longitudinalmente em três partes e um destes terços usado para a determinação da hemólise, enquanto um outro terço foi tingido com "Amidoschwarz 10 B".

Os venenos de *Crotalus terrificus* (=Cascavel) e *Trimeresurus flavoviridis* (=Habu) não mostraram poder hemolítico direto; as figuras 3 e 4 mostram os resultados de hemólise indireta. A suspensão de lecitina usada nêstes casos foi preparada, dissolvendo 0,5 g de lecitina de soja em 10 cm<sup>3</sup> de metanol e diluindo 1 cm<sup>3</sup> desta solução com 20 cm<sup>3</sup> de tampão fosfato isotônico (pH 6,9). Cada célula recebe 0,2 cm<sup>3</sup> desta suspensão de lecitina e 0,4 cm<sup>3</sup> de uma suspensão de eritrócitos humanos a 3 até 4% no mesmo tampão fosfato. Os eritrócitos foram lavados 5 vezes com solução fisiológica. No caso da hemólise direta (*Naja naja*, figura 5, e veneno de abelha, *Apis mellifica*, figura 6) usamos 0,6 cm<sup>3</sup> da mesma suspensão de eritrócitos em cada célula.

## RESULTADOS

Os venenos de *Crotalus terrificus* e *Trimeresurus flavoviridis* se assemelham muito, o que não é de se surpreender em vista do parentesco dos gêneros *Crotalus* e *Trimeresurus* na família Crotalidae, separados sobretudo por diferente distribuição geográfica: na América e no Japão. Já as tiras da electroforese (figuras 3 e 4) mostram esta semelhança e a localização das frações hemolíticas é igual. Em ambos os venenos, as frações hemolisantes são as mais ácidas. Trata-se da lecitinase A que age somente em presença de lecitina.

A hemolisina do veneno da *Naja naja* e do veneno de abelha mostrou, já depois de 5 a 10 minutos, uma forte reação com eritrócitos humanos *sem* lecitina. A fração hemolisante do veneno de *Naja* é a mais básica. O fato de nossas experiências terem mostrado a existência de duas frações diretamente hemoli-

---

(\*\*) Para verificar uma possível influência da temperatura sobre os dois fatores do veneno de abelha com poder hemolítico direto, as tiras foram secas a) 15 minutos a 50-60°C; b) 15 minutos a 120°C e c) 1 hora a 120°C. Os resultados finais foram sempre os mesmos, verificando-se somente um pequeno retardamento.

santes no veneno de abelha, não exclui a possibilidade de uma delas também possuir ação hemolisante indireta, mascarada pela atividade direta. Isto nos parece bem provável em vista dos resultados obtidos por outros. (8).

#### RESUMO

A fim de localizar diretamente nas tiras de papel da eletroforese as frações hemolisantes, foi construído um aparelho simples de matéria plástica. Assim, foi verificado que a lecitinase A (ou fosfolípase A) dos venenos de *Crotalus terrificus* (= Cascavel) e *Trimeresurus flavoviridis* (= Habu) se encontra no lugar correspondente nas tiras. A fração diretamente hemolisante ("Haemolysin") do veneno de *Naja naja* é a mais avançada; o veneno de abelha possui duas frações diretamente hemolisantes.

#### ABSTRACT

A simple apparatus of plastic material was used to localize directly on the filter paper strip of the electrophoresis the haemolytic factors. By this procedure it was determined that lecithinase A (or phospholipase A) of the venoms of *Crotalus terrificus* (= Cascavel) and *Trimeresurus flavoviridis* (= Habu) is found at the correspondent places on the strips. The directly haemolytic fraction ("haemolysin") of the *Naja naja* venom is the most advanced fraction; bee venom contains two directly haemolytic fractions.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Mit einem einfachen Apparat aus Plexiglas wurde festgestellt, wo sich nach der Papierelektrophorese die hämolytisch wirksamen Fraktionen von verschiedenen tierischen Giften auf den Streifen befinden. Die Lecithinase A (auch Phospholipase A genannt) von *Crotalus terrificus* (= Klapperschlange) und von *Trimeresurus flavoviridis* (= Habu), die die roten Blutkörperchen nur unter Lecithinzusatz löst, wurden an sich entsprechenden Stellen der Streifen gefunden. Der ohne Lecithinzusatz hämolysierende Faktor des *Naja naja* Giftes ("Hämolysin") entspricht der am stärksten basischen Fraktion. Im Bienengift wurden zwei direkthämolysierende Fraktionen festgestellt.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Slotta, K. & Fraenkel-Conrat, H. L. — Mem. Inst. Butantan 12:505, 1939.
2. Slotta, K. & Ballester, A. — Mem. Inst. Butantan 26, 311 (1954)

3. Delezenne, C. & Ledebt, S. — Compt. rend. 152: 790, 1911; 153: 81, 1911; 155: 1101, 1912.
4. Nygaard, A. P. & Sumner, J. B. — J. Biol. Chem. 200: 723, 1953; 204: 655, 1953.
5. De, S. S. — Ann. Biochem. & Exp. Med. (India) 2: 237, 1942.
6. Holden, H. F. — Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci. 13: 103, 1935.
7. De, S. S. — Indian J. Med. Res. 27: 793, 1940.
8. Neumann, W. & Habermann, E. — Naturwissenschaften 39: 286, 1952.
9. Neumann, W. — Naturwissenschaften
10. Simonart, P. & Chow, K. Y. — Bull. soc. chim. Belges 59: 417, 1950.
11. Wallenfels, K. & v. Pechmann, P. — Angew. Chem. 63: 44, 1951.

---

*Os autores agradecem ao prof. A. do Amaral, diretor do Instituto Butantan, o fornecimento de veneno de cascavel e de abelha, além da gentileza de revêr a redação dêstes trabalhos; ao prof. Th. Wieland (Frankfurt), o veneno de Naja naja; e ao dr. K. Nakamura (Tokyo), o veneno de Habu.*





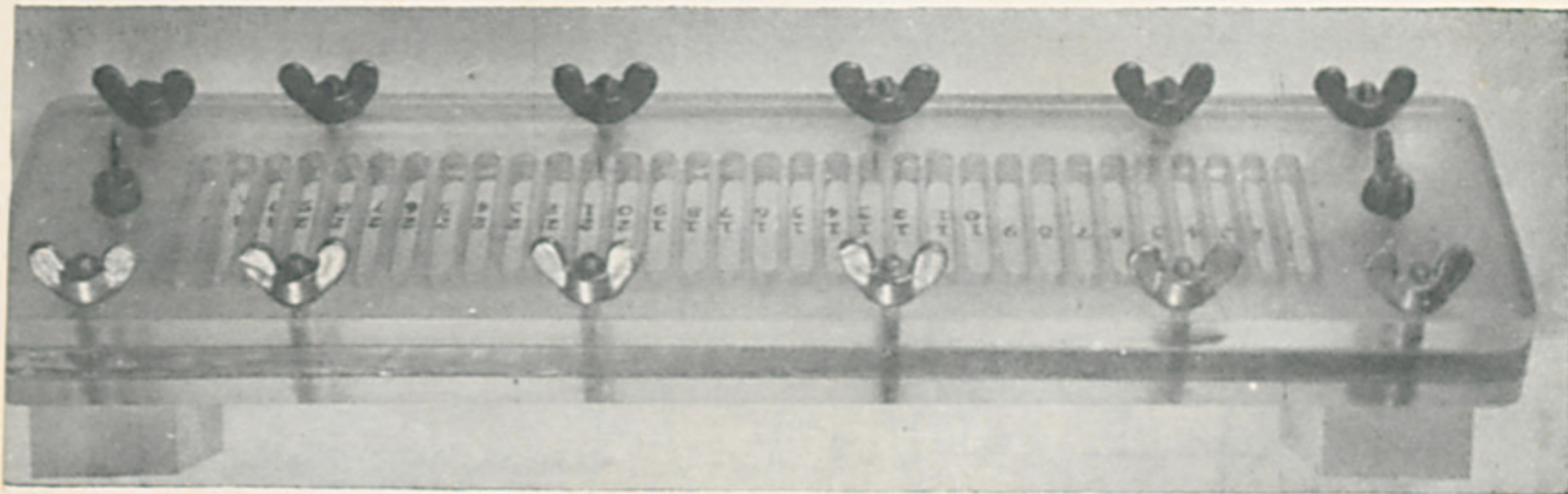


FIG. 1

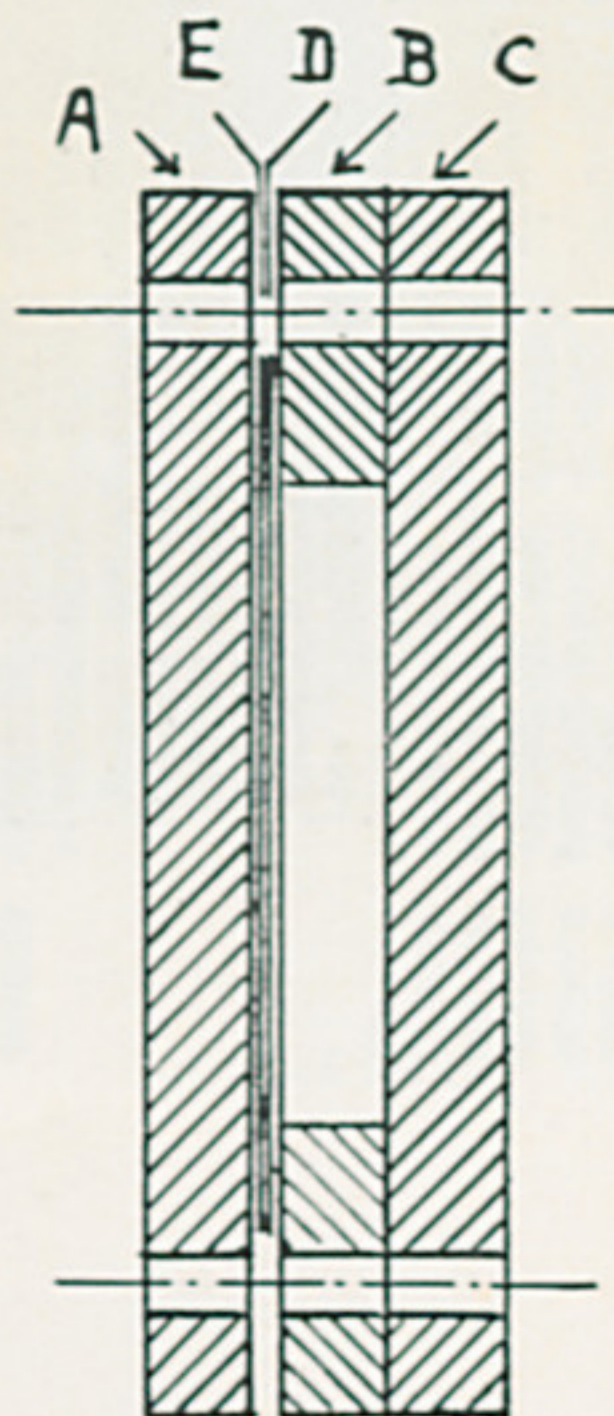


Fig.2

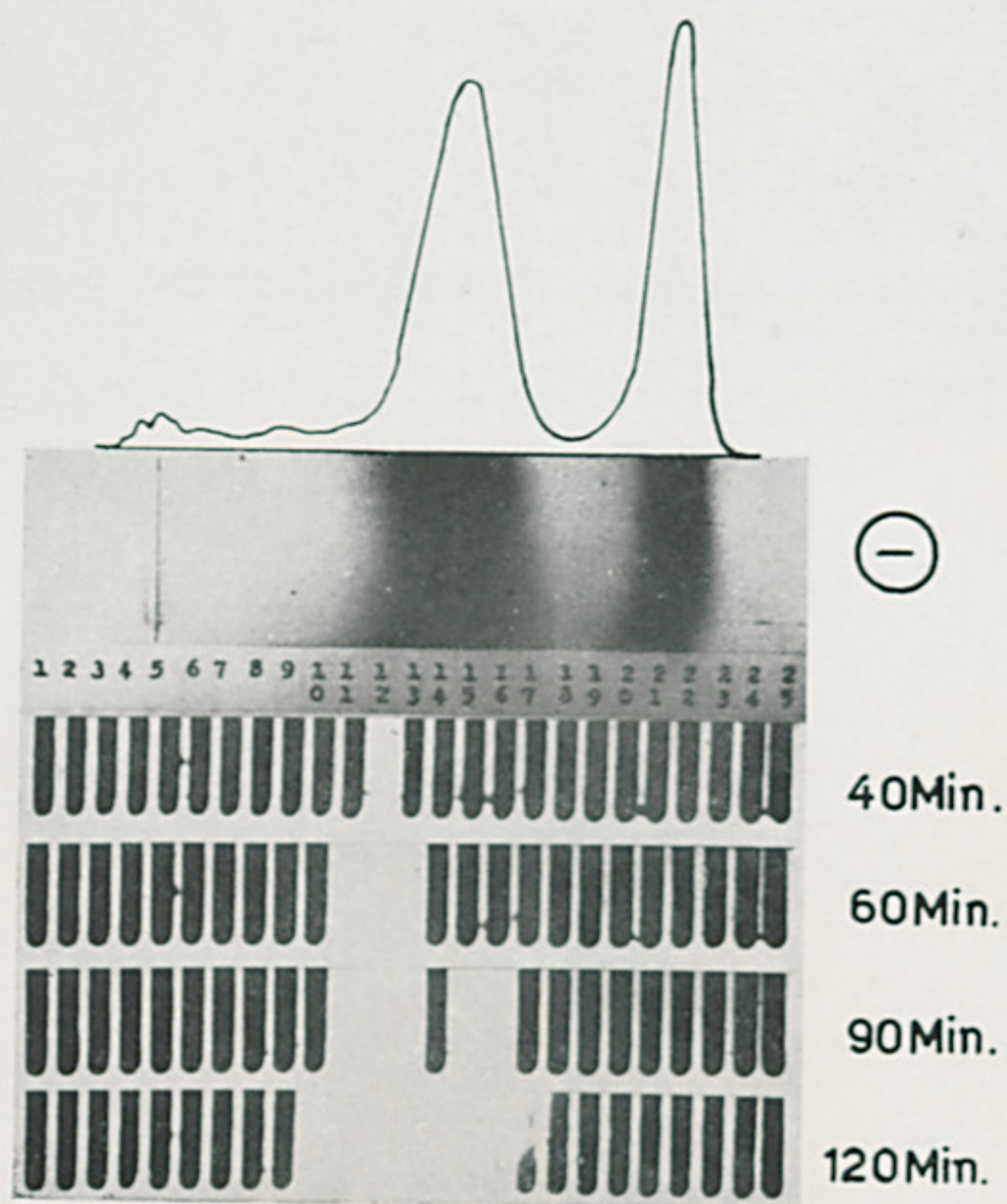


FIG. 3

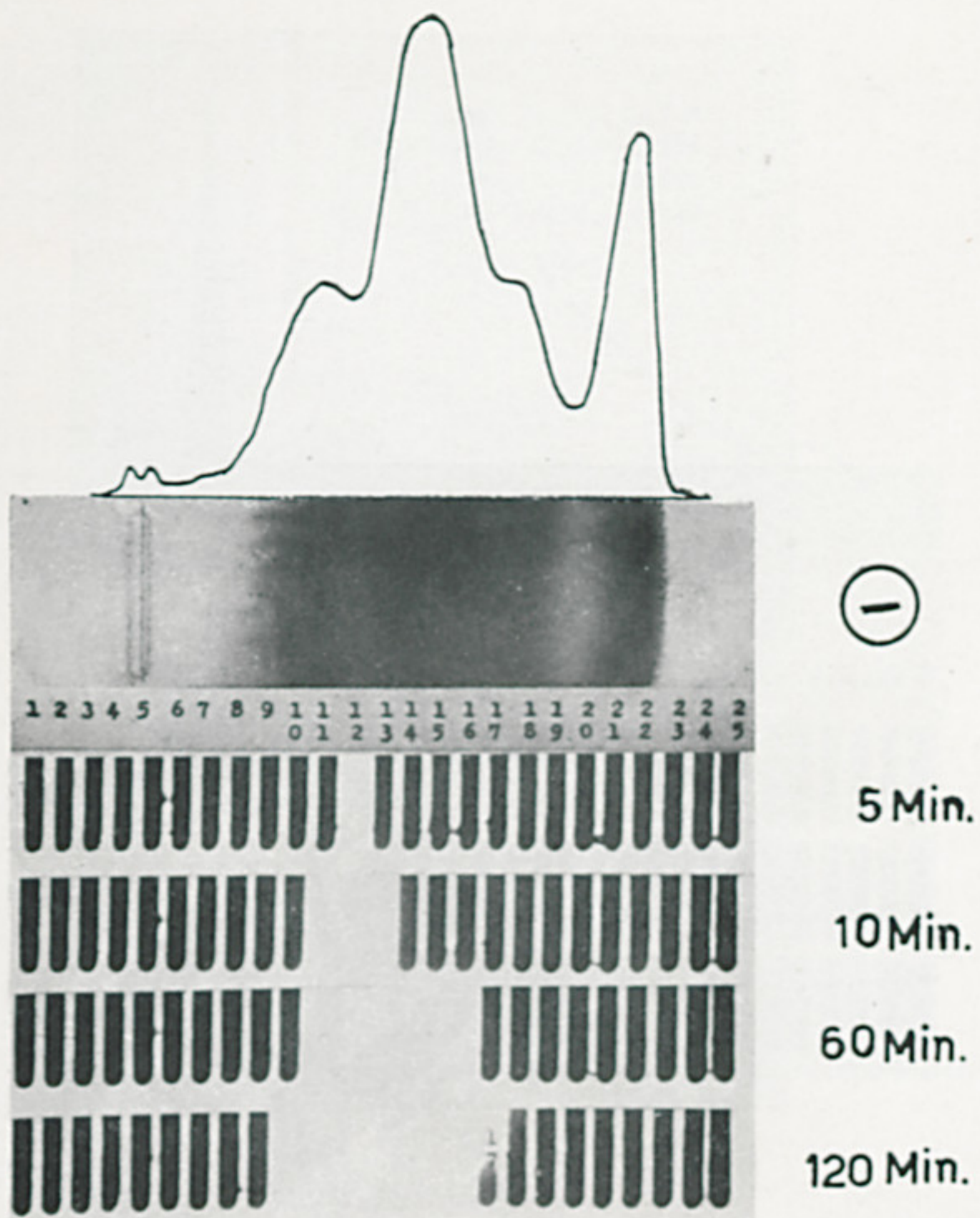


FIG. 4

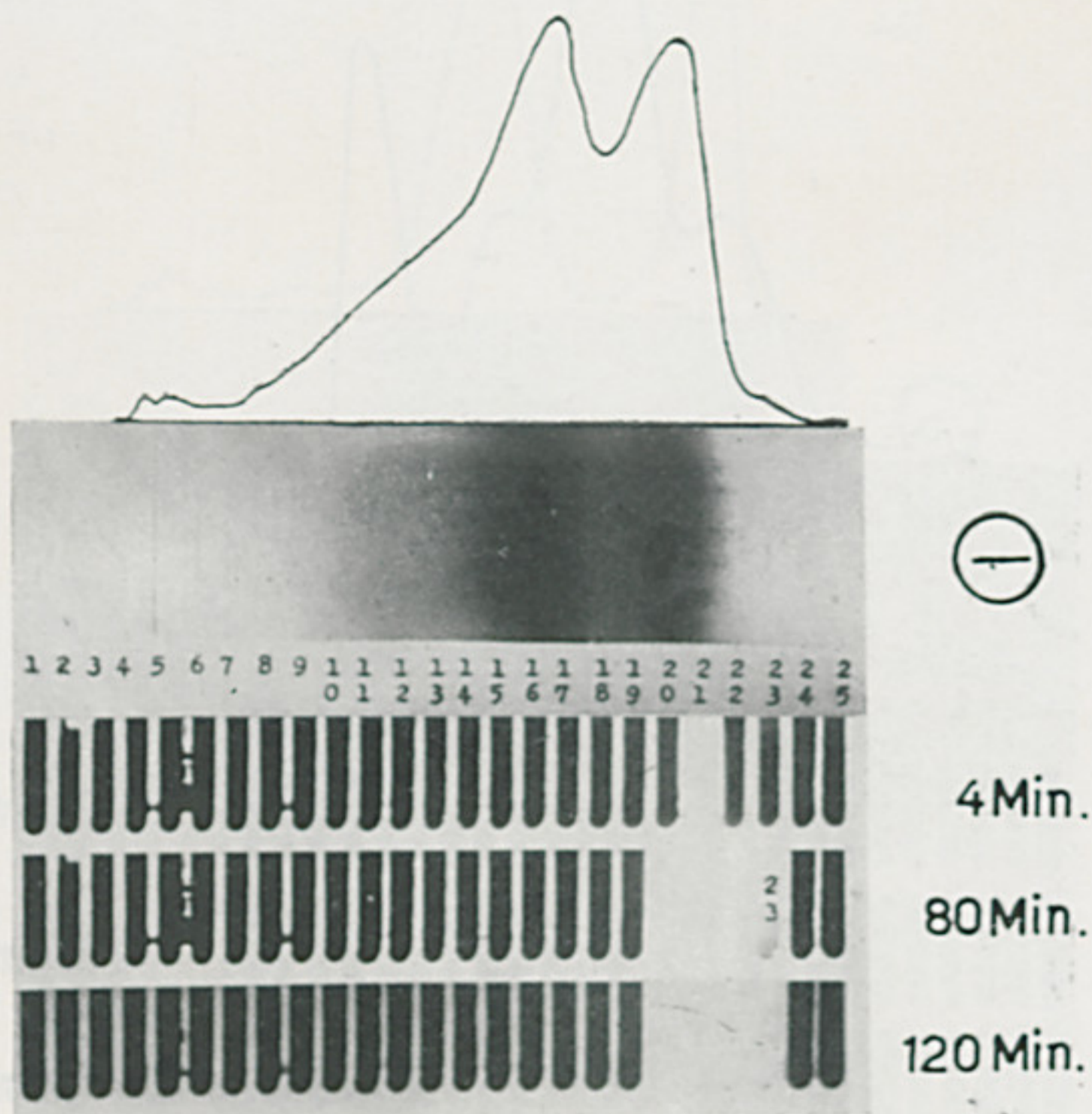


FIG. 5

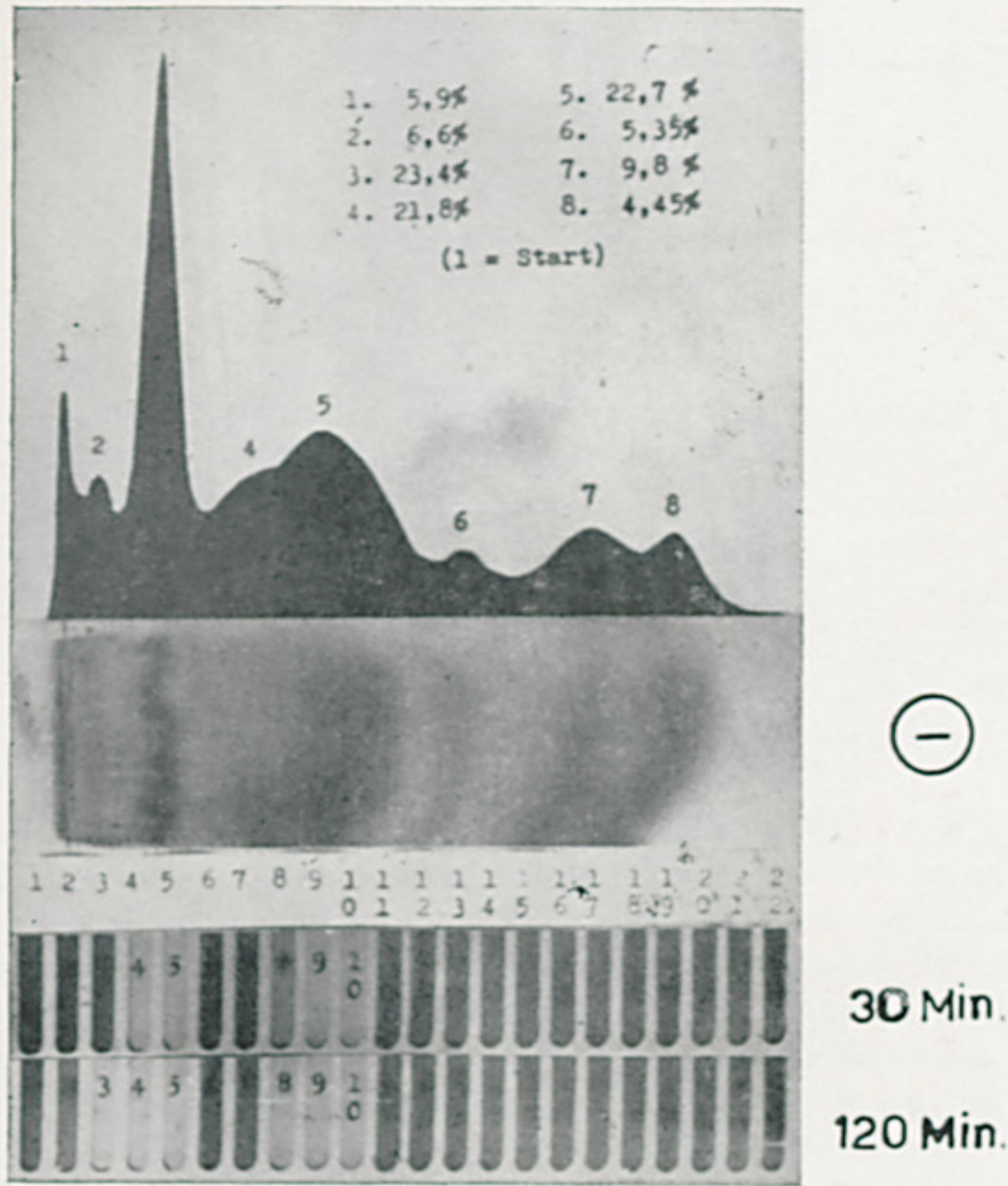


FIG. 6

