

MILENA SARDOU SABINO PINHO

**Purificação e Caracterização Parcial de Duas Toxinas
Hemorrágicas da Peçonha de Jararaca malha-de-cascavel,
Bothrops erythromelas (Serpentes, Viperidae)**

RECIFE, 2005

MILENA SARDOU SABINO PINHO

**Purificação e Caracterização Parcial de Duas Toxinas
Hemorrágicas da Peçonha de Jararaca malha-de-cascavel,
Bothrops erythromelas (Serpentes, Viperidae)**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em
Biologia Animal do Departamento de Zoologia do
Centro de Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos
básicos para obtenção do grau de Mestre em
Biologia Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Míriam Camargo Guarnieri

RECIFE, 2005

Pinho, Milena Sardou Sabino

Purificação e caracterização parcial de duas toxinas hemorrágicas da peçonha de Jararaca malha-de-cascavel, *Bothrops erythromelas* (Serpentes, Viperidae) / Milena Sardou Sabino Pinho. – Recife : O Autor, 2005

X, 40 folhas : il., fig.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Biologia Animal, 2005.

Inclui bibliografia.

1. Ciências biológicas – Biologia animal. 2. Serpentes – Peçonha – Toxinas hemorrágicas – Purificação e caracterização. 3. *Bothrops erythromelas* (Serpentes, Viperidae). I. Título.

**595.126
595.963**

**CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)**

**UFPE
BC2005-256**

BANCA EXAMINADORA

Milena Sardou Sabino Pinho

**Purificação e Caracterização Parcial de Duas Toxinas Hemorrágicas da
Peçonha de Jararaca malha-de-cascavel, *Bothrops erythromelas* (Serpentes, Viperidae)**

Orientadora:



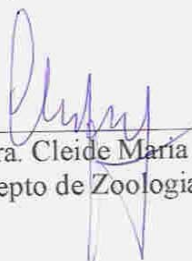
Dra. Miriam Camargo Guarnieri
Depto. de Zoologia / UFPE

Banca Examinadora:

Titulares:

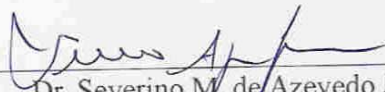
Dr. Patrick Jack Spencer
Centro de Biologia Molecular/IPEN-CNEN-SP

Dr. Gandhi Rhadis Batista
Departamento de Bioquímica/ UFC

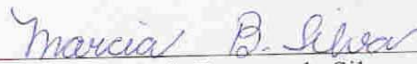


Dra. Cleide Maria Albuquerque Ribeiro
Depto de Zoologia / UFPE

Suplentes:



Dr. Severino M. de Azevedo Júnior
Depto. de Zoologia / UFPE



Dr. Márcia Bezerra da Silva
Depto. de Biofísica / UFPE

Dedico este trabalho aos meus pais
Murilo Gonçalves Sabino Pinho e Vera
Sardou Sabino Pinho, aos meus irmãos
Myriam, Rodrigo e Mariana e ao meu
namorado Spinelli.

AGRADECIMENTOS

À Deus;

À amiga e orientadora Prof. Míriam Camargo Guarnieri por toda a confiança depositada em mim;

Aos meus pais e irmãos pelo incentivo e carinho em todos esses anos de faculdade;

À Spinelli por toda ajuda no desenvolvimento deste trabalho e por estar sempre ao meu lado;

Aos meus sogros (Fernanda e Luiz) e cunhados (Alexandre, Tita e Bruna) por todos os momentos de descontração;

Ao amigo Patrick por tudo;

Ao Dr. Gandhi Rhadis Batista pela compreensão e por sua participação em minha banca;

A Prof. Elza Áurea de Luna Alves Lima por ter me dado a oportunidade do meu primeiro estágio, me iniciando na vida científica;

Aos amigos do LAPTx, Renata, Juliana, Marliete, Márcia, Escobar, Júnior, Lidiany, Ilca, Lucas, Silvia, Rodolfo e Marlos por toda ajuda e companherismo;

À todos os professores que contribuíram para minha formação nesta Universidade;

À professora e amiga Eduarda pelo carinho dedicado e Ana Elizabeth por sempre resolver nossas broncas;

À Sr. Mário, Sr. Ramiro e Sr. Roberto por sempre estarem dispostos a nos ajudar;

À todos os meus amigos de turma: Tininha, Elaine, Luciana, Vivi, Vivy, Priscila, Silvia, Leandro, Aureliana, por tudo;

À professora Cleide Albuquerque pela compreensão, participação em minha banca e empréstimo dos equipamentos do laboratório de invertebrados terrestre e aos amigos deste laboratório: Sr Ramiro e Tininha;

À professora Patrícia do departamento de Bioquímica da UFPE por toda ajuda na realização das cromatografias e ao Sr. João e D. Maria;

À D. Luzinete do departamento de genética pelo constante fornecimento de água deionizada;

À todos do Laboratório de Bioquímica do LIKA, em especial ao Prof. José Luiz, Kilma, Keila e Isaura.

À Edneide e Mineo, do Aggeu Magalhães, pela contribuição para realização deste trabalho;

Aos amigos, em especial Pat, Duda, Cynthia, Sá, Lilliane, Patriota, Dany, Lú e André.

À Felipe e Maria Helena do Biotério do Lika

À CAPES pela concessão de bolsa do Mestrado

Ao CNPq pelo financiamento do projeto;

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

RESUMO

A espécie *Bothrops erythromelas*, conhecida em Pernambuco como jararaca malha-de-cascavel, está amplamente distribuída na Região Nordeste do Brasil. A hemorragia é um dos sintomas mais característicos do envenenamento botrópico, especialmente em Pernambuco. A ação hemorrágica ocorre devido a um grupo de metaloproteínas zinco-dependentes, denominadas hemorraginas, que agem diretamente na parede dos vasos sanguíneos, sendo divididas em 4 classes de acordo com a massa molecular. O objetivo deste trabalho foi purificar e caracterizar duas hemorraginas de alta massa molecular da peçonha de *Bothrops erythromelas* (pBe). Para tanto, 865 mg de pBe foram aplicados em coluna de gel filtração Sephacryl S-200 equilibrada com tampão acetato de amônio 50mM contendo 0,3 M de NaCl, pH 5,0, sendo as frações analisadas quanto a intensidade de atividade hemorrágica em camundongos. A fração com maior atividade foi aplicada em coluna Mono Q 5/50 equilibrada com tampão Tris-HCl 100mM, pH 8,0 e eluída em gradiente não linear de NaCl 2M. Os tubos 9 e 18 provenientes da troca iônica foram recromatografados, separadamente, em coluna de gel filtração TSK G-2000 SW equilibrada com tampão acetato de amônio 150 mM, pH 5,0. As toxinas purificadas tiveram sua massa molecular estimada em 55 KDa segundo EGPA-SDS em condições redutoras e foram completamente inibidas por EDTA. Em conclusão, duas novas metaloproteinases hemorrágicas da classe P-III, denominadas berythrogina 1 e berythrogina 2, foram purificadas da peçonha de *Bothrops erythromelas*.

ABSTRACT

The *Bothrops erythromelas* species, known as jararaca malha-de-cascavel in Pernambuco is widely distributed in the Northeastern region of Brazil. Hemorrhage is one of most characteristics symptoms of the *Bothrops* envenoming, especially in Pernambuco. The hemorrhagic action occurs due to zinc-dependent proteins (hemorrhagins) that act directly in the blood vessel walls. They can be classified in four classes according to their molecular weight. The objective of this work was purify and characterize two hemorrhagins from *b. erythromelas* venom. This venom (865 mg) was applied to a gel filtration Sephacryl S-200 column equilibrated with 50 mM ammonium acetate buffer 0,3 M NaCl, pH 5,0. The fractions were analyzed in relation to their hemorrhagic activity in mice. The most hemorrhagic fraction was applied to a Mono Q 5/50 column equilibrated with 100 mM Tris-HCl buffer, pH 8,0. The elution was done with 2M step wise gradient. The tuber number 9 and 18 were applied, separately, in a gel filtration TSK G2000-SW equilibrated with 150 mM ammonium acetate buffer, pH 5,0. The purified toxins had a molecular weight of 55 kDa by SDS-PAGE in reduced conditions and were completely inhibited by EDTA. In conclusion, two new hemorrhagic metalloproteins of PIII class, named berythrogina 1 and berythrogina 2, were purified from *B. erythromelas* venom.

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Serpente <i>Bothrops erythromelas</i>	04
Figura 2. Fracionamento da peçonha de <i>B. erythromelas</i> por cromatografia de gel filtração.	29
Figura 3. Troca iônica das frações hemorrágicas reunidas da gel filtração	29
Figura 4. Gel filtração da fração 9 proveniente da troca iônica	30
Figura 5. Gel filtração da fração 18 proveniente da troca iônica.	31

ÍNDICE

Dedicatória	iv
Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract	viii
Lista de figuras	ix
I. Revisão Bibliográfica	1
Serpentes	1
Peçonhas Ofídicas	4
Peçonha de <i>Bothrops erythromelas</i>	7
Toxinas Hemorrágicas	8
Referências Bibliográficas	12
II. Purificação e caracterização parcial de duas toxinas hemorrágicas da peçonha de <i>Bothrops erythromelas</i> (jararaca malha-de-cascavel)	22
Resumo	22
Introdução	23
Materiais e métodos	24
Resultados	28
Discussão	32
Referências Bibliográficas	34

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

SERPENTES

As serpentes surgiram durante o Cretáceo, cerca de 100 a 135 milhões de anos atrás. O registro fóssil, embora freqüente, restringe-se, na maior parte das vezes, às vértebras, dificultando os estudos evolutivos e sistemáticos (Soerensen, 1990; Franco, 2003). Acredita-se que as serpentes evoluíram de antepassados do grupo de lacertílios de vida subterrânea que, por adaptação, tiveram corpo extremamente alongado, redução das patas e olhos semi-atrofiados (Stidworthy, 1993; Melgarejo, 2003).

As serpentes são animais ectotérmicos, desprovidos de membros, não têm pálpebras móveis, ouvido externo, nem cavidade do ouvido médio ou tímpano. A mandíbula é composta por duas metades ligadas na parte da frente por um ligamento frouxo, fato esse que, entre outros, permite a deglutição de presas muito grandes (Hoge-Romano-Hoge, 1978/79).

Esses animais são carnívoros e ingerem suas presas inteiras, através dos dentes que servem para imobilizar e/ou envenenar suas presas. Por possuírem especializações como osso quadrado móvel, ausência de esterno e pele elástica, podem alimentar-se de animais relativamente grandes. A tendência à referida ingestão por vezes é levada ao extremo, sendo conhecidos casos de serpentes encontradas mortas após abocarem animais acima da sua capacidade de ingestão (Sazima & Martins, 1990; Marques e Sazima, 2003).

As serpentes podem ter dentes nos seguintes ossos: pré-maxilar, maxilar, palatino, pterigóide e dentário (Vanzolini, 1980) e podem ser classificadas quanto a presença e a localização dos dentes especializados para inóculo de peçonha (Soerensen, 1990).

As áglifas possuem dentes pequenos, iguais e ausência da presa inoculadora; nenhum dos dentes apresenta sulco ou canal. As opistóglifas possuem dois ou mais dentes posteriores com sulco na parte anterior ou lateral, permitindo a saída da peçonha. Pela posição das presas há grande dificuldade de introduzir a peçonha cuja função parece ser mais digestiva (Jorge e Ribeiro, 1990).

As proteróglifas possuem as presas anteriores localizadas no maxilar, geralmente, com canal de peçonha não completamente fechado, sendo as mesmas conectadas com a glândula de peçonha. As solenóglifas apresentam maxilar móvel e o mais perfeito aparelho venenífero; suas presas não apresentam vestígios de sutura e possuem a extremidade afilada, facilitando a penetração (Melgarejo, 2003).

A subordem Serpentes (classe Reptilia, subclasse Lepidosauria, ordem Squamata) possui cerca de 2.900 espécies distribuídas em 465 gêneros e 20 famílias, das quais cerca de 10% do total das espécies ocorrem no Brasil.

A família Viperidae, que se subdivide em duas subfamílias (Viperinae e Crotalinae), possui cerca de 250 espécies distribuídas em todo o mundo e sua principal característica é a presença da dentição solenóglifa. A característica distintiva dessas subfamílias é a presença da fosseta loreal em Crotalinae. Espécies de Crotalinae são distribuídas na Ásia, Índias Ocidentais e América, até a Argentina, enquanto os representantes da subfamília Viperinae são encontrados no Velho Mundo (Soerensen, 1990; Stidworthy, 1993; Melgarejo, 2003).

No Brasil, a subfamília Crotalinae está representada pelos gêneros *Bothrops*, *Bothriops* e *Porthidium* (jararacas), *Crotalus* (cascavéis) e *Lachesis* (surucucus) (Campbel & Lamar, 1989; Borges, 1999), que juntamente com o gênero *Micrurus* (corais verdadeiras - família Elapidae), constituem as serpentes peçonhentas brasileiras.

As serpentes do gênero *Bothrops* (jararacas) compreendem cerca de 30 espécies, distribuídas por todo o território nacional e são responsáveis por 80 a 90% dos acidentes ofídicos ocorridos no Brasil (Barraviera, 1999) e durante o período de 1995 a 1997 foram responsáveis por 78,8% dos acidentes por serpentes peçonhentas ocorridos no estado de Pernambuco (Aquino, 1999).

As jararacas habitam preferencialmente ambientes úmidos como matas e áreas cultivadas e locais onde haja presença de roedores. Estas apresentam hábitos noturnos ou crepusculares e são consideradas muito agressivas podendo atacar sem provocar ruído (Barraviera, 1999; Borges, 1999). As espécies mais conhecidas são *B. atrox* encontrada no norte do Brasil; *B. neuwiedi*, encontrada em todo o território nacional, exceto região norte; *B. alternatus*, distribuída ao sul do país; *B. jararaca*, encontrada na região sul e sudeste; *B. jararacussu*, encontrada no cerrado da região central e em florestas tropicais do sudeste; e *B. erythromelas*, restrita a região nordeste (Pinho e Pereira, 2001).

A espécie *B. erythromelas* (figura 1) conhecida por jararaca-da-seca, jararaca-malha-de-cascavel ou jararaquinha é endêmica da Caatinga e encontra-se amplamente distribuída na região Nordeste do Brasil (CE, PE, BA, PB, RN, SE, AL) (Romano-Hoge, 1990). Esta serpente apresenta pequeno porte, em torno de 50 cm, cor castanho-avermelhada, hábitos terrestres (Cordeiro & Hoge, 1973; Cardoso, 1993; Melgarejo, 2003) e fornece cerca de 20-30 mg de peçonha por extração (Vellard, 1938).



Figura 1: serpente *Bothrops erythromelas*

PEÇONHAS OFÍDICAS

As peçonhas de serpentes são, provavelmente, os mais complexos de todos os venenos, servindo, não apenas para imobilizar a presa, mas também para auxiliar na digestão dos tecidos animais. As peçonhas possuem uma grande variedade de atividades biológicas e contêm vinte ou mais componentes diferentes. Proteínas e peptídeos compreendem aproximadamente 90-95% do peso seco da peçonha. Os outros componentes são cátions metálicos (Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , P^- , Co^{2+} e Zn^{2+}), carboidratos (frequentemente na forma de glicoproteínas), nucleosídeos, aminas biogênicas, lipídeos e aminoácidos livres em pequenas quantidades. Nem todos os metais são encontrados em uma única peçonha e sua importância varia de acordo com a espécie da serpente. O sódio é o maior cátion da peçonha, porém seu papel não é conhecido. O cálcio, manganês e magnésio são de grande importância para a estabilidade de certas proteínas, enquanto o zinco, cobre, ferro e cobalto podem participar como cofatores nos mecanismos catalíticos de determinadas enzimas (Bjarnason e Fox, 1994; Markland, 1998; França e Málaque, 2003).

Várias atividades enzimáticas foram encontradas nas peçonhas ofídicas, devido a presença de fosfolipases, fosfodiesterases, fosfomonoesterases, L-aminoácido oxidases, acetilcolinesterases, enzimas proteolíticas das classes serinoproteases e metaloproteases, arginina esterases, 5'-nucleosidases, hialuronidases e NAD nucleosidases. Entre os peptídeos encontrados nas peçonhas ofídicas estão as neurotoxinas pré e pós-sinápticas e as que se ligam aos canais de potássio, citotoxinas, miotoxinas, cardiotoxinas e inibidores de agregação plaquetária (desintegrinas) (Russell, 1980; Tu, 1988a, b; Ouyang *et al.*, 1992; Stocker, 1999).

O sistema hemostático humano possui um grande número de interações complexas envolvendo proteínas do sangue, plaquetas, células endoteliais e estruturas subendoteliais. Proteínas e peptídeos presentes nas peçonhas ofídicas têm a capacidade de interagir com esses componentes por diferentes mecanismos de ação (Markland, 1998; Braud *et al.*, 2000). Podem ser classificados por possuírem atividade coagulante, anticoagulante e hemorrágica. Entre as enzimas coagulantes estão presentes os ativadores da coagulação sanguínea, fator II (protrombina), fator V e fator X. As anticoagulantes incluem os ativadores de proteína C, inibidores da formação do complexo protrombina e fibrinogenases (α -fibrinogenases, β -fibrinogenases e γ -fibrinogenases). Entre as enzimas pró e anti-coagulantes estão as trombinas-símile, que são capazes de causar coagulação *in vitro* e defibrinação (anticoagulação) *in vivo*. Proteínas presentes nas peçonhas ofídicas também são capazes de afetar as plaquetas, seja pela indução ou inibição da agregação plaquetária, causando hemorragia através da ação plaquetária ou lesando a parede dos vasos sanguíneos (Marsh, 1994)

Os sintomas e a gravidade do envenenamento por serpentes dependem de vários fatores, incluindo: 1) idade, peso e saúde geral da vítima; 2) a localização, profundidade e número de picadas; 3) a quantidade de peçonha injetada; 4) a espécie de serpente envolvida; 5) a condição das presas e das glândulas de peçonha; 6) a sensibilidade da vítima em relação à peçonha; 7) os patógenos presentes na boca das serpentes; e 8) a qualidade dos primeiros socorros, com posterior cuidado médicos (Russel *et al.*, 1997).

Os efeitos locais causados em envenenamentos por serpentes do gênero *Bothrops* são caracterizados por mionecrose, hemorragia e edema, os quais se desenvolvem rapidamente após a picada. Podem ocorrer, também, alterações cardiovasculares, especialmente hemorragia e choque hipovolêmico, desordens na coagulação além de, freqüentemente, defibrinação e alterações renais (Queiroz *et al.*, 1985; Gutiérrez e Lomonte, 1989; Boer-Lima *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2003). A insuficiência renal aguda pode ser causada por necrose tubular ou cortical decorrente da ação direta de proteases ou pela deposição de microtrombos na circulação (Amaral, 1985; Jorge e Ribeiro, 1990; Castro *et al.*, 2004).

A mionecrose pode ser causada pela ação direta de miotoxinas que afetam a integridade das células musculares ou através da isquemia resultante de alterações drásticas nas microvasculaturas e artérias intramusculares. Moura da Silva *et al.* (1990) evidenciaram baixa ação miotóxica nas peçonhas de *B. erythromelas* e *B. jararaca*, enquanto que uma maior atividade foi encontrada na peçonha de *B. jararacussu*.

A hemorragia local em envenenamentos botrópicos ocorre devido à presença de metaloproteínas com alto peso molecular e que agem diretamente nos vasos capilares induzindo o extravasamento. O edema local ocorre devido à ação direta dos componentes da peçonha na microvasculatura aumentando a permeabilidade de capilares e vênulas e

através do efeito de mediadores endógenos liberados por componentes da peçonha (histaminas, prostaglandinas, entre outros).

De acordo com os sintomas apresentados, os acidentes botrópicos podem ser classificados como leve, moderado ou grave. Nos casos leves, os acidentados apresentam reações locais discretas ou ausentes, podendo haver hemorragia local e reduzido sangramento sistêmico (hematúria macroscópica e gengivorragia discretas). Nos casos moderados o edema não se restringe ao local da picada, podendo se estender para outros segmentos sem, no entanto, comprometer todo o membro; podem ser observadas hemorragias sistêmicas (gengivorragia, hematúria macroscópica, púrpura, epistaxe, entre outras). Os casos graves têm como característica fundamental os distúrbios cardiovasculares (hipotensão, choque), alterações renais e sangramentos (hemorragia digestiva, hemoptise, sangramento do sistema nervoso central). Por outro lado, o edema evoluindo para todo o membro acometido, bem como em regiões da cabeça e pescoço, caracteriza igualmente o acidente como grave (França e Málaque, 2003).

O antiveneno constitui a principal terapia para o acidente botrópico e sua indicação é baseada nos critérios clínicos de gravidade. Quando o antiveneno é administrado logo após o acidente ocorre a neutralização total dos efeitos sistêmicos, porém, nem sempre os efeitos locais são totalmente neutralizados e, em alguns casos, resultam em seqüelas permanentes como perda de tecido (Jorge e Ribeiro, 1984; Gutiérrez e Lomonte, 1989).

PEÇONHA DE *Bothrops erythromelas*

A peçonha de *Bothrops erythromelas* é composta predominantemente por proteínas ácidas, cujas massas relativas estão compreendidas entre 3.400 e 151.400 Da. Os principais constituintes inorgânicos são Na, Cl, K, Ca e Zn, em ordem decrescente de concentração

(Vasconcelos, 1996). Esta peçonha possui atividade hemorrágica, fibrinolítica, edematogênica, fosfolipásica, necrosante e destaca-se das demais do gênero por apresentar uma das mais potentes atividades proteolíticas e coagulantes do grupo (Furtado *et al.*, 1991; Zapellini, 1991; Sanches *et al.*, 1992; Ferreira *et al.*, 1992a, 1992b, Flores *et al.*, 1993) e pela ausência da atividade trombina-símile, juntamente com *B. castelnaudi* (Nahas *et al.*, 1979; Furtado *et al.*, 1991; Maruyama *et al.*, 1992a).

O inóculo da peçonha de *B. erythromelas*, em cães, induz a um quadro de hipercoagulação, seguido de incoagulabilidade sangüínea em virtude do consumo dos fatores II, V e X (Vasconcelos, 1996) e hemorragia sistêmica aguda afetando principalmente pulmões, rins e fígado acompanhada de gengivorragia, petéquias hemorrágicas cutâneas, hematúria e sangramento nos locais de incisão cirúrgica (Valença, 1997).

Até o momento somente duas toxinas da peçonha de *B. erythromelas* foram purificadas: um ativador de protrombina denominado berythractivase, que é uma metaloproteinase não hemorrágica do grupo P-III das SVMTs (Silva *et al.*, 2003) e possui 78 KDa; e uma fosfolipase A2 de, aproximadamente, 13KDa (Albuquerque, 2000).

TOXINAS HEMORRÁGICAS

As manifestações de danos teciduais locais, como hemorragia e mionecrose, estão entre os efeitos mais proeminentes dos envenenamentos por serpentes Viperinae e Crotalinae. Nos envenenamentos mais leves, a hemorragia ocorre geralmente no local da picada, enquanto nos casos mais graves a mesma pode ocorrer em órgãos distantes do local, tais como coração, pulmões, rins e cérebro (Bjarnason e Fox, 1994).

Existem proteínas presentes nas peçonhas de serpentes que agem diretamente na parede dos vasos sanguíneos ocasionando o sangramento. Estes componentes são chamados hemorraginas (Grotto *et al.*, 1967) ou toxinas hemorrágicas (Bjarnason & Fox, 1994). Em geral, essas proteínas são metaloproteinases zinco-dependentes, de massa molecular variando de 20 kD a 100kD, aproximadamente, e que têm a capacidade de hidrolisar constituintes da membrana basal dos vasos sanguíneos levando ao extravasamento de sangue para o exterior, interstício ou cavidades pré-formadas do organismo (Bjarnason & Fox, 1994).

As metaloproteinases de peçonhas ofídica (SVMP – *Snake Venom Metalloproteinase*) formam, juntamente com as Adams (*A Desintegrin-like And Metalloproteinase containing protein*), a subfamília das reprotisinas da família metazincina (Jia *et al.*, 1996).

As hemorraginas de peçonhas de serpentes podem ser distribuídas em 4 classes de acordo com seus domínio, massas moleculares e características bioquímicas:

- a) classe P-I – são as menores hemorraginas, com massa de 20 a 30 kD e contêm apenas o domínio proteinase;
- b) classe P-II – incluem as enzimas de massa molecular intermediária (30 a 50 kD) contendo domínios proteinase e desintegrina-símile;
- c) classe P-III – está representada pelas toxinas mais potentes com massa de 50 a 80 kD, apresentando um terceiro domínio rico em cisteína;
- d) classe P IV – com massas moleculares de 80 a 100 kD, incluem as hemorraginas menos tóxicas caracterizadas pela presença de um quarto domínio, o de lectina (Petretski *et al.*, 2000; Huang, 2000).

O papel de cada domínio na toxicidade enzimática não está bem claro, entretanto já se sabe que metaloproteinases de alto peso molecular, que possuem os domínios desintegrina-

símile e rico em cisteína, são mais ativas do que as enzimas que possuem apenas o domínio metaloproteinase (Markland, 1998; Gutiérrez e Rucavo, 2000).

O mecanismo de ação das toxinas hemorrágicas não é bem conhecido, porém Ohsaka (1979) sugeriu que as hemorraginas podem agir por “diapedese” através da abertura das junções intercelulares entre as células endoteliais dos capilares, com o conseqüente extravasamento. Em contraste, Ownby *et al.*(1982) apresentaram fortes evidências indicando que diferentes toxinas hemorrágicas da peçonha de *Crotalus atrox* e *Crotalus horridus* induzem hemorragia “per rhexis”, isto é, pelo rompimento da integridade das células endoteliais, com o extravasamento de eritrócitos através de fendas formadas no interior destas células.

Evidências indicam que o extravasamento de sangue para o meio extravascular, induzido pelas hemorraginas ofídicas, parece estar relacionado com a degradação dos componentes da membrana basal das células endoteliais, sugerindo que este seja o efeito primário destas toxinas (Marsh *et al.*, 1994; Borkow *et al.*, 1995; Petretski *et al.*, 2000). Alterações no sistema de coagulação, caracterizadas pela incoagulabilidade sanguínea, juntamente com a inibição da agregação plaquetária podem contribuir para a severidade do quadro hemorrágico nos envenenamentos ofídicos, que é uma das causas de morte em acidentes por serpentes *Viperidae* (Warrell, 1996; Petretski *et al.*, 2000).

A membrana basal constitui uma matriz extracelular complexa, composta principalmente por colágeno tipo IV, laminina, fibronectina e nidogen, que fornecem suporte para as células endoteliais nos vasos sanguíneos, além de atuarem na comunicação entre os meios intra e extracelular. Metaloproteinases hemorrágicas hidrolisam componentes protéicos da membrana basal, e estes efeitos foram associados à hemorragia precoce no envenenamento ofídico. Várias metaloproteinases presentes nas peçonhas

ofídicas são capazes de degradarem laminina, fibronectina, nidogen e colágeno tipo IV *in vitro* (Bjarnason *et al.* 1988, 1993; Baramova *et al.*, 1989, 1991; Maruyama *et al.*, 1992b; Rucavo *et al.*, 1999; Yamakawa *et al.*, 1995; Franceschi *et al.*, 2000; Khaw *et al.*, 2002).

OBJETIVOS

Embora a principal razão pela qual ocorra hemorragia em envenenamentos ofídicos seja a destruição dos componentes da membrana basal vascular, pouco se conhece acerca do mecanismo de ação das toxinas hemorrágicas da peçonha de *Bothrops erythromelas*. A relevância dos acidentes botrópicos registrados no estado de Pernambuco e a inexistência de toxinas hemorrágicas purificadas da peçonha de *Bothrops erythromelas* nos envenenamentos por esta serpente justificam a realização deste estudo, que tem por objetivo a purificação de hemorraginas de alta massa molecular da referida peçonha.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Citação segundo as normas da ABNT-2002

ALBUQUERQUE, J. C. M. **Purificação e Caracterização de uma Fosfolipase de *Bothrops erythromelas***. 2000. 100 f. Dissertação de Mestrado em Biofísica, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2000..

AMARAL, C. F. S. N.; SILVA. O. A.; GODOY, P. Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *Bothrops jararacussu* snakebite. **Toxicon**. v. 23, p. 877-885, 1985.

AQUINO, W.K. **Epidemiologia e clínica dos acidentes ofídicos no estado de Pernambuco**. 1999. 100 f. Dissertação de Mestrado em Biofísica. Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 1999.

BARAMOVA, E.N., SHANNON, J.D., BJARNASON, J.B., FOX, J.W. Degradation of extracellular matrix proteins by hemorrhagic metalloproteinases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 275, p. 63-71, 1989.

BARAMOVA, E.N., SHANNON, J.D., FOX, J.W., BJARNASON, J.B. Proteolytic digestion of non-collagenous basement membrane proteins by the hemorrhagic metalloproteinase Ht-e from *Crotalus atrox* venom. **Biomed. Biochim. Acta** v. 4, p. 763-768, 1991.

BARRAVIERA, B.; PEREIRA, P.C.M. Acidentes por serpentes do gênero *Bothrops*. In: BARRAVIERA, B. **Venenos Animais**. Rio de Janeiro: Ed. de Publicações Científicas, 1^a edição, 1996.

BJARNASON, J.B; HAMILTON, D.; FOX, J.W. Studies on the mechanism of hemorrhage production by five proteolytic hemorrhagic toxins from *Crotalus atrox* venom. **Biol. Chem.** v. 369, p. 121-129, 1988..

BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmac.Ther.** v. 62, p. 325-372, 1994.

BOER-LIMA, P.A.; GONTIJO, J.A.; CRUZ-HOFLING, M.A. *Bothrops moojeni* snake venom-induced renal glomeruli changes in rat. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 67, p. 217-222, 2002.

BORKOW, G.; GUTIÉRREZ J.M. AND OVADIA M. Isolation and characterization of synergistic hemorrhagins from the venom of the snake *Bothrops asper*, **Toxicon**. v. 31, p. 1137-1150, 1993.

BORGES, R.C. **Serpentes peçonhentas brasileiras: Manual de identificação, Prevenção e Procedimentos em Caso de Acidentes**. São Paulo: Ed. Atheneu, 1999. p 58-72.

.

BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie.** v .82, p. 851-859, 2000.

CAMPBELL, J.A.; LAMAR, W.W. **The venomous Reptiles of Latin America.** New York: Ed. Comstock Publishing Associates, 1989.

CARDOSO, J.L. **Acidentes por animais peçonhentos na Coordenação de Zoonoses e Animais Peçonhentos – Comentários e sugestões.** São Paulo: , 1993.

CASTRO, I.; BURDMANN, E.; SEGURO, A.C.; YU, L. *Bothrops* venom induces direct renal tubular injury: role for lipid peroxidation and prevention by antivenom. **Toxicon.** v. 43, p. 833-839, 2004.

CORDEIRO, C.L.; HOGE, A.R. Contribuição ao conhecimento das serpentes do Estado de Pernambuco. **Mem. Inst. Butantan,** v. 37, p. 261-290, 1973.

FERREIRA, M.L.; MOURA-DA-SILVA, A.M.; MOTA, I.. Neutralization of different activities of venoms from nine species of *Bothrops* snakes by *Bothrops jararaca* antivenom. **Toxicon.** v. 30, p. 1591-1602, 1992a.

FERREIRA, M.L., MOURA-DA-SILVA, A.M., FRANÇA, F.O.S., CARDOSO, J.L., MOTA, I.. Toxic activities of venoms from nine *Bothrops* species and their correlation with lethality and necrosis. **Toxicon.** v. 30, p. 1603-1608, 1992b.

FLORES, C.A.; ZAPPELLINI; PRADO-FRANCESCHI, J., Lipoxygenase-derived mediators may be involved *in vivo* neutrophil migration induced by *Bothrops erythromelas* and *Bothrops alternatus* venoms. **Toxicon**. v. 31, p. 1551-1559, 1993.

FRANCESCHI, A., RUCAVADO, A., MORA, N., GUTIÉRREZ, J. M.. Purification and characterization of BaH4, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**. v. 38, p. 63-77, 2000.

FRANÇA, F.O.S; MÁLAQUE, C.M.S. Acidente Botrópico. In: CARDOSO, J.L.C; FRANÇA, F.O.S; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S; HADDAD Jr, V. **Animais peçonhentos no Brasil. Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Editora Sarvier, 2003. p. 72-86.

FRANCO, F.L. Origem e diversidade das serpentes. In: CARDOSO, J.L.C; FRANÇA, F.O.S; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S; HADDAD Jr, V. **Animais peçonhentos no Brasil. Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Editora Sarvier, 2003. p. 72-86.

FURTADO, M.F.D., MARUYAMA, M., KAMIGUTI, A.S., ANTÔNIO, L.C.,. Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. **Toxicon**. v. 29, p. 219-226, 1991

GUTIÉRREZ, J.M., LOMONTE, B.. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A Review. **Mem. Inst. Butantan**. V. 51, p. 211-223, 1989.

GUTIÉRREZ, J.M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie.** v. 82, p. 841-850., 2000.

HOGUE, A.R. & ROMANO-HOGUE, S.A.R.W.L. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. **Mem. Inst. Butantan.** 1978/79.

JIA, L.G.; SHIMOKAWA, K. BJARNASON J.B.;FOX, J.W. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relationship to the ADAMs family of proteins., **Toxicon.** v. 34, p. 1269-1276, 1996.

JORGE, M.T.; RIBEIRO, L.A. Acidentes por animais peçonhentos. **Revista médica do IAMSPE.** v. 15,. p. 1-2, 1984.

KHOW, O., CHANHONG, L., OMORI-SATO, T., PUEMPUNPANICH, S., SIPRJA, V. A hemorrhagin as a metalloprotease in the venom of *Trimeresurus purpureomaculatus*: purification and characterization. **Toxicon.** v. 40, p. 455-461, 2002.

MARSH, N.A. Snake venoms affecting the haemostatic mechanism – a consideration of their mechanisms, practical applications and biological significance. **Blood Coagulation & Fibrinolysis: an International Journal in Haemostasis and Trombosis.** v. 5, p. 399-410, 1994..

MARKLAND, F.S. Snake venom fibrinogenolytic and fibrinolytic enzymes: An updated inventory. **Thrombosis and Hemostasis**. v. 79, p. , 1998.

MARQUES, O.A.V.; SAZIMA, I. História natural das serpentes. In: CARDOSO, J.L.C; FRANÇA, F.O.S; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S; HADDAD Jr, V. **Animais peçonhentos no Brasil. Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Editora Sarvier, 2003. p. 72-86.

MARUYAMA, M., KAMIGUTI, A.S., TOMY, S.C., ANTÔNIO, L.C., SUGIKI, M., MIHARA, H. Prothrombin and factor X activating properties of *Bothrops erythromelas* venom. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology** . v. 86, p. 549-556, 1992.

MARUYAMA, M.; SUGIKI, M.; YOSHIDA, E.; SHIMAYA, K.; MIHARA, H. Broad substrate specificity of snake venom fibrinolytic enzymes: possible role in haemorrhage. **Toxicon**. v. 30, p. 1387-1397, 1992.

MELGAREJO, A.R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J.L.C; FRANÇA, F.O.S; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S; HADDAD Jr, V. **Animais peçonhentos no Brasil. Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Editora Sarvier, 2003. p. 72-86.

MOURA-DA-SILVA, A.M.; CARDOSO, D.F.; TANIZAKI, M.N. Differences in distribution of myotoxic proteins in venoms from different *Bothrops* species. **Toxicon**. v.28, p. 1293-1301, 1990.

NAHAS, L., KAMIGUTI, A.S., BARROS, M.A.R., 1979. Thrombin-like and factor X-activator components of *Bothrops* snake venoms. **Thrombs. Haemostas. (Stuttg)**. v. 41, p. 314-328, 1990.

OHSAKA, A. Haemorrhagic, necrotizing, and edema-forming effects of snake venoms. In: Lee, C. Y. Ed. **Handbook of Experimental Pharmacology: Snake Venoms**. Berlin: Springer-Verlag, 1979. v.52, p. 480-546.

OLIVEIRA, R.B.; RIBEIRO, L.A.; JORGE, M.T. Fatores associados à incoagulabilidade sanguínea no envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops*. **Revista da Soc. Bras. de Med. Trop.** v. 36, p. 657-663, 2003.

PETRETSKI, J.H., KANASHIRO, M.M., RODRIGUES, F.R., ALVES, E.W., MACHADO, L.T., KINIPS, T.L., 2000. Edema induction by the disintegrin-like/cysteine-rich domains from a *Bothrops atrox* hemorrhagin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 276, p. 29-34, 2003.

OUYANG, C.; TENG, C.M.; HUANG, T.F. Characterization of snake venom components acting on blood coagulation and platelet function. **Toxicon**. v. 30, p. 945-966, 1992.

OWNBY, C. L.; COLBERG, T. R.; ODELL, G. V. A new method for quantitating hemorrhage induced by rattlesnake venom: hability of polyvalent antivenom to neutralize hemorrhagic activity. **Toxicon**, v. 22, p. 227-233, 1982..

RUSSEL, F. E.; WALTER, F.G.; BEY, T. A.; FERNANDEZ, M. C. Snakes and snakebite in Central America – Review. **Toxicon**, v. 35, p. 1469-1522, 1980.

QUEIROZ, L.S.; SANTO NETO, H.; ASSAKURA, M.T.; REICHL, A.P; F.R.. Muscular lesions induced by a hemorrhagic factor from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Brazilian J. Med. Biol. Res.** v. 18, p. 337-340, 1985.

ROMANO-HOGE, S.A.R.W.L. Principais serpentes de interesse médico. Reconhecimento. Distribuição geográfica no continente americano. In: SOERENSEN, B. **Animais Peçonhentos**. Rio de Janeiro: Ed. Livraria Atheneu, 1990. p. 1-45.

RUCAVO, A.; FLORES-SÁNCHEZ, E.; FRANCESCHI, A.; MAGALHAES, A.; GUTIÉRREZ, J.M. Characterization of the local tissue damage induced by LHF-II, a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity isolated from *Lachesis muta muta* snake venom. **Toxicon** v. , p. 1297-1312, 1999.

RUSSEL, F.E.; WALTER, F.G.; BEY, T.A; FERNANDEZ, M.C.. Snakes e snakebite in Central America. **Toxicon**. v. 35, p. 1469-1522, 1997.

SANCHES, E.F., FREITAS, T.U., FERREIRA-ALVES, D.L., VELARDE, D.T., DINIZ, M.R., CORDEIRO, M.N., AGOSTINI-GOTTA, G., DINIZ, C.R. Biological activities of venom from South American snakes. **Toxicon**. v. 30, p. 95-103, 1992.

SILVA, M.B.; SCHATTNER, M.; RAMOS, C.R.R; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.M; GUARNIERI, M.C.; LAZZARI, M.A.; SAMPAIO, C.A.M.; POZNER, R.G., VENTURA, J.S.; HO, P.L.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. A prothrombin activator from *Bothrops erythromelas* (jararaca-da-seca) snake venom: characterization and molecular cloning. **Biochem. J.** v. 369, p. 129-139, 2003.

SOERENSEN, B. **Animais Peçonhentos**. Rio de Janeiro: Editora Livraria Atheneu, 1990. 144p.

STIDWORTHY, J. **Serpentes**. São Paulo: Série Prisma. Edições Melhoramentos. EDUSP. 1993. 158p..

STORER, T.I.; USINGER, R.L.; STEBBINS, R.C.; NYBAKKEN, J.W.. **Zoologia Geral**. São Paulo: Companhia Editora nacional. 1984.

TU, A.T. Snake venoms: General Background and composition. In: **Venoms: Chemistry and Molecular Biology**. New York: John Wiley and Sons. 1988a. p. 1-19.

TU, A.T. Overview of snake venom chemistry. **Adv. Exp. Med. Biol.** v. 391, p. 37-62, 1988b.

VALENÇA, R.C. **Estudo do processo hemorrágico induzido pela peçonha de *Bothrops erythromelas***. 1997. 61 f. Dissertação de Mestrado em Biofísica, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco. 1997.

VANZOLINI, P.E.; COSTA, A.M.M.R.; VITT, L.J.. **Répteis da Caatinga**. Rio de Janeiro: Fundo Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FNDCT). 1980.

VASCONCELOS, C.M.L. **Estudo da peçonha de *Bothrops erythromelas*: caracterização bioquímica, biológica e biodistribuição**. 1996. 112 f.. Dissertação de Mestrado em Biofísica, Universidade Federal de Pernambuco. Pernambuco. 1996.

WARRELL, D.A. Clinical features of envenoming from snakes bites. In: **Envenoming and Treir Treatment**. Ed. C. Bon; M. Goyffon. Lyon: Editions Fondation Mérieus. 1996. p. 63-76.

YAMAKAWA, Y.; OMORI-SATOH, T.; MEBS, D. Hemorrhagic principles in the venom of *Bitis arietans*, a viperous snake. II. Enzymatic properties with special reference to substrate specificity. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1247, p. 17-23, 1995.

ZAPPELINI, A. **Estudos bioquímicos e farmacológicos da peçonha de *Bothrops erythromelas***. 1991. Dissertação de Mestrado, UNICAMP, Campinas, SãoPaulo.

**Purificação e caracterização parcial de duas toxinas hemorrágicas da peçonha de
Bothrops erythromelas (Jararaca malha-de-cascavel)**

Milena Sardou Sabino Pinho¹

¹Departamento de Zoologia/CCB. Av. Professor Moraes Rego nº1235, Cidade
Universitária, Univ. Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brasil.

Resumo

A espécie *Bothrops erythromelas*, conhecida em Pernambuco como jararaca malha-de-cascavel está amplamente distribuída na Região Nordeste do Brasil. A hemorragia é um dos sintomas mais característicos do envenenamento botrópico, especialmente por esta serpente. A ação hemorrágica ocorre devido a um grupo de metaloproteínas zinco-dependentes, denominadas hemorraginas, que agem diretamente na parede dos vasos sanguíneos. Neste trabalho, duas hemorraginas pertencentes a classe P-III das metaloproteinases, denominadas berythrogina 1 e berythrogina 2, foram purificadas da peçonha da serpente *Bothrops erythromelas* por cromatografia em Sephacryl S-200, Mono-Q e TSK- G-2000 SW. As toxinas purificadas apresentaram cadeia única e 55 kDa, segundo EGPA-SDS em condições redutoras e foram completamente inibidas por EDTA.

Palavras-chave: *Bothrops erythromelas*, toxinas hemorrágicas, peçonhas ofídicas.

1. Introdução

As manifestações de danos teciduais locais, como hemorragia e mionecrose, estão entre os efeitos mais proeminentes dos envenenamentos por serpentes Viperidae e Crotalidae. Nos envenenamentos mais leves a hemorragia ocorre, geralmente, no local da picada, enquanto nos casos mais graves a hemorragia pode ocorrer em órgãos distantes do local, tal como coração, pulmões, rins e cérebro (Bjarnason e Fox, 1994).

Toxinas hemorrágicas de várias serpentes estão sendo purificadas e suas propriedades investigadas (Bjarnason e Fox, 1994; Marsh, 1994; Marsh *et al.*, 1995; Miyagi *et al.* 1998; Omori-Satoh *et al.*, 1995; Petretski *et al.*, 2000; Tan *et al.*, 1990; Yamakawa *et al.*, 1995). Em geral, essas proteínas são metaloproteinases zinco-dependentes, de massa molecular variando de 20 kD a 100kD.

A serpente *Bothrops erythromelas*, conhecida em Pernambuco como jararaca malha-de-cascavel, é responsável pela maioria dos acidentes ofídicos ocorridos no nordeste do Brasil (Wen *et al.*, 1985; Romano-Hoge, 1990). Sua peçonha destaca-se das demais do gênero por apresentar uma das mais potentes atividades coagulantes do grupo e (Furtado *et al.*, 1991; Zapellini, 1991; Sanches *et al.*, 1992; Ferreira *et al.*, 1992) pela ausência da atividade trombina símile, juntamente com *B. castelnaudi* (Nahas *et al.*, 1979; Furtado *et al.*, 1991; Maruyama *et al.*, 1992).

Embora a principal razão pela qual ocorra hemorragia em envenenamentos ofídicos seja a destruição dos componentes da membrana basal vascular, pouco se conhece acerca das toxinas hemorrágicas da peçonha de *B. erythromelas*. A relevância dos acidentes

botrópicos registrados no estado de Pernambuco e a ausência de estudos sobre caracterização e elucidação do papel das hemorraginas da peçonha de *B. erythromelas* nos envenenamentos por esta serpente justificam a realização deste estudo, que tem por objetivo a purificação de hemorraginas de alta massa molecular da referida peçonha.

2. Materiais e Métodos

2.1- Reagentes

Bis-acrilamida, persulfato de amônio (APS), β -mercaptoetanol, os padrões de massa molecular utilizados na preparação do gel de poliacrilamida e as colunas de Sephacryl S-200 e Mono Q foram obtidos da Amersham Pharmacia Biotech; azul de bromofenol, dodecil sulfato de sódio (SDS), N,N,N',N'- tetrametiletilenodiamina (TEMED), glicina, padrões de peso molecular e tiosulfato de sódio foram obtidos da Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, U.S.A.); ácido etilenodiaminotetracéico-EDTA e tris hidroximetil-aminometano (Tris) da ISOFAR.; sulfato de amônio e cloreto de sódio da Merck S.A. (Rio de Janeiro, RJ, Brasil); acrilamida da VETEC; nitrato de prata da Avicenna do Brasil; carbonato de sódio da química moderna e hidróxido de amônio da Dinâmica. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.2 – Peçonha

Foi utilizado um “pool” de peçonha extraída, por compressão manual das glândulas, de 52 serpentes adultas da espécie *Bothrops erythromelas*, procedentes de

diversas regiões do estado de Pernambuco e mantidas no Laboratório de Animais Peçonhentos e Toxinas da UFPE. A peçonha liofilizada foi mantida a -20°C até o momento do uso.

2.3 – Animais

Camundongos Swiss machos, pesando entre 18 a 22g, provenientes do Biotério do LIKA, foram utilizados nos experimentos. Os animais foram mantidos em gaiolas de plástico recebendo ração própria para a espécie e água *ad libitum*. Os experimentos com animais foram realizados segundo os procedimentos estabelecidos no Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação.

2.4 – Purificação das hemorraginas

2.4.1-Cromatografia de gel filtração em Sephacryl S-200

A peçonha total (865 mg) de *B. erythromelas* (pBe) foi diluída em 4,2 ml de tampão acetato de amônio 50 mM contendo 0,3 M de NaCl, pH 5,0, centrifugada 10.000 rpm e o sobrenadante aplicado a uma coluna de gel filtração Sephacryl S-200 (1m x 2,6 cm) equilibrada com o mesmo tampão. A corrida foi processada à temperatura ambiente, em fluxo de 2,5 ml/min e o perfil de eluição foi monitorado em 280 nm usando um FPLC (Amersham Biosciences, USA). As frações de alta massa molecular foram testadas e reunidas de acordo com a atividade hemorrágica em camundongos. A fração de interesse

foi dialisada contra acetato de amônio 50 mM, pH 5,0 acrescido de CaCl_2 2mM, liofilizada e mantida a -20°C .

2.4.2 – Cromatografia de troca iônica

A fração com maior atividade hemorrágica (tubos 46-57) foi aplicada em coluna Mono Q 5/50 equilibrada com tampão Tris-HCl 100mM, pH 8,0. As proteínas foram eluídas com um gradiente não linear (0-3,3%; 3,3-5,3%; 5,3-6,7%; 6,7-10%; 10-24%, 24-40%, 40-100%) de tampão de equilíbrio acrescido de NaCl 2M, e fluxo de 1ml/min em sistema ÄKTA FPLC (Amersham Biosciences, USA), à temperatura ambiente, em fluxo de 1 ml/min. Frações de 2 ml foram coletadas, testadas quanto a atividade hemorrágica e estocadas a -20°C .

2.4.3 – Cromatografia de gel filtração em TSK G-2000SW

Duas frações com atividade hemorrágica, provenientes da troca iônica foram aplicadas, separadamente, em coluna TSK-Gel G-2000SW (TOSOH, Tokyo, Japão), equilibrada com tampão acetato de amônio 150mM, pH 5,0. As proteínas foram eluídas em fluxo de 0,5ml/min em sistema ÄKTA PURIFIER - HPLC (Amersham Biosciences, Piscataway, USA). Frações de 1ml foram coletadas, testadas quanto a atividade hemorrágica e estocadas a -20°C .

2.5 –Determinação da atividade hemorrágica

O método de Kondo *et al.* (1960) modificado por Gutiérrez *et al.* (1985) foi utilizado para quantificar a atividade hemorrágica. Alíquotas de 100µl de cada fração cromatográfica foram injetadas, por via intradérmica, no dorso previamente depilado de camundongos. A atividade hemorrágica das frações provenientes da coluna Sephacryl S-200 e da troca iônica foi determinada 1 hora após o inóculo das amostras, enquanto, devido à baixa concentração de proteínas, a atividade hemorrágica das frações oriundas da coluna TSK G2000-SW foi determinada 4 horas após a injeção. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. A pele do dorso foi removida e a área hemorrágica medida através do produto das medidas transversal e longitudinal da lesão.

2.6 – Eletroforese com gel de poliacrilamida e dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Para avaliar a pureza das toxinas purificadas e estimar o peso molecular das mesmas foram realizadas eletroforeses em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio de acordo com o método de Laemmli (1970), com géis de empilhamento (4% em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8) e de resolução (12,5%, em tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,75), na presença e ausência de agente redutor. As massas moleculares das toxinas hemorrágicas foram determinadas a partir da curva de calibração com as proteínas padrão (Sigma).

2.7 – Efeito de inibidor sintético sobre atividade hemorrágica

Para avaliar se as toxinas purificadas pertencem a classe das metaloproteases, 100 µl das toxinas (25 µg) foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente com EDTA (concentração final de 10 mM). Uma alíquota de cada amostra foi incubada a temperatura ambiente pelo mesmo período para utilização como controle. Após esse período, a atividade hemorrágica foi determinada conforme descrito anteriormente.

3. Resultados

Duas hemorraginas da peçonha de *B. erythromelas* (pBe), denominadas berythrogina 1 e berythrogina 2, foram purificadas em três passos cromatográficos.

A cromatografia de gel filtração em coluna Sephacryl S-200 fracionou a pBe em cinco grandes grupos de proteínas de acordo com sua massa molecular (fig.1). Os tubos 31 a 68 apresentaram atividade hemorrágica (fig.1).

Os tubos que exibiram maior atividade (46-57) foram reunidos e cromatografados em coluna Mono Q 5/50, resultando em 6 picos (fig.2). A atividade hemorrágica foi detectada nos picos 2 a 5, entretanto o pico 2, que apresentou a maior densidade óptica, revelou aproximadamente, dez vezes mais atividade hemorrágica (962 mm de halo hemorrágico) do que os outros tubos. Para cromatografia em coluna TSK-Gel G-2000SW foram escolhidas duas frações: tubos 9 e 18 (fig. 2).

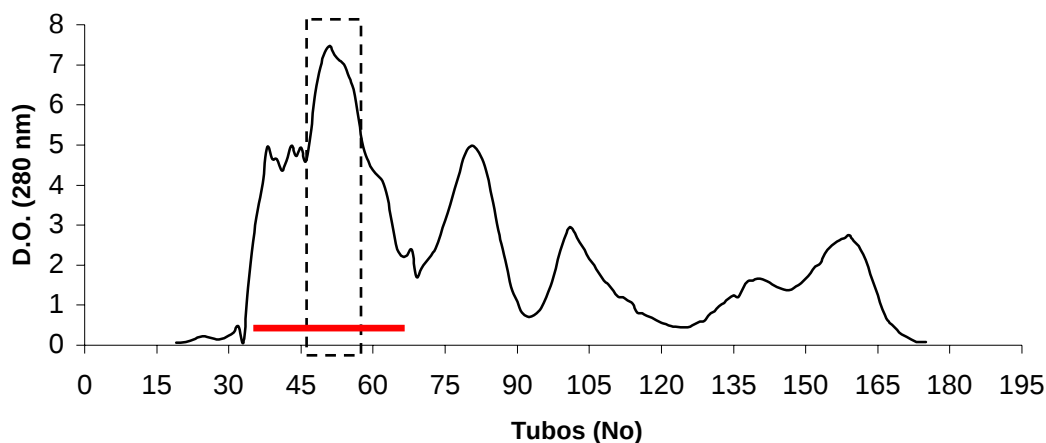


Figura 1. Fracionamento da peçonha de *B. erythromelas* por cromatografia de gel filtração. A peçonha (865 mg) foi diluída em 4,2 ml de tampão acetato de amônio 50 mM contendo 0,3 M de NaCl, pH 5,0, centrifugada e o sobrenadante aplicado a uma coluna de gel filtração Sephacryl S-200 (2,6 x 100 cm) equilibrada com o mesmo tampão. A corrida foi processada à temperatura ambiente, em fluxo de 2,5 ml/min. As frações que apresentaram atividade hemorrágica estão em vermelho (—), e a escolhida para próximo passo está marcada por um retângulo.

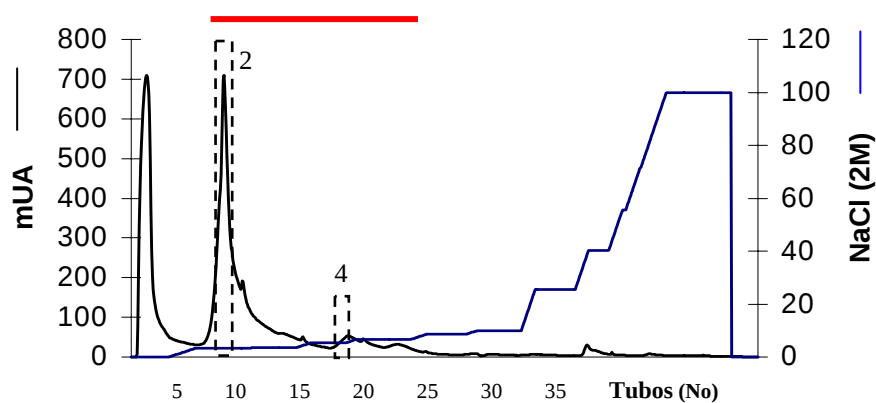


Figura 2. Troca iônica das frações hemorrágicas reunidas da etapa anterior. A fração (21,4 mg) diluída em 2 ml de tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0 foi filtrada em Millipore (22 μ m) e aplicada em Mono Q (0,5 x 5 cm) equilibrada com o mesmo tampão. A corrida foi processada à temperatura ambiente, em fluxo de 1 ml/min. As frações que apresentaram atividade hemorrágica estão em vermelho (—) e as escolhidas para o próximo passo estão identificadas por retângulos.

A cromatografia do tubo 9 em TSK revelou 6 picos, estando a atividade hemorrágica associada ao 2° e 4° picos (fig. 3). A eletroforese destas amostras revelou três bandas na fração proveniente do 4° pico, e apenas uma banda da oriunda do 2° pico com massa molecular de, aproximadamente, 55 kDa, sendo denominada Berythrogina 1 (fig. 3).

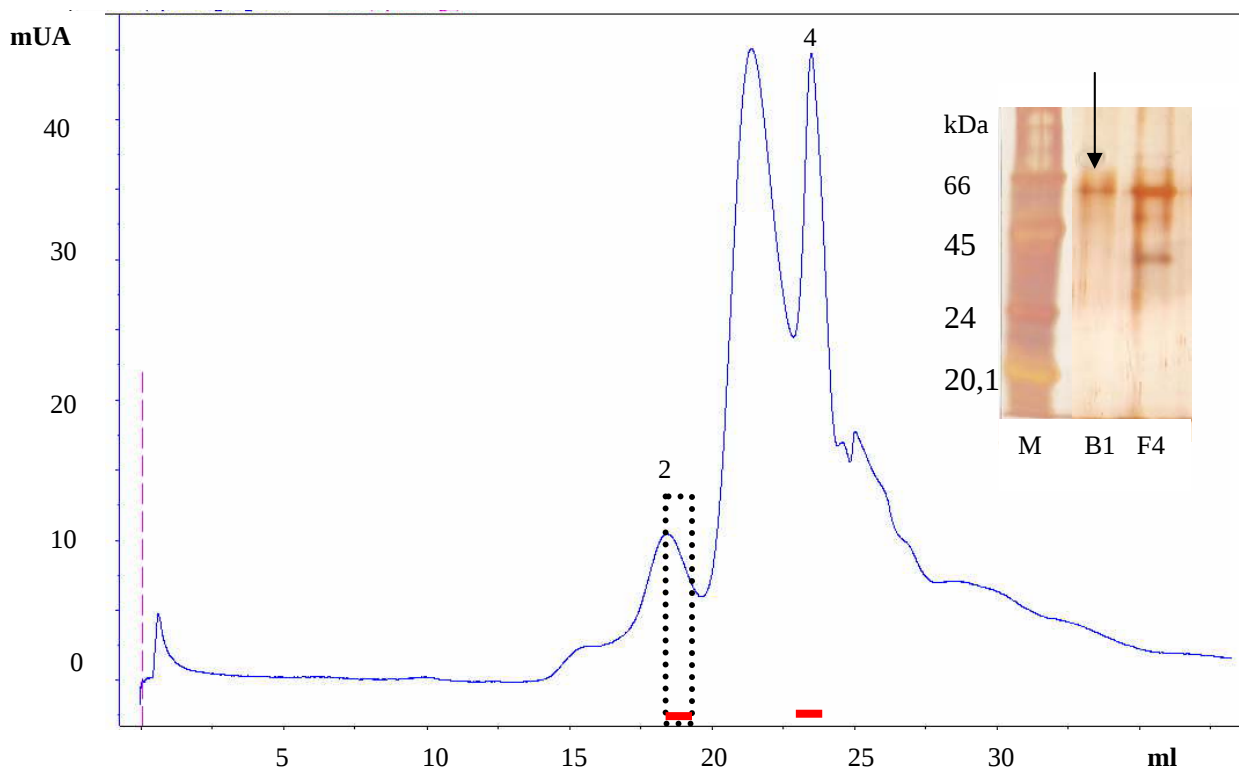


Figura 3. Gel filtração da fração 9 proveniente da troca iônica. A fração (1 ml) foi aplicada em coluna TSK G2000-SW equilibrada em tampão acetato de amônio 150 mM, pH 5,0. A corrida foi processada a 22° C, em fluxo de 0,5 ml/min. As frações que apresentaram atividade hemorrágica estão em vermelho (—). A Berythrogina 1 está identificada por um retângulo. A eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% da toxina purificada (B1) tratada com β -mercaptoetanol apresentou uma única banda estimada 55 kDa e a toxina parcialmente purificada (F4) apresentou duas bandas.

O tubo 18 proveniente da troca iônica também foi submetido à cromatografia em TSK G2000-SW, sendo fracionado em quatro picos, dos quais somente o 2° apresentou

atividade hemorrágica (fig 5). O perfil eletroforético desta amostra revelou uma banda homogênea, denominada berythrogina 2 (fig 4).

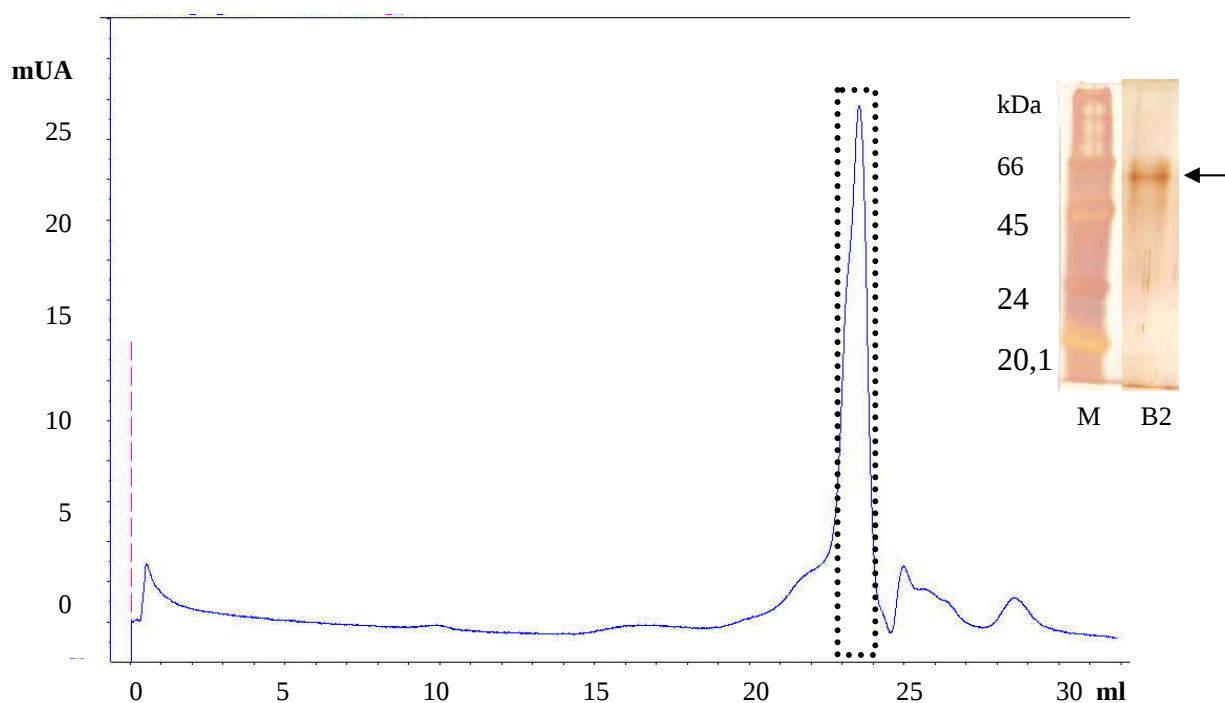


Figura 4. Gel filtração da fração 18 proveniente da troca iônica. A fração (1 ml) foi aplicada em coluna TSK G2000-SW equilibrada em tampão acetato de amônio 150 mM, pH 5,0. A corrida foi processada à 22° C, em fluxo de 0,5 ml/min. A hemorragina, denominada Berythrogina 2, está identificada por um retângulo. A eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% da toxina purificada (B2) tratada com β -mercaptoetanol apresentou uma única banda estimada em 55 kDa.

A atividade hemorrágica da berythrogina 1 e berythrogina 2 foi totalmente inibida pela pré – incubação com EDTA.

4. Discussão

As peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* contêm metaloproteinases que são responsáveis pela maioria dos efeitos locais e sistêmicos observados após o envenenamento (Kamiguti *et al.*, 1996; Gutiérrez e Rucavado, 2000). A hemorragia é um dos efeitos locais mais proeminentes e possui um importante papel em envenenamentos clínicos e experimentais (Baramova *et al.*, 1989; Bjarnason e Fox, 1994). Os principais componentes da peçonha responsáveis por esta atividade são metaloproteinases hemorrágicas, com peso molecular variando de 20 – 100 KDa e divididas em quatro classes (Gutiérrez e Rucavado, 2000; Matsui *et al.*, 2000).

Várias toxinas hemorrágicas estão sendo purificadas e caracterizadas de espécies do gênero *Bothrops*, incluindo *Bothrops jararaca* (Assakura *et al.*, 1986; Paine *et al.*, 1992; Anai *et al.*, 2002; Maruyama *et al.*, 2002; Costa e Santos, 2004) *Bothrops jararacussu* (Mazzi *et al.*, 2004), *Bothrops lanceolatus* (Stroka *et al.*, 2004), *Bothrops atrox* (Franceschi *et al.*, 2000; Watanabe *et al.*, 2003).

Bothrops erythromelas é a serpente responsável pela maioria dos acidentes ofídicos ocorridos em Pernambuco, porém pouco se conhece acerca da composição de sua peçonha. Até o momento, apenas uma toxina, denominada berythraactivase, havia sido isolada. Esta toxina é uma metaloproteinase ativadora de protrombina e possui alta massa molecular (78 kDa) (Silva *et al.*, 2003). Neste trabalho foram isoladas mais duas metaloproteinases de alta massa molecular da peçonha de *B. erythromelas*, porém constituem as primeiras toxinas hemorrágicas purificadas da peçonha desta serpente.

Estas toxinas foram isoladas por uma combinação de cromatografias de gel filtração e troca iônica, observada também na purificação de outras metaloproteinases

hemorrágicas (Ownby *et al*, 1978; Mackessy, 1996; Franceschi *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2004) e, sua pureza foi demonstrada pelo gel de eletroforese corado com prata, este fato também foi descrito para outras hemorraginas (Borkow *et al*, 1993; Franceschi *et al*, 2000).

Embora algumas metaloproteinases tenham sido purificadas utilizando a coluna cromatográfica Resource Q (Khow *et al.*, 2002; Chen *et al*, 2004), esta não é indicada para purificação de proteínas de alto peso molecular da peçonha de *B. erythromelas*, que interagem irreversivelmente com a mesma (dados não mostrados).

A identificação da atividade hemorrágica nas frações provenientes das cromatografias de gel filtração e troca iônica evidenciaram a presença de múltiplas toxinas hemorrágicas de alta massa molecular na peçonha de *B. erythromelas*, das quais duas foram purificadas (berythrogina 1 e berythrogina 2) e outras foram purificadas parcialmente (dados não mostrados). Múltiplas hemorraginas também foram encontradas nas peçonhas de *Bitis gabonica* (Marsh *et al.*, 1995), *Bitis arietans* (Omori-Satoh *et al.*, 1995), *B. jararaca* (Paine *et al.*, 1992), *B. asper* (Franceschi *et al.*, 2000), *Vipera ammodytes* (Leonardi *et al.*, 2001). Essa multiplicidade de hemorraginas não se restringe apenas às de alta massa molecular, sendo encontradas proteínas hemorrágicas desde 28 kDa (classe P1) (Stroka *et al.*, 2004) até 180 kDa (classe P4) (Marsh *et al.*, 1995).

A berythrogina 1 e berythrogina 2 tiveram a atividade hemorrágica totalmente inibida quando incubadas em EDTA, o que comprova que são metaloproteinases como todas as hemorraginas descritas até o momento (Bjarnason e Fox, 1994). Ambas hemorraginas apresentaram apenas uma cadeia polipeptídica e tiveram uma massa molecular de 55 kDa em SDS-PAGE na presença de agente redutor, o que as classifica como metaloproteinases pertencentes a classe P3 das SVMPs (Petretski *et al.*, 2000).

Em estudos anteriores utilizando a fração de maior massa molecular da peçonha de *B. erythromelas* em coluna de Concanavalina A -Sephrose, várias toxinas interagiram com a matriz (dados não publicados), este fato, aliado aos perfis eletroforéticos da berythrogina 1 e berythrogina 2, mostram interação das proteínas com o gel sugerindo que estas hemorraginas sejam glicoproteínas.

Embora as toxinas apresentem, praticamente, a mesma massa molecular em SDS-PAGE, os resultados da troca iônica comprovam que são duas toxinas distintas, uma vez que possuem cargas diferentes, sendo a berythrogina 2 mais carregada negativamente que berythrogina 1.

Em conclusão, duas novas metaloproteinases hemorrágicas da classe P-III com 55 kDa, denominadas berythrogina 1 e berythrogina 2 foram purificadas da peçonha de *Bothrops erythromelas*.

Referências Bibliográficas

- ANAI, K.; SUGIKI, M.; YOSHIDA, E.; MARUYAMA, M. 2001. Neutralization of a snake venom hemorrhagic metalloproteinase prevents coagulopathy after subcutaneous injection of *Bothrops jararaca* venom in rats. *Toxicon*. 40, 63-68.
- ASSAKURA, M.T.; REICHL, A.P.; MANDELBAUM, F.R. 1986. Comparison of immunological, biochemical and biophysical properties of three hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops jararaca* (jararaca). *Toxicon*. 24, 943-946.

BARAMOVA, E.N., SHANNON, J.D., BJARNASON, J.B., FOX, J.W., 1989.

Degradation of extracellular matrix proteins by hemorrhagic metalloproteinases.
Archives of Biochemistry and Biophysics 275, 63-71.

BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. 1994. Hemorrhagic metalloproteinases from snake
venoms. Pharmac.Ther. 62, 325-372.

CHEN, R.; WU,J.; ZHOU, X.; LI, D.S.; LU, K.M.; WANG,W.; XIONG, Y. 2004. A novel
high molecular weight metalloproteinase cleaves fragment F1 of activated human
prothombin. Toxicon. 44, 281-287.

COSTA, E.P.; SANTOS, M.F. 2004. Jararhagin, a snake venom metalloproteinase-
disintegrin, stimulates epithelial cell migration in an in vitro restitution model.
Toxicon. 44, 861-870.

FERREIRA, M.L., MOURA-DA-SILVA, A.M., FRANÇA, F.O.S., CARDOSO, J.L.,
MOTA, I., 1992b. Toxic activities of venoms from nine *Bothrops* species and their
correlation with lethality and necrosis. Toxicon 30, 1603-1608.

FRANCESHI, A.; RUCAVADO, A.; MORA, N.; GUTIÉRREZ, J.M. 2000. Purification
and characterization of BaH4, a hemorrhagic metalloproteinase from the venom of the
snake *Bothrops asper*. Toxicon. 38, 63-77.

FURTADO, M.F.D., MARUYAMA, M., KAMIGUTI, A.S., ANTÔNIO, L.C., 1991.

Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. *Toxicon*. 29, 219-226.

GUTIÉRREZ, J.M.; RUCAVADO, A., 2000. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie*. 82, 841-850

KAMIGUTI, A.S.; HAY, C.R.M.; THEAKSTON, R.G.D.; ZUZEL, M. 1996. Insights into mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. *Toxicon*. 34, 627-642.

KONDO, H., KONDO, S., IKEZAWA, H., MURATA, R., OHSAKA, A., 1960.

Studies on the quantitative method for determination of hemorrhagic activity of habu snake venom. *Jpn J. Med. Sci. Biol*. 13, 43-51.

KHOW, O., CHANHOM, L., OMORI-SATOH, T., PUEMPUNPANICH, S., SIPRJA, V., 2002. A hemorrhagin as a metalloprotease in the venom of *Trimeresurus purpureomaculatus*: purification and characterization. *Toxicon* 40, 455-461.

LAEMMLI, U.K. 1970. In: SILVA JUNIOR, J.C. 2001. Eletroforese de proteínas. Guia teórico-prático. Editora intersciência. Rio de Janeiro.

LEONARDI, A.; GUBENSEK, F.; KRIZAJ, I. 2001 Purification and characterisation of two hemorrhagi metalloproteinases from the venom of the long-nosed viper, *Vipera*

ammodytes ammodytes. Toxicon. 40, 55-62

MACKESSY, S.P. 1996. Characterization of the major metalloprotease isolated from the venom of the northern pacific rattlesnake, *Crotalus viridis oreganus*. Toxicon. 34, 1227-1285.

MARSH, N.A. 1994. Snake venoms affecting the haemostatic mechanism – a consideration of their mechanisms, practical applications and biological significance. Blood Coagulation & Fibrinolysis: an International Journal in Haemostasis and Trombosis. 5, 399-410.

MARSH, N.A.; FYFFE, T.L.; BENNET, E.A. 1995. Isolation and characterisation of two haemorrhagic proteins (Hta e HTb) from the venom of *Bitis gabonica* (Gaboon Viper). Toxicon. 33 (7), 883-899.

MARUYAMA, M.; SUGIKI, M.; YOSHIDA, E.; SHIMAYA, K.; MIHARA, H., 1992. Broad substrate specificity of snake venom fibrinolytic enzymes: possible role in haemorrhage. Toxicon. 30, 1387-1397.

MARUYAMA, M.; SUGIKI, M.; ANAI, K.; YOSHIDA, E. 2002. N-terminal amino acid sequences and some characteristics of fibrinolytic/hemorrhagic metalloproteinases purified from *Bothrops jararaca* venom. Toxicon. 40, 1223-1226.

- MAZZI, M.V.; MARCUSSI, S.; CARLOS, G.B.; STÁBELI, R.G.; FRANCO, TICLI, F.K.; CINTRA, A.C.O.; FRANÇA, S.C.; SOARES, A.M.; SAMPAIO, S.V. 2004. A new hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom: isolation and biochemical characterization. *Toxicon*. 44, 215-223.
- MIYAGI, H.; KATO, K.; TAKAHASHI, H.1998. Purification of haemorrhagic proteinase from the venom of *Agkistrodon caliginosus* (Kankoku-Mamushi). *Toxicon*. 36 (5), 781-790.
- NAHAS, L., KAMIGUTI, A.S., BARROS, M.A.R., 1979. Thrombin-like and factor X-activator components of *Bothrops* snake venoms. *Thrombs. Haemostas. (Stuttg)* 41, 314-328.
- OMORI-SATOH, T.; YAMAKAWA, Y.; NAGAOKA, Y.; MEBS, D. 1995. Hemorrhagic principles in the venom of *Bitis arietans*, a viperous snake. I. Purification and characterization. *Biochimica et Biophysica Acta* 1246, 61-66.
- OWNBY, C.L.; BJARNASON, J.; TU, A.T. 1978. Hemorrhagic toxins from Rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom. *American journal of pathology*.93, 201-210.
- PAINE, M.J.L.; DESMOND, H.P.; THEASKTON, R.G.D.; CRAPTON, J.M. 1992. Purification, cloning and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloproteinase, jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. *J. Biol. Chem*. 267, 22869-22876.

PETRETSKI, J.H., KANASHIRO, M.M., RODRIGUES, F.R., ALVES, E.W.,
MACHADO, °L.T., KINIPS, T.L., 2000. Edema induction by the disintegrin-
like/cysteine-rich domains from a *Bothrops atrox* hemorrhagin. Biochem. Biophys. Res.
Commun. 276, 29-34.

ROMANO-HOGE, S.A.R.W.L., 1990. Principais serpentes de interesse médico.
Reconhecimento. Distribuição geográfica no continente americano. In: SOERENSEN,
B. Animais Peçonhentos, Rio de Janeiro, ed. Livraria Atheneu, 1-45.

SANCHES, E.F., FREITAS, T.U., FERREIRA-ALVES, D.L., VELARDE, D.T., DINIZ,
M.R., CORDEIRO, M.N., AGOSTINI-GOTTA, G., DINIZ, C.R., 1992. Biological
activities of venom from South American snakes. Toxicon 30, 95-103.

SILVA, M.B.; SCHATTNER, M.; RAMOS, C.R.R; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.M;
GUARNIERI, M.C.; LAZZARI, M.A.; SAMPAIO, C.A.M.; POZNER, R.G.,
VENTURA, J.S.; HO, P.L.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. 2003. A prothrombin
activator from *Bothrops erythromelas* (jararaca-da-seca) snake venom: characterization
and molecular cloning. Biochem. J. 369, 129-139.

STROKA, A.; DONATO, J.L.; BON, C.; HYSLOP, S.; ARAÚJO, A.L. 2004. Purification
and characterization of a hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops lanceolatus* (Fer-
de-lance) snake venom. Toxicon, 1-10.

TAN, N.H.& NOMANBHAY, S.1990. Isolation and characterization of a hemorrhagin

from the venom of *Ophiophagus hannah* (King cobra). *Toxicon*. 28 (4), 385-392.

YAMAKAWA, Y.; OMORI-SATOH, T.; MEBS, D. 1995. Hemorrhagic principles in the venom of *Bitis arietans*, a viperous snake. II. Enzymatic properties with special reference to substrate specificity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1247, 17-23.

WATANABE, L.; SHANNON, J.D.; VALENTE, R.H.; RUCAVADO, A.; ALAPE-GIRÓN, A.; KAMIGUTI, A.S.; THEAKSTON, R.D.G.; FOX, J.W.; GUTIÉRREZ, J.M.; ARNI, R.K. 2003. Amino acid sequence and crystal structure of BaP1, a metalloproteinase from *Bothrops asper* snake venom that exerts multiple tissue-damaging activities. *Protein Science*. 12, 2273-2281.

ZAPPELINI, A., 1991. Estudos bioquímicos e farmacológicos da peçonha de *Bothrops erythromelas*. (Dissertação de Mestrado, UNICAMP), Campinas, São Paulo.