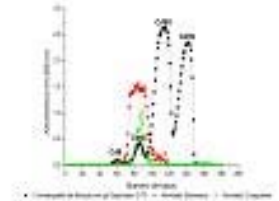


Daniella Gorete Lourenço de Oliveira



PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO

DE PROTEÍNAS DE VENENOS DE SERPENTES

QUE INTERFEREM



NA CASCATA DE COAGULAÇÃO SANGÜÍNEA



Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Daniella Gorete Lourenço de Oliveira

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
PROTEÍNAS DE VENENOS DE SERPENTES
QUE INTERFEREM NA CASCATA DE
COAGULAÇÃO SANGÜÍNEA**

Daniella Gorete Lourenço de Oliveira

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
PROTEÍNAS DE VENENOS DE SERPENTES
QUE INTERFEREM NA CASCATA DE
COAGULAÇÃO SANGÜÍNEA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista, Campus de São José do Rio Preto, para obtenção do título em Biofísica Molecular, área de concentração: Cristalografia de Macromoléculas.

Orientador: Prof. Dr. Raghuvir K. Arni

São José do Rio Preto
2006

Oliveira, Daniella Gorete Lourenço de.

Purificação e caracterização de proteínas que interferem na cascata de coagulação sanguínea / Daniella Gorete Lourenço de Oliveira. – São José do Rio Preto: [s.n.], 2006.

74 : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Raghuvir Krishnaswamy Arni

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biologia molecular. 2. Sangue - coagulação. 3. Venenos - purificação. 4. Proteínas - purificação. 5. Enzimas proteolíticas. 6. Proteinases. 7. Serino-proteinases. I. Arni, Raghuvir Krishnaswamy. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas III. Mestrado.

CDU – 577.322

Daniella Gorete Lourenço de Oliveira

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
PROTEÍNAS DE VENENOS DE SERPENTES
QUE INTERFEREM NA CASCATA DE
COAGULAÇÃO SANGÜÍNEA**

Comissão julgadora

Presidente e Orientador: _____
Prof. Dr. Raghuvir K. Arni.

2º Examinador: _____
Profª. Drª. Adélia Cristina Oliveira Cintra

3º examinador: _____
Prof. Dr. Patrick Jack Spencer

São José do Rio Preto, 08 de dezembro de 2006.

Dados Curriculares

Daniella Gorete Lourenço de Oliveira

A autora desse trabalho, Daniella Gorete Lourenço de Oliveira, nasceu em Araçatuba-SP, no ano de 1979. Realizou seus estudos pré-universitários em escolas particulares e públicas. No ano de 2001, iniciou o curso de Licenciatura em Ciências Biológicas na FUNEPE – Fundação Educacional de Penápolis – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras. Em seu 3º ano de faculdade obteve aprovação em dois concursos públicos para o cargo de Professora de Educação Básica II em Biologia e Ciências Físicas e Biológicas do Estado de São Paulo. Durante a graduação fez cursos e teve participação em Workshops, Congressos e Simpósios na área de Biologia Molecular, Genética, Ecologia e Botânica. Em 2003, deu início ao estágio sob a orientação do Professor Doutorando Edson Montilha Oliveira, na área de Ecologia, com destaque para trabalhos sobre germinação de sementes e quantificação da biomassa de um pequeno fragmento vegetal na UNESP de Araçatuba. Concluiu a graduação com projeto de Educação Ambiental para alunos do Ensino Fundamental e Técnico (Colégio Agrícola). Começou em 2005 o curso de mestrado em Biofísica Molecular na UNESP de São José do Rio Preto com auxílio bolsa FAPESP. Nesse período fez estágios no Instituto Butantan, Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada (CAT/ CEPID), sob a orientação da Dra. Solange Maria de Toledo Serrano e na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, Laboratório de Análises Clínicas, Toxicologia e Bromatologia grupo de pesquisa da Prof^ª. Dr^ª. Suely Vilela Sampaio, sob a orientação e colaboração no trabalho de mestrado da Dra. Adélia Cristina Oliveira Cintra. Participou de cursos no Rio de Janeiro (Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ), Campinas (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron - LNLS) e São Paulo (Instituto Butantan – CAT/ CEPID) e congressos científicos relacionado à área de Biologia Molecular, Bioquímica, Purificação e Cristalografia de Macromoléculas. Os resultados do trabalho de mestrado foram apresentados na forma de painel na XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq) e no Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins (SIMCRO) no ano de 2006.

*“A grandeza
não consiste em receber honras,
mas em merecê-las”*

“Aristóteles”

Dedico este trabalho,
A uma grande amiga e mulher, “Adélia”
que deu vida,
sentido e
qualidade
ao meu trabalho,
ao dedicar um pouco do seu tempo
a arte de ensinar.

*“para estar junto,
não é preciso estar perto,
mas sim do lado de dentro”*

“Leonardo Da Vinci”

Ao carinho de minha família,

Meus pais, Oswaldo e Gorete,
e meus irmãos, Otávio e Natália,
porque são minhas maiores
riquezas nesse mundo.
Amo muito vocês ...

Agradecimentos

Ao meu Orientador,

Prof. Dr. Raghuvir K. Arni,

pela orientação, credibilidade e confiança que depositou em mim.

A amiga Dra. Adélia (FCFRP-USP), pela ajuda nos momentos difíceis e pelas idéias de uma excelente pesquisadora.

Aos meus pais e irmãos, por sempre se fazerem presentes ainda que distantes, assim com todo apoio, credibilidade e confiança que eles depositam em mim, vocês sempre terão minha mão como ajuda e agradecimento.

A minha amiga Livia pelo convívio muito especial e amizade que se faz presente a cada dia.

Aos amigos de laboratório, Flávia, Karine, Mário e minhas princesinhas Joice e Lydia pela ótima convivência, amizade e pelo apoio.

Aos amigos que fiz no laboratório da FCFRP-USP,
Franco, Elaine, Raquel e Gilmara
pelo ótimo e saudável convívio durante o período que estive em Ribeirão Preto,
e pela pronta disposição de ajudar.

A todos os professores, alunos e funcionários do Departamento de Física da UNESP de São José do Rio Preto, pelo companheirismo, amizade, ensinamentos e ajuda.

Aos amigos que fiz ao longo de minha vida e que entendem
minha ausência e falta de tempo para com eles e que ao contrário
de mim eles sempre estão me dedicando alguma forma de atenção
Obrigada pelas demonstrações de carinho e
apoio em minha vida!!!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)
pela bolsa e auxílio financeiro concedido para o desenvolvimento deste trabalho

Obrigada meu Deus por mais uma conquista!!!

“O segredo do sucesso é saber algo que ninguém mais sabe”

“Aristotle Onassis”

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Hemostasia	02
1.2. Serpentes	05
1.2.1. Veneno de Serpentes da Família VIPERIDAE	05
1.2.2. Proteínas de Venenos de Serpentes	06
1.2.3. Venenos de serpentes do gênero <i>Crotalus</i>	07
1.2.4. Venenos de serpentes do gênero <i>Bothrops</i>	09
1.3. Serino proteinases	10
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIAIS	13
3.1. Venenos	14
3.2. Animais	14
3.3. Plasma	14
3.4. Outros materiais	14
4. MÉTODOS	15
4.1. Preparação das amostras do veneno Crotálico	16
4.1.1. Filtração em gel de Sephadex G-75	16
4.2. Preparação das amostras do veneno Botrópico	16
4.2.1. Filtração em gel de Sephadex G-75	16
4.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em coluna de Troca iônica (CLAE)	17
4.3.1. Veneno Crotálico	17
4.3.2. Veneno Botrópico	17

4.4. Avaliação do grau de pureza	17
4.4.1. Determinação quantitativa de proteínas	18
4.5. Caracterização Bioquímica	18
4.5.1. Determinação da massa molecular relativa (<i>Mr</i>)	18
4.6. Caracterização Enzimática	18
4.6.1. Atividade esterásica sobre o TAME	18
4.6.2. Atividade coagulante sobre o plasma humano	19
4.6.3. Efeito do pH e temperatura sob atividade coagulante	19
4.6.4. Efeito do pH e temperatura sob a atividade amidolítica	19
4.6.5. Atividade hemolítica indireta (em placa)	20
4.7. Caracterização Funcional	20
4.7.1. Atividade hemorrágica	20
4.7.2. Atividade edematogênica	20
4.7.3. Atividade fibrinogenolítica	21
4.8. Caracterização Estrutural	21
4.8.1. Ensaios de cristalização	21
5. RESULTADOS	22
5.1. Isolamento de serino protease de veneno Crotálico	23
5.1.1. Isolamento e purificação da serino proteinase do veneno de <i>Crotalus duriss terríficus</i>	23
5.1.2. Isolamento e purificação de serino proteinase do veneno de <i>Crotalus duriss collilineatus</i>	24
5.1.3.. Isolamento e purificação de serino proteinase do veneno de <i>Bothrops jararaca</i>	26
5.2. Caracterização Bioquímica	27
5.2.1. Análise eletroforética	27
5.2.2.. Determinação do peso molecular (<i>Mr</i>)	27
5.3. Caracterização Enzimática	28
5.3.1. Atividade coagulante sobre o plasma humano	28
5.3.2. Dose coagulante mínima (DCM)	29
5.3.3. Efeito do pH e temperatura sob atividade coagulante	30
5.3.4. Atividade esterásica sobre TAME	31
5.3.5. Efeito do pH e temperatura sob a atividade amidolítica	32

5.3.6. Atividade hemolítica indireta (em placa)	33
5.4. Caracterização Funcional	34
5.4.1.. Atividade hemorrágica	34
5.4.2. Atividade edematogênica	34
5.4.3. Atividade fibrinogenolítica	35
5.5. Caracterização Estrutural	36
5.5.1. Ensaio de Cristalização	36
6. DISCUSSÃO	38
7. CONCLUSÃO	46
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
ANEXOS	60

Listade Abreviaturas



- **Bj** *Bothrops jararaca*
- **Cdt** *Crotalus durissus terrificus*
- **Cdc** *Crotalus durissus collilineatus*
- **DCM** Dose coagulante mínima
- **EDTA** Ácido etilenodiaminotetracético
- **HPLC** Cromatografia Líquida de Performance Rápida
- **i.d.** Via intradérmica
- **Mr** Massa molecular relativa
- **pI** Ponto isoelétrico
- **PMSF** Fenilmetanosulfonilfluoridro
- **SDS** Dodecil sulfato de sódio
- **SDS-PAGE** Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
- **TAME** N_{α} - p - tosil - L - arginina metil éster
- **CLAE** Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- **FP-A** Fibrinopeptídeo A
- **AMBIC** Bicarbonato de amônio
- **PBS** Solução tampão fosfato ou solução salina tamponada
- **TF** Fator tissular
- **TFPI** Inibidor do fator tissular
- **t-PA** Ativador de plasminogênio tecidual
- **PL** fosfolipídeos
- **GP** glicoproteínas das plaquetas
- **S-2302** substrato sintético
- **FPLC** cromatografia líquida de performance rápida
- **PEG** polietileno glicol

Listaded saw-Taber



Tabela 1: Recuperação protéica: frações isoladas do veneno bruto de <i>C. d. terríficus</i>	24
Tabela 2: Recuperação protéica: frações isoladas do veneno bruto de <i>C. d. collilineatus</i>	25
Tabela 3: Recuperação protéica: frações isoladas do veneno bruto de <i>B. jararaca</i>	27
Tabela 4: Atividade Coagulante – Análise comparativa dos resultados das frações obtidas por meio de isolamento e da purificação do veneno Crotálico e Botrópico	28
Tabela 5: Atividade Esterásica - Análise comparativa dos resultados das frações do veneno Crotálico e Botrópico	31
Tabela 6: Atividade Hemolítica Indireta - Resultados dos testes realizados com as frações obtidas por meio de isolamento e da purificação do veneno Crotálico e Botrópico	32
Tabela 7: Atividade Hemorrágica - Resultados dos testes realizados com as frações obtidas por meio de isolamento e da purificação do veneno de <i>Bothrops jararaca</i>	33

Listaded Fíguras



Figura 1: Esquema do Sistema Hemostático	02
Figura 2: Representação esquemática do sistema de coagulação sanguínea	03
Figura 3: Representação esquemática do sistema fibrinolítico e seus inibidores	04
Figura 4: Isolamento das frações do veneno bruto de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	23
Figura 5: Isolamento das frações do veneno bruto de <i>Crotalus durissus collilineatus</i>	25
Figura 6: Isolamento das frações do veneno bruto de <i>Bothrops jararaca</i>	26
Figura 7: Determinação do Peso Molecular das proteínas padrões em relação à Mr	28
Figura 8: Determinação da dose coagulante mínima (DCM)	29
Figura 9: Avaliação da estabilidade das frações CdtII-2 e CdcII-2 ao efeito do pH e temperatura sobre a atividade coagulante	30
Figura 10: Avaliação da estabilidade das frações CdtII-2 e CdcII-2 ao efeito do pH e temperatura sobre a atividade amidolítica	31
Figura 11: Foto ilustrativa da atividade hemolítica indireta (em placa)	32
Figura 12: Foto ilustrativa da pele dos animais após indução hemorrágica	33
Figura 13: Indução da atividade edematogênica da fração CdtII e CdcII	34
Figura 14: Determinação da atividade fibrinogenolítica de CdtII-2 e CdcII-2	35
Figura 15: Formações cristalinas de giroxina do veneno de <i>C. d. collilineatus</i>	36
Figura 16: Formações cristalinas de crotamina do veneno de <i>C. d. collilineatus</i>	37

Figura 17: Sistema Hemostático: ponto alvo da atuação de algumas enzimas do veneno de serpentes 40

Figura 18: Tríade Catalítica 41

R e s u m m o



Toxinas isoladas de venenos têm sido usadas como ferramentas moleculares na compreensão de diversos eventos fisiológicos e patológicos, já comprovado por vários trabalhos na literatura. Os venenos de serpentes dos gêneros *Crotalus sp.* e *Bothrops sp.* provocam, entre outras, alterações no sistema hemostático do indivíduo inoculado (PEREZ *et al.*, 1996). A extensão destas pesquisas realizada até o momento, indica um grande potencial a ser explorado na avaliação da estrutura e função das proteínas que modulam alterações no processo de hemostasia. As proteínas responsáveis por este efeito são enzimas trombinas-símile que atuam sobre o fibrinogênio convertendo-o em fibrina. Estruturalmente, são enzimas pertencentes a família das tripsinas que possuem em seu sítio ativo a tríade His⁵⁷, Asp¹⁰² e Ser¹⁹⁵ e onde laços interfaciais e a presença de carboidratos modulam sua especificidade macromolecular (MATHEWS; VAN HOLDE, 1998). O objetivo principal do projeto foi isolar e caracterizar proteínas de venenos de serpentes que afetam o equilíbrio homeostático, em quantidade e grau de pureza necessário para posterior estudos estruturais. Além de avaliar a caracterização bioquímica, enzimática e funcional induzida pelas frações de interesse, outras frações de função e importância biológica e farmacológica do veneno total de *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus collilineatus* e *Bothrops jararaca* foram analisadas. Através de uma combinação de duas metodologias como exclusão molecular por gravidade e troca iônica em HPLC foram isolados os principais componentes dos venenos de *Crotalus durissus collilineatus*, *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops jararaca* com grau de pureza suficiente para os estudos funcionais e estruturais. A partir das frações correspondentes à gioxina (CdtII e CdcII) foram obtidos as subfrações CdtII-2.1, CdtII-2.2, CdtII-2.3 e CdcII-2 e a partir do veneno botrópico da fração BJI foram caracterizadas duas principais moléculas denominadas de BJI-1 e BJI-2, sendo uma metalo proteinase e a outra serino proteinase, respectivamente. As frações CdcIV e CdcII-2 foram submetidas aos ensaios de cristalização obtendo-se condições que levaram a formação de cristais.

Palavras-chave: *Crotalus durissus collilineatus*; *Crotalus durissus terrificus*; *Bothrops jararaca*; coagulação sanguínea; purificação, caracterização e cristalização.

A b s t r a c t



Toxins isolated from venoms have been used as molecular tools to understand many physiological processes. The enzymes isolated from the venoms of *Crotalus* and *Bothrops* species interfere with the control and balance of the hemostatic system (PEREZ *et al.*, 1996) and thus, the determination of their structures is potentially very important. These enzymes are serine proteinases that are similar to trypsin in their specificity but are generally referred to as thrombin-like enzymes due to their ability to cleave fibrinogen. The principal aim of this project was to isolate and characterize snake venom proteins that interfere with the control and regulation of the hemostatic system in quantities and purity required for structural studies. Gel filtration, ion-exchange and HPLC chromatographic techniques were used to isolate convulxin, crotoxin, giroxin and crotamine, the principle components from the venoms of *Crotalus durissus collineatus* and *Crotalus durissus terrificus* and the serine and metallo proteinases from the venom of *Bothrops jararaca*. The purity of the samples was evaluated by SDS-PAGE and the specific activity of the samples was determined. Crystallization experiments were then carried out.

Key Words: *Crotalus durissus collilineatus*; *Crotalus durissus terrificus*; *Bothrops jararaca*; blood coagulation; purification, characterization and crystallization.

1 Introduction



1.1. HEMOSTASIA

A hemostasia é o conjunto de mecanismo desencadeado pelo organismo para manter o sangue fluído no interior dos vasos. Esses mecanismos atuam no sentido de impedir a formação de trombos em vasos intactos além de desencadear uma série de reações que resultam no fechamento de lesões na parede vascular evitando uma hemorragia prolongada. Inúmeros fatores estão envolvidos para o sucesso desse processo, tais como plaquetas, plasma e vasos sanguíneos. A integridade dos vasos sanguíneos garante a liberação de componentes inibidores da coagulação e agregação plaquetária (Figura 1).

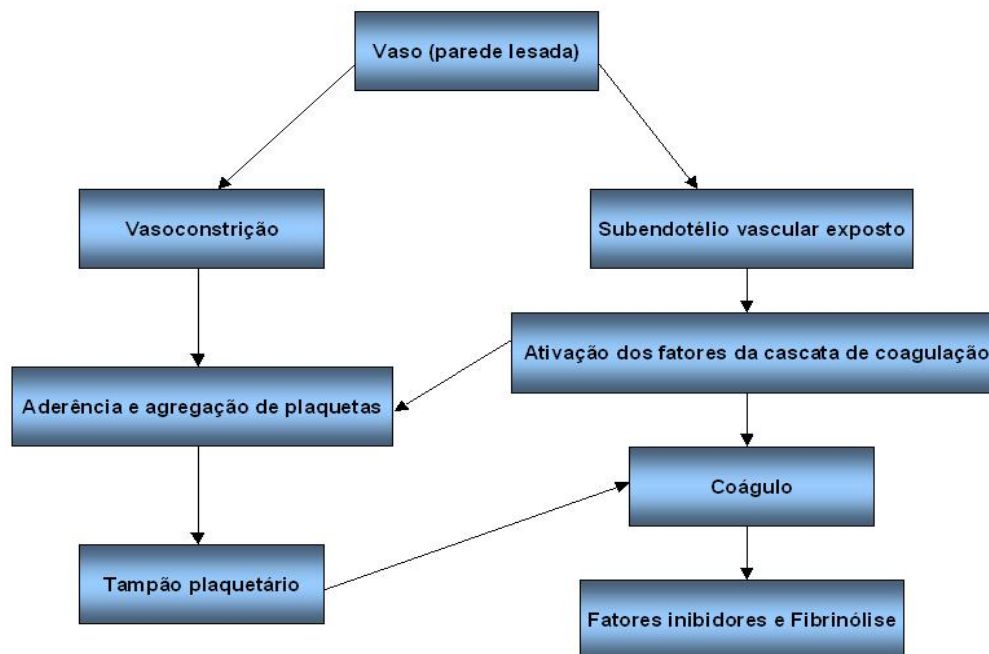


Figura 1: Esquema do Sistema Hemostático. Adaptado de (Narayanan & Hamasaki, 1998).

No plasma sanguíneo existem os fatores de coagulação na forma de zimogênios que são ativados durante o desenvolvimento do sistema de coagulação. Estes fatores quando ativados convertem o próximo precursor na sua forma ativa. O evento iniciador para a coagulação sanguínea é a exposição do fator tissular (TF) provocado por algum trauma vascular. O TF, na “via extrínseca”, em combinação com fator FVIIa e fosfolípídeos (PL) ativam os fatores FIX e FX. A “via intrínseca” inclui a ativação do fator FXI pelo complexo cininogênio de alto peso molecular (HMW)/FXIIa (Figura2). O FXIa também ativa o FIX, que por sua vez, em combinação com FVIIIa, PL e íons cálcio (complexo tenase) converte FX em FXa (COLMAN *et al.*, 1994; MANN, 1999).

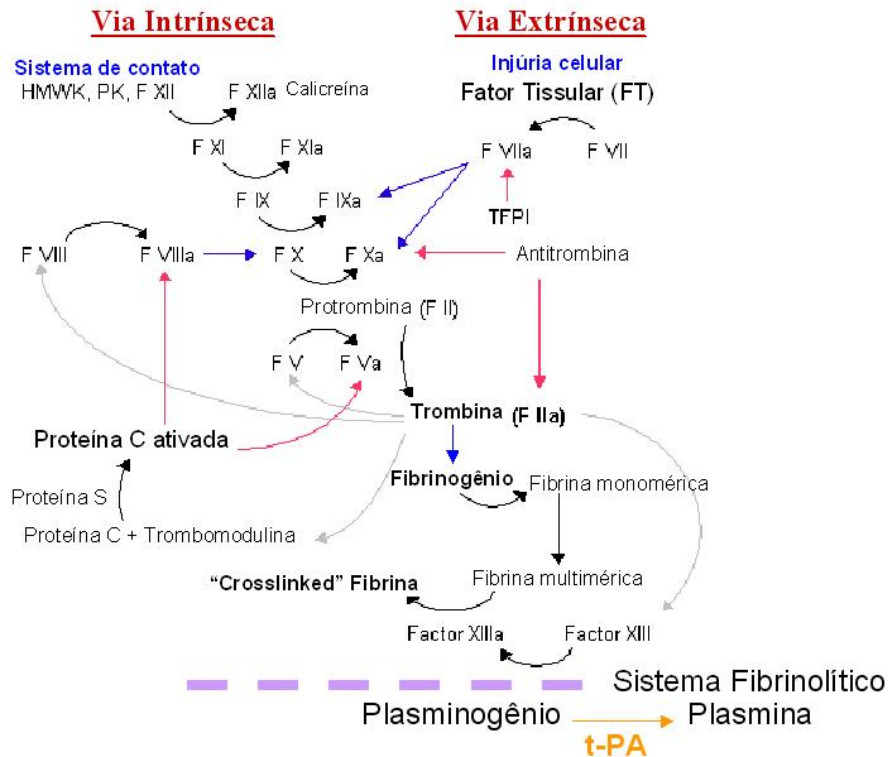


Figura 2: Representação esquemática do sistema de coagulação sanguínea. Adaptado de (Narayanan & Hamasaki, 1998).

Na via comum, FXa mais o FVa, PL e íons cálcio formam o complexo protrombinase, que hidrolisa a protrombina em trombina. Esse FIIa formado, hidrolisa o fibrinogênio liberando fibrinopeptídeo A e B e mudando suas cargas, permitindo a ligação entre as moléculas e formando a fibrina solúvel. O FXIII, ativado pelo FIIa, estabiliza o coágulo (BITHELL, 1998).

Várias proteínas agem como inibidores naturais retardando a coagulação, o C1-inibidor (C1-INH) além de inibir o sistema de complemento, neutraliza os FXIa, FXIIa, plasmina e caliceína. O inibidor da via do fator tissular (TFPI) bloqueia o TF/FVIIa. A proteína C ativada (APC) degrada proteoliticamente as formas ativas FVIIIa e FVa. A anti-trombina (AT) bloqueia os FIXa, FXa e trombina e a $\alpha 2$ -macroglobulina ($\alpha 2$ -M) inibe a trombina mais lentamente que a AT (COLMAN *et al.*, 1994; HALKIER, 1991). O sistema fibrinolítico é o principal meio fisiológico de descartar a fibrina formada após a função hemostática para que os vasos sanguíneos lesados sejam restituídos.

A fibrinólise resulta da conversão do plasminogênio plasmático, em plasmina. Essa conversão é feita pela liberação do ativador tissular de plasminogênio (t-PA) presente no endotélio. Estímulos vasoativos fisiológicos e patológicos (exercícios, choque elétrico, estresse, adrenalina, histamina, pirógenos bacterianos, isquemia, hipóxia, trombina, FXa e substâncias

liberadas de plaquetas) levam a liberação de ativadores endoteliais que provocam a liberação dos ativadores de plasminogênio (HALKIER, 1991). A plasmina cliva vários fatores de coagulação e fibrinogênio (Figura 3). A ação proteolítica da plasmina sobre a fibrina ou fibrinogênio leva à formação de fragmentos protéicos solúveis (HALKIER, 1991).

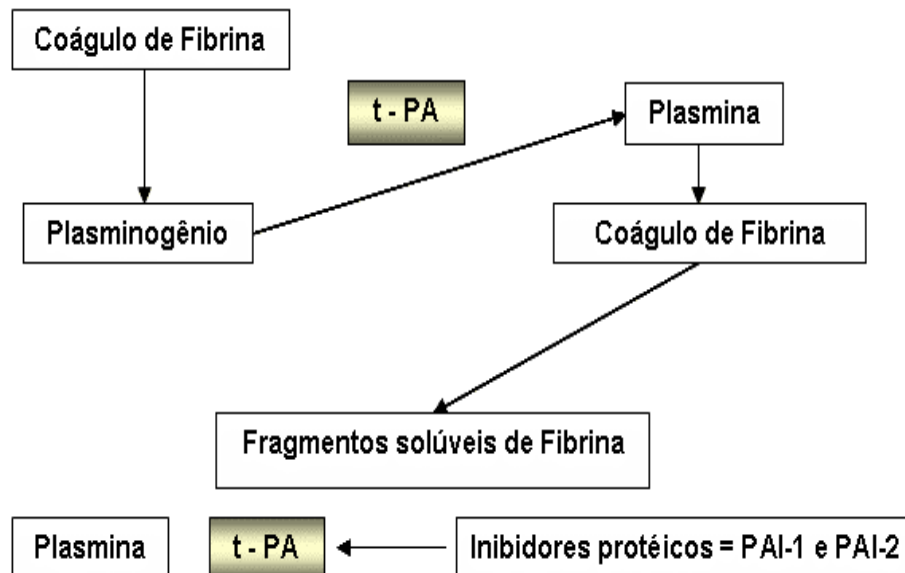


Figura 3: Representação esquemática do sistema fibrinolítico e seus inibidores. Adaptado de (Narayanan & Hamasaki, 1998).

t-PA: Ativador de plasminogênio tecidual.

PAI-1: Inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1.

PAI-2: Inibidor do ativador de plasminogênio tipo 2.

1.2. SERPENTES

Das quase 2 mil espécies e subespécies de serpentes existentes no mundo, aproximadamente 300 são conhecidas como venenosas e classificadas de acordo com as características morfológicas, compreendendo quatro famílias: Viperidae, Elapidae, Hydrophiidae e Colubridae.

1.2.1. Venenos de serpentes da família VIPERIDAE

A família Viperidae é formada pelos gêneros *Bothrops*, *Lachesis* e *Crotalus*. O gênero *Bothrops* ocorre em todo o território nacional enquanto que, o *Lachesis* em áreas úmidas, em regiões de floresta e na região Amazônica. Em contraste o *Crotalus* não é encontrado nestas regiões e no litoral, sendo encontrado preferencialmente em áreas secas (HOGE; ROMANO-HOGE, 1978-1979).

Os venenos de serpentes da família Viperidae apresentam uma grande variedade de proteínas, que desencadeiam no organismo, alterações sistêmicas e locais. Danos musculares são os efeitos mais comuns produzidos por esses venenos (MELO; OWNBY, 1999).

As miotoxinas são componentes desses venenos que apresentam uma ação específica sobre o músculo esquelético, sendo que outros tecidos, como o conjuntivo, nervos e vasos permanecem essencialmente intactos. O efeito produzido por essas miotoxinas é denominado de miotoxicidade. A mionecrose é o resultado da ação miotóxica (MEBS; OWNBY, 1990; LOMONTE *et al.*, 1990).

Um grande número de proteases tem sido isolado dos venenos de serpentes nos últimos anos e geralmente estão classificadas estruturalmente em serino proteinases e metalo proteinases. As serino proteinases também chamadas de trombina-símile são fibrinogenolíticas e/ou fibrinolíticas, podendo apresentar ambas as atividades ou somente uma delas. As metalo proteinases altamente tóxicas provocam no organismo das vítimas hemorragias pela interferência na coagulação sanguínea e formação do tampão hemostático ou pela degradação dos componentes da lâmina basal capilar e citotoxicidade sobre as células endoteliais dos vasos sanguíneos, causando lesões e provocando a saída de eritrócitos (MOREIRA *et al.*, 1994; KAMIGUTI, *et al.*, 1996; MATSUI *et al.*, 2000).

A subespécie *Crotalus durissus terrificus* pertence à família Viperidae, sub-família Crotalinae, gênero *Crotalus* e espécie *Crotalus durissus*, segundo a classificação de McDowell (1987). As serpentes da família Viperidae estão distribuídas na Europa, África, região leste temperada da Ásia, sul da Ásia, Austrália, Índias, Américas do Norte, Central e do Sul (Cadle, 1987).

A natureza e as propriedades biológicas dos componentes da peçonha são típicos da espécie animal de onde provém, enquanto a concentração de cada um deles, intraespecificamente, pode variar com a região geográfica, a idade, o sexo, os hábitos, as

mudanças das estações e o tempo decorrido entre uma extração e a imediatamente anterior (FURTADO *et al.*, 1991; FERREIRA *et al.*, 1992).

As glândulas veneníferas da serpente *Crotalus durissus terrificus* secretam uma mistura complexa de proteínas (5-nucleotidases, fosfodiesterase, enzima semelhante à trombina, L-aminooxidase, hidrolase do NAD⁺, fosfolipases e toxinas), peptídeos, nucleotídeos, carboidratos, lipídeos, aminas biogênicas e constituintes inorgânicos (BERCOVICI *et al.*, 1987).

A complexa composição deste veneno apresenta efeitos importantes sobre o sistema nervoso, músculos esqueléticos, rins, fígado e sangue dos indivíduos intoxicados (BARRAVIERA, 1994).

1.2.2. Proteínas de Venenos de Serpentes

Os venenos são largamente distribuídos na natureza e cumprem diversos papéis biológicos nos sistemas de alimentação. Mais de 90 % da massa seca da maioria dos venenos é constituída de proteínas, dentre as quais estão incluídos enzimas hidrossolúveis, toxinas e pequenos peptídeos, sendo que cada qual é capaz de modular uma reação fisiológica nos animais envenenados (STOCKER, 1990).

As propriedades funcionais e farmacológicas além das aplicações clínicas de muitas proteínas extraídas do veneno de serpente estão sendo estudadas. Assim sendo, a purificação de proteínas do veneno de serpente é de grande interesse e valor comercial, pois suas funções biológicas servem como ferramentas bioquímicas em biotecnologia e pesquisa biomédica (VAN DRIESSCHE *et al.* 1996, GABIUS; GABIUS, 1997, LIS; SHARON, 1998).

Proteínas como as enzimas trombina-símile foram purificadas e estão sendo testadas clinicamente no tratamento de tromboembolismo. Essas enzimas têm a capacidade de interferir nos fatores de coagulação, tais como na liberação de fibrinopeptídeos e fatores hemorrágicos, por isso, a denominação enzima trombina-símile (SELISTRE; GIGLIO, 1987). A atividade coagulante é principalmente atribuída às enzimas serino proteinases, que se assemelham à trombina na função de ativar o fibrinogênio pela hidrólise das cadeias α , β ou γ liberando os fibrinopeptídeos (SERRANO *et al.*, 1995; MATSUI *et al.*, 2000). Outras proteínas também vêm sendo extensivamente estudadas e comercializadas por suas propriedades farmacológicas, tais como Batroxobin[®], Protac[®] e convulxina, com aplicação no controle da coagulação sangüínea e agregação plaquetária, a calicreína e peptídeos potenciadores de bradicinina.

O interesse científico na compreensão estrutural e funcional dessas moléculas traz contribuições significativas no desenho de novas drogas, e tratamento de distúrbios cardiovasculares e antivenenos.

1.2.3. Venenos de serpentes do gênero *Crotalus*

O veneno de *Crotalus durissus terrificus* é composto pelas seguintes neurotoxinas: crotoxina (SLOTTA; FRAENKEL-CONRAT, 1938), crotamina (GONÇALVES; VIEIRA, 1950), “inter-cro” (LAURE, 1990), giroxina (BARRABIN *et al.*, 1978) e convulxina (PRADO-FRANCESCHI; VITAL BRAZIL, 1981).

A fração do veneno mais bem conhecida do ponto de vista fisiopatológico é a crotoxina. Esta representa 40 a 60 % do peso seco do veneno; é o principal componente tóxico do mesmo (FAURE; BON, 1988) e também a principal neurotoxina desta peçonha (VITAL BRAZIL *et al.*, 1966). Possui duas sub-unidades diferentes ligadas não covalentemente: A (ácida), com ponto isoelétrico (pI) de 3,4 e um peso molecular entre 8.000 e 9.000 e B (básica), com pI de 8,6 e peso molecular entre 14.500 e 16.400 (RÜBSAMEN *et al.*, 1971).

- Sub-unidade B, denominada fosfolipase A₂, é formada por uma única cadeia polipeptídica de 122 aminoácidos de baixa toxicidade e com atividade enzimática (AIRD *et al.*, 1985). As fosfolipases A₂ são enzimas que catalisam a hidrólise da ligação 2-acil éster de fosfolipídeos, gerando lisofosfatídeos, mais ácidos graxos (FLEER *et al.*, 1981).
- Sub-unidade A, chamada crotapotina, destituída de atividade tóxica e enzimática (HENDON; FRAENKEL-CONRAT, 1971), consiste de três cadeias polipeptídicas ligadas por pontes dissulfeto e suas seqüências de aminoácidos são homólogas às da fosfolipase A₂, sugerindo que o componente A seja derivada de uma molécula precursora de fosfolipase (AIRD *et al.*, 1985). A crotapotina potencializa a toxicidade da fosfolipase A₂ “in vivo”, mas inibe sua atividade hemolítica “in vitro” (RÜBSAMEN *et al.*, 1971; HENDON; FRAENKEL-CONRAT, 1971).

A crotamina tem a capacidade de induzir espasmos musculares nas patas posteriores de camundongos quando injetada por via intraperitoneal. CHANG e TSENG (1978) estudaram o efeito miotóxico da crotamina sobre os canais de sódio em músculos esqueléticos. Os autores concluíram que esta toxina é capaz de induzir a despolarização do potencial da membrana das células musculares, sendo possível sua atuação nos canais de sódio, induzindo o fluxo deste cátion para o interior das células. O aumento de cálcio na célula muscular promove a hipercontração dos miofilamentos e autólise das fibras por ativação de proteases e fosfolipases endógenas dependentes do cálcio (GOPALAKRSHNAKONE *et al.*, 1984). MANCIN *et al.*, (1998) demonstraram que a crotamina injetada em camundongos, induziu um efeito analgésico dependente do tempo e da dose. Quando comparou com a morfina, a crotamina, até mesmo em doses extremamente baixas, foi aproximadamente 30 vezes mais potente.

VITAL BRAZIL *et al.* (1966) descreveram uma fração neurotóxica da peçonha da *C. d. terrificus*, diferente da crotoxina e da crotamina, responsável por convulsões e distúrbios circulatórios e respiratórios. Dessa fração foi isolada a convulxina, uma toxina de alto peso molecular que se comporta como proteína homogênea quando examinada por cromatografia de gel de filtração e imunoeletroforese (PRADO FRANCESCHI; VITAL BRAZIL, 1981). Quando administrada intravenosamente em camundongos, a convulxina provoca dentro de 20 minutos uma breve fase de apnéia, seguida de perda de equilíbrio e convulsões.

A giroxina isolada e purificada do veneno de *C. d. terrificus* tem peso molecular de 33.000 a 34.000. A estabilidade desta neurotoxina depende do pH, sendo máxima no pH 4,0. Não é afetada por congelamento e descongelamento ou por tratamento a 40°C por 15 minutos (SEKI *et al.*, 1980). Essa neurotoxina não é letal, mas causa uma síndrome convulsiva nos animais, caracterizada por movimentos rotacionais em volta do eixo central do seu corpo (PRADO FRANCESCHI; VITAL BRAZIL, 1981).

O veneno de *C. d. terrificus* possui ainda uma enzima denominada hialuronidase que causa hidrólise do ácido hialurônico presente na pele, tecido conjuntivo e junções ósseas facilitando assim, a difusão destas neurotoxinas para os tecidos da vítima (DURAN REYNALS, 1942). Ao contrário de muitas peçonhas de outras espécies, essa não induz dor ou grave destruição tecidual no local da inoculação. As vítimas geralmente sentem uma sensação analgésica na área afetada pela picada (ROSENFELD, 1971). A região afetada em geral fica adormecida poucos minutos após o acidente ofídico e permanece assim por várias semanas ou meses.

1.2.4. Venenos de serpentes do gênero *Bothrops*

Os venenos de serpentes da família Viperidae, na qual se insere o gênero *Bothrops*, produzem intensos efeitos nos tecidos, que se caracterizam localmente por hemorragia, mionecrose e edema.

A composição do veneno é um complexo de neurotoxinas, citocinas, cardiotoxinas, fatores de crescimento de nervo, lectinas, proteínas ligantes ao fator de Von Willebrand, ao fator IX/X e as glicoproteínas das plaquetas (GP), as desintegrinas, peptídeos potenciadores de Bradicinina, peptídeos natiuréticos, ainda, enzimas como proteases, fosfolipases, fosfodiesterases, colinesterases, aminotransferases, aminoácido oxidase, catalase, ATPases, hialuronidases, NAD nucleosidase e β -glucosaminase (MATSUI *et al.*, 2000).

O efeito hemorrágico do veneno de *B. jararaca* é provocado pelas metaloenzimas, que provocam a degradação enzimática da membrana basal, com perda da integridade da parede vascular (OHSAKA, 1979).

Algumas metalo proteinases possuem domínios chamados de desintegrinas que apresentam uma seqüência de aminoácidos RGD que ocupa o sítio de ligação do fibrinogênio à plaqueta impedindo a ligação plaqueta-fibrinogênio, ou ainda, degradando o fibrinogênio. Kamiguti *et al.* (1994) relatam que a jararagina, uma outra metaloproteinase, se liga ao sítio receptor de colágeno das plaquetas, impedindo a ligação colágeno-plaqueta, entretanto, essa enzima tem o seu domínio homólogo às desintegrinas substituído pela seqüência ECD (ácido glutâmico, cisteína e ácido aspártico).

As metalo proteinases podem também apresentar uma inibição da atividade agregante das plaquetas *in vitro* (OUYANG *et al.*, 1979) e a maioria destas enzimas hidrolisam fibrinogênio que é um importante cofator para a agregação plaquetária (HAWIGER *et al.*, 1982).

A mionecrose pode ser atribuída à ação de miotoxinas com ou sem atividade de fosfolipases A_2 , direta e especificamente sobre as fibras musculares esqueléticas, ou indiretamente, como conseqüência de degenerações vasculares e isquemia, causadas por hemorraginas (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1989; DIAZ *et al.*, 1992).

O edema é bastante característico e se deve basicamente à ação do veneno sobre a musculatura lisa e a liberação de mediadores endógenos, como histamina, cininas e prostaglandinas, resultantes da ação do veneno sobre mastócitos, cininogênios e fosfolipídeos.

1.3. Serino proteinases

Os venenos de serpentes das famílias Crotalidae e Viperidae contêm, entre outras, serino proteinases e metalo proteinases. Algumas das serino proteinases assemelham-se à trombina na sua habilidade de iniciar a coagulação pela sua interação com o fibrinogênio. Outras serino proteinases não possuem tal atividade, mas têm um papel na agregação de plaquetas.

Há um grande número de serino proteinases, responsáveis por agregação de plaquetas, encontradas em vários venenos. Em *B. atrox*, essa serino proteinase é a trombocitina (KIRBY *et al.*, 1979); já o veneno de *Crotalus horridus horridus*, possui outra enzima, a crotalocitina (SCHMAIER; COLMAN, 1980); em *B. jararacussu* encontram-se os ativadores do Fator VII e BJV-VIII_{CP} (HILL EUBANKS *et al.*, 1989); em *B. moojeni*, a serino proteinase é a MSP1 (SERRANO *et al.*, 1993) e no veneno de *B. jararaca*, encontra-se botrombina e PA-BJ (SERRANO *et al.*, 1993).

A homologia seqüencial entre as serino proteinases citadas é de aproximadamente 65 %, mas a homologia dessas enzimas com as serino proteinases que são encontradas em mamíferos, como trombina e tripsina, são de aproximadamente 30 % e 40 %, respectivamente.

Uma grande parte das pesquisas de nosso grupo está baseada nas estruturas de serino proteinases, como a α -trombina humana (ARNI *et al.*, 1993), fator Xa humano e batroxobin (*Bothrops moojeni*) e os complexos dessas enzimas com inibidores sintéticos (ARNI *et al.*, 1994; KRISHNAN *et al.*, 1998; KRISHNAN *et al.*, 2000).

Por ter um importante papel funcional no processo de coagulação, as serino proteinases foram estudadas como drogas na área clínica terapêutica, pela capacidade de prevenir a formação de trombos, além de melhorar a circulação reduzindo a viscosidade do sangue. Os estudos dos aspectos funcionais e caracterização destas proteinases apontam para novas possibilidades e potenciais aplicações bioquímicas e biotecnologias.

2 O b j e t t i v o s



2.1. Objetivos Gerais

Isolar e caracterizar proteínas de venenos de serpentes que interferem na cascata de coagulação sanguínea, em quantidade e grau de pureza necessário para posteriores estudos estruturais.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Purificação da serino proteinase de veneno Crotálico e Botrópico.

2.2.2. Caracterização Bioquímica

2.2.3. Caracterização Enzimática

2.2.4. Caracterização Funcional

2.2.5. Caracterização Estrutural: Ensaio de Cristalização

3 M a t t e r i a l i s



3.1. Veneno

Veneno bruto liofilizado de *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus collilineatus* e *B. jararaca* adquirido do Serpentário Sanamaru, Taquaral, SP.

3.2. Animais

Para as atividades farmacológicas, foram utilizados 70 camundongos machos da linhagem suíça, com peso de 18-22 g, no qual foram mantidos no Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em sala com temperatura e ventilação controladas, recebendo água e ração ad libitum. Os venenos e toxinas foram administrados de forma subcutânea e intra-plantar, em seguida o animal foi sacrificado com dióxido de carbono.

3.3. Plasma

O plasma humano utilizado para o ensaio enzimático de coagulação *in vitro* foi procedente do Hemocentro da cidade de Ribeirão Preto, em bolsas próprias para utilização no laboratório.

3.4. Outros materiais

Os demais reagentes, materiais e equipamentos estão descritos na metodologia.

4. Méthodes



4.1. Preparação das amostras de veneno Crotálico.

Amostras de 280 mg do veneno bruto liofilizado de *Crotalus durissus terrificus* e 500 mg de *Crotalus durissus collilineatus* foram suspensas em 5,0 mL de tampão Formiato de Amônio 0,05 M, pH 3,0 e centrifugada a 12.000 g durante 10 minutos a 0° C. Alíquotas do sobrenadante foram retiradas para dosagem de proteínas pelo método do microbiureto (ITZHAKI; GILL, 1964) e leitura da absorbância em 280 nm.

4.1.1. Filtração em gel de Sephadex G-75

O sobrenadante límpido obtido anteriormente foi aplicado a uma coluna contendo Sephadex G-75 (110 x 4,0 cm), previamente equilibrada, e eluído com tampão Formiato de Amônio 0,05 M, pH 3,0. Frações de 5,0 mL, foram coletadas em um coletor de frações LKB acoplado a um detector ultravioleta e a um registrador num fluxo de 30 mL/ h à temperatura ambiente. A absorbância das frações coletadas foi determinada em 280 nm, em espectrofotômetro Beckman DU-640. As frações foram reunidas, dializadas e liofilizadas.

4.2. Preparação da amostra de veneno Botrópico

500 mg do veneno bruto liofilizado de *Bothrops jararaca* foi suspensa em 5,0 mL de tampão Bicarbonato de Amônio 0,05 M, pH 8,0 e centrifugada a 12.000 g durante 10 minutos a 0° C. Alíquotas do sobrenadante foram retiradas para dosagem de proteínas pelo método do microbiureto (ITZHAKI; GILL, 1964) e leitura da absorbância em 280 nm.

4.2.1. Filtração em gel de Sephadex G-75

O sobrenadante límpido obtido foi aplicado a uma coluna contendo Sephadex G-75 (110 x 4,0 cm), previamente equilibrada, e eluído com tampão Bicarbonato de Amônio 0,05 M, pH 8,0. Frações de 5,0 mL, foram coletadas em um coletor de frações LKB acoplado a um sistema ultravioleta e a um registrador num fluxo de 30 mL/ h à temperatura ambiente. A absorbância das frações coletadas foi determinada em 280 nm, em espectrofotômetro Beckman DU-640. As frações foram reunidas, dializadas e liofilizadas.

4.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em coluna de Troca iônica (CLAE):

4.3.1. Veneno Crotálico

A separação dos compostos presentes na fração CdtII e CdcII, originária da cromatografia do veneno Crotálico, que apresentou atividade coagulante foi realizada por meio de uma cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando-se de cromatógrafo líquido Shimadzu com detector modelo SPD-10AV, a coluna utilizada foi ES 502N de troca aniônica (7,6 x 100 mm). A fase móvel consistiu em Bicarbonato de Amônio 0,05 M pH 8,0 (eluente A) e Bicarbonato de Amônio 0,5 M pH 8,0 (eluente B). 500 µL da amostra foi dissolvida no eluente A e aplicada com o mesmo tampão, iniciando o gradiente linear de concentração 0 % do eluente A e 100 % do eluente B em 120 minutos, permanecendo por 20 minutos e voltando ao tampão inicial em 20 minutos, perfazendo o tempo total de corrida em 180 minutos, num fluxo de 0,8 mL/ minuto. A leitura da absorbância foi feita em 280 nm.

4.3.2. Veneno Botrópico

A fração BJI obtida da cromatografia do veneno *Bothrops jararaca* apresentou atividade coagulante e foi submetida a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando-se de cromatógrafo líquido Shimadzu com detector modelo SPD-10AV, a coluna utilizada foi ES 502N de troca aniônica (7,6 x 100 mm). A fase móvel consistiu em Bicarbonato de Amônio 0,05 M pH 8,0 (eluente A) e Bicarbonato de Amônio 0,5 M pH 8,0 (eluente B). 500 µL da amostra foi dissolvida com eluente A e aplicada, iniciando o gradiente linear de concentração 0 % do eluente A e 50 % do eluente B em 60 minutos, permanecendo por 20 minutos e voltando ao tampão inicial em 10 minutos, perfazendo o tempo total de corrida em 130 minutos, num fluxo de 1,0 mL/ minuto. As amostras foram solubilizadas em eluente A em uma concentração de 10 mg/ mL. A leitura da absorbância foi feita em 280 nm.

4.4. Avaliação do grau de pureza

Todas as etapas cromatográficas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) na presença de SDS e β - mercaptoetanol.

4.4.1. Determinação Quantitativa de Proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada segundo o método do microbiureto, descrito por ITZHAKI; GILL, (1964). A curva padrão foi determinada pela montagem de um gráfico com os dados de regressão linear das diferentes concentrações da proteína soro albumina bovina.

4.5. Caracterização Bioquímica:

4.5.1. Determinação da massa molecular relativa (Mr)

A eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) foi realizada segundo metodologia descrita por LAEMMLI, (1970). O gel de resolução a 12 % (m/v) em acrilamida foi preparado em tampão Tris-HCl 2,0 M pH 8,8 e SDS a 1 %. O gel de concentração a 5 % em acrilamida foi preparado em tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 e SDS 0,1 %. Amostras contendo de 5,0 a 50 µg de proteína foram dissolvidas em 10 µL de tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 6,8 contendo 10 % (v/v) β-mercaptoetanol, 2 % de SDS (v/v) e 0,05 % azul de bromofenol (m/v), seguido por fervura a 100 °C por 5 minutos. As condições eletroforéticas foram: 100 V (voltagem) com corrente de 10 mA (Electrophoresis Power Supply EPS 601 – AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH). O gel foi corado por 15 minutos em Comassie Brillante Blue G-250 a 0,1 % (m/v) dissolvido em água: metanol (1:1, v/v) e descorado em ácido acético 7 %. Os padrões de peso molecular utilizado foram: fosforilase b (94 kDa), albumina de soro bovino (67 kDa), ovoalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1 kDa) e α-lactoalbumina (14,4 kDa).

4.6. Caracterização Enzimática

4.6.1. Atividade esterásica

A atividade esterásica foi determinada usando 0,5 mM de N_α – p – tosil – L – arginina metil éster (TAME) como substrato em uma solução de Tris –HCl 0,1 M pH 7,8 a 37 °C como descrito por Viljoen *et al.*, 1978. 50 µL da solução de enzima foram incubadas com 2,5 mL de TAME por 15 minutos a 37 °C. Findo esse tempo a reação foi interrompida com a adição de 0,1 mL de ácido acético glacial e as absorbância lidas em 247 nm. Uma unidade de atividade esterásica foi definida como a quantidade de enzima capaz de aumentar em 0,001 na absorbância em 1 min.

4.6.2. Atividade coagulante sobre o plasma humano

A atividade é caracterizada pelo imediato aparecimento da rede de fibrina em comparação com o tempo de coagulação do controle contendo cloreto de cálcio 0,25 M. A dose coagulante mínima (DCM) é definida como sendo a quantidade de enzima capaz de coagular o plasma (200 µL) em 60 segundos (SELISTRE *et al.*, 1990). A atividade foi realizada utilizando 200 µL de plasma humano incubadas com diferentes concentrações das frações de toxinas isoladas (0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10 µg em 25 µL) a 37 °C e o tempo de formação da rede de fibrina cronometrado. Cada dose foi efetuada em triplicata. Como controle utilizamos plasma (200 µL) e no lugar da toxina utilizamos 25 µL de CaCl₂ a 0,25 M com o tempo de coagulação decorrido de 3 a 4 minutos.

4.6.3. Efeito do pH e temperatura sob a atividade coagulante

A estabilidade da enzima em vários pHs foi testada por incubação de 1 DCM de cada giroxina em tris -HCl 0,05 M em diferentes pHs (2,5; 3,5; 4,5; 5,5; 7,0; 8,0 e 10,0) por 2 horas em temperatura ambiente. Após esse tempo a enzima foi acrescentada ao plasma e cronometrado o tempo para o aparecimento da rede de fibrina. Como controle 1 DCM de cada amostra giroxínica foi acrescentado 200 µL de plasma citratado e o tempo para o aparecimento da rede de fibrina foi cronometrado e considerado como 100% utilizando a formula de $TC = 1/\Delta \times 100$ onde Δ = média dos tempos em segundos.

Para o estudo da estabilidade da enzima a diferentes temperaturas utilizamos 1 DCM da enzima diluída em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,6 que permaneceu por 30 minutos nas temperaturas de 4, 37, 50 e 100°C. Findo esse tempo 25 µL de cada solução foi acrescentado a 200 µL de plasma e cronometrado o tempo de formação da rede de fibrina.

4.6.4. Efeito do pH e temperatura sob a atividade amidolítica

A estabilidade da enzima a vários pH e diferentes temperaturas foi avaliada por incubação de 1,5 µg da enzima em Tris-HCl 0,05 M em diferentes pHs (incubados por 2 horas em temperatura ambiente) e para temperatura (incubados com Tris-HCl 0,05 M , pH 7,6) em diferentes temperaturas. Após esse tempo a enzima foi misturada com o substrato sintético S-2302 (2 mM) e a atividade amidolítica foi determinada em espectrofotômetro por medida da absorbância em 405 nm.

4.6.5. Atividade hemolítica indireta (em placa)

A uma solução de salina tamponada (PBS) foi adicionado agarose 1,0 % sob aquecimento, até a formação de um colóide transparente (volume final de 10 mL). Após o esfriamento da solução de agarose (+/- 40 °C) foi adicionado a solução eritrócitos lavados, CaCl₂ 0,01 M, gema de ovo (na proporção de 1:3 PBS) e Azida sódica 0,005 % , sendo a solução final, vertida em placa de petri (a placa foi mantida à 4 °C por 30 minutos). As amostras foram aplicadas em orifícios no gel nas concentrações desejadas, em volume final de 30 µL, seguido por incubação a 37 °C durante 24 horas, e posterior medida dos halos (HABERMANN; HARDT, 1972).

4.7. Caracterização Funcional

4.7.1. Avaliação da atividade hemorrágica.

A atividade hemorrágica das frações foi determinada segundo a metodologia descrita por OWNBY *et al.*, 1984. Para avaliação da atividade hemorrágica, 50 µL das frações obtidas da cromatografia em Sephadex G-75 do veneno de *Bothrops jararaca* e a originárias da BJI após cromatografia líquida de alta eficiência foram injetadas intradermicamente na região dorsal de 10 (dez) camundongos (18 – 22 g). Após duas horas, os animais foram sacrificados e as peles removidas para avaliação da atividade hemorrágica. Como controle negativo foi utilizado solução salina tamponada (PBS). A hemorragia foi inibida com de EDTA (1 mM). Para o ensaio, primeiramente incubou-se 10 µg de cada fração com EDTA 1 mM, por 15 minutos. Findo esse tempo a solução foi injetada intradermicamente na região dorsal do camundongo. Após duas horas, os animais foram sacrificados e as peles removidas para avaliação do efeito inibitório.

4.7.2. Atividade edematogênica

A curva dose-resposta para este ensaio foi realizada utilizando proteína isolada. Seis grupos de cinco camundongos machos da linhagem suíça (18-22 g) receberam por via intradérmica (i.d.), na região subplantar da pata direita posterior, aplicações de diferentes concentrações de toxinas (5 µg, 10 µg, 25 µg, 50 µg e 100 µg) em 50 µL de PBS. 50 µL de PBS por animal para o grupo controle.

Foi feita previamente a leitura das patas dos camundongos antes da injeção das amostras (tempo 0h). Após a aplicação das amostras, realizou-se a mensuração das patas em diferentes intervalos de tempo 30 min, 1, 2, 4 e 8 h (de cada valor foram subtraídos os valores

inicialmente aferidos no tempo 0h). O aumento do volume na pata dos camundongos foi medido com um paquímetro de baixa pressão 0.01 mm e expresso em porcentagem direta de edema induzido (SOARES *et al.*, 2000).

4.7.3. Atividade fibrinogenolítica

A atividade fibrinogenolítica foi determinada segundo metodologia descrita por Edgar e Prentice (1973). 30 μL das toxinas isoladas do veneno de Crotálico nas concentrações de (0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10 μg) foram incubadas com 30 μL de fibrinogênio bovino (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) em Tris-HCL 0,05 M pH 8,0 a 37 °C por 2 h. A reação foi interrompida com a adição de 30 μL de tampão Tris - HCl 0,05 M, pH 6,8 contendo glicerol 10 % (v/v), β -mercaptoetanol 10 % (v/v), SDS 2 % (v/v) e azul de bromofenol 0,05 % (m/v) e deixados por 24h, seguida por fervura a 100 °C durante 5 minutos. Análise das amostras em SDS-PAGE a 12 % de SDS a 0,1 %.

4.8. Caracterização Estrutural

4.8.1. Ensaio de cristalização

Os experimentos de cristalização seguem a técnica de difusão de vapor em gota suspensa, através do método da matriz esparsa (JANCARIK; KIM, 1991) e outras variantes desta técnica mantendo a temperatura de 18 °C, na câmara fria. Essa técnica, em condições herméticas, promove trocas de vapores entre as soluções do reservatório e da gota, até que alcancem o equilíbrio.

Nos ensaios iniciais de cristalização a proteína foi incubada com 50 e 48 soluções presentes: Hampton - Kit Crystal Screen 1 e 2, respectivamente. 1,0 μL da amostra protéica é misturada a solução de cristalização (1,0 μL) em uma lamínula siliconada, e colocada sobre o reservatório que contém 500 μL da mesma solução de cristalização contida na gota.

5 Results



5.1 Isolamento das proteínas do veneno Crotálico

5.1.1. Isolamento e purificação da serino proteinase do veneno de *Crotalus durissus terrificus*

A serino proteinase foi purificada em duas etapas, a primeira consistiu de uma filtração em gel Sephadex G-75 em tampão Formiato de Amônio pH 3,0, resultando em quatro frações principais denominadas CdtI; CdtII, CdtIII e CdtIV (Figura 4a). As frações foram submetidas a ensaios para a determinação da atividade coagulante e esterásica. A fração CdtII apresentou atividade coagulante e esterásica (Tabela 4a). Em seguida as frações foram liofilizadas, sendo submetidas posteriormente à cromatografia de alta eficiência (CLAE) em coluna de troca iônica. Obteve-se cinco frações denominadas CdtII-1, CdtII-2.1, CdtII-2.2, CdtII-2.3 e CdtII-3 (Figura 4b), as quais foram reunidas e liofilizadas.

Todas as etapas de purificação da serino proteinase de *Crotalus durissus terrificus*, foram monitoradas por espectrofotometria em comprimento de onda de 280 nm, atividade coagulante, esterásica e análise eletroforética (Tabelas 4 e 5 e Figuras 4b e 4d).

A atividade coagulante e esterásica mais relevante foi observada na fração CdtII com recuperação protéica em relação ao veneno de CdtII 10,25 % e CdtII-2 8,4 % (Tabela 1).

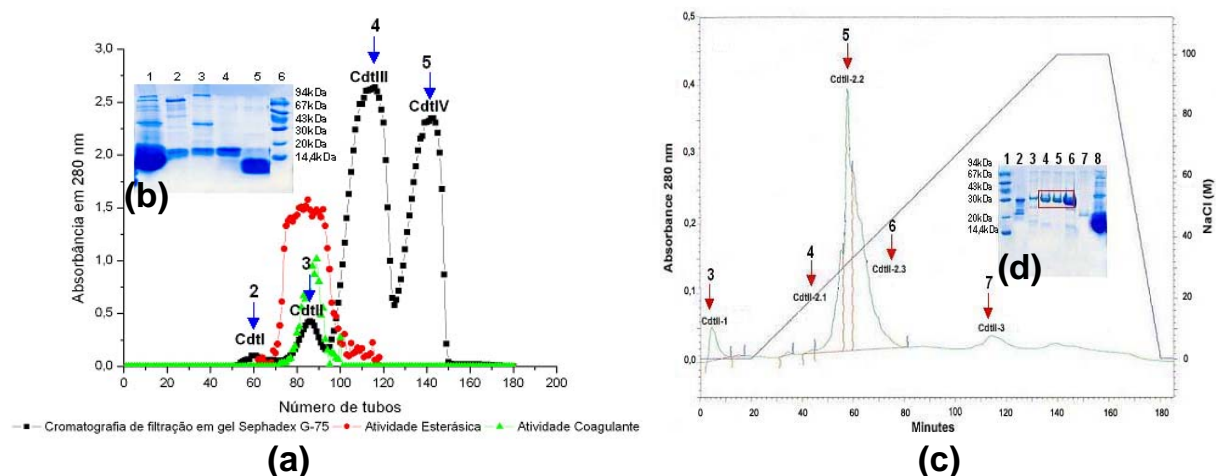


Figura 4: (a) Isolamento do veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus* em coluna de gel de Sephadex G-75 (110 x 4,0 cm). Atividade esterásica das frações sobre o substrato N_{α} -p-tosil-L-arginina metil éster (TAME). Atividade coagulante das frações sobre o plasma humano incubada com 20 μ L de cada tubo em triplicata mantidas a 37 $^{\circ}$ C, cronometrando o tempo de formação da rede de fibrina. $TC = 1/\Delta \times 100$, (TC = tempo de coagulação e Δ = média dos tempos em segundos). (b) A análise em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes. Amostras com agente redutor (20 μ L) (1) veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus*; (2) CdtI; (3) CdtII, (4) CdtIII; (5) CdtIV (6) Padrão de massas moleculares relativas. (c) Purificação de 5 mg diluído em 500 μ L da fração CdtII por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em coluna ES 502N de troca iônica (7,6 x 100 mm). (d) A análise em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes. Amostras com agente redutor (20 μ L); (1) Padrão de Massas Moleculares Relativas; (2) CdtII isolada da coluna de filtração em gel (Sephadex G-75); (3) CdtII-1; (4) CdtII-2.1; (5) CdtII-2.2; (6) CdtII-2.3, (7) CdtII-3 e (8) veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus*.

Tabela 1: Recuperação protéica das frações obtidas do isolamento de 280 mg do veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus* em coluna de gel de Sephadex G-75.

Etapas de Purificação	Proteínas Totais (mg)	Proteínas Totais (mg %)
Veneno <i>C. d. terrificus</i>	280	100
Sephadex G-75		
CdtI	3,17	1,13
CdtII	17,42	6,22
CdtIII	116,00	41,40
CdtIV	81,60	29,20

5.1.2. Isolamento e purificação da serino proteinase do veneno de *Crotalus durissus collilineatus*

O isolamento e purificação da serino proteinase de veneno de *Crotalus durissus collilineatus* seguiu as mesmas etapas cromatográficas da serino proteinase de *Crotalus durissus terrificus*.

Na primeira etapa de purificação obteve-se quatro frações denominadas CdcI, CdcII, CdcIII e CdcIV (Figura 5a). A fração CdcII que apresentou atividade foi submetida a cromatografia líquida de alta eficiência resultando em três frações denominadas CdcII-1, CdcII-2 e CdcII-3 (Figura 5c).

Todas as etapas de purificação foram monitoradas em 280 nm e a atividade coagulante e esterásica de cada fração foi determinada (Tabelas 4 e 5). As figuras 5b e 5d representam o perfil eletroforético das frações obtidas nas etapas de purificação descritas acima.

A fração CdcII apresentou atividade coagulante e esterásica (Figura 5a) com recuperação protéica em relação ao veneno de CdcII 10,25 % e CdcII-2 8,4 % (Tabela 2).

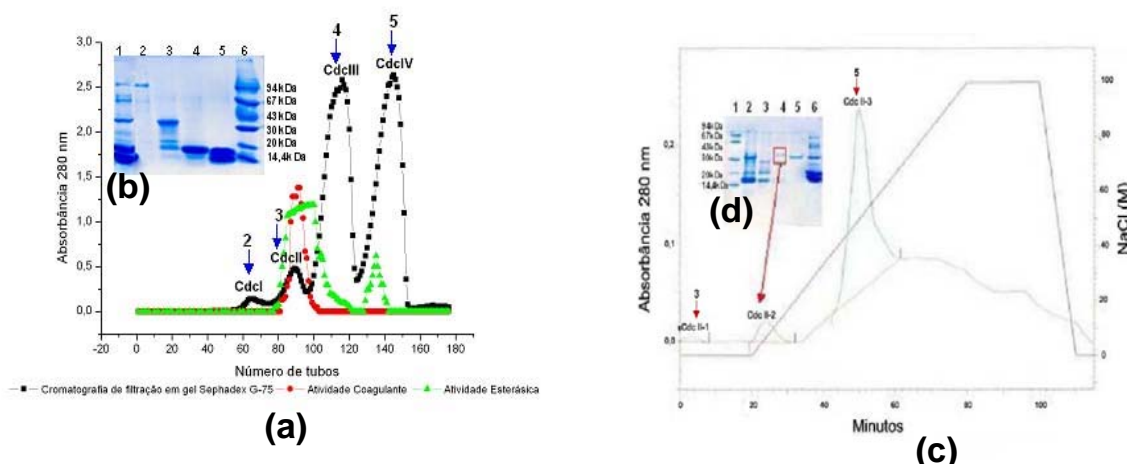


Figura 5: (a) Isolamento do veneno bruto de *Crotalus durissus collilineatus* em coluna de gel de Sephadex G-75 (110 X 4,0 cm). Atividade coagulante das frações sobre o plasma humano incubada com 20 µL de cada tubo em triplicata mantidas a 37 °C, cronometrando o tempo de formação da rede de fibrina. $TC = 1 / \Delta \times 100$, ($TC =$ tempo de coagulação e $\Delta =$ média dos tempos em segundos). Atividade esterásica das frações sobre o substrato N_{α} -p-tosil-L-arginina metil éster (TAME). (b) Análise em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes. Amostras com agente redutor (20 µL): (1) veneno bruto de *Crotalus durissus collilineatus*; (2) CdcI; (3) CdcII; (4) CdcIII, (5) CdcIV e (6) Padrão de Massas Moleculares Relativas. (c) Purificação de 5 mg diluído em 500 µL da fração CdcII por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em coluna ES 502N de troca iônica (7,6 x 100 mm). (d) Análise em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes. Amostras com agente redutor (20 µL) (1) Padrão de Massas Moleculares Relativas; (2) fração CdcII isolada da coluna de filtração em gel (Sephadex G-75); (3) CdcII-1; (4) CdcII-2, (5) CdcII-3 e (6) veneno bruto de *Crotalus durissus collilineatus*.

Tabela 2: Recuperação protéica das frações obtidas do isolamento de 500 mg do veneno bruto de *Crotalus durissus collilineatus* em coluna de gel de Sephadex G-75 e da purificação de 500 µl da fração CdcII em cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em coluna ES 502N de troca iônica.

Etapas de Purificação	Proteínas Totais (mg)	Proteínas Totais (mg %)
Veneno <i>C. d. collilineatus</i>	362,4	100
Sephadex G-75		
CdcI	22,77	6,28
CdcII	37,15	10,25
CdcIII	171,25	47,25
CdcIV	66,03	18,22
ES-502N		
CdcII	5	100
CdcII-1	0,045	0,9
CdcII-2	0,42	8,4
CdcII-3	1,0	2,0

5.1.3. Isolamento e purificação da serino proteinase do veneno de *Bothrops jararaca*

A figura 6a representa o cromatograma do veneno bruto de *Bothrops jararaca* em gel Sephadex G-75 com uso de Bicarbonato de Amônio 0,05 M pH 8,0 resultando em cinco frações denominadas BJI, BJI-1, BJI-2, BJI-3, BJI-4 e BJI-5, seguido de cromatografia de alta eficiência (CLAE) da fração BJI que apresentou atividade coagulante.

Nesta etapa de purificação obteve-se cinco picos denominados BJI-1, BJI-2, BJI-3, BJI-4 e BJI-5 (Figura 6c) que foram reunidos e liofilizados.

As frações já citadas foram submetidas à atividade coagulante, esterásica e hemorrágica (Tabelas 4, 5 e 7 e Figuras 6b e 12). A recuperação protéica em relação ao veneno foi de BJI 17,1 % e BJI-2 10 % (Tabela 3).

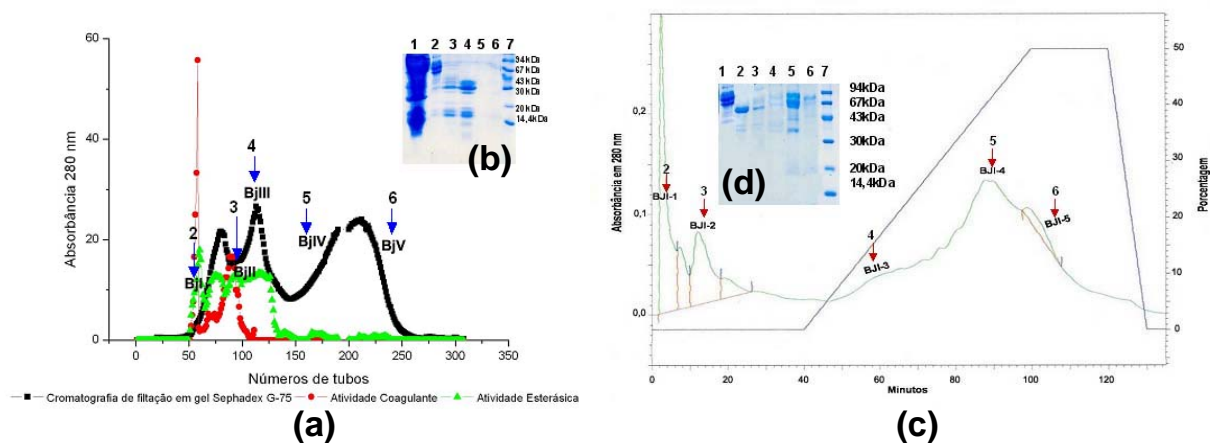


Figura 6: (a) Isolamento do veneno bruto de *Bothrops jararaca* em coluna de gel de Sephadex G-75 (110 X 4,0 cm). Atividade coagulante das frações sobre o plasma humano incubada com 20 μ L de cada tubo em triplicata mantidas a 37 $^{\circ}$ C, cronometrando o tempo de formação da rede de fibrina. $TC = 1/\Delta \times 100$, (TC = tempo de coagulação e Δ = média dos tempos em segundos). Atividade esterásica das frações sobre o substrato N_{α} -p-tosil-L-arginina metil éster (TAME). (b) Análise em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes. Amostras com agente redutor (20 μ L) (1) veneno bruto de *Bothrops jararaca* em coluna de gel de Sephadex G-75; (2) BJI; (3) BJI-1; (4) BJI-2; (5) BJI-3; (6) BJI-4 e (7) Padrão de Massas Moleculares Relativas. (c) Purificação de 5 mg diluído em 500 μ L da fração BJI por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em coluna ES 502N de troca iônica (7,6 x 100 mm). (d) Análise em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes. Amostras com agente redutor (20 μ L): (1) fração BJI isolada da coluna de filtração em gel (Sephadex G-75); (2) BJI-1; (3) BJI-2; (4) BJI-3; (5) BJI-4, (6) BJI-5 e (7) Padrão de Massas Moleculares.

Tabela 3: Recuperação protéica das frações obtidas do isolamento de 500 mg do veneno bruto de *Bothrops jararaca* em coluna de gel de Sephadex G-75 e da purificação de 500 µl da fração BJI isolada por filtração do veneno bruto de *Bothrops jararaca* em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em coluna ES 502N de troca iônica.

Etapas de Purificação	Proteínas Totais (mg)	Proteínas Totais (mg %)
Veneno B. jararaca	500	100
Sephadex G-75		
BjI	85,63	17,10
BjII	40,65	8,13
BjIII	232,65	46,53
BjIV	71,40	14,28
BjV	4,08	1,4
ES-502N		
BjI	5	100
BjI-1	0,7	14
BjI-2	0,5	10
BjI-3	0,44	8,8
BjI-4	0,28	5,6
BjI-5	0,81	16,2

5.2. Caracterização Bioquímica

5.2.1. Análise Eletroforética

A eletroforese das frações sob SDS-PAGE (Figuras 4b e 4d, 5b e 5d, 6b e 6d) representam o perfil protéico obtido da coluna de Sephadex G-75 e da cromatografia de alta eficiência. Essa análise foi monitorada com um padrão de peso molecular e a pureza das proteínas confirmada, na última etapa de purificação com a presença de uma única banda nas frações CdtII-2 poço 4, 5 e 6 (Figura 4d), CdcII-2 poço 4 (Figura 5d) e BjI-2 poço 3 (Figura 6d)

5.2.2. Determinação do peso molecular

Em condições redutoras as serino proteinases: CdtII-2 de *Crotalus durissus terrificus* e CdcII-2 de *Crotalus durissus collilineatus* apresentaram uma única banda com massa molecular de 33 kDa (Figura 7b). A convulxina CdtI de *Crotalus durissus terrificus* (Figura 7b) apresenta uma massa molecular acima de 94 kDa não sendo possível no momento a determinação de sua massa, pois é necessário um padrão de alto peso molecular.

A serino proteinase BjI-2 apresenta uma massa molecular de 47 kDa (Figura 7d).

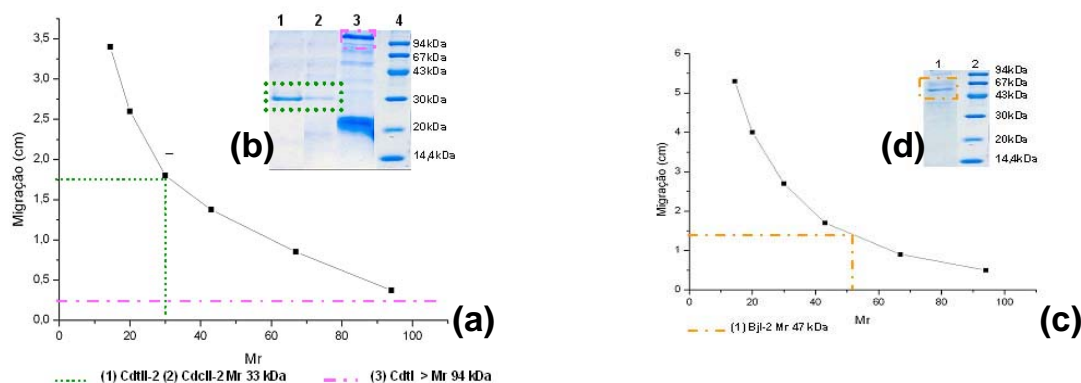


Figura 7: (a) (b) Determinação do peso molecular das frações CdtII-2, CdcII-2 e de CdtI. Distância de migração das proteínas padrões em relação a Mr (massa molecular relativa). Análise em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes. **(b)** Amostras com agente redutor (20 μ L): **(1)** CdtII-2; **(2)** CdcII-2, **(3)** CdtI e **(4)** Padrão de Massas Moleculares. **(d)** Amostras com agente redutor (20 μ L): **(1)** Bjl-2 e **(2)** Padrão de Massas Moleculares Relativas.

5.3. Caracterização Enzimática

5.3.1. Atividade Coagulante sobre Plasma Humano

As figuras 4a, 5a e 6a representam a atividade coagulante determinada para cada tubo do perfil cromatográfico dos venenos utilizando como substrato artificial plasma humano.

Para os venenos Crotálico e Botrópico a atividade coagulante caracterizou-se na fração CdcII e Bjl, respectivamente.

Após as etapas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) os venenos e frações que apresentaram atividade coagulante foram submetidos à determinação da dose coagulante mínima.

Tabela 4: Atividade Coagulante – Análise comparativa dos resultados dos testes realizados com as frações obtidas por meio de isolamento em coluna de gel de Sephadex G-75 e da purificação em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em coluna ES 502N de troca iônica do veneno Crotálico e Botrópico.

Atividade e Coagulante	
<i>Veneno Crotalus durissus terrificus</i> (+)	
CdtI	(+)
CdtII	(+)
CdtIII	(+)
CdtIV	(+)
<i>Veneno Crotalus durissus collilineatus</i> (+)	
CdcI	(+)
CdcII	(+)
CdcIII	(+)
<i>Veneno de Bothrops jararaca</i> (+)	
Bjl	(+)
BjII	(+)
BjIII	(+)
BjIV	(+)
BjV	(+)
Bjl-1	(+)
Bjl-2	(+)
Bjl-3	(+)
Bjl-4	(+)
Bjl-5	(+)

5.3.2. Dose Coagulante Mínima (DCM)

A DCM do veneno de *Crotalus durissus terrificus* foi de 8,3 μg , enquanto a serino proteinase CdtII-2 apresentou uma DCM de 1,5 μg como mostra a figura 8a . O veneno de *Crotalus durissus collilineatus* apresentou uma DCM de 8,0 μg , enquanto que a serino proteinase de CdcII-2 apresentou uma DCM de 0,6 μg como mostra a figura 8b. Para o veneno de *Bothrops jararaca* a DCM foi de 4,5 μg (Figura 8c).

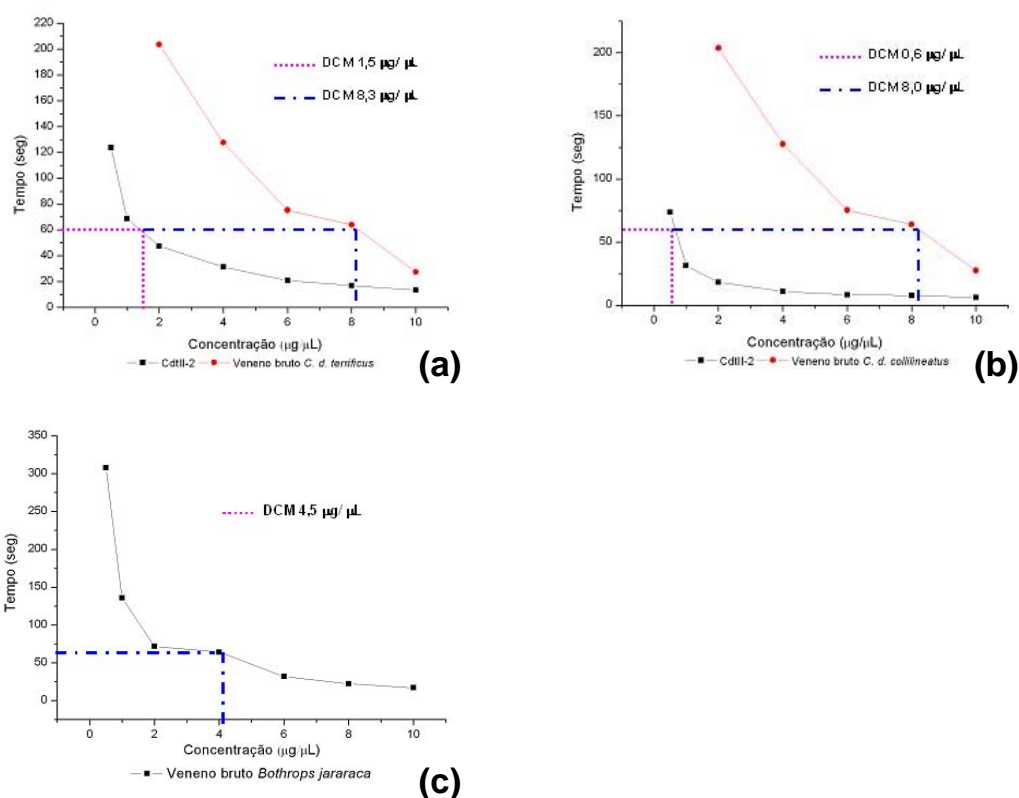


Figura 8: Determinação da dose coagulante mínima (DCM). Definida pela quantidade de enzima capaz de coagular o plasma (200 μL) em 60 segundos. (a) Veneno bruto *Crotalus durissus terrificus* e a fração CdtII-2 (b) Veneno bruto *Crotalus durissus collilineatus* e a fração CdcII-2 (c) Veneno bruto *Bothrops jararaca*.

5.3.3. Efeito do pH e Temperatura sobre a Atividade Coagulante

Atividade coagulante em diferentes pHs mostra que a fração CdtII-2 sofre considerável perda da atividade em pH 2,5 e mantém atividade ótima para pH 4,5 (Figura 9a). Para a fração CdcII-2 a baixa atividade se dá no mesmo pH e no pH 5,5 foi observado a melhor atividade (Figura 9b). Quanto ao comportamento dessa atividade com a variação de temperatura ambas amostras têm alta estabilidade observando melhor atuação a 37 $^{\circ}\text{C}$ (Figuras 9c e 9d).

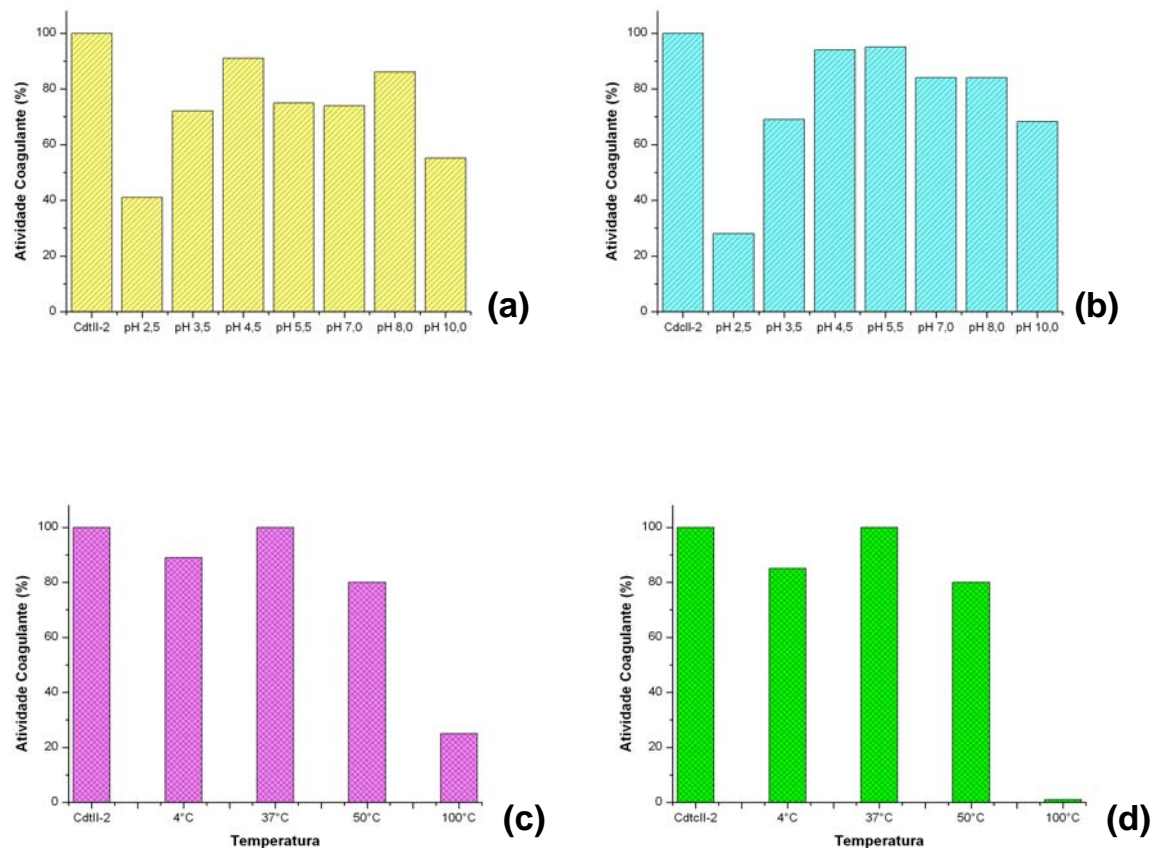


Figura 9: Avaliação da estabilidade das frações CdtII-2 e CdcII-2 para atividade coagulante sobre a influência de diferentes pHs e temperaturas. (a) e (b) CdtII-2 e CdcII-2 em diferentes condições de pHs, respectivamente ; (c) e (d) CdtII-2 e CdcII-2 em diferentes condições de temperatura, respectivamente.

5.3.4. Atividade Esterásica sobre TAME

As figuras 4a, 5a e 6a e tabela 5 apresentam as atividades esterásica realizadas para os venenos Crotálicos e Botrópico utilizando o substrato artificial TAME.

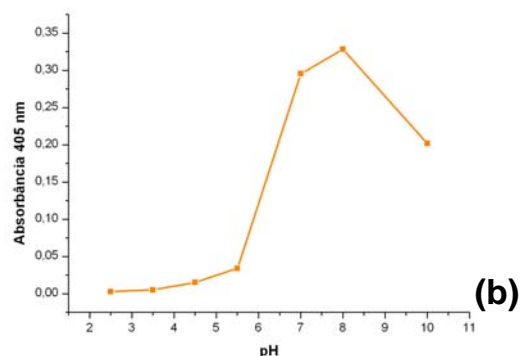
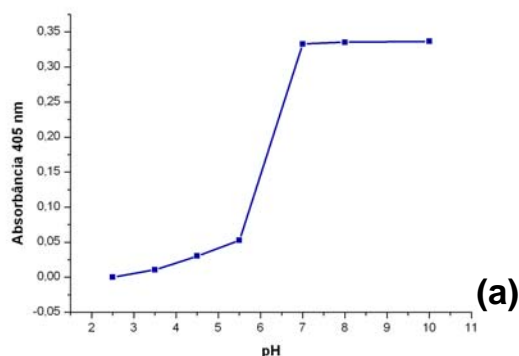
Para a cromatografia de filtração do veneno de *C. d. terrificus* (Figura 4a) e *C. d. collilineatus* (Figura 5a), a atividade esterásica foi determinada nas frações CdtII e CdcII, respectivamente. Enquanto que, para a cromatografia de *Bothrops jararaca* (Figura 6a), a atividade esterásica foi atribuída ao longo da fração BjI e BjII. A tabela 5 mostra as frações que apresentaram atividade esterásica significativa.

Tabela 5: Atividade Esterásica - Análise comparativa dos resultados da atividade esterásica dos veneno Crotálico e Botrópico. Testes realizados com as frações obtidas por meio de isolamento em coluna de gel de Sephadex G-75 e da purificação em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em coluna ES 502N de troca iônica

Atividade Esterásica	
Veneno <i>Crotalus durissus terrificus</i>	(+)
CdtI	(++)
CdtII	(+++)
CdtIII	(+++)
CdtIV	(-)
CdtII-1	(-)
CdtII-2.1	(-)
CdtII-2.2	(+++)
CdtII-2.3	(+++)
CdtII-3	(-)
Veneno <i>Crotalus durissus collilineatus</i>	(+)
CdcI	(-)
CdcII	(++)
CdcIII	(+++)
CdcII-1	(-)
CdcII-2	(+)
CdcII-3	(+)
Veneno de <i>Bothrops jararaca</i>	(+)
BjI	(++)
BjII	(+++)
BjIII	(+++)
BjIV	(-)
BjV	(-)
BjI-1	(-)
BjI-2	(+++)
BjI-3	(+++)
BjI-4	(+++)
BjI-5	(+++)

5.3.5. Efeito do pH e Temperatura sobre a Atividade Amidolítica

Atividade amidolítica em diferentes pHs mostra que ambas frações CdtII-2 (Figura 10a) e CdcII-2 (Figura 10b) mantêm o mesmo perfil até o pH 8,0. CdtII-2 estabiliza no pH 10,0 e CdcII-2 sofre uma queda. Para a fração CdcII-2 a baixa atividade se dá no mesmo pH e no pH 5,5 foi observado a melhor atividade (Figura 9b). Quanto ao comportamento dessa atividade com a variação de temperatura as amostras apresentam uma pequena distinção de atuação a 50°C (Figuras 10c e 10d).



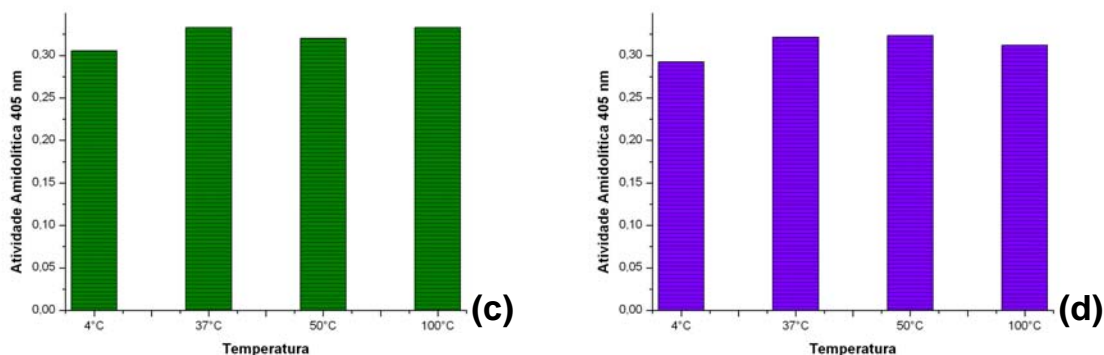


Figura 10: Avaliação da estabilidade das frações CdtII-2 e CdcII-2 para atividade amidolítica sobre a influência de diferentes pHs e temperaturas. (a) e (b) CdtII-2 e CdcII-2 em diferentes condições de pHs, respectivamente ; (c) e (d) CdtII-2 e CdcII-2 em diferentes condições de temperatura, respectivamente.

5.3.6. Atividade Hemolítica Indireta

As frações que apresentaram atividade hemolítica indireta sob eritrócitos em gel de agarose estão listados na tabela 6, sendo observado a formação dos halos após 24 horas de incubação a 37 °C como mostra a figura 11 (A, B, C e D). Como controle negativo foi utilizado plasma incubado com 0,25 M de CaCl₂, o qual coagulou o plasma de 3 a 4 minutos.

Tabela 6: Atividade Hemolítica Indireta - Resultados dos testes realizados com as frações obtidas por meio de isolamento em coluna de gel de Sephadex G-75 e da purificação em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em coluna ES 502N de troca iônica.

Atividade Hemolítica Indireta (em placa)	
Veneno <i>Crotalus durissus terrificus</i> (+)	
CdtI	(-)
CdtbII	(-)
CdtIII	(-)
CdtIV	(-)
CdtII-1	(-)
CdtII-2.1	(-)
CdtII-2.2	(-)
CdtII-2.3	(-)
CdtII-3	(-)
Veneno <i>Crotalus durissus collilineatus</i> (+)	
Cdcl	(-)
CdcII	(-)
CdcIII	(-)
CdcII-1	(-)
CdcII-2	(-)
CdcII-3	(-)
Veneno de <i>Bothrops jararaca</i> (+)	
BjI	(-)
BjII	(-)
BjIII	(-)
BjIV	(-)
BjV	(-)
BjI-1	(-)
BjI-2	(-)
BjI-3	(-)
BjI-4	(-)
BjI-5	(-)

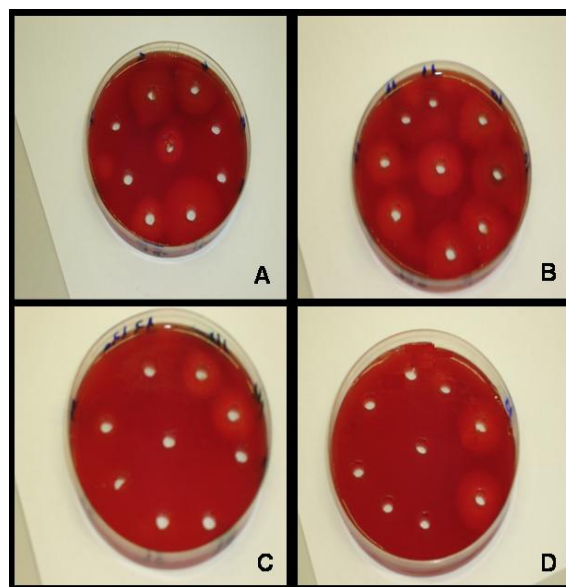


Figura 11: Foto ilustrativa da atividade hemolítica indireta (em placa)

5.4. Caracterização Funcional

5.4.1. Atividade Hemorrágica

As frações obtidas do veneno de *Bothrops jararaca* por cromatografia em Sephadex G-75 e as originárias da cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em coluna ES 502N de troca iônica que apresentaram atividade hemorrágica estão listadas na tabela 7. O uso de um inibidor específico (EDTA) teve por objetivo identificar a fração correspondente a metalo proteinase. As frações Bjl-1, Bjl-3, Bjl-4 e Bjl-5, mesmo sendo reconhecidas por alguma atividade proteolítica (serino proteinases) apresentaram hemorragia considerável e inibição ao EDTA (metalo proteinases), como mostra a figura 12.

Tabela 7: Atividade Hemorrágica - Resultados dos testes realizados com as frações obtidas por meio de isolamento em coluna de gel de Sephadex G-75 e da purificação em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em coluna ES 502N de troca iônica do veneno de *Bothrops jararaca*.

Atividade Hemorrágica	
Veneno de <i>Bothrops jararaca</i>	(+)
Bjl	(+)
BjII	(-)
BjIII	(+)
BjIV	(+)
BjV	(+)
Bjl-1	(+)
Bjl-2	(-)
Bjl-3	(+)
Bjl-4	(+)
Bjl-5	(+)

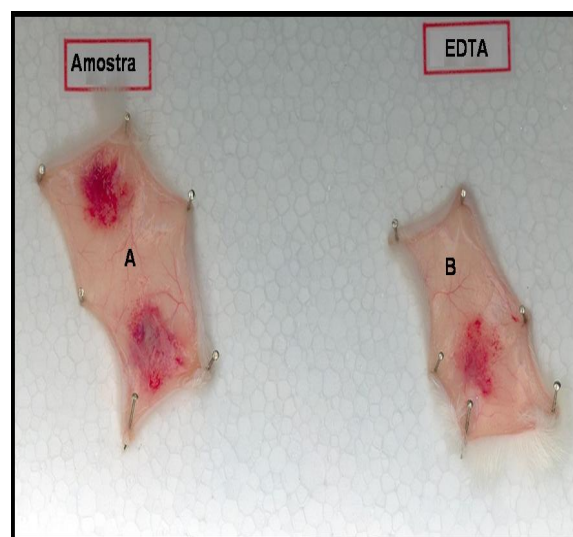


Figura 12: Foto ilustrativa da pele dos animais após indução hemorrágica. Atividade Hemorrágica com injeção intradérmica no dorso do camundongo. Sacrifício dos animais 2 horas após a administração das amostras, e retirada das peles para a observação dos halos formados. A fração do veneno de *Bothrops jararaca* Bjl-1 na concentração de 25 µg/ µL apresentou hemorragia (A) e inibição (B) com a adição de EDTA (1 mM).

5.4.2. Atividade Edematogênica

As figuras 13a e 13b mostram a porcentagem de edema verificada após a aplicação por via intradérmica das toxinas CdtII e CdcII.

Os animais tratados com a toxina CdtII apresentaram expressivo edema de aproximadamente 50 % meia hora após a injeção da dose independente da quantidade aplicada. Com exceção para a dose de 0,5 µg que apresentou um edema de 60 % que permaneceu até 1 hora voltando rapidamente ao normal em 8 horas, quando comparado com o controle.

Nos animais que foi aplicado a toxina CdcII foi possível observar um expressivo edema de aproximadamente 50 % meia hora após a injeção, retornando ao normal em 8 horas.

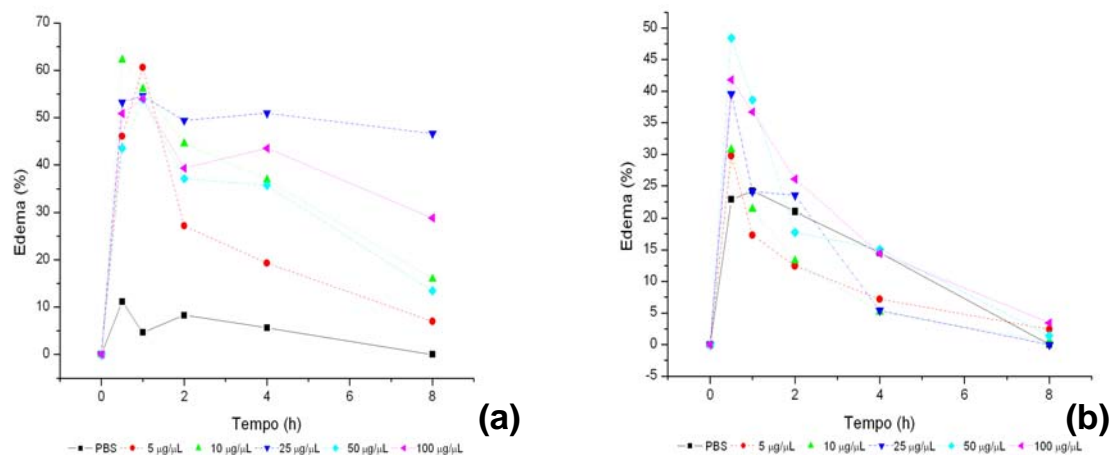


Figura 13: Atividade Edematogênica. Indução de edema em camundongos, através da injeção via intradérmica na região subplantar da pata direita posterior contendo diferentes concentrações de toxinas (a) CdtII e (b) CdcII (5,0 µg; 10 µg; 25 µg; 50 µg e 100 µg) e PBS. As linhas representam à média dos valores em porcentagem (%) da atividade edematogênica.

5.4.3. Atividade Fibrinogenolítica

As toxinas isoladas dos venenos crotálicos atuaram sobre o fibrinogênio convertendo-o em fibrina pela clivagem de ambas cadeias α e β (bandas de baixo peso molecular). Em baixas concentrações apresentou uma diminuição da banda correspondente a cadeia α do fibrinogênio e a formação de fibrinopeptídeos. (Figura 14 A e B).

Em concentrações acima de 4,0 µg é observado o aparecimento de banda de cadeia α e o início da degradação de cadeia β . Como controle utilizamos fibrinogênio (30 µL), o qual após SDS-PAGE apresentou 3 bandas no gel correspondente a cadeia $A\alpha$, $B\beta$ e γ .

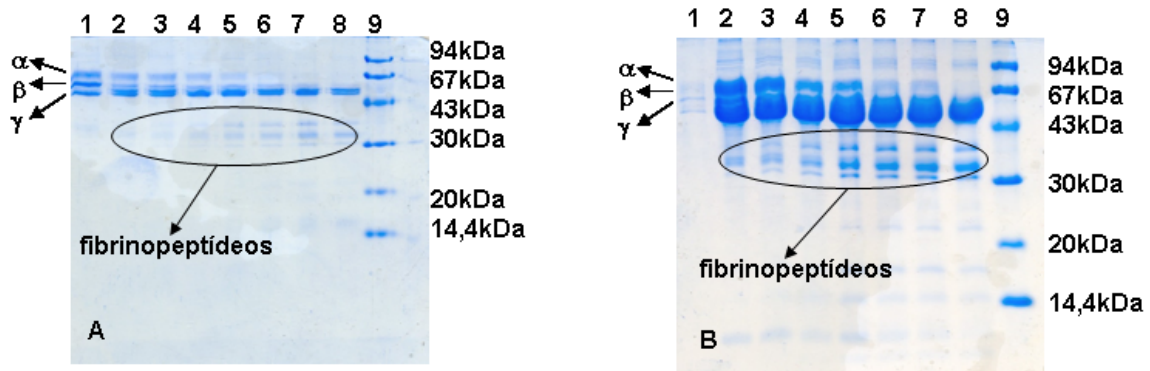


Figura 14: Determinação da atividade fibrinogenolítica de CdtII-2 e CdcII-2 dose dependente. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12 % em condições desnaturantes, 30 μ L das toxinas isoladas dos venenos Crotálicos em diferentes concentrações foram incubadas à 37 °C durante duas horas com 30 μ L de fibrinogênio bovino em TRIS-HCl 0,05 M pH 8,0. A reação foi interrompida com a adição de 30 μ L de tampão TRIS – HCl 0,05 M, pH 6,8 contendo glicerol 10 % (v/v), β -mercaptoetanol 10 % (v/v), SDS 2 % (v/v) e azul de bromofenol 0,05 % (m/v) e deixados por 24h, seguida por fervura a 100 °C durante 5 minutos. (A) CdtII-2 e (B) CdcII-2. Amostras: (1) Controle (30 μ g de fibrinogênio bovino); (2) 0,5 μ g; (3) 1,0 μ g; (4) 2,0 μ g; (5) 4,0 μ g. (6) 6,0 μ g. (7) 8,0 μ g; (8) 10,0 μ g (B) e (9) Padrão de Massas Moleculares.

5.5. Caracterização Estrutural

5.1.1. Ensaio de Cristalização

Na maioria das gotas de proteína encubadas com 50 soluções (Hampton - Kit 1 e 2) ocorreu a formação de precipitados, na solução 45 do Crystal Screen Kit 2 (0,1 M Tris pH 8,5, 0,01 M Cloreto hexahidratado de níquel (II) e 20 % PEG 2000) após três dias, observou-se a formação de microcristais e policristais alongados com imperfeições (Figura 15 A) envolvidos por um precipitado amorfo. Em uma semana, a solução 41 do Crystal Screen Kit 1 (0,1 M Heps – Na pH 7,5, 10 % isso-propanol e 20 % PEG 4000) apresentou cristais na forma de agulhas sem precipitado (gota clara) (Figura 15 C). A partir dessas soluções foram reproduzidas as condições com a diluição do precipitante (2 %, 4 %, 8 % e 16 %) para promover uma formação mais lenta dos cristais. Contudo, ainda houve a formação de policristais, microcristais e precipitados amorfos.

O próximo passo foi o acréscimo de 5 % de Glicerol, 1 % de Dioxano, a variação do pH de 4,6 a 8,5 e inversões dos tampões das mesmas soluções iniciais (Figura 15 B e D). Na figura E a solução 22 do Crystal Screen Kit 1 (0,1 M Tris - pH 8,5, 0,2 M de Acetato de Sódio e 30 % PEG 4000) foi otimizada com a variação para 25 % de PEG 4000, sendo observado a formação de microcristais e de um policristal com superfície irregular. A figura F trata-se da mesma solução, porém com a adição de 10 % de água tendo obtido microcristais e um precipitado amorfo. Ainda com a mesma solução foi realizado mais dois ensaios com a adição de 2 mM de

CaCl₂ e (NH₄)₂SO₄ e notou-se uma distinção entre a formação cristalina da figura G, que tinha ainda na composição da solução 10 % de água, e a figura H que apresentou o melhor resultado na formação do cristal com a adição de 10 % de Additive Screen 3 (1,0 M Cloreto de Potássio e 2,0 M de Cloreto de Sódio) e do inibidor MOL144 CID-29206 na solução.

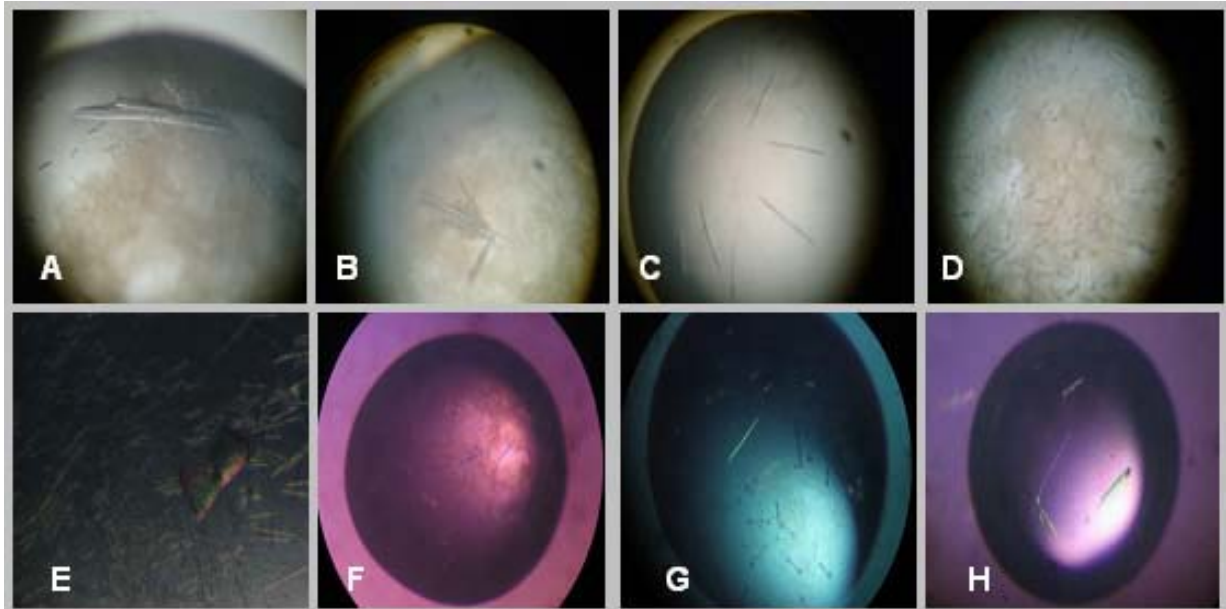


Figura 15: Formações cristalinas Giroxina (serino-proteinase) de veneno de *Crotalus durissus collilineatus* obtidos pela técnica de difusão de vapor por gota suspensa (Hanging drop). (A) solução 45 do kit 2 (0,1 M Tris pH 8,5, 0,01 M Cloreto hexahidratado de níquel (II) e 20 % PEG 2000); (B) reprodução da solução 45 kit 2, com variação do pH para 8,0 e adição de 5 % de glicerol, (C) solução 41 do kit 1 (0,1 M Hepes – Na pH 7,5, 10 % isopropanol e 20 % PEG 4000), (D) reprodução da solução 45 kit 2 com a mudança do tampão por 0,1 M de Hepes pH 7,5. Soluções otimizadas (E) (0,1 M Tris pH 8,5, 0,2 M de Acetato de Sódio e 25 % de PEG 4000), (F) (0,1 M Tris pH 8,5, 0,2 M de Acetato de Sódio, 25 % de PEG 4000 e 10 % de água destilada e filtrada), (G) (0,1 M Tris pH 8,5, 0,2 M de Acetato de Sódio, 25 % de PEG 4000 e 2 mM de CaCl₂ e (NH₄)₂SO₄) e (H) (0,1 M Tris pH 8,5, 0,2 M de Acetato de Sódio, 25 % de PEG 4000, 10 % de Additive Screen 3: 1,0 M Cloreto de Potássio e 2,0 M de Cloreto de Sódio e a adição de um inibidor MOL144 CID-29206).

Nos ensaios realizados com a Crotamina após os testes com as soluções Crystal Screen Kit 1 e 2 foram obtidos quatro condições interessantes (Figura 16). A solução 46 Crystal Screen Kit 1 (0,2 M Acetato de Cálcio; 0,1 M e 18% PEG 8000) foi selecionada para os ensaios de otimização (Figura 16D). A partir dessa condição foram reproduzidas onze novas condições variando de 0,2 do pH 5,0 a 7,4. Os pHs 6,4 e 5,2 apresentaram o mesmo padrão da solução inicial (Figura 16D). O próximo passo foi acrescentar a essas soluções sais que ajudassem a atingir o ponto ótimo de saturação para melhor nucleação dos cristais, porém o resultado manteve o padrão observado anteriormente.

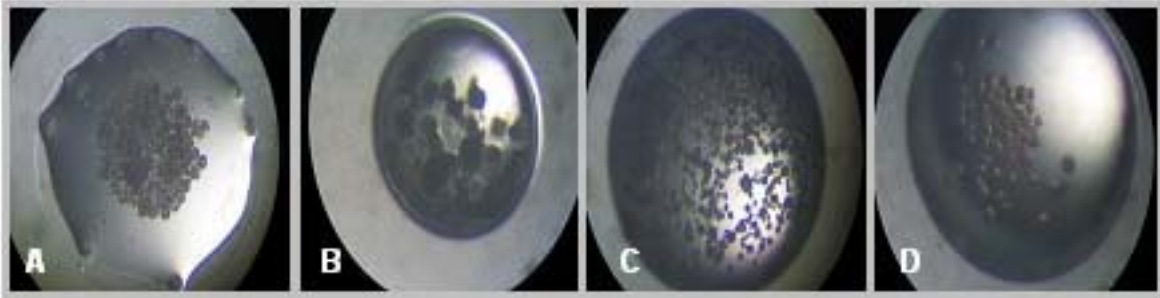


Figura 16: Formações cristalinas de Crotamina de veneno de *Crotalus durissus collilineatus* obtidos pela técnica de difusão de vapor por gota suspensa (Hanging drop). (A) solução 24 do kit 1 (0,1 M Acetato de Sódio pH 4,6; 0,2 M Cloreto de Cálcio e 20 % isso-propanol); (B) solução 45 kit 1 (0,1 M de Cacodilato de Sódio pH 6,5; 0,2 M de Acetato de Zinco e 18 % PEG 8000) (C) solução 46 do kit 1 (0,1 M Cacodilato de Sódio pH 6,5; 0,2 M de Acetato de Cálcio e 18 % PEG 8000) e (D) solução 34 kit 2 (0,1 M de Hepes pH 7,5; 0,05M de Sulfato de Cádmio e 1,0 M de Acetato de Sódio).

Answers to Discussion 6

Toxinas isoladas de venenos têm sido usadas como ferramentas moleculares na compreensão de diversos eventos fisiológicos e patológicos comprovado por vários trabalhos na literatura. O veneno de serpente do gênero *Crotalus sp.* provoca ação neurotóxica e miotóxica, já o do gênero *Bothrops sp.* tem ação proteolítica e hemorrágica, mas ambas possuem a ação coagulante que interfere diretamente no sistema hemostático do indivíduo inoculado (PEREZ *et al.*, 1996).

A maioria das serino proteinases descritas dos venenos são classificadas como enzimas coagulantes que liberam somente fibrinopeptídeo A (FP-A) do fibrinogênio, mas não são capazes de ativar Fator XIII que faz um coágulo estável (crosslinked clot). Sobre a cadeia A α do fibrinogênio a clivagem ocorre entre Arg¹⁶-Gly¹⁷ levando a liberação do fibrinopeptídeo A (FP-A) e a conversão do fibrinogênio em fibrina. A enzima batroxobin (25 kDa) (STOCKER; BARLOW, 1976) do veneno de *B. atrox*, apresenta atividade apenas sobre a cadeia A α do fibrinogênio, liberando FP-A (Figura 17). A Proteína C, uma enzima dependente de vitamina K, tem uma função chave na autoregulação da cascata de coagulação sangüínea e é ativada pelo complexo trombina/trombomodulina (ESMON, 1981). Foi demonstrado que o serino proteinase Protac (ACC-C) (25 kDa) do veneno de *Agkistrodon contortrix contortrix* é um anticoagulante que ativa a PC sem necessitar a interação com trombomodulina (STOCKER *et al.*, 1986; MARTINOLI; STOCKER, 1986; McCALL *et al.*, 1987) (Figura 17).

Como o ativador fisiológico de plasminogênio, t-PA, a serino proteinase TSV-PA (33 kDa) do veneno de *Trimeresurus stejnegeri* cliva especificamente a ligação Arg⁵⁶¹-Val⁵⁶² do plasminogênio gerando plasmina (Figura 17).

A cumarina, heparina e seus derivados são anticoagulantes, e são utilizados clinicamente para controlar a coagulação. No entanto, essas moléculas têm um efeito colateral potencialmente devastador provocando dermonecrose. Novas estratégias e estudos para descoberta do princípio anticoagulante incluem os inibidores sintéticos direto da trombina e o inibidor do Fator Xa. Diversas proteínas isoladas de venenos de serpentes vêm sendo comercializadas por indústrias farmacêuticas, tais como Batroxobin[®] e Protac[®] que não apresentam efeitos colaterais.

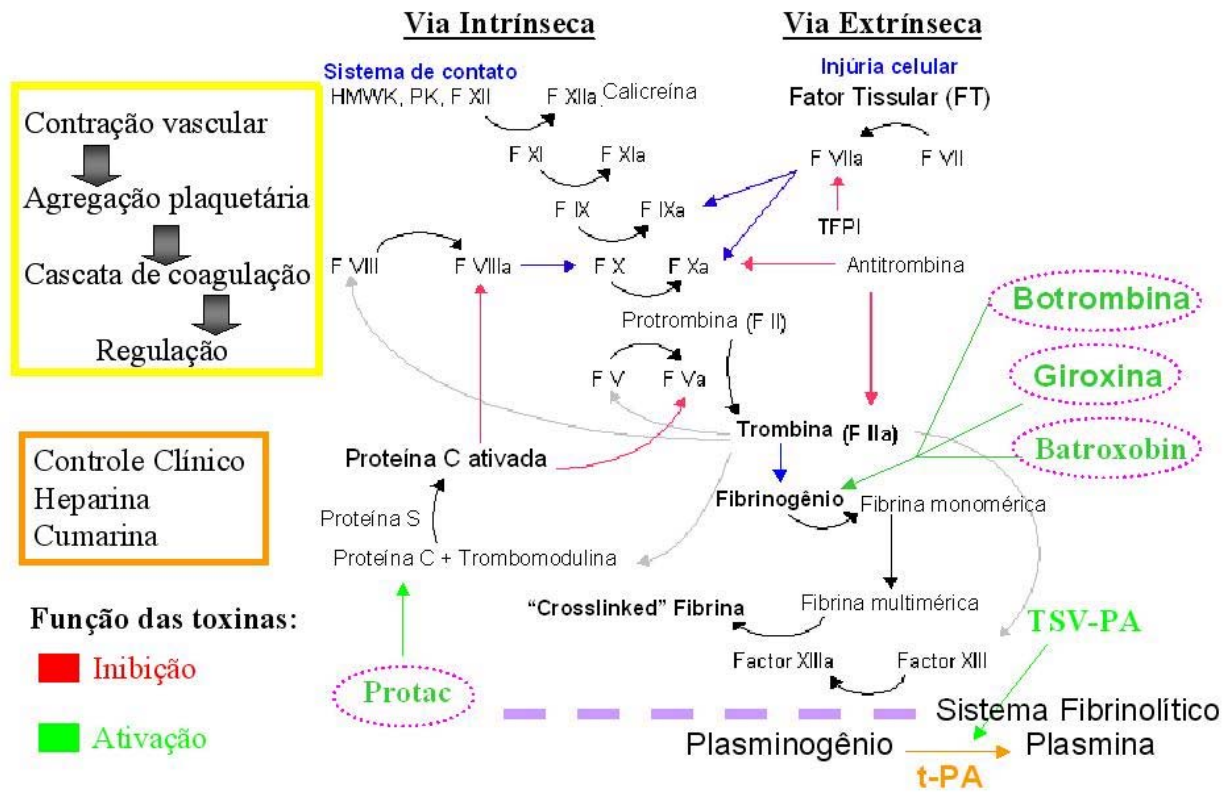


Figura 17: Sistema Hemostático: Adaptado de (Narayanan & Hamasaki, 1998) evidenciando pontos alvo da atuação de algumas enzimas do veneno de serpentes.

As enzimas Botrombina e Giroxina clivam fibrinogênio produzindo fibrina (Figura 17), sendo assim, têm utilidade clínica alternativa para sutura cirúrgica. O grupo do professor Barraviera está testando essas frações para sua eficácia como adesivos biológicos no processo de cicatrização.

O estudo realizado até o momento neste trabalho, indica um grande potencial a ser explorado na avaliação da estrutura e função das proteínas que modulam alterações no processo de hemostasia. As proteínas responsáveis por este efeito são as enzimas trombina-símile que atuam sobre o fibrinogênio convertendo-o em fibrina. Estruturalmente, são enzimas que possuem em seu sítio catalítico um resíduo serino (Ser) e, assim sendo, pertencem à família das serino proteinases (Figura 18). Além disso, apresenta um “bolso”, característico para cada tipo de serino proteinase que lhe confere especificidade como enzima proteolítica (MATHEWS; VAN HOLDE, 1998).

A trombina, com uma função proteolítica muito específica, cliva somente poucos tipos de conexões, principalmente aquelas de Arg-Gly. Algumas serino proteinases têm especificidade pelo mesmo sítio de clivagem, pois apresentam em seu “bolso” resíduos de arginina (MATHEWS; VAN HOLDE, 1998). *Crotalus durissus cascavella* apresenta uma

fração menos estudada denominada gioxina que tem sido descrita como uma proteína trombina-símile como relatado por RAW *et al.* (1986) e ALEXANDER *et al.* (1988).

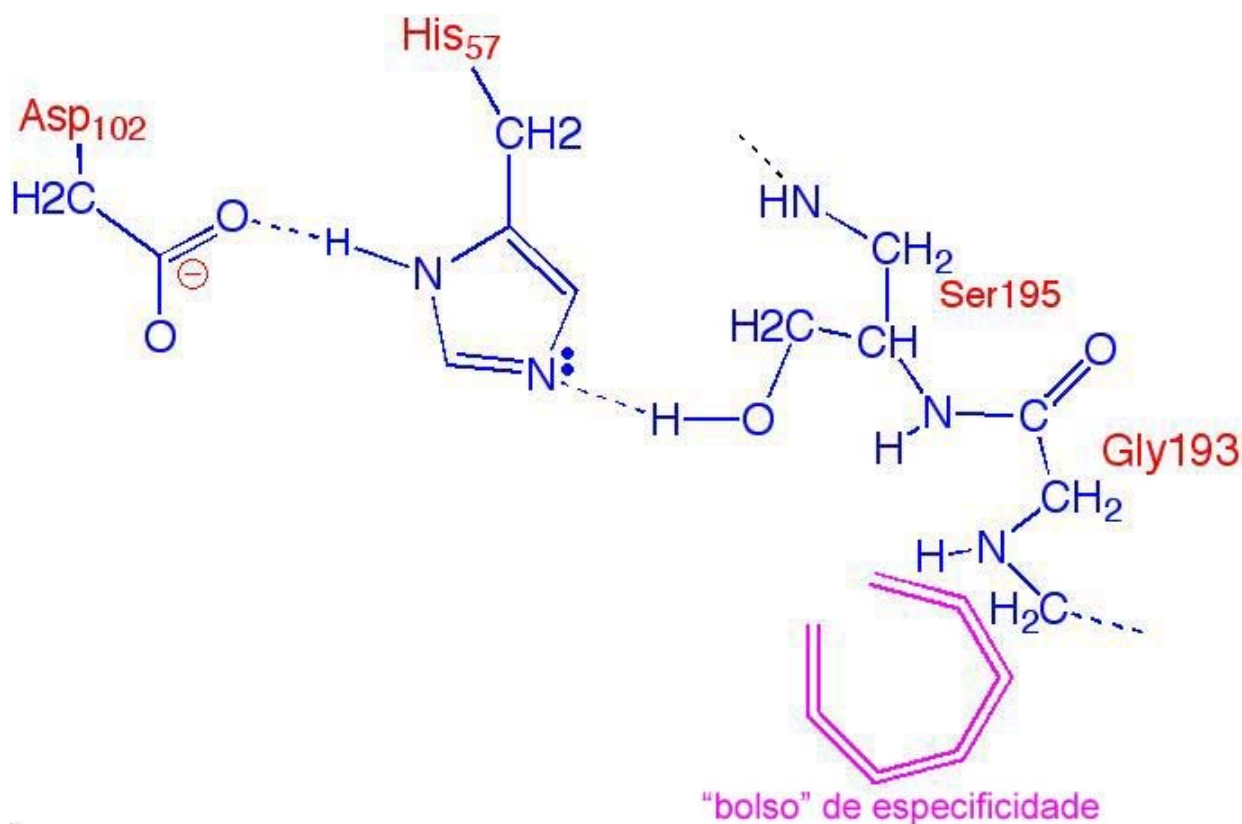


Figura 18: Tríade Catalítica – Formada pelos resíduos Ser195-His57-Asp102 em serino proteinase. Adaptado de (Mathews & Van Holde, 1998).

O objetivo principal do projeto foi isolar e caracterizar proteínas de venenos de serpentes que afetam o equilíbrio homeostático, em quantidade e grau de pureza necessário para posterior estudo estrutural. Além de avaliar as atividades de caracterização bioquímica, enzimática e funcional induzida pelas frações de interesse, como também, outras de função e importância biológica e farmacológica do veneno total de *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus collilineatus* e *Bothrops jararaca*.

O isolamento das enzimas trombinas-símile utiliza 2 a 3 técnicas cromatográficas, tais como cromatografia de exclusão molecular; cromatografia de afinidade e cromatografia de troca iônica.

MARKLAND e DAMUS (1971) isolaram e caracterizaram uma trombina-símile de *Crotalus adamanteus* através de cromatografia de exclusão molecular em G-100; cromatografia de troca iônica e novamente em cromatografia de exclusão molecular totalizando 5 etapas cromatográficas.

TOYAMA *et al.* (2001), isolaram e caracterizaram a convulxina de *Crotalus durissus collilineatus* utilizando duas etapas cromatográficas, uma de exclusão molecular em sistema de cromatografia líquida de performance rápida (FPLC) e outra em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

As toxinas isoladas de veneno Crotálico e Botrópico foram obtidas com a combinação de duas etapas cromatográficas, uma de exclusão molecular utilizando coluna de Sephadex G-75 e outra de troca iônica (coluna aniônica) com uso de CLAE. O método pode ser considerado relativamente rápido e eficiente, quando comparado a outros métodos para o isolamento das enzimas trombinas-símile, onde geralmente são utilizados de 2 a 3 técnicas cromatográficas.

O processo de isolamento para as frações do veneno Crotálico foi utilizado com tampão de caráter ácido (Formiato de Amônio, pH 3,0), o qual manteve a integridade das frações impedindo a degradação das mesmas e promovendo uma melhor separação da serino proteinase (giroxina), frações CdtII e CdcII e das frações CdtIII e CdcIII correspondentes a crotoxina (Figura 4a e 5a). Neste trabalho, o pico correspondente a fração giroxínica é heterogênea composta de uma trombina-símile e proteína L-amino oxidase (LAO), a qual parece estar envolvida em várias atividades. A ação da LAO foi inibida pelo pH ácido (tampão Formiato de Amônio 0,05 M, em pH 3,0) usado no processo de purificação das frações. A recuperação em termos de proteínas totais do veneno de *Crotalus durissus terrificus* para as frações foi CdtI 1,13 %; CdtII 6,22 %; CdtIII 41,40 % e CdtIV 29,20 % (Tabela 1) e do veneno de *Crotalus durissus collilineatus* foi de CdcI 6,28 %; CdcII 10,25 %; CdcIII 47,25 % e CdcIV 18,22 % (Tabela 2).

Para a obtenção das toxinas do veneno Botrópico foi realizada uma cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G-75) em tampão volátil (Bicarbonato de Amônio, pH 8,0), processo descrito por ANDRIÃO ESCARSO *et al.*, (2000), com algumas modificações. O tampão apresenta condições favoráveis de pH, o qual não interfere na atividade das enzimas que geralmente perdem parte de sua atividade em pHs ácidos, como as metalo proteinases (MAZZI *et al.*, 2004) (Figura 6a). A recuperação em termos de proteínas totais para o veneno de *Bothrops jararaca* para as frações foi de BjI 17,1 %; BjII 8,13 %; BjIII 46,53%; BjIV 14,28 % e BjV 1,4 % (Tabela 3).

As frações obtidas da cromatografia de exclusão molecular que apresentam atividade coagulante CdtII (Tabela 4 e Figura 4a); CdcII (Tabela 4 e Figura 5a) e BjI (Tabela 4 e Figura 6a), foram submetidas a cromatografia de troca iônica utilizando o sistema de cromatografia de alta eficiência.

Nesta etapa foi possível obter pureza das frações CdtII-2 (Figura 4d, poços 4, 5 e 6), CdcII-2 (Figura 5d, poço 4) e BjlI-2 (Figura 6d, poço 3) de forma rápida (3 horas) comparado ao tempo consumido na cromatografia de exclusão molecular (24-48 horas). A recuperação em termos de proteínas totais para o veneno de *Crotalus durissus collilineatus* para as frações foi de CdcII-1 0,9 %; CdcII-2 8,4 %; CdcII-3 2,0 % (Tabela 2) e para o veneno de *Bothrops jararaca* para as frações BjlI-1 14,0 %; BjlI-2 10,0 %; BjlI-3 8,8 %; BjlI-4 5,6 % e BjlI-5 16,2 % (Tabela 3). Geralmente a recuperação protéica dessa classe de enzimas em relação ao veneno bruto total é baixa ficando em torno de 1,0 %.

Várias preparações de serino proteinases de veneno de serpentes apresentam diferentes massas moleculares e ponto isoelétrico (pIs), devido a variação na sua composição em aminoácidos e conteúdo de açúcar, sob condições redutoras apresentam massa molecular que varia de 26 a 67 kDa e são glicoproteínas de cadeia única. MARKLAND *et al.*, (1982) isolou e caracterizou uma serino proteinase de *Crotalus adamanteus*, crotalase, com massa molecular de 32,7 kDa. No veneno de *Bothrops jararaca* foram isoladas a Bothrops protease A com 67 kDa (MURAYAMA *et al.*, 2003); Bothrombin com 35 kDa (NISHIDA *et al.*, 1994), PA-BJ com 30 kDa (SERRANO *et al.*, 1995). A enzima coagulante isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e *Crotalus durissus collilineatus* apresenta uma massa molecular de 33 kDa (Figura 7a). A serino proteinase isolada do veneno de *B. jararaca* apresenta uma massa molecular de 47 kDa (Figura 7c).

A análise eletroforética dos venenos de *Crotalus durissus terrificus* e *Crotalus durissus collilineatus* apresentou bandas distintas. Segundo FONSECA 2005, o veneno de *C. d. collilineatus* apresenta massa molecular para a convulxina de 78 kDa, nesse trabalho foi observado que o veneno de *C. d. terrificus* apresentou para a convulxina um massa molecular acima de 94 kDa (Figura 7a).

Com a análise em SDS-PAGE, na presença de agente redutor (β -mercaptoetanol) e um ensaio enzimático (atividade hemolítica indireta) ficou confirmado a presença de contaminantes de baixa massa molecular em algumas frações pela formação de halos (Tabela 6 e Figura 11). Possivelmente, estes contaminantes sejam uma proteína da classe das fosfolipases A2 (PLA2s) também muito abundantes nos venenos de serpentes, devido à distância de migração da banda que se aproxima de 14.000 para o monômero, como observado na análise eletroforética.

A espécie de *Crotalus durissus terrificus* (coloração amarela) similar a *Crotalus durissus ruruima* (coloração branca) tem mostrado diferenças bioquímicas e biológicas, além das diferenças cromáticas quando comparado as duas espécies (DOS SANTOS, *et al.*, 1993). Ambas componentes protéicos dos venenos afetam o sistema hemostático tanto na via de

coagulação sangüínea como na fibrinólise e agregação plaquetária, porém diferem no modo de ação no fator I da coagulação podendo degradar o fibrinogênio na cadeias A α (classe A), B β (classe B) e ambas cadeias simultaneamente (classe AB, KORNALIK, 1990).

As serino proteinases das frações CdtII e CdcII isoladas do veneno crotálico apresentaram atividade proteolítica sobre a cadeia A α em baixas concentrações. Em altas concentrações as serino proteinases apresentaram atividade proteolítica sobre a cadeia B β (Figura 14 A e B). Os resultados obtidos foram similares a Calobin (*Crotalus atrox*) e Crotalase (*Crotalus adamanteus*), (HALTAN, 1973; HENSCHEN; EDMAN, 1999).

Além da atividade proteolítica sobre o fibrinogênio, as serino proteinases são glicosiladas o que é de fundamental importância, uma vez que interfere em sua relação estrutura-função e apresentam atividade esterásica sobre o substrato artificial TAME demonstrando ser uma proteína com capacidade proteolítica, atuando preferencialmente sobre as ligações arginil. Como é o caso da elegaxobin II do veneno de *Trimeresurus elegans*, onde a deglicosilação afetou sua interação com macromoléculas TAME, esses resultados supõem que há participação direta de partes glicídicas que interferem no reconhecimento de substratos (OYAMA; TAKAHASHI, 2003).

As frações gioxínicas exibiram uma atividade proteolítica com o fibrinogênio, não interferindo na interação com moléculas menores como a habilidade para degradar fibrinogênio (Figura 14), assim como observado para outras enzimas trombina-símile (SELISTRE; GIGLIO, 1987). As serino proteinases do veneno de serpentes têm sido caracterizadas como enzimas com atividades fibrinogenolíticas e fibrinolíticas, mas muitas têm exibido apenas atividade fibrinogenolíticas (FONSECA, 2005).

CdtII e CdcII isoladas do veneno crotálico induziram moderado efeito edematogênico (Figura 13a e 13b, respectivamente).

A atividade coagulante em diferentes pHs para as frações gioxínica (serino proteinase) apresenta uma atividade considerável no pH sangüíneo que deve ficar entre 7,35 e 7,45. Com relação à variação de temperatura ambas amostras têm alta estabilidade observando melhor atuação a 37°C, temperatura do corpo humano (Figura 9).

Os testes com atividade amidolítica para diferentes pHs e temperaturas apresentou um perfil consideravelmente semelhante entre as frações CdtII-2 e CdcII-2, sendo ótima para as duas frações em pH 8,0 e estabilidade funcional para todas as temperaturas testadas (Figura 10).

As trombinas-símile estudadas nesse trabalho não foram capazes de induzir hemorragia, mesmo em altas concentrações (Tabela 7). A hemorragia é um efeito tóxico característico

causado principalmente pelas hemorraginas, enzimas metalo proteinases, efeito muito pronunciado em acidentes com serpentes do gênero *Bothrops*.

Nos ensaios cristalográficos realizados com a Crotamina não foi obtido êxito na otimização da solução e com a Giroxina (serino proteinase) de veneno de *Crotalus durissus collilineatus* os melhores resultados foram obtidos com a solução 22 do Crystal Screen Kit 1 (0,1 M Tris - pH 8,5, 0,2 M de Acetato de Sódio e 30 % PEG 4000) e suas variações na concentração de precipitante e inibidor mantendo o mesmo tampão e pH. Contudo, mesmo com as alterações os cristais obtidos ainda não são adequados (Figura 12 A e B) para a difração de raios X.

O presente trabalho traz várias contribuições para o estudo desses venenos e toxinas isoladas. Isso possibilita a compreensão do mecanismo de ação dessas toxinas sobre o sistema hemostático determinando as características estruturais que confere a essas moléculas atividade funcional e no futuro servir de modelos para novos fármacos.

Answers ! 7



Neste trabalho a purificação de toxinas do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus collilineatus* e *Bothrops jararaca* foram realizadas e apresentaram um bom rendimento e grau de pureza satisfatório para os ensaios cristalográficos, bem como a caracterização das frações por meio de análises eletroforéticas e testes de atividades. As metodologias foram aplicadas para melhor identificação das frações que contêm serino proteinase.

- Através de processos simples de separação, tais como filtração utilizando gel de Sephadex e cromatografia de troca iônica foi possível isolar as serino proteinases dos venenos Crotálicos e Botrópicos com recuperação em termos de proteínas totais para CdtII (6,22 %), CdcII (10,25 %) e para BJI (17,1 %) apresentando alta atividade coagulante.

- As frações de serino proteinases isoladas do veneno Crotálico, CdtII e CdcII são enzimas de cadeia única com massa molecular relativa de 33 kDa e a isolada de veneno Botrópico com massa molecular relativa de 47 kDa.

- Em pesquisa a trabalhos já publicados, as frações que se referem a convulsina têm massa molecular de 78 kDa (TOYAMA *et al.*, 2001). A fração CdtI do veneno de *Crotalus durissus terrificus* apresentou nesse trabalho, massa molecular maior que 94 kDa (padrão molecular), o que impossibilitou uma análise mais precisa.

- CdtII e CdcII apresentaram atividade proteolítica sobre o fibrinogênio atuando preferencialmente na cadeia A α e em alta concentração na cadeia B β .

- As frações isoladas dos venenos crotálicos não causam hemorragia e induzem níveis moderados de edema. A fração CdcII-2 apresenta elevada atividade coagulante (DCM 0.6 μ L) se comparado a fração CdtII-2. Observando os resultados da atividade edematogênica para as amostras CdtII-2 e CdcII-2 verificou-se que a fração do veneno de *C. .d. terrificus* é mais ativa que a fração do veneno de *C. d. collilineatus*.

- Para a atividade coagulante em diferentes pHs e temperaturas as frações gioxínica (serino proteinase) apresentam uma atividade considerável no pH sanguíneo e na temperatura do corpo humano.

- Nos ensaios de cristalização os cristais obtidos ainda não estão adequados para a difração de raios X.

- A caracterização bioquímica e estrutural tornou-se de suma importância para entender o mecanismo de ação em induzir efeito tóxico e farmacológico apresentadas por estas toxinas.

188



AIRD, S. D.; KAISER, I.I. Comparative studies on three rattlesnake toxins. **Toxicon**, Elmsford, v. 23, n. 3, p. 361-74, 1985.

ALEXANDER, G. *et al.* Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is thrombin-like enzyme. **Toxicon**, Elmsford, v. 26, n. 10, p. 953-960, 1988.

ANDRIÃO-ESCARSO, S. H. *et al.* Myotoxic phospholipases A(2) in *bothrops* snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. **Biochemistry**, New York, v. 82, n. 8, p. 755-63, 2000.

ARNI, R. K. *et al.* Crystal structure of myotoxin II, a monomeric Lys49-phospholipase homologue isolated from the venom of *Cerrophidion (Bothrops) godmani*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 366, n. 2, p. 177-182, 1999.

ARNI, R. K.; *et al.* Structure of the non-covalent complex of prothrombin kringle 2 with PPACK-thrombin. **Chemistry and Physics of Lipids**, Limerick, v. 67, n. 8, p. 59-66, 1994.

ARNI, R. K.; *et al.* Structures of the noncovalent complexes of human and bovine prothrombin factor 2 with Human PPACK-thrombin. **Biochemistry**, New York, v. 32, p. 4727-4737, 1993.

BARRABIN, A. *et al.* Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a trombin-like enzyme. **Toxicon**, Elmsford, v. 26, p. 953-960, 1978.

BARRAVIERA, B. **Venenos animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro, EPUC, 1994, p. 261-280.

BERCOVICI, D. *et al.*. A systematic fractionation of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Memórias do Instituto Butantan**, São Paulo, v. 49, p. 69-78, 1987.

BITHELL, T. C. Trombocitopenia causada por destruição plaquetária imunológica: púrpura trombocitopênica idiopática, trombocitopenia induzida por drogas e formas diversas. In: LEE, G. R.; *et al.* (Eds.) **Hematologia clínica**, São Paulo, 1998, p. 1458-87.

BRAZIL, V. O Pharmacology of crystalline crotoxin. II Neuromuscular blocking action. **Memórias do Instituto Butantan**, São Paulo, v. 33, p. 981-992, 1966.

CADLE, J. E. Geographic distribution: Problems in phylogeny and zoogeography. In **Snakes: Ecology and Evolutionary Biology**. SEIGE, R. A.; COLLINS, L. J. T.; NOVAK, S. S. (Eds.), Macmillan, New York, 1987, p. 77-105.

CHANG, C. C. AND TSENG, K. H. Effect of crotamine, a toxin of South American rattlesnake venom, on the sodium channel of murine skeletal muscle. **Journal of Pharmacological**, Tokyo, v. 63, n. 3, p. 551-559, 1978.

COLMAN, R. W. *et al.* (Eds.) **Haemostasis and thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice**, Stuttgart, 1994, p. 3-16.

DIAZ, C.; *et al.*. The effect of myotoxins isolated from *Bothrops* snake venoms on multilamellar liposomes: relationship to phospholipases A₂, anticoagulant and myotoxic activities. **Biochemical and Biophysical Acta**, Orlando, v. 1070, p. 455-460, 1991.

DOS SANTOS, M. C. *et al.* Characterization of the biological activities of the “yellow and “white” venoms from *Crotalus durissus ruruima* compared with the *Crotalus durissus terrificus* venom. Neutralizing activity of *Crotalus durissus ruruima* antivenins. **Toxicon**, Elmsford, 1993, v.31, n. 11, p. 1459-69, 1993.

DURAN-REYNALS, F. Tissue permeability and the spreading factors in infection. A contribution to the host: parasite problem. **Bacteriological Reviews**, Baltimore v. 6, p. 197-252, 1942.

EDGAR, W.; PRENTICE, C. R. M. The proteolytic action of ancrod on human fibrinogen and its polypeptide chains. **Thrombosis Reviews**, Elmsford, v. 2, p. 85-95, 1973.

ESMON, C.T. Regulation of blood coagulation. **Biochemical and Biophysical Acta**, Orlando. v. 1477, p. 349-360, 2000.

FAURE, G. & BON, C. Crotoxin, a phospholipase A₂ neurotoxin from the south america rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. Purification of several isoforms and a Comparison of their molecular structure and of their biological activites. **Biochemistry**, New York, v. 27, n. 2, p. 730-738, 1988.

FERREIRA, L. A. F. *et al.* Antivenom and biological effects of ar-turmerone isolated from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). **Toxicon**, Elmsford, v. 30, p. 1211-1218, 1992.

FLEER, E. A.; VERHEIJ, H. M. AND DE HAAS, G. H. Modification of carboxylate groups in bovine pancreatic phospholipase A₂. Identification of aspartate-49 as Ca²⁺-binding ligand. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 113, p. 283–288, 1981.

FONSECA, F. V. **Isolamento e caracterização de um novo conjunto de serinoproteases com atividade trombina-like e de L-aminoácido oxidase do veneno de *Crotalus durissus cascavella***. 2005. Tese de (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

FURTADO, M. F. D.; COLLETO, G. M. D. D. ; DIAS DA SILVA, W . Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos. I Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos de algumas espécies dos gêneros *Bothrops*. **Memórias do Instituto Butantan**, São Paulo, v. 53, p. 149-159, 1991.

GABIUS, H. J.; GABIUS, S. **Glycosciences: Status and Perspectives**, CHAPMAN; HALL: London, 1997.

GONÇALVES, J. M.; VIEIRA, L. G. Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras. I Análise eletroforética. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 22, p. 141, 1950.

GOPALAKRISHNAKONE, P **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. Cellular and mitochondrial changes induced in the structure of murine skeletal muscle by crotoxin, a neurotoxic phospholipase A₂ complex. **Toxicon**, Elmsford, v. 22, p. 85–98, 1984.

GUTIÉRREZ, J. .M.; LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms: A review. **Memórias do Instituto Butantan**, São Paulo, v. 51, p. 211-23, 1989.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, Elmsford, v. 33, p. 1405-1424, 1995.

HABERMAMN, E.; HARDT, K.L. A Sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 50, p. 163, 1972.

HALKIER, T. **Mechanisms in Blood Coagulation, Fibrinolysis, and the Complement System**. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, p. 129-160, 1991.

HALTAN, M.W.C. Studies an the coagulant enzyme from *Agkistrodon Rhodosto* MA venom. Isolation and some proprieties of the enzyme. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 31 p. 799-807, 1973.

HAWIGER, J. *et al.* Platelet receptor recognition domains on the alpha chain of human fibrinogen: structure-function analysis. **Biochemistry**, New York, v. 28, n. 7, p. 2909-14, 1982.

HENDON, R.A.; FRAENKEL-CONRAT, H. Biological roles of the two components of crotoxin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, United States, v. 68, p. 1560-1563, 1971.

HENSCHEN-EDMAN, A. H. *et al.* Crotalase, fibrinogen-clotting snake venom enzyme: primary Struture and evidence for a fibrinogen recognition exocite different from thrombin. **Thrombosis and Haemostasis**, Stuttgart, v. 81, p. 81-86, 1999.

HILL-EUBANKS, D. C.; PARKER, C. G. AND LOLLAR, P. Differential proteolytic activation of factor VIII-von Willebrand factor complex by thrombin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, United States, v. 86, p. 6508-651, 1989.

HOGUE, A. R. & ROMANO-HOGE, S. A. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. **Memórias do Instituto Butantan**, São Paulo, v. 42/43, p. 373-496, 1978/1979.

ITZHAKI, R. F.; GILL, D. M. A micro-biuret method for estimating proteins. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 9, p. 401-410, 1964.

JANCARICK, J.; KIM, S. H. Sparse matrix sampling – a screening method for crystallization of proteins. **Journal Applied Crystallography**, United States , v. 24, p. 409-411, 1991.

KORNALIK, F. Toxins affecting blood coagulation and fibrinolysis. In: **Handbook of Toxicology**. Shier, W.T. (Eds.), Academic Press, United States, 1990, p. 683.

KAMIGUTI, A. S. *et al.* Biological properties of the venom of the Papuan black snake (*Pseudechis papuanus*): presence of a phospholipase A2 platelet inhibitor. **Toxicon**, Elmsford, v. 32, n. 8, p. 915-25, 1994.

KAMIGUTI, A. S. *et al.* Coagulopathy and haemorrhage in human victims of *Bothrops jararaca* envenoming in Brazil. **Toxicon**, Elmsford, v. 29, p. 961-972, 1996.

KIRBY, E. P. *et al.* Thrombocytin, a serine protease from *Bothrops atrox* venom. 1. Purification and characterization of the enzyme. **Biochemistry**, New York, v. 18, p. 3564-3570, 1979.

KRISHNAN, R. *et al.* Structure of thrombin complexed with selective non-electrophilic inhibitors having cyclohexyl moieties at P1. **Acta Crystallographica**, Copenhagen, v. 56, p. 156-166, 2000.

KRISHNAN, R. *et al.* Highly selective mechanism-based thrombin inhibitors: structures of thrombin and trypsin inhibited with rigid peptidyl aldehydes. **Biochemistry**, New York, v. 37, p. 12094-12103, 1998.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, New York, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAURE, C.J. *Crotalus durissus terrificus* venom: crotoxin and inter-cro. **Memórias do Instituto Butantan**, São Paulo, v. 52, p.17-19, 1990.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins: carbohydrate specific proteins that mediate cellular recognition. **Chemical Reviews**, Washington, v. 98, p. 637-674, 1998.

LOMONTE, B. *et al.* Isolation of Basic Myotoxins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* snake venoms. **Toxicon**, Elmsford, v.28, p.1113-1146, 1990.

MAKLAND, J. R. F. S. *et al.* Kallikrein-like activity of crotalase, a snake venom enzyme that clots fibrinogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, United States, v. 79, p. 1688-1692, 1982.

MAZZI, M. V. *et al.* A new hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venos: isolation and biochemical characterization. **Toxicon**, Elmsford, v. 44, p. 215-223, 2004.

MARTINOLI, J. L.; STOCKER, K. Fast functional protein C assay using Protac, a novel protein C activator. **Thrombosis Reviews**, Elmsford, v. 43, p. 253-264, 1986.

MCCALL, F. *et al.* Measure-ment of protein C in plasma – a fully automated assay. **Thrombosis Reviews**, Elmsford, v. 45, p. 681-685, 1987.

MANCIN, A. C. *et al.* The histamine releasers crotamine, protamine and compound 48/80 activate specific proteases and phospholipases A₂. **Biochemistry and Molecular Biology International**, Marrickville, v. 42, p. 1171-1177, 1997.

MANN, K. G. Biochemistry and physiology of blood coagulation. **Thrombosis and Haemostasis**, Stuttgart, v. 82, p. 165 174, 1999.

MARKLAND, F. S.; DAMUS, P. S. Purification and properties of a thrombin-like enzymes from the venom of *Crotalus adamanteus* (eastrn diamadback rattlesnake). **Journal Protein Chemistry**, New York, v. 21, p. 6460-6473, 1971.

MATHEWS, C. K.; VAN HOLDE, K. E.; AHERN, K. G. **Biochemistry**. Madrid: Adison Wesley Pearson Education; 2002.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochemical and Biophysical Acta**, Orlando, v. 1477, n. 1/ 2, p. 146–156, 2000.

MCDOWELL, S. B. Snake systematics. In: SIEGEL, R. A.; COLLINS, J. T.; NOVAK, S. S. (Eds.), **Snakes: Ecology and Evolutionary Biology**. Macmillan, New York, 1987, p. 3–50.

MEBS, D.; OWNBY, C. L. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. **International Journal Of Clinical Pharmacology, Therapy And Toxicology**, Deisenhofen, v. 48, p. 223-236, 1990.

MELO, P. A.; OWNBY, C. L. Ability of wedelolactone, heparin and para-bromophenacyl bromide to antagonize the myotoxic effects of two crotaline venoms and their PLA₂ myotoxins. **Toxicon**, Elmsford, v. 37, p. 199-215, 1999.

MOREIRA, L. *et al.* .M. Pathological changes induced by BaH1, a hemorrhagic proteinase isolated from *Bothrops asper* (Terciopelo) snake venom, on mouse capillary blood vessels. **Toxicon**, Elmsford, v. 32, p. 977-987, 1994.

MURAYAMA, N. *et al.* The unusual high molecular mass of Bothrops protease A, a trypsin like serine-protease peptidase from the venom of *Bothrops jararaca*, is due to its high carbohydase content. **Biochemical and Biophysical Acta**, Orlando, v. 1652, n. 1 e 6, 2003.

NISHIDA, S. *et al.* Purification and characterization of bothrombin, a fibrinogen-clotting serine protease from the venom *Bothrops jararaca*. **Biochemistry**, New York, v. 33, p. 1843-1849, 1994.

OHSAKA, A. Hemorrhagic, necrotizing and edema-forming effects of snakes venoms, p. 481-546. In: LEE, C. Y. (Ed.). **Snake venoms, handbook of experimental pharmacology**. Berlin, Springer, p. 1129, 1979.

OUYANG, C.; TENG, C. M.; CHEN, Y. C. Properties of fibrinogen degradation products produced by a and b-fibrinogenases of *Trimeresurus mucrosquamatus* snake venom. **Toxicon**, Elmsford, v. 17, p. 121–126, 1979.

OYAMA, E.; TAKAHASHI, H. Purification and characterization of a thrombin-like, elegaxobin, from the venos of *Trimeresurus elegans* (Sakishima-habu). **Toxicon**, Elmsford, v. 38, p. 1087-1100, 2000.

OWNBY, C. L.; COLBERG, T. R.; ODELL, G. V. A new method for quantitating hemorrhage induced by rattlesnake venoms: ability of polyvalent antivenom to neutralize hemorrhagic activity. **Toxicon**, Elmsford, v. 22, n. 2, p.227-33, 1984.

PÉREZ, O. A. *et al.* Effects of *Bothrops alternatus* venom of Argentina en muscle and different organs in mices. **Acta Physiologica et Pharmacologica Latinoamericana**, Buenos Aires, v. 46, p. 97-102, 1996.

PRADO-FRANCESCHI, J.; VITAL-BRASIL, O. Convulxin, a new toxin from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, Elmsford, v. 19, p. 875–887, 1981.

RAW, I. *et al.* Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 19, p. 333-338, 1986.

ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology, and treatment of snake bites in South America. In: BUCHERL, W.; BUCKLEY, E. E., (Ed.). **Venomous Animals and their Venoms**, New York, Academic Press, v. 2, p. 345-384, , 1971.

RUBSAMEN, K.; BREITHAUPT, H.; HABERMANN, E. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. I. Subfractionation and recombination of the crotoxin complex. **Naunyn-Schmiedebergs Archives Of Pharmacology**, Leipzig, v. 270, n. 3, p. 274-88, 1971.

SCHMAIER, A. H.; COLMAN, R.W. Crotalocytin: characterization of the timber rattlesnake platelet activating protein. **Blood**, Ribeirão Preto, v. 56, n. 6, p. 1020-8, 1980.

SEKI, C.; VIDAL, J. C.; BARRIO, A. Purification of gyroxin from a South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom. **Toxicon**, Elmsford, v. 18, p. 235-247, 1980.

SELISTRE, H. S.; GIGLIO, J. R. Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of the snake *Bothrops insularis* (Jararaca ilhoa). **Toxicon**, Elmsford, v. 25, p. 1135–1144, 1987.

SELISTRE, H. S.; GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Atividade anticoagulante de toxinas dos venenos de *Bothrops insularis* e *Bothrops jararacussu*. **Memórias do Instituto Butantan**, São Paulo, v. 52, p. 73-74, 1990.

SERRANO, S. M. T. *et al.* Purification, characterization, and amino acid sequence of a serine proteinase, PA-BJ, with platelet-aggregating activity from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry**, New York, v. 34, p. 7186-7193, 1995.

SERRANO, S. M. T. *et al.* Basic Proteinases From *Bothrops moojeni* Venom. I- Isolation And Activity Of Two Serine Proteinases, MSP1 And MSP2, On Synthetic Substrates And On Platelet Aggregation.. **Toxicon**, Elmsford, v. 31, n. 4, p. 471-481, 1993.

SOARES, A. M. *et al.* Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys⁴⁹ myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Bothrops newviedi pauloensis* venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 378, p. 201-209, 2000.

STOCKER, K.; BARLOW, G. H. The coagulant enzyme from *Bothrops atrox* venom (Batroxobin). In: **Methods in Enzymology**. Ed. Lorand, L. New York. v. 45, p. 214-223, 1986.

STOCKER, K. F. Comparison of snake venoms, In: STOCKER, K. F. **Medical Use Snake Venom Proteins**, New York, Boca Raton: Ed. CRC Press., 1990, p. 33-57.

TOYAMA, M. H. *et al.* Isolation and characterization of a convulxin-like protein from *Crotalus durissus collilineatus* venom. **Journal Protein Chemistry**, New York, v. 20, n. 7, p. 585-590, 2001.

VAN DRIESSCHE, E. *et al.* (Ed.). **The Electronic Lectin Journal: Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**, Denmark, v.11, 1996.

VILJOEN, C. C.; MEEHAN, C. M.; BOTES, D. P. Separation of *Bitis gabonica* (Gaboon adder) venom arginine esterases into kinin-releasing, clotting and fibrinolytic factors. **Toxicon**, Elmsford, v. 17, n. 2, p.145–154, 1978.

A n e x o s





Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular

XXXV Reunião Anual da SBBQ

de 1 a 4 de julho de 2006 - Hotel Monte Real - Águas de Lindóia, SP

High Yield Purification and Characterization of Fibrinogen Converting Enzymes from Snake Venoms

D.G.L. Oliveira¹, A.C.O. Cintra², S.M.T. Serrano³ and R. K. Arni^{1,3}. Department of Physics, IBILCE/ UNESP, São José do Rio Preto, SP¹; Department of Biochemistry and Immunology, USP, Ribeirão Preto, SP²; Center for Applied Toxinology, Butantan Institute, São Paulo, SP³.

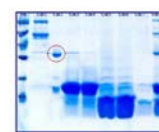
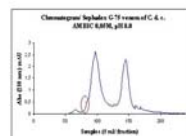
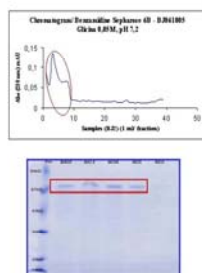
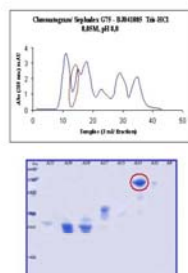
Snake venom serine proteinases (SVSPs) belong to the trypsin/chymotrypsin subfamily of enzymes, share high sequence identities (50-70%) and are highly specific in relation to the macromolecular substrates with which they interact. These enzymes are glycosylated to varying degrees and interfere in the control, regulation and maintenance of the hemostatic system by interacting with the enzymes of the coagulation cascade and the fibrinolytic feedback system. Procoagulant SVSPs have received much attention due to their potential clinical applications since they are capable of converting fibrinogen to fibrin by the specific cleavage of fibrinopeptide A (A α 1-16) from the N-terminal portion of the A α -chain. These SVSPs are also referred to as thrombin-like enzymes because they form a non-cross linked “soft clot” that is rapidly eliminated from the circulatory system by the fibrinolytic mechanism resulting in a defibrinogenating effect. On the other hand, PA-BJ isolated from the venom of *Bothrops jararaca* possesses platelet aggregating activity. With the aim of understanding the specificities of SVSPs and the role of the carbohydrate moieties, we have recently solved the crystal structure of the protein C activator from the venom of *Agkistrodon contortrix contortrix* and now extend our study to include the development of experimental techniques for the establishment of large-scale purification of SVSPs from the venoms of *Bothrops jararaca*, *Crotalus durissus terrificus* and *Crotalus durissus collilineatus* that exhibit fibrinogen-clotting and platelet aggregating activities. The purification procedures involved a combination of gel filtration, ion-exchange and affinity chromatography (benzamidine-sepharose 4 fast flow). After each step, the specific activity of the enzymes was monitored and the purity of the samples was confirmed by silver stained SDS-PAGE gels and mass spectrometry. Crystals suitable for the determination of the crystal structures have been obtained and diffraction data has been collected.

Acknowledgements: This research was supported by grants from FAPESP, SMOLBNet, CEPID, CNPq and CAPES/DAAD.

High Yield Purification and Characterization of Fibrinogen Converting Enzymes from Snake Venoms.

D.G.L. Oliveira¹, A.C.O. Cintra², S.M.T. Serrano³ and R. K. Arn^{1,3}. Department of Physics, IBILCE/ UNESP, São José do Rio Preto, SP¹; Department of Biochemistry and Immunology, USP, Ribeirão Preto, SP²; Center for Applied Toxinology, Butantan Institute, São Paulo, SP³.

Snake venom serine proteinases (SVSPs) belong to the trypsin/chymotrypsin subfamily of enzymes, share high sequence identities (50-70%) and are highly specific in relation to the macromolecular substrates with which they interact. These enzymes are glycosylated to varying degrees and interfere in the control, regulation and maintenance of the hemostatic system by interacting with the enzymes of the coagulation cascade and the fibrinolytic feedback system. Procoagulant SVSPs have received much attention due to their potential clinical applications since they are capable of converting fibrinogen to fibrin by the specific cleavage of fibrinopeptide A (A α 1-16) from the N-terminal portion of the A α -chain. These SVSPs are also referred to as thrombin-like enzymes because they form a non-cross linked “soft clot” that is rapidly eliminated from the circulatory system by the fibrinolytic mechanism resulting in a defibrinogenating effect. With the aim of understanding the specificities of SVSPs and the role of the carbohydrate moieties, we have recently solved the crystal structure of the protein C activator from the venom of *Agkistrodon contortrix contortrix* and now extend our study to include the development of experimental techniques for the establishment of large-scale purification of SVSPs from the venoms of *Bothrops jararaca*, *Crotalus durissus terrificus* and *Crotalus durissus collilineatus* that exhibit fibrinogen-clotting and platelet aggregating activities.

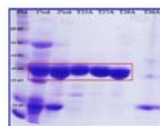
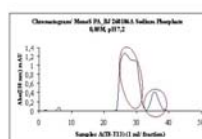
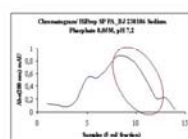


O veneno bruto de *Crotalus durissus collilineatus* foi aplicado em coluna de filtração em gel e as frações são observadas em SDS-PAGE. Tais frações foram submetidas a testes de atividade para identificação da fração correspondente a serino protease.

The first chromatographic step to obtain a purified serine-proteinase from crude venom of *Bothrops jararaca* consisted of gel filtration chromatography. The fractions were then applied to a benzamidine affinity resin for further identification of the fraction corresponding to the serine-proteinase. The protein has a molecular weight of 67 kDa, which is above the expected range (25-35 kDa) of molecular weights observed for known serine-proteinases.

Fibrinogen-clotting assay

Samples	Clotting time		
	Enzymatic Inhibitors	(Sample + EDTA)	(Sample + PMSF)
Crude Venom	43 sec	2 min 13 sec	1 min 09 sec
Cdc1	-	-	-
Cdc2	14 sec	25 sec	43 sec
Cdc3	1 min 18 sec	-	2 min 40 sec
Cdc4	2 min 25 sec	-	7 min 35 sec
Cdc5	-	-	-
Cdc6	-	-	-
Cdc7	-	-	-



A BA-BJ de *Bothrops jararaca* foi purificada em duas etapas de cromatografia de troca iônica. Utilizando no primeiro passo do processo de purificação coluna catiônica HiPrep™ 16/10 SP Sepharose XL e no passo subsequente a coluna catiônica Mono S. A proteína conforme observada em gel de SDS-PAGE, apresenta um peso molecular de 30 kDa.

Dentre as frações obtidas por filtração em gel, a fração Cdc2 apresentou alta atividade fibrinolítica e inibição na presença de PMSF. Comportamento característico de serino-protease.

Caseinolytic Activity

Sample	Abs (280 nm)
Crude Venom	0.1743
Cdc1	0.1579
Cdc2	0.0974
Cdc3	-0.0198
Cdc4	-0.0185
Cdc5	-0.0167
Cdc6	-0.0139
Cdc7	-0.0163

Chromogenic assay

Samples	Abs (415 nm)
Crude Venom	0.0273
Cdc1	0.0002
Cdc2	0.1128
Cdc3	0.0104
Cdc4	0.0070
Cdc5	0.0078
Cdc6	0.0003
Cdc7	0.0099

Para o teste de atividade caseinolítica as amostras Cdc1 e Cdc2 apresentaram maior atividade, mas confrontando os dados do teste de atividade fibrinolítica e ensaio cromogênico, cuja atividade amidolítica foi maior na fração Cdc2, pode-se concluir que a fração Cdc2 é a serino-protease isolada de veneno de *Bothrops jararaca*.





S I M C R O
2 0 0 6

Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins
de 18 a 20 de outubro – Hotel Colina Verde – São Pedro, SP

Fractioning and functional characterization of whole venom of *Crotalus durissus terrificus* and *Crotalus durissus collilineatus*

D.G.L. Oliveira¹, A.C.O. Cintra² and R. K. Arni^{1,3}.

E-mail: daniella@webmail.ibilce.unesp.br

Department of Physics, IBILCE/ UNESP, São José do Rio Preto, SP¹; Department of Biochemistry and Immunology, USP, Ribeirão Preto, SP²; Center for Applied Toxinology, Butantan Institute, São Paulo, SP³

Proteinases carry out a large variety of functions interfering with hemostatic and inflammatory pathways. Advances in analytical techniques have demonstrated that serine proteinases are highly specific and selective and active a number of enzymes.

Snake venom serine proteinases (SVSPs) belong to the trypsin subfamily of enzymes, share high sequence and structural similarities (50-70%) and are highly specific in relation to the macromolecular substrates with which they interact. They are responsible for the complex processes involved in the normal physiology of the cell as well as in abnormal pathophysiological conditions.

This work presents the purification of serine proteinases from the crude venom of *C. d. collilineatus* (yellow venom) and *C. d. terrificus* (white venom) using gel filtration chromatography on Sephadex G-75 column followed by ion-exchange chromatography using an ES 502 N column in a HPLC system. Both purified enzymes migrated as a single protein band corresponding to a molecular mass of 33 KDa in SDS_PAGE gels and are capable of converting fibrinogen to fibrin by the specific cleavage of fibrinopeptide A (A₁₋₁₆) from the N-terminal portion of the A_α-chain. These SVSPs are also referred to as thrombin-like enzymes because they form a non-cross linked “soft clot” that is rapidly eliminated from the circulatory system by the fibrinolytic mechanism resulting in a defibrinogenerating effect. Giroxins the SVSPs from these venoms presents low toxicity do not cause hemorrhage and induces moderate levels of edema and are highly coagulant (dose 1,2 g/ L) compared to the crude venom.

These serine proteases are currently used both clinically and as diagnostic tools and possess. Functional characterization will provide further information on the specificity of these enzymes.

Acknowledgements: This research was supported by grants from FAPESP, SMOLBNet, CEPID, CNPq and CAPES/DAAD. DGLO is the recipient of a FAPESP fellowship.

Fractioning and functional characterization of the whole venom of *Crotalus durissus terrificus* and *Crotalus durissus collilineatus*

D.G.L. Oliveira¹, A.C.O. Cintra² and R. K. Ami^{1,3}. Department of Physics, IBILCE/ UNESP, São José do Rio Preto, SP¹; Department of Clinical, Toxicological, and Bromatological Analysis, FCFRP/USP, Ribeirão Preto, SP²; Center for Applied Toxinology, Butantan Institute, São Paulo, SP³.

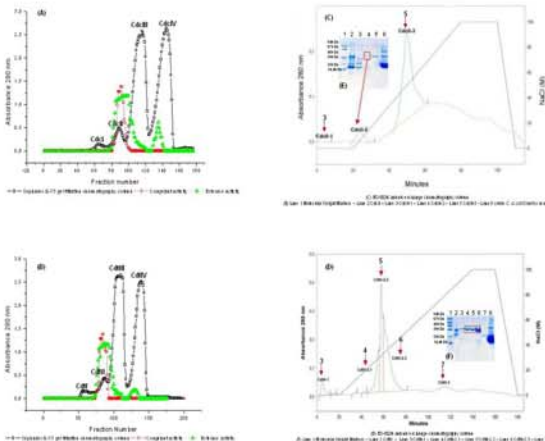
Scope

Proteinases carry out a large variety of functions and interfere with the hemostatic and inflammatory pathways. Advances in analytical techniques have demonstrated that serine proteinases are highly specific and selective and activate a number of enzymes.

Snake venom serine proteinases (SVSPs) belong to the trypsin subfamily, share high sequence and structural similarities (50-70%) and are highly specific in relation to the macromolecular substrates with which they interact. They are responsible for the complex processes involved in the normal physiology of the cell as well as in abnormal pathophysiological conditions.

These SVSPs are also referred to as thrombin-like enzymes because they form a non-cross linked “soft clot” that is rapidly eliminated from the circulatory system by the fibrinolytic system resulting in a defibrinogenating effect. These serine proteases are currently used both clinically and as diagnostic tools. Functional characterization will provide further information on the specificity of these enzymes.

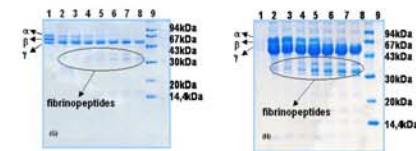
Purification and Characterization of SVSPs from *Crotalus collilineatus* and *Crotalus durissus terrificus*



First step: The crude *C. d. collilineatus* (A) or *C. d. terrificus* (B) venoms (100 mg) were dissolved and applied to a Sephadex G-75 column pre-equilibrated with the forementioned 0.05 M ammonium formate buffer (pH 3.0) at a flow rate of 30 mL/h. Fractions showing highest esterase and coagulant activity (A and B) were pooled (Table 1).

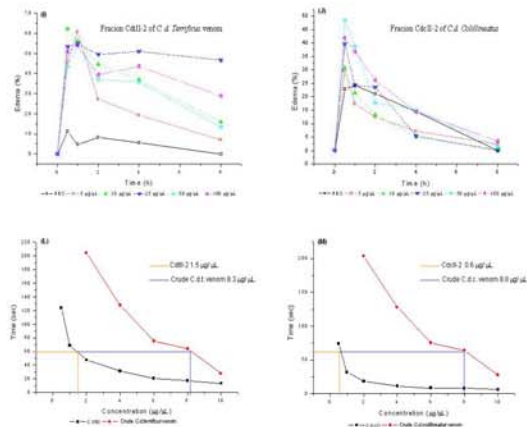
Second step: The dialyzed fractions CdtII and CdcII were further subjected to ion-exchange chromatography on an ES-502N column in a HPLC system. The column was equilibrated with 0.05 M ammonium bicarbonate buffer (pH 8.0) and the proteins were eluted with an 0–0.5 M ammonium bicarbonate linear gradient and a 0.8 ml/min flow rate. Both purified enzymes migrated as single protein bands (Gel E, Lane 4 and Gel F, Lane 4; Lane 5, Lane 6) corresponding to a molecular masses of 33 KDa in SDS PAGE gels.

Fibrinolytic Activity



(G) CdtII-2 and (H) CdcII-2 showed a similar action on fibrinogen. The two fractions, in different concentrations, made the cleavage of fibrinogen into both chains α and β , liberating fibrinopeptides A α preferentially.

Minimum Coagulant Dose and Edematogenic Activity



The SVSPs from these venoms present low toxicity, do not cause hemorrhage and induce moderate levels of edema (I and J). CdcII-2 fraction presents high coagulant activity (M) (dose 0.6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) compared with the crude venom CdtII-2 fraction. Observing the results of the edematogenic activity for the samples CdtII-2 and CdcII-2, the fraction of the *C. d. Terrificus* venom (“white”) is more active than the *C. d. Collilineatus* venom fraction (“yellow”). Otherwise, CdcII-2 shows a higher minimum coagulant dose activity compared to the CdtII-2 fraction.

Table 1. Hemolytic, coagulant and esterase activities of venom fractions.

	Indirect hemolytic activity	Coagulant activity	Esterase activity
<i>C. d. terrificus</i> venom			
CdtI	+	+	+
CdtII	+	+	+
CdtIII	+	+	+
CdtIV	+	+	+
CdtV	+	+	+
CdtVI	+	+	+
CdtVII	+	+	+
CdtVIII	+	+	+
CdtIX	+	+	+
CdtX	+	+	+
CdtXI	+	+	+
CdtXII	+	+	+
CdtXIII	+	+	+
CdtXIV	+	+	+
CdtXV	+	+	+
CdtXVI	+	+	+
CdtXVII	+	+	+
CdtXVIII	+	+	+
CdtXIX	+	+	+
CdtXX	+	+	+
<i>C. d. collilineatus</i> venom			
CclI	+	+	+
CclII	+	+	+
CclIII	+	+	+
CclIV	+	+	+
CclV	+	+	+
CclVI	+	+	+
CclVII	+	+	+
CclVIII	+	+	+
CclIX	+	+	+
CclX	+	+	+
CclXI	+	+	+
CclXII	+	+	+
CclXIII	+	+	+
CclXIV	+	+	+
CclXV	+	+	+
CclXVI	+	+	+
CclXVII	+	+	+
CclXVIII	+	+	+
CclXIX	+	+	+
CclXX	+	+	+

Acknowledgements: This research was supported by grants from FAPESP, SMOLBNet, CEPID, CNPq and CAPES/DAAD.

DGLO is the recipient of a FAPESP fellowship.



Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)