

Purificação e Caracterização de uma Enzima Trombina-símile do Veneno de *Pseudechis australis*.

Erika Yumi Matsusaki, Patrick Jack Spencer
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN

INTRODUÇÃO

Os venenos ofídicos são os fluídos secretórios mais concentrados de que se tem conhecimento [1]. São compostos por cerca de 90% de proteínas e peptídeos com um vasto leque de atividades biológicas. Alguns destes compostos tem aplicações biotecnológicas, e/ou farmacológicas sendo que já existem no mercado ou em teste vários medicamentos derivados de venenos como o anti-hipertensivo Captopril e seus derivados, e o batroxobin, utilizado em distúrbios da coagulação.

Existe interesse em enzimas trombina-símile para o desenvolvimento de fármacos que possam ser utilizados para depletar o fibrinogênio durante processos cirúrgicos. Estudos preliminares do veneno de *Pseudechis australis* evidenciaram a existência desta enzima.

OBJETIVO

Purificar e caracterizar serino-proteinases provenientes do veneno de *Pseudechis australis*, com potencial farmacológico.

METODOLOGIA

Foi utilizado o veneno fornecido por Peter Mirtschin (Venom Supplies, Austrália). Para a purificação do veneno foram realizados três métodos, utilizando como Tampão de retenção Tris-HCl 50mM e diferentes concentrações de NaCl e Tampão de eluição glicina com diferentes concentrações em pH3. Também houve

a variação de resinas na coluna cromatográfica.

A avaliação da pureza foi realizada por SDS-PAGE 12,5%, as proteínas obtidas foram comparadas com um padrão de peso molecular. E a caracterização da atividade enzimática foi realizada pelo método de Furukawa e Hayashi [2] modificado para microplaca utilizando veneno de *Bothrops jararacussu* como controle positivo.

RESULTADOS

A Figura 1 retrata o cromatograma do veneno de *P. australis*, utilizando o tampão Tris HCl 50mM/NaCl 150 mM pH8. Observam-se dois picos bem distintos

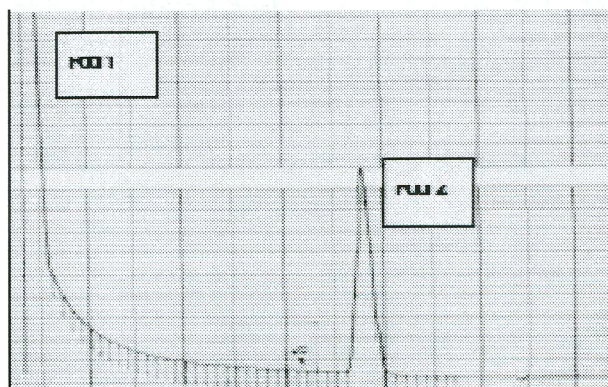


Figura 1: Purificação de *P. australis* em benzamidina comercial. Pool 1 refere-se a fração não retida e o Pool 2 refere-se a fração eluída.

Analizamos a pureza através de SDS-PAGE (Figura 2). em diferentes corridas cromatográficas utilizando o tampão 50mM Tris HCl/150mM NaCl pH8. Nota-se que o veneno possui um conjunto de proteínas com afinidade por benzamidina.

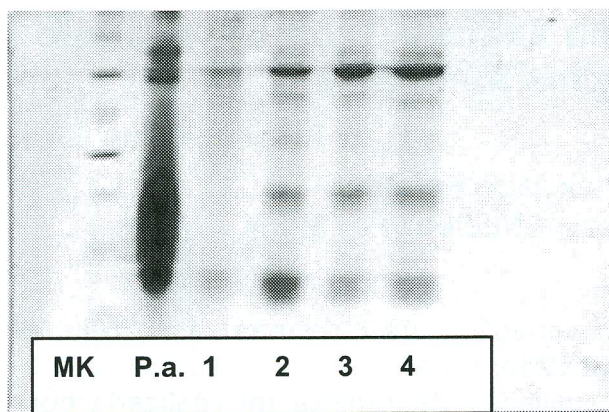


Figura 2: MK- Marcador de peso molecular. P.a.- Veneno total de *Pseudechis australis*. 1-4- Frações retidas do veneno de *Pseudechis australis*, obtidas em diferentes cromatografias.

A Tabela 1 demonstra a prevalência da atividade trombina-símile na fração retida. Observa-se uma atividade superior àquela do controle positivo (veneno de *Bothrops jararacussu*).

Tabela 1: Atividade fibrinogenolítica das frações.

Δt	Branco	C+	Não Retido	Retido
20'	0,093	0,044	0,046	0,150
40'	0,113	0,048	0,047	0,182
60'	0,111	0,056	0,050	0,200

CONCLUSÕES

Os nossos dados indicam que o melhor método para a purificação da serinoprotease é utilizar a coluna de benzamidina comercial. No entanto, apesar da seletividade teórica da resina, é possível observar a presença de vários contaminantes tornando necessário outro passo cromatográfico.

O experimento da atividade fibrinolítica adaptado para microplaca permite economia de material, tempo e ainda fornece maior sensibilidade, uma vez que a leitura é realizada por métodos espectrofotométricos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] STOCKER, K. F. *Medical use of snake venom proteins*. CRC press.1990
- [2] FURUKAWA, Y., HAYASHI, K. (1977). Factor X converting and trombin-like activities of *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon*, 15:107-114.

APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

PIBIC/CNPq