

Serinoproteases do Veneno de *Crotalus durissus terrificus*: Atividade na Proliferação de Células Endoteliais

Vanessa Danielle Magalhães e Maria Aparecida P Camillo
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN

INTRODUÇÃO

Nos venenos de serpentes as serino proteases são componentes preservados ao longo da evolução e são encontradas em espécies de todos os continentes. São denominadas SVSP - *snake venom serine proteases*; participam na captura e digestão da presa e, em geral não são os componentes de maior toxicidade do veneno. Algumas SVSPs reproduzem muitas das atividades da trombina como por exemplo, sua ação na hemostasia. Esta atividade é responsável por um dos sintomas mais críticos nos pacientes picados por serpentes [Camillo et al.,2001].

A trombina estimula a angiogênese *in vivo* e a formação e diferenciação das células endoteliais em estruturas capilares em ensaio *in vitro* (Haralabopoulos et al.,1997). O mecanismo pelo qual a trombina induz a angiogênese ainda é pouco conhecido.

A angiogênese é um fator importante no sucesso do tratamento de pacientes que necessitem da reposição de tecidos como, por exemplo, em casos de queimados, radioacidentados etc. As opções de tratamento variam entre aloenxertos, autoenxertos e outros substituintes dérmicos.

A associação de um fator que acelere a vascularização do substituto dérmico é um significativo ganho na qualidade do tratamento, pois a vascularização é a responsável pela nutrição e oxigenação das células que irão refazer a pele (derme e epiderme) do paciente, promovendo a cicatrização da ferida.

OBJETIVO

Identificar componentes do veneno da cascavel brasileira *Crotalus durissus terrificus* capazes de induzir a proliferação de células endoteliais.

METODOLOGIA

Fracionamento do veneno. O veneno de *Crotalus durissus terrificus* foi gentilmente doado pelo Instituto Butantan. O veneno foi fracionado em Superdex-75, que separa as amostras por tamanho molecular. O eluente foi tampão formiato de amônio 100mM pH3,0; fluxo de 05,mL/min e detecção da eluição pela absorvância em 280 nm. Análises das proteínas. A concentração protéica das frações foi medida com o método de microBradford. Em seguida, alíquotas de 100 µg foram secas em centrifuga liofilizadora. A composição de cada fração foi analisada em eletroforese em gel de poliacrilamida 15%, em sistema descontínuo de tampões. A atividade enzimática (serinoprotease) foi pesquisada nas frações com o ensaio colorimétrico utilizando TAME como substrato [Camillo et al.,2001].

Cultura de células endoteliais. As células endoteliais (ECV-304) foram cultivadas em meio RPMI com 10% soro fetal bovino (SFB), antifúngico, antibiótico e glutamina, a 37°C com 5% CO₂. Para o ensaio de proliferação celular a cultura foi sincronizada em G₀ da mitose, com a retirada do SFB do meio por 24 horas.

Proliferação celular. Foram semeadas 3000 cels/poço (em placa de 96); após terem aderido e estarem sincronizadas,

receberam o meio de cultura não modificado (com SFB) e contendo 10µg de cada fração, em quadruplicata. O ensaio foi incubado por 72 horas e revelado com o método colorimétrico que utiliza o MTS como indicador de viabilidade celular.

RESULTADOS

O cromatograma de eluição do veneno crotálico foi dividido em 21 frações. A análise em eletroforese evidenciou a presença de diversos componentes protéicos em cada fração.

A comparação das curvas de crescimento das células endoteliais ECV-304 (Figura 1) comprova que na ausência de SFB as células param a mitose, permanecendo na fase G₀.

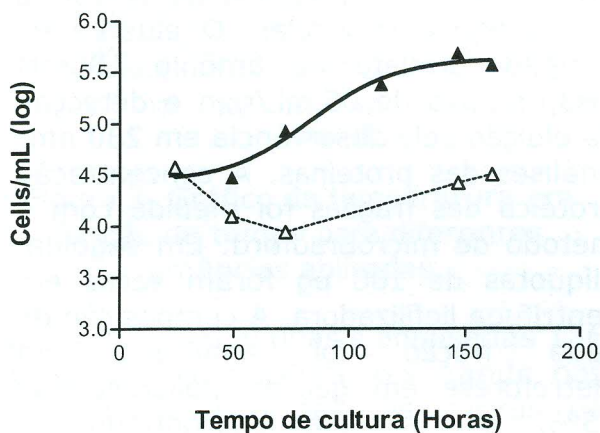


Figura 1: Curvas de crescimento das células ECV-304 em meio com (-▲-) e sem (-Δ-) SFB (soro fetal bovino).

O ensaio de proliferação celular permitiu identificar duas frações com atividade importante; #5 e #11 ultrapassaram os 100% de viabilidade (Figura 2).

Destas frações apenas a #5 possui atividade compatível com uma serino

protease, podendo tratar-se de uma SVSP.

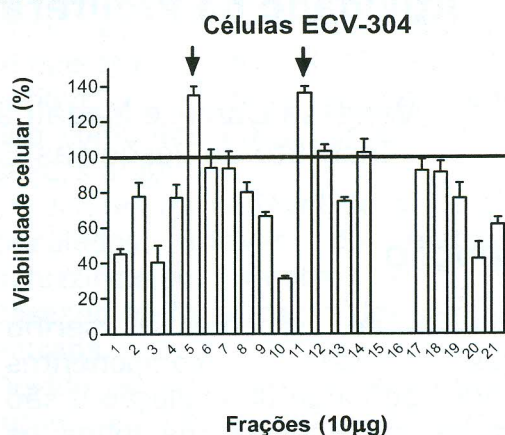


Figura 2: Comparação da proliferação de células endoteliais em cultura sobre ação de diversas frações do veneno crotálico. As frações que tiveram uma significativa atividade na indução da proliferação celular estão indicadas com as setas.

CONCLUSÕES

Nesta etapa do trabalho foi possível identificar no veneno crotálico componentes capazes de induzir a proliferação de células endoteliais em cultura e iniciar a caracterização destas proteínas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] CAMILLO, M.A.P.; ARRUDA PAES, P.C.; TRONCONE, L.R.P.; ROGERO, J.R. *Toxicon* v.39, p.843-853, 2001
- [2] HARALABOPOULOS GC, GRANT DS, KLEINMAN HK, MARAGOUDAKIS ME. *Am J Physiol.* 273(1 Pt 1):C239-45, 1997

APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

Bolsa CNPq-PIBIC