

Isolamento e caracterização de peptídates do veneno de *Pseudechis australis*

Gustavo Gimenez Freitas e Patrick Jack Spencer
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN

INTRODUÇÃO

Os venenos de serpentes peçonhentas representam uma mistura muito rica em compostos orgânicos e inorgânicos. Dentre os compostos inorgânicos estão o íons metálicos e sua composição orgânica inclui carboidratos (glicoproteínas), lipídeos (fosfolipídeos), aminas biogênicas, aminoácidos e nucleotídeos. A maior parte dos compostos presentes nos venenos das serpentes é formada por proteínas que são 90-95% do peso seco do veneno [1]. Entre delas destacam-se as peptidases (serino e metalopeptidases). Várias peptidases isoladas de venenos ofídicos estão sendo usadas para fins terapêuticos, dentre as quais serinopeptidases, como o Batroxobin® e o Ancrod® utilizados como anticoagulantes em cirurgias cardíacas. A batroxobina, uma enzima trombina símile encontrada no veneno de *Bothrops atrox*, usada no tratamento de doenças trombóticas [2]. Dessa forma produz uma rede flexível de ligações não cruzadas que é rapidamente removida do sistema circulatório pelo sistema fibrinolítico resultando em um efeito final desfibrinante.

Ainda que já existam enzimas do veneno de serpentes com aplicação na regulação da cascata da coagulação, vários laboratórios têm buscado novas alternativas de venenos que apresentem atividade na hemostasia, a fim de obtenção de produtos farmacológicos ainda não investigados com potencial terapêutico. Destacam-se, para este fim, as serpentes australianas do gênero elapidae, pois seu veneno apresenta uma alta quantidade de proteínas pro-coagulantes (5-40% do total) com propriedades similares ao

complexo enzimático macromolecular encontrado no sangue [3]. Este complexo consiste em uma serinopeptase fator Xa (FXa) e cofator Va ligados a superfície de membrana aniônica que converte rapidamente a protrombina em trombina atuando posteriormente como uma enzima-chave na regulação para a formação do tampão hemostático [4].

Com o advento das técnicas bioquímicas mais sensíveis e precisas, como espectrometria de massa, resinas cromatográficas de alta resolução e detectores ultravioleta mais sensíveis, tornou-se possível identificar e caracterizar componentes minoritários dos venenos que antes, devido a sua baixa concentração e/ou baixa resolução dos sistemas de purificação, passavam despercebidos.

OBJETIVO

Isolar e caracterizar metalopeptidases do veneno de *Pseudechis australis*.

METODOLOGIA

1. Veneno

O veneno utilizado neste trabalho foi oriundo do banco de venenos do Centro de Biotecnologia do IPEN, ou cedidos pela empresa *Venom Supplies* (Austrália) com a qual temos colaboração formal.

2. Purificação

Baseados em "screening" anteriores realizados pelo grupo, para a obtenção de peptidases derivadas do veneno de *Pseudechis australis*.

2.1. Cromatografia de troca aniônica

O veneno bruto (30 mg) foi dissolvido em 1 mL de tampão tris 25 mM pH 8,5 e centrifugado. O sobrenadante foi então

injetado em uma coluna Mono-Q 5/50 (GE-healthcare) com um fluxo de 1 mL/minuto e um gradiente de 0 a 1 M de NaCl em 20 minutos. Foram coletados 1 mL tubo.

3. Dosagem proteica

A dosagem proteica foi realizada pelo método de Bradford [5].

4. Eletroforese SDS-PAGE 10%

Géis preparados dos produtos de: água destilada, poliacrilamida 30% (29,2g de acrilamida e 0,8 g de bisacrilamida), persulfato de amônio, TEMED e SDS 10% com tampão de resolução (12,1g de tris, pH 8,8, ajuste do pH com HCl e q.s.p 100mL) ou tampão de empilhamento (6,0g de tris, pH 6,8, ajuste do pH com HCl e q.s.p 100mL)

5. Zimografia

A realização do ensaio zimográfico utiliza a mesma metodologia do experimento SDS-PAGE 12% para o preparo do gel e da corrida eletroforética. Entretanto, durante o preparo do gel, é diluído o substrato (gelatina ou caseína) para que seja degradado pela amostra a ser analisada.

RESULTADOS

A utilização do método de cromatografia de troca iônica, foram obtidos 6 picos. Foram utilizados 30mg do veneno de *Pseudechis australis* diluídos em tampão Tris 25 mM pH 7,4 para corrida cromatográfica de Troca Aniônica com um gradiente de eluição crescente de Tris 25 mM + NaCl 1 M utilizando a coluna MonoQ 50/5. Observou-se que no final do procedimento, a obtenção de 5 picos após o início do gradiente e 1 pico de 'não-retidos' antes do início do gradiente. Findo o fracionamento, os picos obtidos foram analisados por eletroforese em gel (SDS-PAGE) visando estimar a pureza e massa molecular utilizando um padrão (figura 2) e, em seguida, o teste de zimografia feito com gelatina em sua composição (figura 3). Confirmando a presença de peptidases nos picos 2 e 3 também em etapas subsequentes, como a análise com azo-

caseína em placa de microtitulação diluído em Tris-HCl 10 mM + NaCl 100 mM pH 7,6.

CONCLUSÕES

A abordagem utilizada permitiu segregar a atividade proteolítica em dois picos distintos o que facilitará etapas posteriores de purificação. Houve significativo ganho de tempo nos ensaios cromatográficos após a transição da cromatografia de gel filtração pela técnica de troca iônica, já que em etapas anteriores do projeto, foram feitas tentativas com outras técnicas de purificação. Com a mudança de estratégia, foi verificada a obtenção de picos distintos com uma atividade detectável, algo promissor. Os ensaios pós-fracionamento evidenciam que a técnica utilizada não aboliu a atividade, possibilitando assim o desenvolvimento das etapas futuras de isolamento da toxina de interesse.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Markland FS. Snake venoms and hemostatic system. **Toxicon**. 1998;36:1749-1800.
- [2] Kisiel W, Kondo S, Smith KJ, McMullen BA, Smith LF. Characterization of a protein C activator from *Agkistrodon contortrix contortrix* venom. **J Biol Chem**. 1987;15(26):12607-613.
- [3] Speijer H, Govers-Riemslog JW, Zwaal RF, Rosing J. Prothrombin activation by an activator from the venom of *Oxyuranus scutellatus* (Taipan snake). **J. Biol. Chem**. 1986, 261, 13258-13267.
- [4] Mann KG, Nesheim ME, Church WR, Haley PE, Krishnaswamy S. Surface
- [5] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**. 1976;72:248-54.

APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

PIBIC/CNPq