

# Isolamento e caracterização de metalopeptídates do veneno de *Crotalus durissus terrificus*

Ighor Gomes Chaves e Patrick Jack Spencer  
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN

## INTRODUÇÃO

Os venenos ofídicos são constituídos por secreções produzidas em glândulas especializadas que tem como principal função natural dominar, paralisar, e/ou matar potenciais presas. Essas secreções são complexas, constituída em sua grande parte por proteínas (grande variedade de enzimas), peptídeos, toxinas não-enzimáticas e proteínas não-tóxicas. Já foram descritas na literatura, além das proteínas, miotoxinas, fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), lectinas, serino-proteases, L-amino-oxidases, metalopeptidases (SVMP). [1,2]. As SVMPs formam uma família poligênica de enzimas, encontradas em grande quantidade no veneno da maioria dos viperídeos, principalmente em serpentes do gênero *Bothrops* sp. e são capazes de interagir com diferentes alvos moleculares que controlam funções fisiológicas da presa e/ou predador, como exemplo, a hemostasia. No local da picada, induzem a formação de hemorragia, edema, mionecrose, bolhas, dermonecrose e reação inflamatória, além dos efeitos sistêmicos [3]. Recentemente, Melani e colaboradores (2015), utilizando diferentes abordagens proteômicas, identificaram essas toxinas hemorrágicas (SVMPs) no veneno *Crotalus durissus terrificus* (cascavel brasileira), evidenciando seu potencial neurotóxico e miotóxico; os sintomas locais causados pelo envenenamento são menos expressivos. Em experimentos iniciais, o nosso grupo de pesquisa de venenos do Centro de Biotecnologia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares identificou e purificou parcialmente metalopeptidases do veneno de *C. d. terrificus*. No entanto, o papel destas enzimas no quadro clínico ainda não foi descrito na literatura. O presente projeto visa isolar e caracterizar estas enzimas.

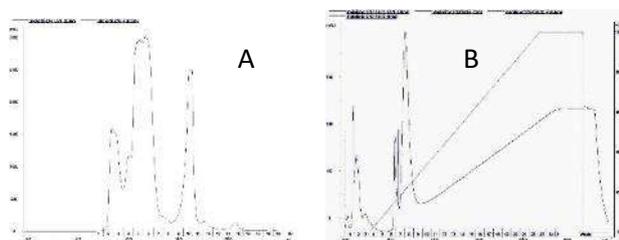
## OBJETIVO

Isolar e caracterizar metalopeptidases do veneno de *Crotalus durissus terrificus*.

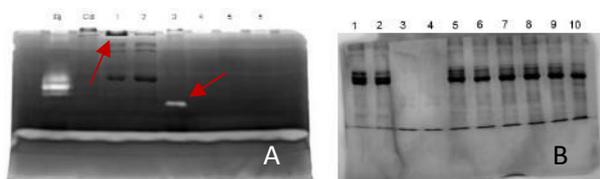
## METODOLOGIA

Para o início do isolamento da proteína a ser caracterizada, primeiramente a amostra foi analisada por cromatografia de exclusão molecular (Superdex 75 10/300 GL) no sistema ÄKTA ambientado com tampão fosfato-salina (PBS) pH 7,3. As amostras foram diluídas em tampão PBS e aplicadas no equipamento. As frações foram coletadas de acordo com os picos resultantes. Uma segunda cromatografia de exclusão por afinidade a metal (HiTrap IMAC) foi ambientada com 1mL de zinco bivalente para isolar as metalopeptidases obtidas na primeira etapa cromatográfica. A coluna foi eluída com imidazol e as frações da eluições foram coletadas e armazenadas a -80 °C. Para a análise da purificação da amostra fracionadas pelas cromatografias, foram realizados ensaios de eletroforese em gel de poli(acrilamida) (SDS-PAGE) a 10% em condições não reduzidas, corando com Coomassie Blue – G. Foram realizados três ensaios para a caracterização da proteína,: um ensaio zimográfico, utilizando gelatina como substrato a ser degradado pela amostra; análise de atividade fibrinogenolítica, para demonstrar em diferentes períodos a clivagem das cadeias monoméricas alfa, beta e gama e concentração por meio de precipitação com ácido tricloroacético (TCA) 15% visando concentrar a amostra, a fim de detectar eventuais contaminantes minoritários em um SDS-PAGE, que não seriam identificados na amostra diluída.

## RESULTADOS



**FIGURA 1 – (A).** Análise cromatográfica de gel filtração do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*. **(B).** Análise cromatográfica por afinidade a Zinco do 3º pico da gel filtração (figura 2) com uma gradiente de imidazol no decorrer da corrida



**FIGURA 2 – (A).** Análise zimográfica dos picos de interesse da cromatografia de exclusão molecular do veneno da serpente *Crotalus Durissus Terrificus* em um gel de poliacrilamida 10% com gelatina em sua composição. Bj – Veneno da serpente *Bothrops jararaca* como controle positivo. Cdt – Veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*. 1 - 1º Pico da cromatografia de exclusão molecular. 2 - 2º Pico da cromatografia de exclusão molecular. 3 - 3º Pico da cromatografia de exclusão molecular. 4 - 4º Pico da cromatografia de exclusão molecular. 5 - 5º Pico da cromatografia de exclusão molecular. 6 - 6º Pico da cromatografia de exclusão molecular. **(B).** Análise fibrinogenolítica (SDS-PAGE 10%) da banda de interesse da figura 5 (4º pico). 1- Fibrinogênio – 30'. 2- Fibrinogênio – 24hrs. 3- Amostra – 30'. 4- Amostra – 24hrs. 5- Amostra + Fibrinogênio – 30'. 6- Amostra + Fibrinogênio – 1h. 7- Amostra + Fibrinogênio – 2hrs. 8- Amostra + Fibrinogênio – 3hrs. 9- Amostra + Fibrinogênio – 4hrs. 10- Amostra + Fibrinogênio – 24hrs

## CONCLUSÕES

Foi possível concluir que há a presença de uma proteína de alta massa molecular e que possui afinidade a metal. É possível afirmar

com os ensaios zimográficos, a presença dessa enzima capaz de degradar gelatina e, mesmo com algumas bandas apresentarem pouca atividade no substrato, devido sua baixa concentração, foi identificada a presença dessa enzima com a análise da atividade fibrinogenolítica, evidenciado pela clivagem da cadeia Beta. Com esses resultados, pode-se presumir que essa enzima, apresentando diversas atividades em vários ensaios seja a metalopeptidase almejada. Estes resultados possibilitarão que por meio de mais algumas técnicas de purificação, já será possível isolar a enzima e sequencia-la.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie*, 2000, 82, pp. 841-850,. Review.
- [2] CALVETE, J. J.; FASOLI, E.; SANZ, L.; BOSCHETTI, E.; RIGHETTI, P. G. Exploring the Venom Proteome of the Western Diamondback Rattlesnake, *Crotalus atrox*, via Snake Venomics and Combinatorial Peptide Ligand Library Approaches. *J. Prot. Res.*, 2009, 8, pp. 3055-3067.
- [3] MARKLAND, F. S.; SWENSON, S. Snake venom metalloproteinases. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*, 2013, 62, pp. 3-18.
- [4] MELANI, R. D., ARAUJO, G. D. T., CARVALHO, P. C., GOTO, L., NOGUEIRA, F. C. S., JUNQUEIRA, M., DOMONT, G. B. Seeing beyond the tip of the iceberg: A deep analysis of the venome of the Brazilian Rattlesnake, *Crotalus durissus terrificus*. *EuPA Open Proteomics.*, 2015, 8, pp. 144-156.

## APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Bolsa PIBIC