

Purificação e Caracterização de uma Metaloprotease do Veneno da Serpente *Bothrops lanceolatus*

Isadora R. Sasso, Renata M. S. Terra, Antônio F. M. Pinto e Jorge A. Guimarães
Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Introdução

Bothrops lanceolatus é uma serpente endêmica da ilha de Martinica, no Caribe.

Envenenamentos causados pela picada desta serpente são frequentemente caracterizados pela ocorrência de trombose sistêmica, a qual pode levar as vítimas à morte por infarto do miocárdio, pulmonar ou cerebral.

Hemorragia e necrose raramente ocorrem, o que difere do quadro hemorrágico evidenciado nos envenenamentos por outras *Bothrops sp.* Ainda que os quadros clínicos contrastem, os venenos destas serpentes constituem uma complexa mistura de toxinas capazes de interferir no processo hemostático. Dentre estas, as metaloproteases são os componentes mais abundantes e os principais responsáveis pelo desenvolvimento dos distúrbios hemostáticos. Isto porque são capazes de ativar diversos fatores da cascata de coagulação; além de degradar proteínas da superfície de células endoteliais e de matriz extracelular (responsáveis pela integridade dos capilares).

Objetivo

O objetivo deste trabalho é isolar a enzima majoritária do veneno da serpente *Bothrops lanceolatus* e caracterizar suas funções biológicas, buscando identificar componentes determinantes para o desenvolvimento da trombose.



Métodos

Ensaio de coagulação: Plasma humano citratado (50uL) foi incubado com doses crescentes de veneno ou enzima purificada, a 37 °C. A reação foi iniciada pela adição de 10 uL de CaCl₂ 150 mM e monitorada por 30 min a 650 nm em leitor de microplacas.

Atividade amidolítica: A atividade hidrolítica sobre substratos cromogênicos foi monitorada pelo aumento de absorbância a 405 nm após adição do veneno aos substratos cromogênicos S2238 (para trombina), S2251 (para plasmina), S2302 (para calicreína), S2222 (para fator X) e BAPNA (para serinoproteases).

Purificação da enzima: A purificação da enzima majoritária foi feita através da combinação de cromatografia de interação hidrofóbica, em coluna Phenyl Sepharose, e cromatografia de troca iônica, em coluna MonoQ. As frações obtidas foram analisadas em SDS-PAGE 10% sob condições redutoras. Atividade proteolítica foi testada sobre azocaseína.

Inibição da atividade proteolítica: A fração purificada foi incubada com OPA (inibidor específico de metaloproteases), EDTA (inibidor de metaloproteases), EGTA (inibidor de metaloproteases), PMSF (inibidor específico de serino proteases) e E-64 (inibidor específico de cisteíno proteases) por 15 min a 30 °C; e, em seguida, testada a atividade proteolítica sobre azocaseína.

Ativação de protrombina: Atividade testada de duas formas: (1) pela incubação da fração parcialmente purificada com protrombina a 37 °C, por 1h, 2h, 4h e 18h com análise dos fragmentos de degradação, em SDS-PAGE 10% sob condições redutoras e (2) ensaio de atividade sobre S2238, substrato específico para trombina, gerada por proteólise, após incubação por 15 min.

Seqüência de aminoácidos: A seqüência da enzima foi obtida por LC/MS/MS.

Resultados

Substrato Cromogênico	Especificidade	Atividade (U/ug de proteína)
Bapna	Serino proteases	24,1
S-2238	Trombina	1574,3
S-2222	Fator Xa	145,6
S-2251	Plasmina	163,7
S-2444	Uroquinase	49,8
S-2302	Calicreína	576,1

U = pmols de pNA/poço/min

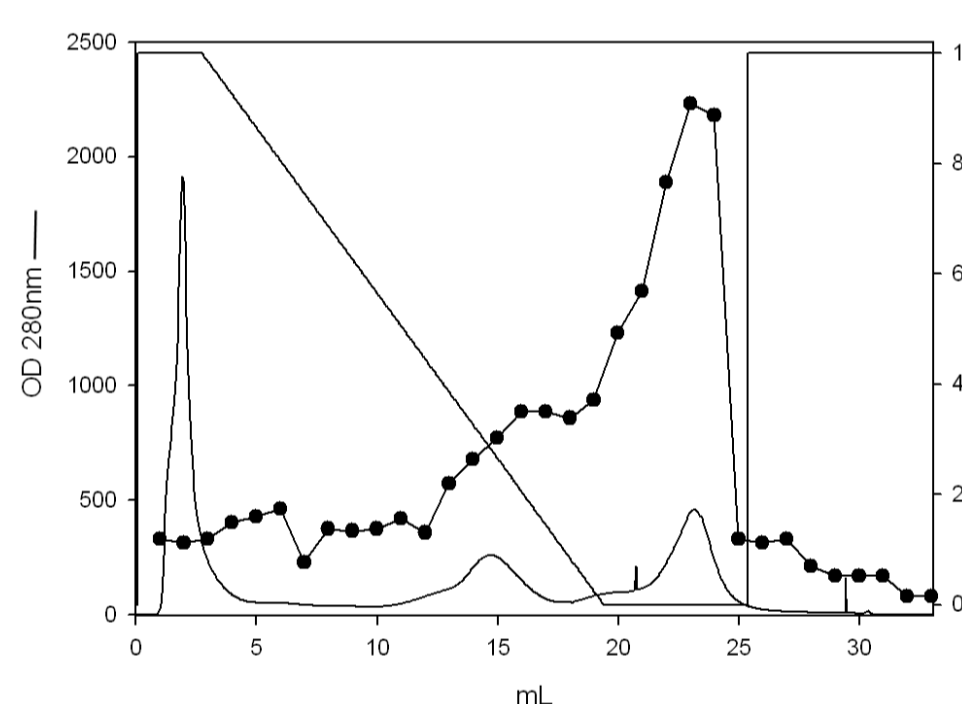


Fig. 1. Cromatografia de interação hidrofóbica. Veneno de *B.lanceolatus* fracionado em coluna de Phenyl Sepharose. Atividade proteolítica monitorada pela degradação de azocaseína.

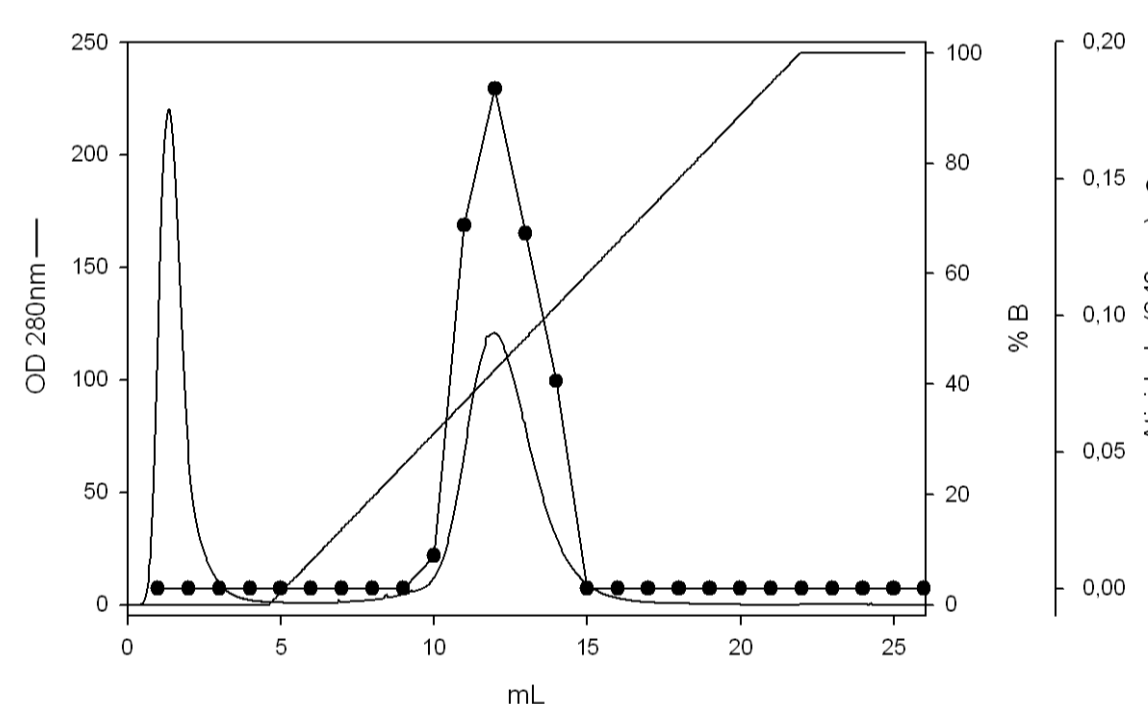


Fig. 2. Cromatografia de troca iônica. Frações 24, 25 e 26, da etapa anterior, fracionadas em coluna MonoQ. Atividade proteolítica monitorada pela degradação de azocaseína.

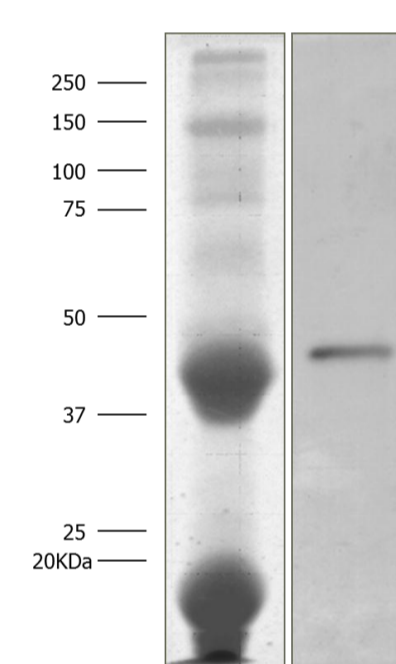


Fig. 3. SDS-PAGE 10%. Veneno bruto (6,5ug) e enzima (1,0ug), sob condições redutoras.

Tabela I - Atividade amidolítica do veneno de *B. lanceolatus* (1ug).

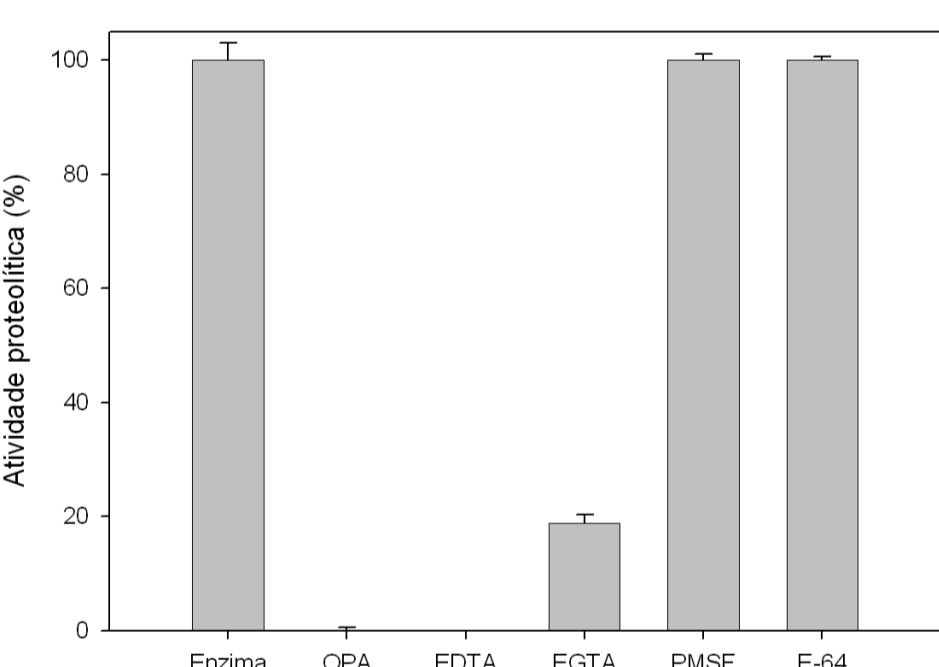


Fig. 4. Influência de inibidores sobre a atividade proteolítica. Enzima purificada incubada com OPA, EDTA e EGTA (inibidores de metaloprotease), PMSF (inibidor de serino protease) e E-64 (inibidor de cisteíno protease) por 10 min. Atividade azocaseinolítica ensaiada

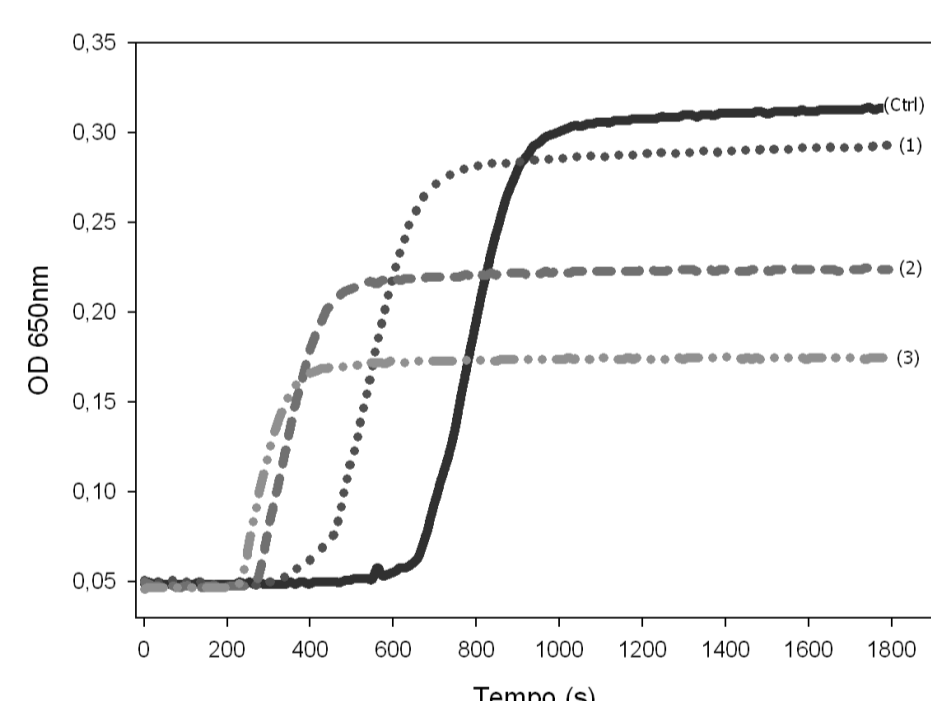


Fig. 5. Atividade pró-coagulante da enzima purificada. Plasma humano incubado com (1) 1 ug, (2) 5 ug e (3) 10 ug da enzima por 10 min. (Ctrl) Controle de plasma. Formação de coágulo monitorada, depois da adição de CaCl₂ por 30 min a 650 nm.

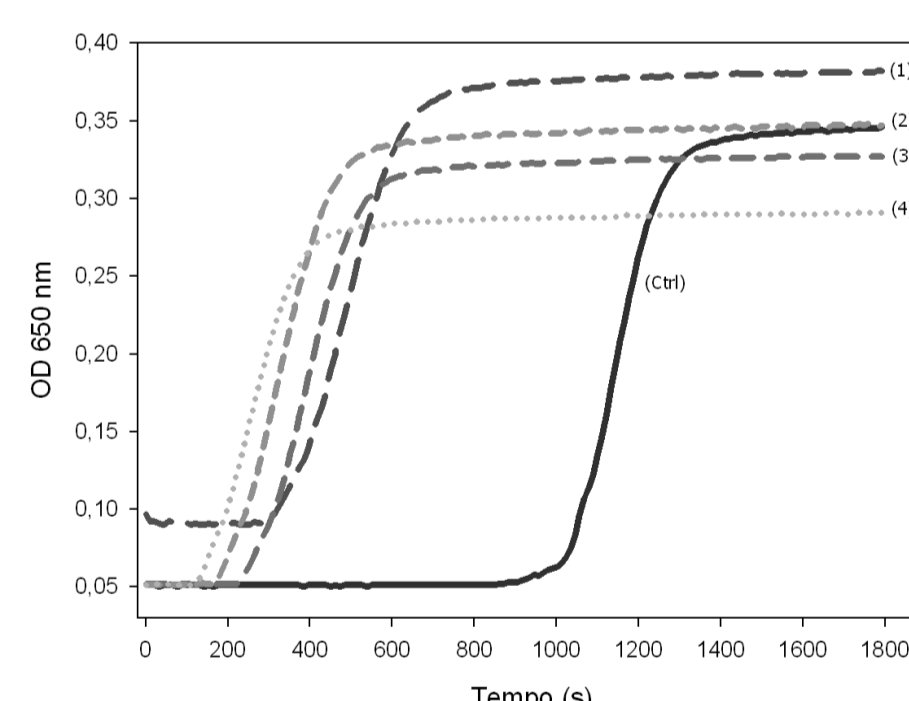


Fig. 6. Atividade pró-coagulante do veneno de *B.lanceolatus*. Formação de coágulo monitorada por 30 min a 650 nm após recalcificação. Curvas representativas de coagulação para plasma controle (Ctrl) e incubado com 0,5 ug (1), 2,5 ug (2), 1 ug (3) e 5ug (4) de veneno.

```

A T R P K G A V Q P   K Y E D A M Q Y E F   K V N G E P V V L H
L E K N K G L F S K   D Y S E I H Y S P D   G R E I T T Y P P V
E D H C Y Y H G R I   E N D A D S T A S I   S A C N G L K G Y F
K L Q R E T Y F I E   P L K L P O S E A H   A V F K Y E N V E K
E D E A P K M C G V   T O N W K S Y E P I   K K A S Q L A F T A
E Q Q R Y D P Y K Y   I E F F V V D Q G   T V T K N N G D L D
K I K A R M Y E L A   N I V N E I F R Y L   Y M H V A L V G L E
I W S N G D K I T V   K P D V D Y T L N S   F A E W R K T D L L
T R R K K H D N A Q L   L T A I D F N G P T   I G Y A Y I G S M C
H P K R S V G I V Q   D Y S P I N L V V A   V I M A H E M G H N
L G I H H D T G S C   S C G D Y P C I M G   P T I S N E P S K F
F S N C S Y I Q C W   D F I M N H N P E C   I I N E P L G T D I
I S P P V C G N E L   L E V G E E C D C G   T P E N C Q N E C C
D A A T C K L K S G   S O G G H O D G G E   Q G K F S K S G T E
C R A M S E C D P   A E H C T G O S S E   C P A D V F H K N G
Q P C L D N V C G Y C   Y N G N C P I M Y H   Q C Y A L F G A D V
Y E A E D S C F K L   N Q K N Y Y G Y C   R K E N G K K I P C
A P E D V K C G R L   Y G K D N S P G O N   N P C K M F Y S N D
D E H K G M V L P G   T K C A D G K V C S   N G H C V D V A T A
    
```

Fig. 7. Peptídeos identificados por LC/MS/MS. Identificação de 8 peptídeos da seqüência da enzima parcialmente purificada com identidade à seqüência da proteína jararagina, do veneno de *B. jararaca*.

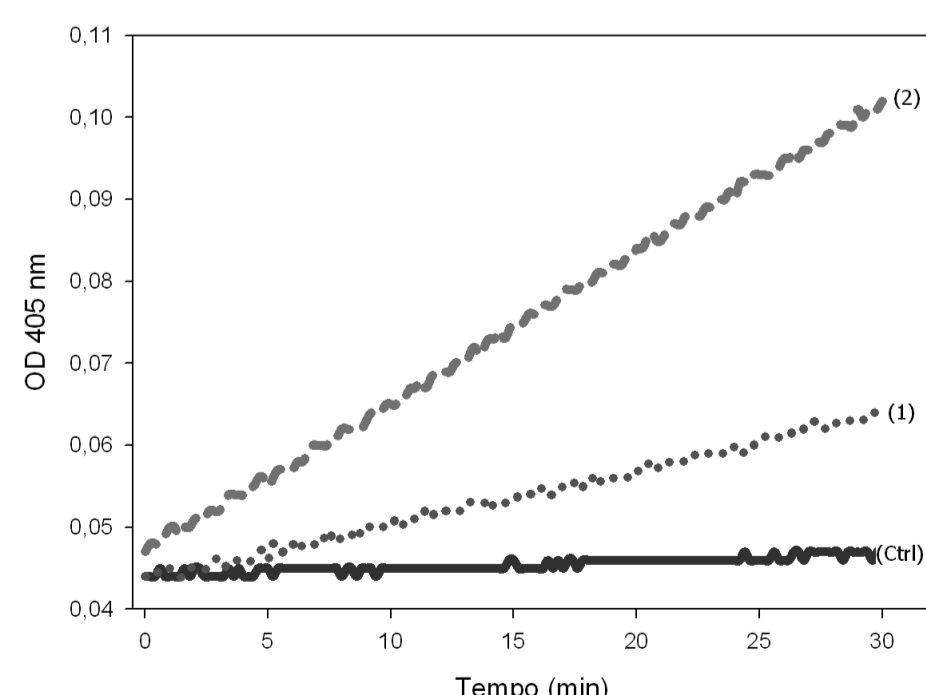


Fig. 8. Ativação de protrombina pela enzima purificada. Atividade direta sobre substrato cromogênico S2238 (1) e atividade da trombina formada após incubação por 15 min de 1 ug da enzima com protrombina (2). Controle (Ctrl), apenas protrombina.

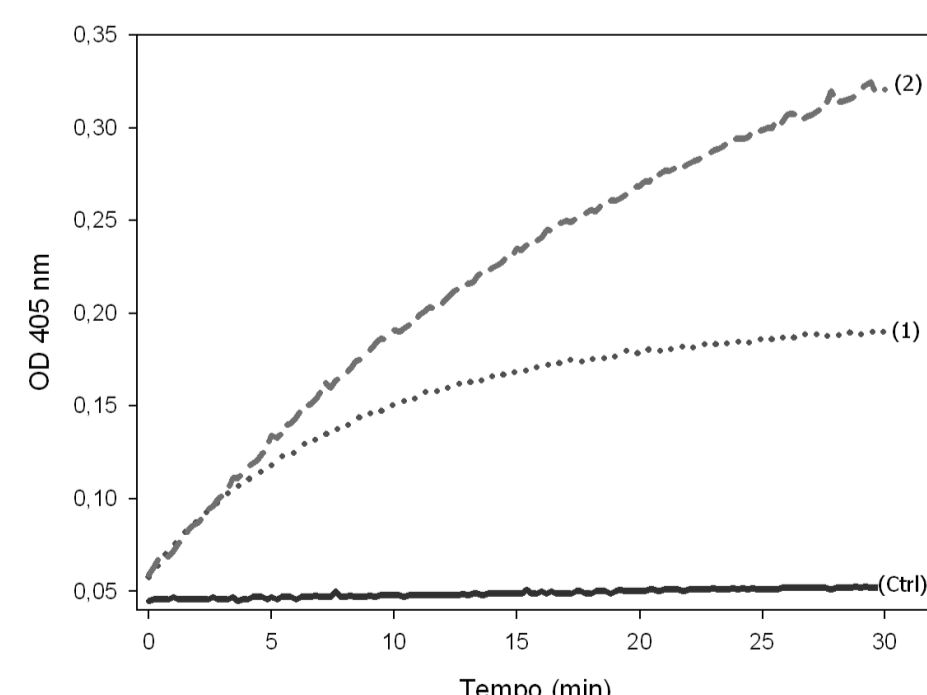


Fig. 9. Ativação de protrombina pelo veneno de *B.lanceolatus*. Atividade direta sobre substrato cromogênico S2238 (1) e atividade da trombina formada após incubação por 15 min de 1 ug do veneno com protrombina (2). Controle (Ctrl), apenas protrombina.

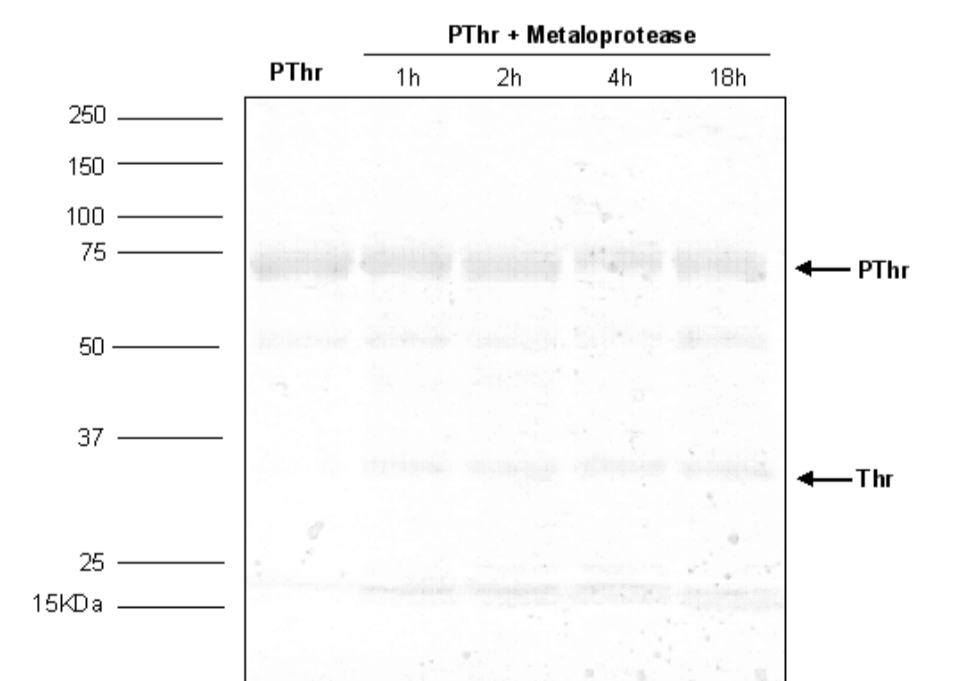


Fig. 10. Ativação de protrombina pela enzima parcialmente purificada. Análise dos fragmentos gerados pela enzima (1 ug) incubada com protrombina por 1, 2, 4 e 18 horas. (PThr) Protrombina, (Thr) Trombina.

Conclusões

A enzima purificada possui 50 kDa, é inibida especificamente por orto-fenantrolina (OPA) e sua seqüência peptídica a identifica como uma metaloprotease. Esta metaloprotease possui atividade pró-coagulante, à semelhança do veneno bruto, de forma dose-dependente (1-10 ug enzima), sendo capaz de ativar pró-trombina na menor dose testada. A atividade pró-coagulante é observada nos envenenamentos pela formação de trombo na microvasculatura.

