

ILCA PRISCILA DE ARAÚJO

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE
UMA ENZIMA TROMBINA-SÍMILE DA PEÇONHA DA
SERPENTE *Bothrops leucurus*
(Viperidae)**

RECIFE
2006

ILCA PRISCILA DE ARAÚJO

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE
UMA ENZIMA TROMBINA-SÍMILE DA PEÇONHA DA
SERPENTE *Bothrops leucurus*
(Viperidae)**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em
Biologia Animal do Departamento de Zoologia do
Centro de Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos
básicos para obtenção do grau de Mestre em Biologia
Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Míriam Camargo Guarnieri

**RECIFE
2006**

Araújo, Ilca Priscila de

**Purificação e caracterização parcial de uma
enzima trombina-símile da peçonha da serpente
Bothrops leucurus (viperidae) / Ilca Priscila de Araújo.**

– Recife : O Autor, 2006.

ix, 33 folhas : il., gráf.

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal
de Pernambuco. CCB. Biologia animal, 2006.**

Inclui bibliografia e anexo.

**1. *Bothrops leucurus* – Enzima trombina-símile. 2.
Peçonhas ofídicas. I. Título.**

598.126

CDU (2.ed.)

UFPE

597.963

CDD (22.ed.)

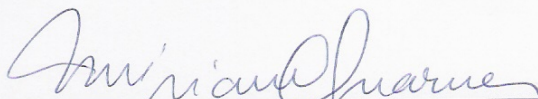
BC2006-231

BANCA EXAMINADORA

Ilca Priscila de Araújo

Purificação e Caracterização Parcial de uma Enzima Trombina-Símile da Peçonha da
Serpente *Bothrops leucurus* (Viperidae)

Orientadora:



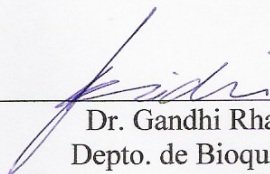
Dra. Miriam Camargo Guarnieri
Depto. de Zoologia/UFPE

Banca Examinadora:

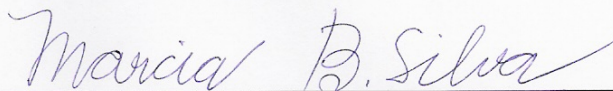
Titulares:



Dr. Patrick Jack Spencer
Centro de Biologia Molecular/IPEN-CNEN-SP

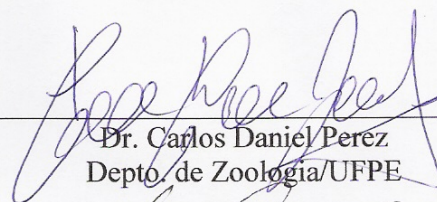


Dr. Gandhi Rhadis Batista
Depto. de Bioquímica/UFPE

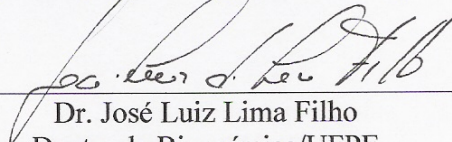


Dra. Márcia Bezerra da Silva
Depto. de Biofísica/UFPE

Suplentes:



Dr. Carlos Daniel Perez
Depto. de Zoologia/UFPE



Dr. José Luiz Lima Filho
Depto. de Bioquímica/UFPE

“Então respondeu Jó ao
Senhor: Eu sei que tudo
podes; e nenhum dos teus
planos pode ser impedido.”
Jó 42:1-2.

AGRADECIMENTOS

Por suas promessas e por tudo o que Ele é. Agradeço a Deus pelo o que tem feito e tudo o que ainda irá fazer.

Àquela que passou momentos inesquecíveis conosco. Àquela que é um exemplo de professora, pesquisadora, mãe, irmã e amiga, o meu eterno agradecimento. À Míriam Camargo Guarnieri por toda paciência, dedicação, amor e carinho dispensados. Obrigada por ter me ensinado o princípio e o método.

Ao amigo Prof. Dr. Patrick J. Spencer do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) por estar sempre de braços abertos a nos receber. Obrigada por todo o carinho, atenção e por cuidar de mim como uma filha querida.

À minha mãe querida pelos inúmeros sacrifícios que ela faz por mim. Por me acompanhar sempre na minha vida acadêmica. Obrigada por me amar.

Ao Dr José Luiz Lima Filho e a todos do Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami (LIKA), em especial Kilma e Renata.

À Dra. Cleide Albuquerque pelo empréstimo de equipamentos do Laboratório de Invertebrados Terrestres e aos amigos deste laboratório: Ethiene e Sr. Ramiro.

À Dra Ruth Vassão do Instituto Butantan. Obrigada pelos finais de semana no Jabaquara, um puxadinho da minha casa.

À Sra. Vera S. Camargo Guarnieri pela valiosa contribuição na realização deste trabalho. À Claíne Albuquerque, Sr Jack e Sra Karin Spencer, pela hospedagem e divertidos dias nas suas casas;

Aos colegas do IPEN: Lucélia, Fernanda, Milena, Júnior, Janaína, Murilo, Rosa, Edu, Alberto e Johnny. Dias inesquecíveis passei com vocês. Todos são pessoas fantásticas que sempre me incentivaram.

Muito mais que amigas e muito mais achegadas que irmãs, Juliana e Lidiany:
Amo vocês!

À minha amiga e companheira em São Paulo, Milena S. S. Pinho. Foi muito bom, mesmo!

Aos companheiros do laboratório de Animais Peçonhentos e Toxinas, especialmente Renata, Marliete, Silvia, Júnior, Escobar e Lucas. Obrigada pelo agradável convívio proporcionado.

Aos amigos Dr. Kurt Rhen e Dra. Vitorina N. C. Rhen por terem me iniciado na pesquisa científica.

À professora Eduarda pelo carinho e à Ana Elizabete pela reconhecida eficiência. Aos companheiros de turma neste mestrado;

A Daniel Yuji por estar presente, por chegar junto e segurar na minha mão.

Ao CNPq pelo financiamento do projeto “Obtenção de toxinas botrópicas do Nordeste com ação na hemostasia e potencial de aplicação médica e biomédica”

À CAPES pela concessão de bolsa de mestrado.

RESUMO

A serpente *Bothrops leucurus* (jararaca do rabo branco), maior responsável pelos acidentes botrópicos no Estado da Bahia, também tem ocorrência registrada em Pernambuco. As alterações na coagulação sangüínea são uma característica relevante no envenenamento provocado pela peçonha de *B. leucurus*. Enzimas ofídicas que atuam estrategicamente na hemostasia com ação direta sobre o fibrinogênio, convertendo-o em fibrina, são chamadas trombina-símile. Apesar de estarem presentes em diversas peçonhas botrópicas e representarem modelos moleculares para o desenvolvimento de novas drogas e reagentes, poucos estudos têm sido realizados com estas toxinas, inclusive com a peçonha de *B. leucurus*. Neste trabalho foi realizada a purificação e caracterização parcial de uma toxina trombina-símile da peçonha de *B. leucurus*. A enzima trombina símile foi obtida a partir do fracionamento de 600 mg da peçonha total de *B. leucurus* em quatro etapas de purificação: troca iônica em Mono-Q, afinidade em Benzamidina-Sepharose, gel filtração em TSK-G3000 SW e fase reversa em C₄. A toxina purificada, denominada BL-TL I, teve um rendimento final de 0,05% e apresentou cadeia única de massa molecular 23 e 31,8 KDa, conforme estimativa em SDS-PAGE em condições não redutoras e redutoras, respectivamente. BL-TL I teve sua atividade parcialmente reduzida após cromatografia em coluna C₄, não apresentando atividade sobre os substratos S-2238 e S-2765, bem como ativadora de fator X. Por outro lado, mesmo com reduzida atividade coagulante sobre fibrinogênio, a BL-TL1 foi capaz de hidrolisar o substrato S-2222. A BL-TL1 é a primeira enzima trombina-símile purificada da peçonha de *B. leucurus*, porém outra técnica complementar deve ser estabelecida para obtenção da toxina com atividade total para estudos subseqüentes, com o intuito de complementar a caracterização da referida toxina.

ABSTRACT

Main responsible for bothropic accidents in the State of Bahia, *Bothrops leucurus* snake (jararaca do rabo branco, or white tail jararaca) has also been reported as occurring in Pernambuco. Blood clotting alterations are a relevant characteristic in the envenoming caused by *B. leucurus* venom. Ophidic enzymes that act in the hemostasy, converting fibrinogen into fibrin and causing blood clotting, are called thrombin-like. Although present in several bothropic venoms and models for the development of new drugs and reagents, few studies have been realized on those toxins, including *B. leucurus* venom. In this work, it was realized the purification and partial characterization of a thrombin-like toxin from *B. leucurus* venom. The thrombin-like toxin was obtained from the fractioning of 600 mg of *B. leucurus* crude venom in four steps of purification: ionic exchange in Mono-Q, affinity in Benzamidine-Sepharose, gel filtration in TSK-G3000 SW and reverse phase in C₄. The purified toxin, called BL-TL I, had a final yielding of 0,05%, and presented a single molecular chain of 23 and 31,8 KDa, according to estimation in SDS-PAGE, in reduced and non reduced conditions, respectively. BL-TL I had its activity drastically reduced after chromatography in C₄ column, presenting no activity on the substrates S-2238 and S-2765, or activator of factor X. On the other hand, even with reduced clotting activity on fibrinogen, BL-TL1 was capable to hydrolyze the substrate S-2222. BL-TL1 is the first purified thrombin-like enzyme from *B. leucurus* venom, but it is necessary to establish a new technique to complete the characterization of the referred toxin.

SUMÁRIO

Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract	viii
I. Revisão Bibliográfica	1
Serpentes	1
<i>Bothrops leucurus</i>	3
Peçonhas Ofídicas	4
Serinoproteases	5
Serinoproteases trombina-símile	7
Referências Bibliográficas	12
II. Purificação e Caracterização Parcial de uma Enzima Trombina-Símile da Peçonha da Serpente <i>Bothrops leucurus</i> (Viperidae)	17
Resumo	17
Introdução	18
Materiais e Métodos	20
Resultados	23
Discussão	25
Referências Bibliográficas	29

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

SERPENTES

Na classificação tradicional, que agrupa os animais com base nas similaridades de caracteres morfológicos, a subordem Serpentes pertence à Ordem Squamata (juntamente com Lacertilia) e à classe Reptilia (juntamente com Chelonia, Crocodilia e Rhyncocephalia). Segundo a classificação cladística, que considera a origem evolutiva dos animais propondo a formação de grupos monofiléticos, a subordem Serpentes pertence à Ordem Squamata e ao grupo Lepidossauromorpha (Pough, 1999).

Embora tenham sofrido uma radiação adaptativa surpreendente, as serpentes conservam um padrão morfológico. Algumas características diagnósticas deste grupo são: corpo alongado, ausência de apêndices locomotores e de ouvido externo, e perda de pálpebras móveis (Cardoso *et al.* 2003).

A ausência da sínfise mandibular e da cintura escapular, juntamente com outras modificações cranianas, permite às serpentes engolir presas inteiras e maiores que seu diâmetro (Franco, 2003; Soerensen, 1990).

As serpentes distribuem-se por quase todos os ambientes do globo, com exceção das regiões em que o clima demasiadamente frio impede a vida de vertebrados ectotérmicos. Há serpentes aquáticas (de água doce e marinhas) e terrestres, sendo fossoriais, terrestres e arborícolas e podendo ser encontradas em matas, savanas ou desertos (Franco, 2003).

Uma das classificações mais aceitas (Macdowell, 1987), divide as serpentes viventes em duas infraordens, seis superfamílias e 19 famílias. As peçonhentas estão distribuídas em quatro famílias: Atractaspididae, Elapidae, Colubridae e Viperidae.

A família Viperidae, com aproximadamente 215 espécies, inclui as subfamílias Viperinae e Crotalinae, que possuem o mais complexo aparelho peçonhífero (Borges, 1999). No Brasil, a subfamília Crotalinae (10-15 gêneros) está representada pelos gêneros *Bothrops* (jararacas), *Crotalus* (cascavéis) e *Lachesis* (surucucus) que, juntamente com o gênero *Micrurus* (corais), da família *Elapidae*, constituem os ofídios peçonhentos da fauna brasileira (Borges, 1999; Pough, 1999; Campbel & Lamar, 1989; Bjarnason & Fox, 1988-89).

A capacidade de inocular peçonha está relacionada a modificações ocorridas no crânio, nas glândulas salivares e na dentição das serpentes, compondo o aparelho peçonhífero que é considerado um dos mais especializados aparatos de alimentação dentre os vertebrados. De acordo com a complexidade morfológica e eficiência na inoculação, as serpentes são, tradicionalmente, divididas em quatro categorias:

- 1) Áglifas: serpentes sem dentes sulcados no maxilar para inoculação de peçonha podendo ou não ter glândula de peçonha (glândula de Duvernoy);
- 2) Opistóglifas: serpentes com dentes sulcados e conectados a glândula de Duvernoy na região posterior do maxilar;
- 3) Proteróglifas: serpentes com dentes sulcados na região anterior do maxilar e com glândula de peçonha;
- 4) Solenóglifa: serpentes com dentes muito desenvolvidos, canaliculados e móveis (semelhantes às agulhas hipodérmicas) na região anterior do maxilar. Sulco ligado ao canal excretor da glândula de peçonha (Cardoso *et al.*, 2003).

As serpentes chamam a atenção do homem por causarem medo e inquietude em virtude de provocarem acidentes, por vezes levando à morte (Leake, 1968). Os acidentes ofídicos passaram a ser de notificação obrigatória no país de acordo com o Ministério da

Saúde que relata uma média de 20.000 acidentes por ano, dos quais 90% são causados por serpentes do gênero *Bothrops*, encontradas em todo território nacional (Ministério da Saúde-Fundação Nacional da Saúde, 1999). Algumas espécies apresentam maior importância por sua extensa distribuição geográfica como, por exemplo, *B. atrox* na Amazônia, *B. erythromelas* e *B. leucurus* no Nordeste, *B. moojeni* nas regiões Centro-Oeste e Sudeste e *B. jararaca* nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (Campbell & Lamar, 1989).

***Bothrops leucurus* (Wagler, 1824)**

A serpente *Bothrops leucurus* é conhecida popularmente como jararaca do rabo branco, quando filhote, e jararaca malha-de-sapo quando adulta. Esta espécie foi descrita, inicialmente, por Wagler em 1824 e teve sua história nomenclatural confusa. Em 1989, Campbell & Lamar consideraram *B. leucurus* uma espécie em si, garantindo seu posicionamento taxonômico específico.

B. Leucurus é uma espécie terrícola, de porte avantajado (1,7 m de comprimento) e bastante prolífera. Lira-da-Silva *et al.* (1994) fazem referência aos aspectos da biologia reprodutiva desta espécie, que tem uma média de 12 filhotes por ninhada com nascimentos de janeiro a março, e os meses setembro e outubro de época preferencial para a cõrte (Cardoso *et al.*, 2003).

Esta serpente é comum na faixa atlântica do Nordeste do Brasil, em áreas remanescentes, desde a Paraíba até o norte do Espírito Santo. Provavelmente, é uma das mais importantes serpentes encontradas no Nordeste, por habitar as regiões mais densamente povoadas pelo homem, tanto nas áreas urbanas e periurbanas, quanto rurais. Em Pernambuco, Soares (2001) registrou a ocorrência de *B. leucurus* em área remanescente de Mata Atlântica no município de Caruaru.

Lira-da-Silva & Nunes (1993) relataram que na região Metropolitana de Salvador-BA, esta serpente é a única causadora de acidentes ofídicos. Em estudo descritivo das características clínico-epidemiológicas dos acidentes ocasionados por *B. leucurus* na Bahia, Lira-da-Silva *et al.* (1996) constatou que os acidentes foram predominantes na zona rural e as regiões anatômicas mais freqüentemente atingidas foram pés e mãos. Os acidentes por *B. leucurus* caracterizaram-se por distúrbios locais como dor, edema, eritema, dormência e equimose; e distúrbios sistêmicos com alteração na coagulação, cefaléia, vômitos, oligúria, entre outros.

PEÇONHAS OFÍDICAS

As peçonhas das serpentes são os fluidos biológicos mais concentrados produzidos por vertebrados, apresentando vários componentes diferentes. Aproximadamente 90% do peso seco das peçonhas é constituído por proteínas e peptídeos. A fração não protéica é formada por ânions inorgânicos e cátions, além de substâncias de baixo peso molecular, como aminoácidos, pequenos peptídeos, lipídeos, nucleosídeos, nucleotídeos, carboidratos e aminas biogênicas (Stocker, 1990).

Os distúrbios na coagulação sanguínea estão entre os mais dramáticos efeitos do envenenamento ocasionado por serpentes. Já foram descritas mais de 100 diferentes peçonhas de serpentes que atuam diretamente no sistema hemostático humano, utilizando-se dos mais variados mecanismos. Os componentes protéicos destas peçonhas foram agrupados em diferentes categorias com base em suas funções hemostáticas: 1) enzimas que coagulam fibrinogênio (trombina-símile); 2) ativadores de plasminogênios; 3) ativadores de protrombina; 4) ativadores de fator V; 5) ativadores de fator X; 6) enzimas com atividade anticoagulante, incluindo inibidores da formação do complexo

protrombinase, inibidores de trombina, fosfolipases e ativadores de proteína C; 7) enzimas com atividade hemorrágica; 8) enzimas que degradam inibidores de serinoproteases plasmáticas; 9) ativadores de agregação plaquetária, incluindo enzimas de ação direta, componentes não enzimáticos e agentes que necessitam de cofator; 10) enzimas que degradam o fibrinogênio (fibrinogenolíticos) e fibrina (fibrinolíticos); 11) inibidores de agregação plaquetária, incluindo fibrinogenolíticos, 5'-nucleotidases, fosfolipases e disintegrinas. É importante ressaltar que uma única peçonha não contém todos esses componentes descritos (Markland, 1998).

Apesar da existência de variações na composição e nas atividades farmacológicas das peçonhas botrópicas, as mesmas causam em vítimas humanas um quadro fisiopatológico similar, caracterizado por edema, acompanhado ou não de equimose, necrose e abscesso, que podem levar à amputação do membro atingido; manifestações sistêmicas com alteração de coagulação sanguínea, hemorragia, choque e insuficiência renal (Cardoso *et al.* 2003; Chippaux *et al.* 1991; Gutiérrez & Lomonte, 1989).

A soroterapia antiveneno é a única terapia utilizada como passo fundamental para o tratamento dos acidentes ofídicos e tem por objetivo neutralizar a maior quantidade possível de peçonha circulante (Ministério da saúde-Fundação nacional de saúde, 1999).

SERINOPROTEASES

As serinoproteases são enzimas que estão envolvidas diretamente em eventos proteolíticos e apresentam um mecanismo catalítico comum: possuem no sítio ativo um resíduo de serina que é estabilizado pela presença de resíduos de histidina e ácido aspártico; assim formam a tríade catalítica, H₅₇-D₁₀₂-S₁₉₅. (Markland, 1998; Pirkle, 1998; Barret & Rawlings, 1995). Embora as serinoproteases apresentem mecanismo catalítico semelhante,

diferem na especificidade sobre substratos (Maroun, 2001). Além de inibidores como fenilmetilsulfonil (PMSF) e diisopropilfluorofosfato (DFP) que modificam o sítio ativo da enzima, as serinoproteases mostram-se sensíveis a benzamidina e derivados (Serrano & Maroun, 2005).

As serinoproteases incluem enzimas com funções digestivas em procariotos e eucariotos, assim como proteínas que participam da coagulação sanguínea e dos processos inflamatórios (Voet, 2002). Serinoproteases presentes nas peçonhas de serpentes são capazes de afetar o sistema hemostático de diversas maneiras, por exemplo, podem agir sobre substratos da coagulação, sobre os sistemas fibrinolítico e calicreína-cinina, e sobre a agregação de plaquetas (Serrano & Maroun, 2005).

Algumas serinoproteases presentes nas peçonhas ofídicas têm como substrato o fibrinogênio. Quando as cadeias de aminoácidos do fibrinogênio são expostas às enzimas proteolíticas, há a liberação de fibrinopeptídeos A e/ou B (FPA, FPB) (Herrick *et al.*, 1999), dependendo do local em que o fibrinogênio é clivado, observa-se a formação do coágulo (atividade trombina-símile) ou a destruição da molécula de fibrinogênio (atividade fibrinogenolítica) (Stocker, 1990).

Outras atividades desempenhadas por serinoproteases de peçonhas ofídicas são a liberação de bradicinina do cininogênio, assim como a calicreína de mamíferos, sendo chamadas calicreína-símile. Adicionalmente, existem poucos relatos de serinoproteases de serpentes com atividade ativadora de fator V, proteína C, plasminogênio e agregação de plaquetas (Matsui *et al.*, 2000).

As serinoproteases têm sido purificadas de peçonhas ofídicas através de vários métodos cromatográficos. Frequentemente o fracionamento das proteínas se dá por cromatografias de exclusão molecular seguidas por cromatografias de troca iônica ou

afinidade (Benzamidina ou Arginina-Sepharose) (Serrano & Maroun, 2005). Quando purificadas, as serinoproteases de serpentes constituem proteínas monoméricas com massa molecular entre 26 e 67 KDa com agente redutor, dependendo da concentração de carboidratos.

SERINOPROTEASES TROMBINA-SÍMILE

Quando um vaso sanguíneo é danificado, um coágulo forma-se como resultado da agregação plaquetária e da formação da rede de fibrina a partir da ação da serinoprotease trombina sobre o fibrinogênio.

A trombina é uma enzima multifuncional presente nos mamíferos que desempenha importante função na hemostasia. Além de atuar sobre o fibrinogênio produzindo a fibrina, a trombina também é um potente ativador de plaquetas, promovendo a ativação e a agregação das mesmas. A trombina também apresenta propriedades anticoagulantes, uma vez que interage com a trombomodulina e ativa proteína C, importante fator anticoagulante (Maroun, 2001). Além destas funções, a trombina atua sobre múltiplos substratos como fator V, VII e XIII, glicoproteína V de membrana e proteína S (Voet & Voet, 2002; Matsui *et al.*, 2000).

O fibrinogênio é uma proteína de 340 KDa circulante no plasma, primariamente sintetizada pelos hepatócitos, composta de duas moléculas simétricas com dois pares de três cadeias polipeptídicas denominadas $A\alpha$, $B\beta$ e γ , ligadas umas as outras por pontes dissulfeto, com peso molecular de 70, 56 e 48 KDa, respectivamente (Stocker, 1990; Herrick *et al.*, 1999). A molécula do fibrinogênio possui três domínios diferentes; dois domínios terminais, D (67 KDa), ligados por um domínio central, E (33 KDa) (Figura 1).

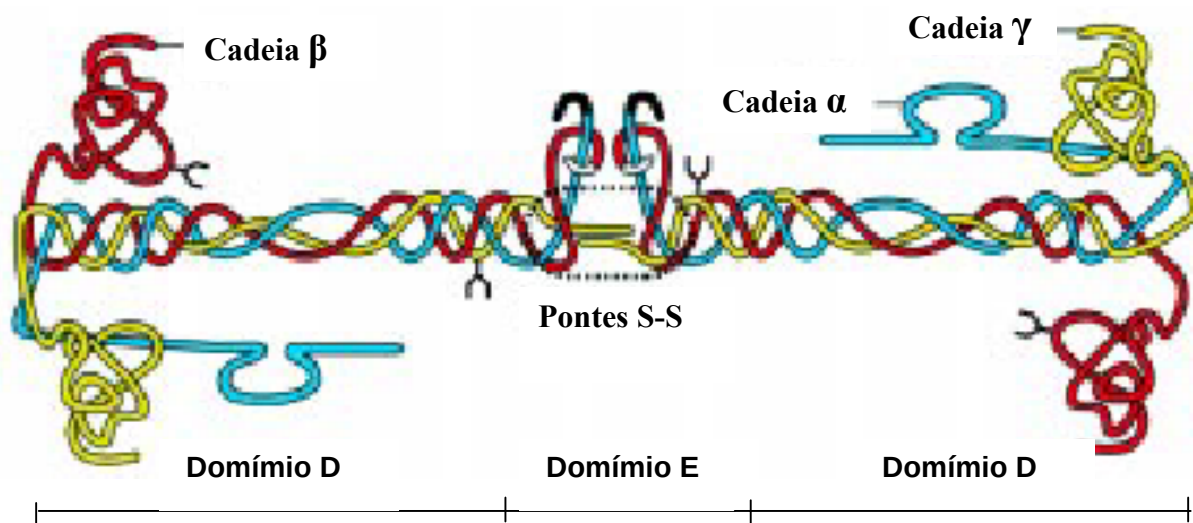


Figura 1. Diagrama esquemático do fibrinogênio (Adaptado de Herrick *et al.*, 1999).

A conversão do fibrinogênio em fibrina é decorrente da ação da α -trombina que libera fibrinopeptídeos A e B clivando Arg16-Gly17 e Arg14-Gly15 da porção amino-terminal das cadeias $A\alpha$ e $B\beta$, respectivamente. Os monômeros de fibrina então formados polimerizam espontaneamente e através de ligações cruzadas formam um coágulo estável na presença de transglutaminase (fator XIIIa), muito menos suscetível à atividade proteolítica (Herrick, *et al.*, 1999; Stocker, 1990).

As enzimas presentes nas peçonhas de serpentes que agem de forma semelhante à trombina, chamadas trombina-símile, são serinoproteases de cadeia simples, glicosiladas, com massa molecular entre 19,5 e 70 KDa, com sítio ativo nas posições H₅₇-D₁₀₂-S₁₉₅. Entre si apresentam um alto grau de homologia (aproximadamente 60-68%), por outro lado, mostram menos de 40% de homologia com a trombina endógena de humanos. As atividades das serinoproteases trombina-símile são, contudo, não exatamente idênticas às aquelas desempenhadas pela enzima multifuncional trombina (Kini *et al.*, 2001). Por outro

lado, enzimas trombina-símile e a tripsina têm uma estrutura conservada e alta homologia, sugerindo um ancestral comum (Castro *et al.*, 2001; Lesk & Fordham, 1996).

Uma vez que, geralmente, não ativam o fator XIII da coagulação e liberam apenas um fibrinopeptídeo, as enzimas trombina-símile produzem monômeros de fibrina que não formam ligações cruzadas, levando a formação de coágulos que são rapidamente dissolvidos (Marsh & Williams, 2005; Kini *et al.*, 2001; Pirkle & Markland, 1988).

Enzimas trombina-símile são encontradas em peçonhas de vários gêneros das famílias Viperidae (*Agkistrodon*, *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis*, *Trimeresurus*, *Bitis* e *Cerastes*) e Colubridae (*Dispholidus typus*) (Pirkle & Stocker, 1991). Aproximadamente 100 toxinas de serpentes foram descritas como trombina-símile e 21 destas tiveram suas seqüências de aminoácidos determinadas parcial ou completamente, dentre estas, Ancrod (*Agkistrodon rhodostoma*), Batroxobina (*Bothops atrox*) e Crotalase (*Crotalus adamanteus*). Por outro lado, o estudo da estrutura terciária de enzimas trombina-símile ainda é escasso (Marsh & Williams, 2005; Bortoleto *et al.*, 2002; Castro *et al.*, 2001; Pirkle & Markland, 1988).

O estudo da similaridade entre as estruturas primárias das enzimas trombina-símile talvez não seja suficiente para descrever o mecanismo de reconhecimento dos substratos específicos. É possível que estudos das estruturas tridimensionais de serinoproteases possam definir resíduos específicos que estão envolvidos no mecanismo de catálise e de atividade biológica das enzimas trombina-símile de peçonhas de serpentes (Castro *et al.*, 2001; Serrano & Maroun, 2005).

Krem *et al.* (1999) sugerem que a porção C-terminal das enzimas trombina-símile apresenta importante função no reconhecimento de substratos específicos. Mais notavelmente, a posição 193 pode ser ocupada por uma variedade de resíduos que não

sejam a glicina, usualmente encontrada. Como exemplo, o resíduo fenilalanina na posição 193 da serinoprotease TSV-PA, está diretamente envolvido na atividade catalítica sobre o plasminogênio (Serrano & Maroun, 2005; Castro *et al.*, 2001; Pirkle, 1998).

Batroxobina, Venzima (*Agkistrodon contortrix*) e Gabonase (*Bitis gabonica*) exemplificam os três tipos de classificação para enzimas trombina-símile que clivam o fibrinogênio liberando, preferencialmente, o fibrinopeptídeo A, o fibrinopeptídeo B ou ambos A e B e sendo classificadas como venombinas A, Venombinas B ou venombinas A e B, respectivamente (Markland, 1998).

A sequência catalítica das toxinas trombina-símile de serpentes possuem a tríade (His, Asp e Ser), sensível aos inibidores de serinoproteases (PMSF, DFP), porém, a maioria não se mostra sensível aos inibidores da trombina como antitrombina III, hirudina e inibidores endógenos de serinoproteases (SERPINS) (Matsui *et al.*, 2000).

Desde que não administradas de forma crônica, enzimas ofídicas com atividade trombina-símile podem ser bem toleradas clinicamente no tratamento de doenças oclusivas, uma vez que não são susceptíveis a inibidores endógenos e a fibrina formada é rapidamente dissolvida pelo sistema fibrinolítico. Enzimas trombina-símile podem atuar como agente defibrinogenante, sendo as mais aplicadas: Ancrod (Arvin®; *A. rodosthoma*) e Batroxobina (Defibrase®, Reptilase®; *B. atrox*) (Marsh & Williams, 2005; Kini *et al.*, 2001)

Através da comparação da atividade coagulante de peçonhas de 26 espécies do gênero *Bothrops*, Nahas *et al.* (1979) observaram que, a exceção de *Bothrops erythromelas* e *Bothrops taeniata*, todas as peçonhas mostraram atividade trombina-símile, uma vez que coagularam o fibrinogênio diretamente. Até o momento foram purificadas seis enzimas trombina-símile de serpentes do gênero *Bothrops* (Bortoleto *et al.*, 2002; Petretski *et al.*,

2000; Cavinato *et al.*, 1997; Smolka, *et al.*, 1997; Zaganelli *et al.*, 1996; Petretski *et al.*, 2000; Stocker, 1990) e poucos estudos são realizados com peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* encontradas no Nordeste do Brasil. Da peçonha de *B. leucurus* apenas uma enzima fibrinolítica foi isolada recentemente (Bello *et al.*, 2005) e a presença de enzimas trombina-símile relatada através de imunoprecipitação (Petretski *et al.*, 2000). A purificação e caracterização de uma enzima trombina-símile poderá trazer novas perspectivas no uso de toxinas para aplicações médicas e biomédicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Citação segundo as normas da ABNT-2002

BARRET, A.J. & WILLIAMS, N.D. Perspectives in Biochemistry and Biophysics. *Arch. Biochim. Biophys.* v. 318, p. 247-250, 1995.

BELLO, C.A.; HERMOGENES, A.L.N.; MAGAKLHAES, A.; VEIGA, S.S.; GREMSKI, L.H.; RICHARDSON, M.; SANCHEZ, E.F. Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic proteinase from *Bothrops leucurus* (white-tailed jararaca) snake venom. *Toxicon*, (article in press) 2005 .

BJANARSON, J.B. & FOX, J.W. Hemorrhagic toxins from snake venoms. *J. Toxicol.-Toxin Reviews*, v. 7, p. 121-209, 1988-1989.

BORGES, R. C. **Serpentes peçonhentas brasileiras: anual de identificação, prevenção e procedimento em caso de acidentes**. São Paulo: Editora Atheneu, 1999, p. 148.

BORTOLETO, R.K.; MURAKAMI, M.T.; WATANABE, L.; SOARES, A.M.; ARNI, R.K. Purification, characterization and crystallization of Jararacussin-I, a fibrinogen-clotting enzyme isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. *Toxicon*. v. 40, 1307-1312, 2002.

CAMPBELL, J.A.; LAMAR, W.W. **The venomous reptiles of Latin America**. New York: Editora Comstock Publishing Associates, 1989, p. 425.

CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD Jr, V. **Animais peçonhentos no Brasil. Biologia, clínica e terapêutica**. São Paulo: Editora Sarvier, 2003, p. 468.

- CASTRO, H.C.; SILVA, D.M.; CRAIK, C.; ZINGALI, R.B. Structural features of a snake venom thrombin-like enzyme: thrombin and trypsin on a single catalytic platform? *Biochim. Biophys. Acta.* v. 1547, p. 183-195, 2001.
- CAVINATO, R.A; REMOLD, H.; KIPNIS, T. Purification and Variability in thrombin-like activity of *Bothrops atrox* venom from different geographic regions. *Toxicon*, v. 36, n.2, p. 257-267, 1997.
- CHIPPAUX, J.P.; WILLIAM, Y.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon*, v. 29, n.11, p. 1279-1303, 1991.
- FRANCO, F.L. Origem e diversidade das serpentes. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; WEN, F.H.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD Jr, V. **Animais peçonhentos no Brasil. Biologia, clínica e terapêutica.** São Paulo: Editora Sarvier, 2003, p. 468.
- GUTIERRÉZ, J.M & LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. *Em. Inst. Butantan*, v. 51, p. 211-223, 1989.
- HERRICK, S.; BLANC-BRUDE, O.; GRAY, A.; LAURENT, G. Fibrinogen. Review. *Int j Biochem Cell Biol.* v. 31, p. 741-746, 1999.
- KINI, R.M.; RAO, V.S; JOSEPH. J.S. Procoagulant Proteins from Snake venoms. *Haemostasis*, v. 31, p. 218-224, 2001.
- KREM, M.M.; ROSE, T.; DI CERA, E. The C-terminal sequence encodes function in serine proteases. *J. Biol. Chem.* v. 274, 28063-28066, 1999.
- LEAKE, C.D. Development of knowledge about venoms. In: BUCHERL, W., BUCKLEY, E.E., DEULOFEU, V. **Venomous animals and their venoms.** New York: Academic Press, v. 1, p. 1-12. 1968.
- LESK, A.M. & FORDHAM, W.D. Conservation and variability in the structure of serine proteinases of the chymotrypsin family. *J. Mol. Biol.* v. 258, 501-537, 1996.

LIRA-DA-SILVA, R.M.; CASAIS-E-SILVA, L.L.; QUEIROZ, I.B.; NUNES, T.B. Contribuição à biologia de serpentes da Bahia, Brasil. I. Vivíparas. *Rev. Bras. Zool* v. 11, n. 2, p. 187-193, 1994.

LIRA-DA-SILVA, R.M.; NUNES, T.B. Ophidian accident by *Bothrops leucurus* Wagler, 1824 in Bahia, Brasil. *Toxicon*. v. 31, n. 2, p. 143-144, 1993.

LIRA-DA-SILVA, R.M.; ANDRADE-LIMA, R., BRAZIL, T. K. Distribuição geográfica de *Bothrops leucurus* (SERPENTES; VIPERIDAE). In: IV CONGRESSO LATINOAMERICANO DE HERPETOLOGIA, 1996. Santiago. Resumos, Santiago: sociedade Latinoamericana de Zoologia, 1996. p. 153.

LIRA-DA-SILVA, R.M.; VASCONCELOS, C.M.; GUARNIERI, M.C. Partial characterizations of *Bothrops leucurus* venom. In: *IV Simpósio da Sociedade Brasileira de Toxinologia- Toxinas como ferramentas científicas em pesquisa e medicina*. 1996. Recife. Programa e Resumos, p. 165.

MACDOWELL JR, F. S Systematics In: SEIGEL, R. A.; COLLINS, J. T.; NOVAK, S. S. *Snakes: ecology and evolutionary biology*. New York, MacGraw – Hill, p 3-50.

MARKLAND, F.S. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon*, v.36, v. 12, p. 1749-1800, 1998.

MAROUN, R.C. Molecular basis for the partition of the essential functions of thrombin among snake venom serine proteinases: the case of thrombin-like enzymes. *Haemostasis*. v. 31, p. 247-256, 2001.

MARSH, N. & WILLIAMS, V. Pratical applications of snake venom toxins in hemostasis. *Toxicon*. Article in press, 1-11, 2005.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochemica et Biophysica Acta*, v. 1447, p.146-156, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE-FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília, 1999. 131p.

NAHAS, L.; KAMIGUTI, A.S.; BARROS, M.A.R. Thrombin-like and factor X activator components of bothrops snake venoms. *Thromb. Haemost.* v. 41, p. 314-319, 1979.

PETRESTIKI, J.H.; KANASHIRO, M.; SILVA, C.P.; ALVES, E.W.; KIPNIS, T.L. Two related thrombin-like enzymes present in *Bothrops atrox* venom. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v. 33, p. 1293-1300, 2000.

PIRKLE, H & MARKLAND Jr, F. **Hemostasis and Animal venoms**. Marcel Dekker. Inc. New Yprk-Basel, (1988).

PIRKLE, H. & STOCKER K. Thrombin like enzymes from snake venom: an inventory. *Thromb. Haemost.* v. 65, p. 444-450, 1991.

PIRKLE, H. Thrombin-like enzymes from snake venoms: An update inventory. *Thromb. Haemost.* v. 79, 675-683, 1998.

POUGH, F. H. **A vida dos vertebrados**. 2 ed. São Paulo: Editora São Paulo, 1999, 700p.

SERRANO, S.M & MAROUN, R.C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. Substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon*. v. 45, 1115-1132, 2005.

SMOLKA, M.B.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; NOVELLO, J.C. Purification and partial caracterizaion of a tthrombin-like enzyme, balterobin, from the venom of *Bothrops alternatus*. *Toxicon*. v. 36, p. 1059-1063, 1997.

SOARES, M.M.S. Identificação taxonômica das serpentes coletadas no estado de Pernambuco. 2001, 65f. (Monografia do Bacharelado em Ciências Biológicas) Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

SOERENSEN, B. **Animais peçonhentos**. Rio de janeiro: Editora Atheneu, 1990, p.144.

STOCKER, K.F. Snake venoms proteins affecting hemostasis and fibrinolysis. In: STOCKER, K.F. *Medical use of snake proteins*. v.2. CRC Press, 1990, p. 97-161.

VOET, D. & VOET, A.S. **Biochemistry**. Canadá: John Wile & Sons, Inc. 2 ed. 2002.

WAGLRE, J. Oophidians Solenocglyphes. XI. Genre Bothrops. In: **Érpetologie générale ou Historie Naturelle compete des Reptiles**. Tome septéme. Deixième partie. 1824

ZAGANELLI, G.L.; ZAGANELLI M.G.M.; MAGALHÃES, A.; DINIZ, C.R.; LIMA, M.E. Purification and characterization of a fibrinogen clotting enzyme from the venom of jararacuçu (*Bothrops jararacussu*). *Toxicon*. v. 34, p. 807-819, 1996.

Purificação e Caracterização Parcial de uma Enzima Trombina-Símile da Peçonha da Serpente *Bothrops leucurus* (Viperidae)

I.P. Araújo¹, P.J. Spencer², M.C. Guarnieri¹

¹Laboratório de Animais peçonhentos e Toxinas, Departamento de Zoologia/UFPE. Av. Professor Moraes Rego, 1235. Cidade Universitária, Univ. Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brasil. ²Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares/CNEN-SP. Av. Lineu Prestes, 2242. Cidade Universitária, São Paulo, Brasil.

Resumo

Proteínas que agem de forma similar à trombina e clivam o fibrinogênio, designadas trombina-símile, são serinoproteases que induzem diretamente a coagulação do fibrinogênio. Uma enzima trombina-símile purificada da peçonha da serpente *Bothrops leucurus* foi obtida a partir do fracionamento de 600 mg da peçonha total de *B. leucurus* em quatro etapas de purificação: troca iônica em Mono-Q, afinidade em Benzamidina-Sepharose, gel filtração em TSK-G3000 SW e fase reversa em C₄. A toxina purificada, denominada BL-TL I, teve um rendimento final de 0,05% e apresentou cadeia única de massa molecular 23 e 31,8 KDa, conforme estimativa em SDS-PAGE em condições não redutoras e redutoras, respectivamente.

Palavras-Chave: *Bothrops leucurus*, enzimas trombina-símile, peçonhas ofídicas.

1. Introdução

Serinoproteases são enzimas envolvidas em diferentes eventos proteolíticos que possuem a tríade de aminoácidos H₅₇-Asp₁₀₂-Ser₋₁₉₅, conservados no sítio catalítico (Barret & Williams, 1995; Markland, 1998; Pirkle, 1998). Algumas serinoproteases são classificadas como trombina-símile devido à capacidade de clivar a molécula de fibrinogênio nas ligações Arg₁₆-Gly e Arg₁₅-Gly na porção amino-terminal das cadeias A α e/ou B β (Markland, 1998).

As enzimas trombina-símile não apresentam todas as propriedades da trombina endógena dos mamíferos, como exemplo, não são capazes de liberar fibrinopeptídeos usando mecanismos distintos de interações hidrofóbicas para reconhecimento do substrato; não ativam o fator XIII (Kini *et al.*, 2001; Serrano & Maroun, 2005); não atuam sobre os fatores V e VII; como também não atuam na agregação de plaquetas (Matsui *et al.*, 2000). Além de inibidores como PMSF e DPF, que modificam o resíduo ativo das serinoproteases, a maioria das enzimas trombina-símile não são sensíveis aos inibidores da trombina, como hirudina, antitrombina III e outros inibidores endógenos de serinoproteases (Marsh & Williams, 2005).

As serinoproteases presentes nas peçonhas de serpentes, incluindo enzimas trombina-símile, fazem parte da família tripsina S1 do Clan SA e exibem alto grau de homologia (60-68%) (Maroun, 2001). Estas proteínas apresentam uma estrutura conservada e, provavelmente, possuem o mesmo precursor que a tripsina; revelando maior similaridade com a tripsina do que com a trombina (Castro *et al.*, 2001; Lesk & Fordham, 1996; Kini *et al.*, 2001). Adicionalmente, enzimas trombina-símile hidrolisam substratos sintéticos com

especificidade semelhante à tripsina e contêm resíduos de Cys unidos por pontes dissulfeto que pareiam de forma idêntica à tripsina (Matsui *et al.*, 2000).

Vários estudos relatam a importância do resíduo 193 no reconhecimento de substratos e inibidores específicos de serinoproteases (Serrano & Maroun, 2005; Castro *et al.*, 20001; Maroun, 2001). Krem *et al.* (1999) sugerem que a porção C-terminal das serinoproteases pode ter um papel fundamental na atividade destas enzimas (Serrano & Maroun, 2005; Castro *et al.*, 2001; Kini *et al.*, 2001).

Todas as enzimas trombina-símile descritas em peçonhas de serpentes são glicoproteínas com única cadeia polipeptídica, algumas apresentam microheterogeneidade devido a glicosilação (Magalhães *et al.*, 2003; Zaganelli *et al.*, 1996; Burkhart *et al.*, 1992). Carboidratos possuem importante função na estrutura e atividade das serinoproteases, uma vez que atuam na estabilidade e funcionamento das glicoproteínas (Maruyama *et al.*, 2003).

Embora as enzimas trombina-símile apresentem um elevado grau de similaridade entre suas seqüências e estruturas tridimensionais, até o momento, o modo de ação sobre diferentes substratos ainda não está esclarecido (Serrano & Maroun, 2005). As seqüências de aminoácidos de 21 enzimas trombina-símile foram determinadas parcial ou completamente (Marsh & Williams, 2005), porém, apenas duas tiveram sua estrutura terciária esclarecida (Bortoleto *et al.*, 2002; Castro *et al.*, 2001).

As enzimas trombina-símile podem ser utilizadas terapeuticamente como agentes defibrinogénantes (Kini *et al.*, 2001). As toxinas mais amplamente utilizadas são a batroxobina e ancrod, purificadas das peçonhas de *Bothrops atrox* e *Callosellasma rhodostoma*, respectivamente (Marsh & Williams, 2005; Kini *et al.*, 2001; Markland, 1998).

Até o momento nenhum estudo foi realizado sobre enzimas trombina-símile da peçonha de *B. leucurus*. O estudo da peçonha desta serpente pode revelar novas toxinas com potencial uso terapêutico. O presente trabalho descreve a purificação e caracterização parcial da primeira enzima trombina-símile da peçonha de *B. leucurus*.

2. Materiais e métodos

2.1. Materiais

A peçonha cristalizada de *B. leucurus* foi obtida de serpentes coletadas na Bahia e mantidas no serpentário da Universidade Federal da Bahia. A coluna cromatográfica Mono Q HR 10/10 e a resina Benzamidina-Sepharose foram obtidas da Amersham Biosciences. A coluna de gel filtração TSK-G3000 SW foi obtida da TOSO-HAAS e a de fase reversa C₄ da VYDAC. O fibrinogênio bovino foi adquirido da Calbiochem. Os substratos cromogênicos S-2222, S-2238 e S-2765 foram adquiridos da Cromogenix. Padrões de massa molecular foram obtidos da Sigma-Aldrich. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.2. Purificação da enzima

Quatro amostras de 150 mg da peçonha de *B. leucurus* foram diluídos, separadamente, em 1,5 mL de tampão Tris-HCl 25 mM pH 8,5, centrifugados e cada sobrenadante aplicado na coluna Mono Q HR 10/10, previamente equilibrada com o referido tampão. As frações foram eluídas em gradiente não linear (6,7; 19,9; 20,3; 33,9 e 100%) no mesmo tampão da amostra acrescido de 1 M de NaCl, em fluxo de 2 mL/min. As frações que apresentaram atividade coagulante sobre o fibrinogênio foram reunidas e aplicadas em coluna de afinidade Benzamidina-Sepharose (10 x 100 mm) empacotada

manualmente, previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 25 mM pH 8,5. As proteínas adsorvidas foram eluídas em tampão formiato de amônio 100 mM pH 3,0, em fluxo 1 mL/min. As frações foram imediatamente congeladas e liofilizadas. As frações com atividade coagulante sobre o fibrinogênio procedentes da cromatografia em Benzamidina foram reunidas, dissolvidas em tampão bicarbonato de amônio 50 mM pH 8,0 e aplicadas na coluna TSK-G3000 SW (TOSO-HAAS, 7,5 x 600 mm) equilibrada com o mesmo tampão, em fluxo de 1 mL/min. A fração com atividade trombina-símile foi aplicada em uma coluna de fase reversa C₄ (VYDAC, 4,6 x 250 mm) equilibrada com ácido trifluoracético (TFA) 0,05% e eluída em gradiente linear (30-100%) de acetonitrila contendo 0,1% de TFA, em fluxo 1 mL/min. A enzima purificada foi liofilizada e mantida a -20° C.

2.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

Para avaliar a pureza da toxina e estimar a massa molecular da mesma foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio, de acordo com o método de Laemmli (1970), com géis de empilhamento 2,5% em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e de resolução 12,5%, em tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,75, na presença e ausência de agente redutor (β -mercaptoetanol). Os padrões de massa molecular utilizados foram: albumina bovina (66 KDa), ovoalbumina (45 KDa), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (36 KDa) e anidrase carbônica (29KDa). A SDS-PAGE foi processada a 40 mA e 100 V por, aproximadamente, 4 horas. O gel foi corado com nitrato de prata segundo o método de Blum *et al.* (1987).

2.4. Atividade trombina-símile

A atividade trombina-símile foi avaliada pelo método de Furukawa & Hayashi (1977), modificado para microplaca (Coastar 3590). Para tanto, 50 μ L de solução de fibrinogênio bovino 0,5% diluído em NaCl 0,154 M foram incubados a 37° C durante um minuto, sendo acrescentados 25 μ L de CaCl₂ 0,015 M. Em seguida, foram adicionados 25 μ L das amostras e da toxina purificada (10-50 μ g). O ensaio foi monitorado em leitor de microplaca (DYNATECH MR4000) em 590 nm, para detecção da formação do coágulo. Uma solução de trombina 20 U/mL (SIGMA) foi utilizada como controle positivo.

2.5. Atividade amidolítica sobre substratos cromogênicos

A capacidade da toxina hidrolisar substratos cromogênicos foi avaliada segundo o método de Koh *et al.* (2001). Dez microlitros de cada substrato cromogênico (3 mM), 10 μ L da toxina purificada (1 mM) e 190 μ L de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,8 foram incubados a 37° C, durante 20 min. A liberação de para-nitroanilina foi determinada em densidade óptica de 405 nm, durante 1 h, em leitor de microplaca. Os substratos cromogênicos testados foram: D- Phe-Pip-Arg-pNA (S-2238), Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-pNA (S-2222) e Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA (S-2765).

2.6. Atividade ativadora de fator X

A capacidade de BL-TL I ativar o fator X foi realizada de acordo com o método de Hofmann & Bon (1987), adaptado para microplaca. Para tanto, 10 μ L da toxina (3 μ g) foram incubadas com 0,5 μ L de fator X bovino (0,00015 nM), 199 μ L de tampão Tris-HCl 25 mM contendo 10 mM de CaCl₂ pH 8,3 e 0,5 μ L do substrato F3301 (Sigma) (0,02 mM)

a 37° C. Após 10 e 30 minutos, a atividade foi determinada pela leitura das placas em leitor de microplaca, em 405 nm.

3. Resultados

A enzima BL-TL I foi purificada em quatro etapas cromatográficas de acordo com a figura 1. A peçonha total de *B. leucurus* foi fracionada em cinco picos majoritários em cromatografia de troca iônica (fig. 1A). A atividade coagulante sobre o fibrinogênio foi identificada em três frações: tubos 11 a 16, tubos 23 a 30 e tubos 35 a 38, sugerindo a presença de pelo menos três enzimas trombina-símile nesta peçonha. A fração que apresentou maior atividade coagulante sobre o fibrinogênio (fração BL) foi reunida e submetida à cromatografia de afinidade em Benzamidina-Sepharose (fig 1B). A fração adsorvida, denominada BL-T foi aplicada em TSK-G3000 revelando dois picos majoritários e a atividade trombina-símile foi detectada no pico BL-TL (fig. 1C). A enzima trombina-símile, denominada BL-TL I, teve a pureza confirmada em coluna de fase reversa C₄ e em eletroforese SDS-PAGE (fig. 1D).

A atividade coagulante da enzima trombina-símile sobre o fibrinogênio foi drasticamente reduzida após a etapa de purificação em coluna C₄, sendo detectada apenas com 50 µg da enzima.

A enzima trombina-símile BL-TL I teve rendimento de 0,05 % e possui cadeia única com massa molecular estimada em 23 e 31,8 KDa em condições não redutoras e redutoras, respectivamente.

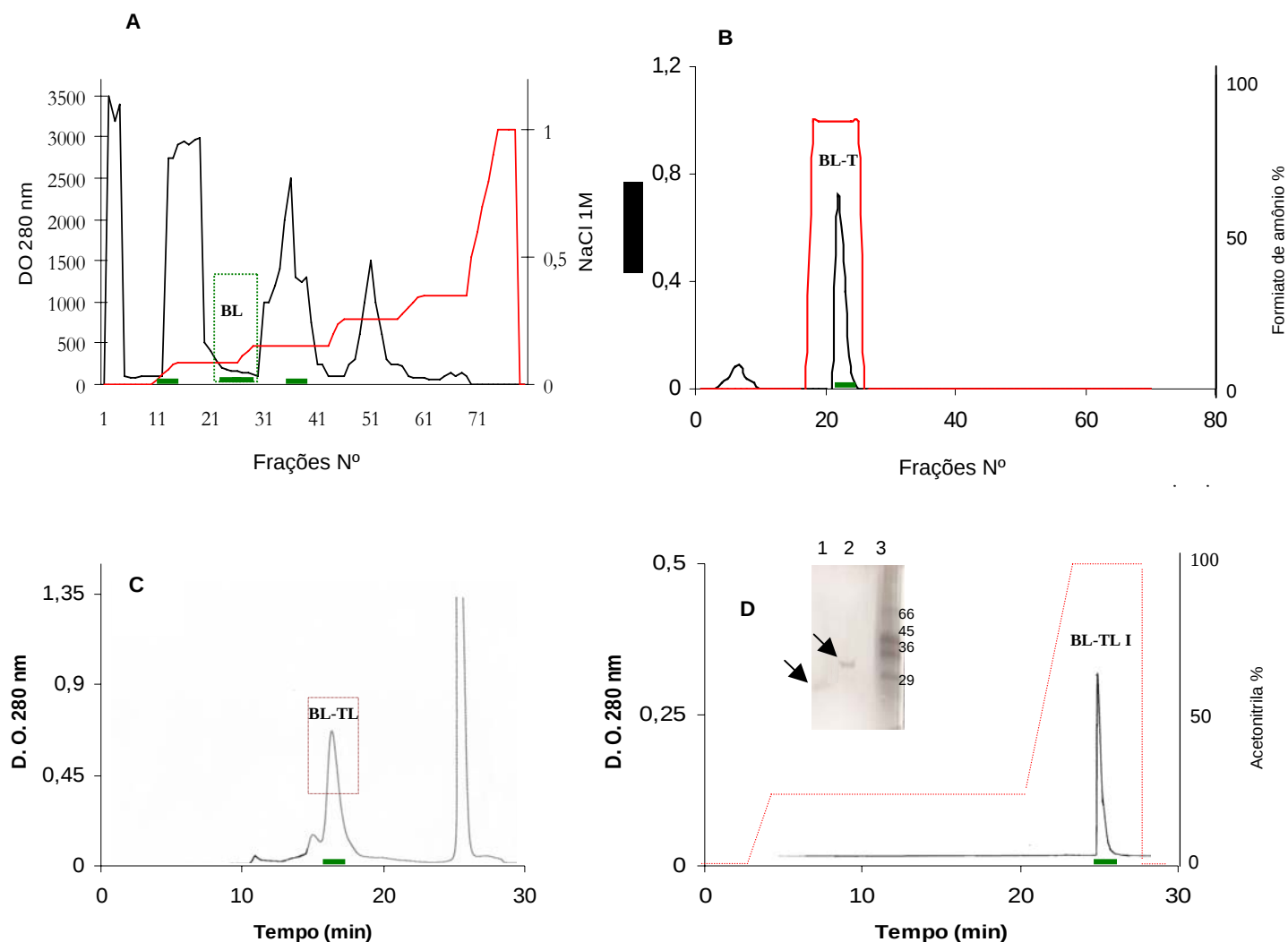


Figura 1. Esquema de purificação de BL-TL I. (A): Fracionamento da peçonha de *B. leucurus* por cromatografia de troca iônica. Quatro “pools” da peçonha (150 mg) foram diluídos em 1,5 mL de tampão Tris-HCl 25 mM pH 8,5, centrifugados e o sobrenadante aplicado a uma coluna Mono Q HR 10/10 equilibrada com o mesmo tampão. A corrida foi processada à temperatura ambiente, em fluxo de 2 mL/min. As frações que apresentaram atividade coagulante sobre fibrinogênio estão em verde (—), e a escolhida para próximo passo está marcada por um retângulo. **(B):** Cromatografia da fração BL em coluna de afinidade Benzamidina-sepharose (10 x 100 mm) equilibrada com tampão Tris-HCl 25 mM pH 8,5. As proteínas foram eluídas em tampão formiato de amônio 100 mM pH 3,0, em fluxo de 1 mL/min. **(C):** Cromatografia da fração BL-T em coluna TSK-G3000 equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 50 mM pH 8,0, em fluxo de 1 mL/min. A fração da gel filtração que apresentou atividade trombina-símile está destacada por um retângulo. **(D):** Purificação de BL-TL em fase reversa C₄ equilibrada com ácido trifluoracético (TFA) 0,05%. A proteína foi eluída em gradiente linear (30-100%) de acetonitrila contendo 0,1% de TFA, em fluxo 1 mL/min. SDS-PAGE 12,5 % de BL-TL I: (1)- BL-TL sem agente redutor; (2) BL-TL I com agente redutor; (3)- padrão de massa molecular. 66 KDa albumina bovina, 45 KDa ovoalbumina, 36 KDa gliceraldeído 3’fosfato e 29 KDa anidrase carbônica.

Embora a enzima BL-TL I não tenha apresentado atividade sobre o fator X, nem capacidade de hidrolisar os substratos S2238 e S2765, a mesma foi capaz de hidrolisar o substrato S-2222, específico para fator X.

Tabela 1. Atividades biológicas da toxina BL-TL I sobre diferentes substratos.

Atividade	Substrato	Atividade após a etapa C ₄
Trombina-símile	Fibrinogênio bovino	Drasticamente reduzida
Ativadora de fator X	F-3301	Ausente
Amidolítica	S-2222	Presente
Amidolítica	S-2238	Ausente
Amidolítica	S-2765	Ausente

4. Discussão

A serpente *Bothrops leucurus* merece destaque por ocasionar acidentes ofídicos no Nordeste do Brasil, especialmente na cidade de Salvador (Lira-da-Silva, 1996), constituindo um problema de saúde pública. O estudo da peçonha desta serpente e de seus componentes é escasso; até o momento apenas uma enzima fibrino(geno)lítica foi purificada da peçonha desta espécie (Bello *et al.*, 2005). O conhecimento detalhado de toxinas presentes na peçonha de *B. leucurus* apresenta importância do ponto de vista funcional, podendo ajudar no esclarecimento de alguns efeitos gerais das peçonhas botrópicas, assim como gerar produtos de importância médica.

Durante o desenvolvimento deste trabalho, uma proteína que coagula o fibrinogênio, denominada BL-TL I, foi purificada da peçonha de *B. leucurus*. A estratégia

de purificação para esta toxina foi a utilização de quatro passos cromatográficos, incluindo como etapa intermediária uma cromatografia de afinidade em coluna Benzamidina-Sepharose. A resina de afinidade tem como ligante o inibidor sintético *p*-aminobenzamidina usado, freqüentemente, para o isolamento de serinoproteases, como mostrado por De-Simone *et al.* (2005). Este inibidor liga-se ao sítio ativo das serinoproteases, mais especificamente, à tríade catalítica His₅₇-Asp₁₀₂-Ser₁₉₅ de serinoproteases, sendo esta ligação revertida por uma alta concentração de sal ou por uma queda brusca do pH.

A utilização da cromatografia em coluna de Benzamidina empacotada com resina comercial não foi eficiente para obtenção da toxina de interesse, em estado homogêneo, uma vez que várias proteínas foram adsorvidas na coluna. Este fato sugere que outras serinoproteases com funções biológicas distintas ou fosfolipases podem ser encontradas na peçonha de *B. leucurus*. Por outro lado, a utilização de coluna Benzamidina-Sepharose ativada em laboratório revelou resultado diferente, uma vez que toxinas puras e parcialmente puras de peçonhas botrópicas foram obtidas em única etapa (Araújo *et al.*, 2005). Em concordância com De-Simone *et al.* (2005), as serinoproteases podem apresentar diferentes perfis de purificação de acordo com espaçadores presentes na resina cromatográfica.

A toxina BL-TL I sofreu grande redução em sua atividade após a cromatografia de fase reversa, em coluna C₄, o que sugere a ocorrência de alterações na sua estrutura terciária, decorrentes de interações hidrofóbicas com a coluna e/ou com o solvente orgânico acetonitrila. A técnica de fase reversa tem sido utilizada para purificação de enzimas trombina-símile como balterobina (Smolka *et al.*, 1997) e Jerdonobina-II (Jin *et al.*, 2005). Esses resultados sugerem que a coluna C₄ só deve ser utilizada para obtenção da toxina a ser analisada por técnicas nas quais a presença da atividade da enzima é irrelevante, como a

determinação da estrutura primária por degradação de Edman. Embora a pureza da toxina BL-TL I tenha sido determinada em coluna C₄ é possível afirmar que a toxina está pura na etapa anterior (gel filtração TSK-G3000). Desta forma, será utilizada uma técnica complementar a gel filtração TSK-G3000 para confirmação da pureza da toxina e obtenção da mesma ativa.

Os resultados da eletroforese mostraram que a BL-TL I apresenta cadeia única, como a as enzimas trombina-símbles purificadas até o momento, com exceção da brevinase isolada da peçonha de *Agkistrodom blomhofii brevicaudus* (Serrano & Maroun, 2005). A massa molecular de BL-TL I sob condições não redutoras, 23 KDa, é semelhante à outras toxinas trombina-símile, como as purificadas da peçonha de *Trimeresurus flavoviridis* (23,5 KDa), *T. mucrosquamatus* (28 KDa), *Bothrops jaracussu* (28 KDa) e *Crotalus durissus terrificus* (29 KDa) (Serrano & Maroun, 2005; Bortoleto *et al.*, 2002; Pirkle, 1998). A estimativa de massa molecular de 31,8 KDa em eletroforese em condições redutoras corrobora os relatos referentes a presença de resíduos de cisteína que formam pontes dissulfeto intra-cadeia (Serrano & Maroun, 2005). Uma vez desfeitas essas ligações, a BL-TL I apresentou conformação que interferiu na capacidade migratória da proteína.

Petretski e colaboradores (2000), através de imunoprecipitação com anticorpo monoclonal 6AD2-G5, identificaram duas toxinas trombina-símile na peçonha de *B. leucurus*; uma com massa molecular entre 36-38 KDa e outra com menos de 31 KDa. Este relato corrobora o nosso resultado de que na peçonha de *B. leucurus* estão presentes mais do que uma toxina com atividade trombina-símile.

BL-TL I até o momento é a única toxina com atividade trombina-símile capaz de hidrolisar o substrato cromogênico S-2222 (Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-pNA), específico para o fator X, sugerindo que ela pode atuar como ativadora da protrombina.

A enzima BL-TL I não hidrolisou o substrato S-2238 específico para trombina. A Jerdonobina-II, uma trombina-símile com baixa atividade coagulante sobre fibrinogênio, isolada da peçonha de *Trimeresurus jerdonii*, também não hidrolisou esse substrato, atuando sobre S2251, o que mostra sua preferência sobre resíduos de lisina ao invés de arginina (Jin *et al.*, 2005). Por outro lado, outras toxinas com alta atividade coagulante sobre fibrinogênio como a Jerdonobina-I (*Trimeresurus jerdonii*) e a trombina-símile isolada da peçonha de *Agkistrodon saxatilis* hidrolisam o substrato S2238 (Jin *et al.*, 2005; Koh *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2000). Uma vez que a BL-TL I apresentava alta atividade coagulante sobre fibrinogênio antes de ser submetida à cromatografia em C4, a ausência de hidrólise do substrato específico para trombina parece ser decorrente da redução da sua atividade.

Os ensaios biológicos realizados neste trabalho em microplaca apontam uma nova metodologia prática e menos dispendiosa, em que os testes das atividades trombina-símile e amidolítica podem ser realizados com rapidez, eficiência e confiabilidade.

Em virtude do baixo rendimento que a toxina purificada apresenta, é necessária a utilização de quantidades maiores de peçonha total, para tornar viável a total caracterização de BL-TL I.

BL-TL I é a primeira toxina trombina-símile purificada da peçonha de *B. leucurus*. Para estudos subseqüentes serão estabelecidas novas estratégias de purificação, com o intuito de complementar a caracterização da referida toxina.

5. Referências Bibliográficas

Araújo IP, Spencer PJ, Guarnieri MC (2005). Adaptação de técnica cromatográfica para purificação de serinoprotease trombina-símile da peçonha de *Bothrops leucurus*. In: *XIV Congresso Brasileiro de Toxicologia*. 2005. Recife. Revista Brasileira de Toxicologia, p. 255.

Barret AJ & Williams ND (1995). Perspectives in Biochemistry and Biophysics. *Arch. Biochim. Biophys*, 318:247-250.

Bello CA, Hermogenes ALN, Magalhães A, Veiga SS, Gremski LH, Richardson M, Sanchez EF (2005). Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic proteinase from *Bothrops leucurus* (white-tailed jararaca) snake venom. *Toxicon* (in press).

Blum H, Beier H, Gross HJ (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8:93-99.

Bortoleto RK, Murakami MT, Watanabe L, Soares AM, Arni RK (2002). Purification, characterization and crystallization of Jararacussin-I, a fibrinogen-clotting enzyme isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. *Toxicon*, 40:1307-1312.

Burkhart W, Smith GFH, Su JL, Parikh I, Levine H (1992). Amino acid sequence determination of Ancrod, the thrombin-like α -fibrinogenase from the venom of *Agkistrodon rhodostoma*. *FEBS*, 297:297-301.

Castro HC, Silva DM, Craik C, Zingali RB (2001). Structural features of a snake venom thrombin-like enzyme: thrombin and trypsin on a single catalytic platform? *Biochim. Biophys. Acta*, 1547:183-195.

De-Simone SG, Correa-Neto C, Antunes OAC, De-Alencastro RB & Silva Jr FP (2005). Biochemical and molecular modeling analysis of the ability of two *p*-aminobenzamidine-based sorbents to selectively purify serine proteases (fibrinogenases) from snake venoms. *Journal of Chromatography B*, 822:1-9.

Furukawa Y, Hayashi K, (1977). Factor X converting and thrombin-like activities of *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon*, 15:107-114.

Hofmann H & Bon C (1987). Blood coagulation induced by the venom of *Bothrops atrox*. Identification, purification and properties of two factor X activators. *Biochemistry*, 26:780-787.

Jin Y, Lu Q-M, Chen R-Q, Wu J-B, Xiong Y-L (2005). Molecular characterization of a weak fibrinogen-clotting enzyme from the *Trimeresurus jerdonii* venom. *Toxicon*, 45:353-360.

Kini RM, Rao VS, Joseph JS (2001). Procoagulant proteins from snake venoms. *Haemostasis*, 2001:218-224.

Koh Y, Chung K-H, Kim D-S (2000). Biochemical characterization of a thrombin-like enzyme and a fibrinolytic serine proteases from snake (*Agkistrodon saxatilis*) venom. *Toxicon*, 39:555-560.

Krem MM, Rose T, Di Cera E (1999). The C-terminal sequence encodes function in serine proteases. *J. Biol. Chem*, 274:28063-28066.

Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.

Lesk AM & Fordham WD (1996). Conservation and variability in the structure of serine proteinases of the chymotrypsin family. *J. Mol. Biol*, 258:501-537.

Lira-da-silva R, Andrade-lima R, Brazil TK (1996). Distribuição geográfica de *Bothrops leucurus* (SERPENTES; VIPERIDAE). *IV Congresso Latinoamericano de Herpetologia 1996*, Santiago, 153.

Lu Q-M, Jin Y, Li D-S L, Wang W-Y, Xiong Y-L (2000). Characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of *Trimeresurus jerdonii*. *Toxicon*, 38:1225-1236.

Magalhães A, Ferreira RN, Richardson M, Gontijo S, Yarleque A, Magalhães HPB, Bloch C, Sanchez E (2003). Coagulant thrombin-like enzymes from the venoms of Brazilian and Peruvian bushmaster (*Lachesis muta muta*) snakes. *Comparative Biochemistry and Physiology part B*, 136:255-266.

Markland FS (1998). Snake venom and the hemostatic system. *Toxicon*, 36:1749-1800.

Maroun RC (2001). Molecular basis for the partition of the essential functions of thrombin among snake venom serine proteinases: the case of thrombin-like enzymes. *Haemostasis*, 31:247-256.

Marsh N & Williams V (2005). Practical applications of snake venom toxins in hemostasis. *Toxicon*. Article in press, 1-11.

Maruyama N, Sagushi K, Mentele R, Assakura MT, Ohi H, Fujita Y, Camargo AC, Higuchi S, Serrano SM (2003). The unusual high molecular mass from Bothrops proteaseA, a trypsin-like serine protease from the venom of *Bothrops jararaca*, is due to its high carbohydrate content. *Biochim. Biophys. Acta*, 1652:1-6.

Matsui T, Fujimura Y, Titani K (2000). Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochim. Biophys. Acta*, 1477:146-156.

Parry MA, Jacob U, Huber R, Wisner A, Bon C, Bode W (1998). The crystal structure of the novel snake venom plasminogen activator TSV-PA: a prototype for snake venom serine proteinases. *Structure* 9, 1195-1206.

Petrestiki JH, Kanashiro M, Silva CP, Alves EW, Kipnis TL (2000). Two related thrombin-like enzymes present in *Bothrops atrox* venom. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33:1293-1300.

Pirkle H (1998). Thrombin-like enzymes from snake venoms: An update inventory. *Thromb. Haemost*, 79:675-683.

Serrano SM & Maroun RC (2005). Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. Substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon*, 45:1115-1132.

Smolka MB, Marangoni S, Oliveira B, Novello JC (1997). Purification and partial characterization of a thrombin-like enzyme, balterobin, from the venom of *Bothrops alternatus*. *Toxicon*, 36:1059-1063.

Stocker KF (1990). *Medical use of snake venom proteins*. CRC press.

Zaganelli GL, Zaganelli MGM, Magalhães A, Diniz CR, Lima ME (1996). Purification and characterization of a fibrinogen clotting enzyme from the venom of jararacuçu (*Bothrops jararacussu*). *Toxicon*, 34:807-819.