

# PURIFICAÇÃO PARCIAL DE PROTEASES DO VENENO DE BOTHROPS COTIARA (SERPENTES: VIPERIDAE)

## Partial purification of proteases from *Bothrops cotiara* venom (Serpentes: Viperidae)

Tiago Tuleski Lorencetti<sup>1</sup>  
André Zelanis Palitot Pereira<sup>1</sup>  
Priscila Hess Lopes<sup>1</sup>  
Elder Ribeiro Pereira<sup>1</sup>  
Viviane Kizltyka<sup>2</sup>  
Luiz Fernando Pereira<sup>3</sup>  
Selene Lobo Elifio-Esposito<sup>4</sup>

### Resumo

*Bothrops cotiara* (GOMES, 1913) pode ser encontrada desde São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Paraná e Santa Catarina. Diversas toxinas já foram isoladas de venenos botrópicos, mas pouco se sabe sobre enzimas proteolíticas obtidas a partir do veneno de *B. cotiara*. Por essa razão, a caracterização de tais moléculas se faz importante. A atividade proteolítica foi medida usando caseína como substrato e por zimograma em SDS-PAGE contendo gelatina. Os resultados mostraram baixa atividade caseinolítica (7,5 U/ mg) se comparada com a de outros venenos botrópicos, mas esta baixa atividade também é encontrada no veneno de outras espécies do grupo *alternatus*. O zimograma mostrou maior atividade por proteínas na faixa de aprox. 95 Kda que foi inibida totalmente por EDTA (10 mM) e parcialmente pelo inibidor de serinoprotease PMSF (5 mM). Cromatografia de filtração em gel de Sephadex G-100 (130 x 2 cm) resultou em dois picos principais, com atividade proteolítica apenas no primeiro (P1). Tal fração apresentou cinética enzimática pela variação do substrato e de temperatura semelhante ao veneno bruto. Os resultados sugerem a purificação parcial de uma metaloprotease.

Palavras-chave: Metaloprotease; Veneno; Serpentes; *Bothrops cotiara*.

### Abstract

*Bothrops cotiara* (GOMES, 1913) is found through São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Paraná and Santa Catarina. Diverse toxins from bothropic venoms have already been isolated. However, just a few data are found about *B. cotiara* toxins, in respect to its proteolytic activity. For this reason, the characterization of such activity becomes important. The proteolytic activity was investigated by kinetic assays using casein as substrate and by zymogram on SDS-PAGE with gelatine. Results showed low caseinolytic activity (7,5 U/ mg) in relation to those described for other *Bothrops* venoms, however, this low activity is verified in other species of the *alternatus* group. Zymogram presented intense proteolytic activity over gelatine characterized by proteins of aprox. 95 KDa, inhibited by the presence of 2-mercaptoetanol, divalent metal chelators as EDTA (10 mM) and partialy by serine-protease inhibitor, as PMSF (5 mM). Gel filtration chromatography performed on Sephadex G-100 column (130 x 2 cm) resulted in two peaks where isolation of the fraction with proteolytic activity was possible (P1). Such a fraction showed the same kinetcs by substract and temperature variation as crude venom. These results suggest the presence of a metaloprotease in the venom of *B. cotiara*, as described for other *Bothrops* species.

Keywords: Metaloprotease; Venom; Serpentes; *Bothrops cotiara*.

<sup>1</sup> Aluno do Curso de Biologia da PUCPR.

<sup>2</sup> Biólogo Graduado pelo Curso de Biologia da PUCPR.

<sup>3</sup> Professores do Curso de Biologia da PUCPR.

<sup>4</sup> Autora para correspondência: Rua Imaculada Conceição, 1155. CEP 80215-901. Curitiba, PR. E-mail: selene.e@pucpr.br

## Introdução

O veneno botrópico é um conjunto complexo de enzimas e diversos outros componentes protéicos que demonstram importante papel na alteração de processos fisiológicos (1). Dentre suas várias ações, a atividade proteolítica é inerente a todas espécies do gênero (2). Estas enzimas não são responsáveis pela ação letal, mas sim por séria hemorragia e necrose sistêmica e local principalmente por interferir em diversos pontos do mecanismo hemostático (3). Diversas toxinas oriundas do veneno de serpentes do gênero *Bothrops* já foram isoladas, contudo, não existem dados a respeito de proteases provenientes do veneno de *B. cotiara* (4). Desta forma, torna-se importante um estudo bioquímico com enfoque de purificação e caracterização bioquímica destas enzimas.

## Material e Métodos

Foi utilizado um pool de veneno de *Bothrops cotiara* liofilizado, fornecido pelo Instituto Butantan, São Paulo. O veneno foi mantido à temperatura de -20°C até o uso. Para utilização nos ensaios, foi preparada uma solução estoque em tampão fosfato-salina (PBS) pH 7,4 (10 mg/ml).

Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) foi realizada de acordo com o método descrito por Laemmli (5). O ensaio foi realizado em gel de poliacrilamida a 15% (8,3 x 10,0 cm). Para os ensaios com o veneno bruto, este foi diluído em tampão de amostra de eletroforese com e sem 2-mercaptoetanol e foi aplicado volume correspondente a 10, 20, 30 e 50 µg de veneno/poço. Para ensaios com a fração obtida por cromatografia, este foi diluído somente em tampão sem 2-mercaptoetanol e foi aplicado volume correspondente a 50 µg de veneno/poço. As corridas ocorreram sob corrente constante de 25 mA, em temperatura ambiente. A revelação das bandas protéicas foi feita com Azul de Comassie R-250 (Merck).

Para os zimogramas, a análise de atividade proteolítica sobre a gelatina

(3mg/ml) foram realizadas segundo Feitosa et al. (6) com algumas modificações. As corridas foram realizadas em 4°C. Após a corrida o gel foi encubado por 30 minutos em solução de Triton X-100 2,5% para remoção do SDS. Em seguida, este gel foi incubado por três horas em uma solução tampão contendo Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM e CaCl<sub>2</sub> 5 mM, pH 7,4, em estufa a 37°C. Para análise da ação de inibidores de proteases, o gel foi incubado em tampão nas mesmas condições descritas acima, contendo EDTA 10 mM ou PMSF 5mM.

O ensaio de atividade proteolítica seguiu o protocolo descrito por Lomonte e Gutiérrez (2), onde a caseína foi utilizada como substrato. As amostras foram diluídas em PBS, para uma concentração final de 100 mg/ml. Em tubos de ensaio foram adicionados 1ml da solução de veneno, juntamente com 2ml de solução de caseína 1%. Em seguida, os tubos foram incubados a 37°C por 30 minutos em banho-maria. Decorrido esta fase inicial, 4ml de ácido tricloro-acético (TCA) a 5% foram adicionados em cada tubo e estes deixados em repouso em temperatura ambiente por 30min. Os tubos foram centrifugados por 10min a 9000 rpm, 24°C. A absorbância dos sobrenadantes foi mensurada a 280nm. A atividade proteolítica foi expressa em unidades por miligrama de veneno. Seguiram-se ensaios de cinética enzimática pela variação da concentração de substrato e pela variação da temperatura.

A dosagem do teor protéico total do veneno bruto foi feita pelo método colorimétrico de Lowry et al. (7), enquanto que a determinação de carboidratos totais seguiu o método do fenol-ácido sulfúrico (8). Para ambas as dosagens, o veneno foi diluído em solução salina 0,9% para uma concentração final de 500 mg/ml. A determinação do teor protéico e glicídico total foi feita com base em uma curva de calibração com padrão de Albumina Sérica Bovina (BSA, SIGMA, St. Louis, MO, USA) e D-Galactose (VETEC QUÍMICA, Rio de Janeiro, Brasil), respectivamente. Os ensaios foram feitos em triplicata.

O veneno bruto de *B. cotiara* foi fracionado por cromatográfica líquida,

utilizando-se uma coluna de vidro de 130 x 2cm, com volume aproximado de 400ml. A coluna foi preenchida por gel de filtração (Sephadex G-100, Uppsala, Sweden) e equilibrada com tampão acetato de sódio 0,05M, pH 5,4. Para esta etapa, 400mg do veneno bruto de *B. cotiara* foram re-suspendidos em 8ml de tampão acetato de sódio e centrifugados a 12.000 rpm, 4°C por uma hora. O sobrenadante foi retirado e aplicado na coluna. O tempo total de fracionamento foi de 12 horas com um fluxo de eluição de 0,5 ml/min. As frações do veneno foram coletadas com o auxílio de um coletor automático (Pharmacia, Biotech, USA), resultando em um total de 120 frações com volume de 5ml cada. O perfil de eluição foi monitorado espectrofotometricamente pela absorbância a 280nm.

## Resultados e Discussão

O veneno bruto de *B. cotiara* apresentou alto teor protéico (937,9 ± 56,2 mg/mg de veneno) e baixo teor glicídico (31,2 ± 1,2 mg/mg de veneno). Pouco se sabe a respeito da porção glicídica dos venenos de serpentes, nem tampouco do seu possível papel durante o envenenamento (9). Contudo, é sabido que os carboidratos representam uma pequena fração dos venenos de serpentes, podendo estar

associados a proteínas, como radicais prostéticos ou na formação de glicoproteínas (10). Por outro lado, as proteínas constituem mais 90% da composição do veneno (11) e compõem uma mistura complexa de toxinas responsáveis direta ou indiretamente pelos efeitos deletérios do veneno nos tecidos animais (4).

A atividade proteolítica sobre a caseína medida para o veneno de *B. cotiara* foi de 7,5 U/ mg, relativamente baixa se comparada aos venenos de algumas espécies do gênero *Bothrops* (1,9), mas de acordo com o que é verificado em outras espécies do grupo *alternatus* (12).

O veneno apresentou um perfil protéico caracterizado por bandas protéicas de baixa massa molar nas faixas de 14 a aprox. 70 KDa (Figura 1-A). O zimograma (Figura 1-B) revelou atividade proteolítica sobre a gelatina, a partir da concentração de 20 mg veneno/poço referentes a bandas protéicas de aprox. 40 e 70 KDa. Diferentes preparações com 2-mercaptoetanol não apresentaram atividade proteolítica, assim como pela incubação do gel em tampão com EDTA 10 mM. Incubação com PMSF 5mM, inibidor de serinoproteases, resultou apenas em leve redução da atividade (dados não mostrados).

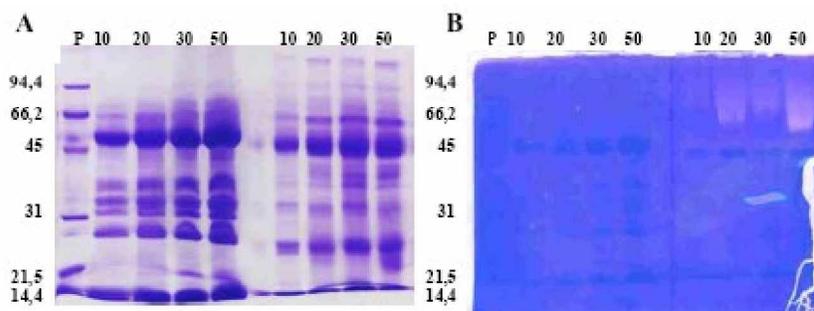


Fig 1: Perfil protéico do veneno bruto de *B. cotiara* em diferentes concentrações de proteína (em µg; números acima nos géis). Os dois géis mostram nos quatro poços à esquerda o resultado em presença de 2-mercaptoetanol (condições desnaturantes) e, nos quatro poços à direita, ausência (condições não desnaturantes). A) SDS-PAGE; B) Zimograma com atividade proteolítica sobre a gelatina. Números à esquerda dos géis indicam padrões de massa molar (KDa).

O fracionamento do veneno bruto de *B. cotiara* por cromatografia de gel filtração resultou em dois picos principais, mostrados na Figura 2. A Figura 3A mostra

o perfil eletroforético destas frações e verifica-se que o pico 1 se apresenta livre de proteínas de baixa massa molar, que se concentraram no pico 2. Tais frações foram

dialisadas contra água destilada e liofilizadas para análise. Ensaios de atividade proteolítica revelaram resultado positivo para o pico 1 (P1), que foi escolhido para dar prosseguimento ao projeto. O zimograma desta fração (Figura 3B) revelou intensa atividade proteolítica sobre a gelatina caracterizadas por proteínas próximas da origem do gel (aprox. 70 e 95 KDa), além da manutenção da atividade na faixa próximas a

40 KDa. A incubação do gel com tampão contendo EDTA 10mM impediu a atividade proteolítica. O incremento da atividade específica verificada para esta fração em relação ao veneno bruto, característico de um processo de purificação, também pôde ser constatado pelo ensaio in vitro com caseína que revelou atividade proteolítica de 13 U/mg de proteína.

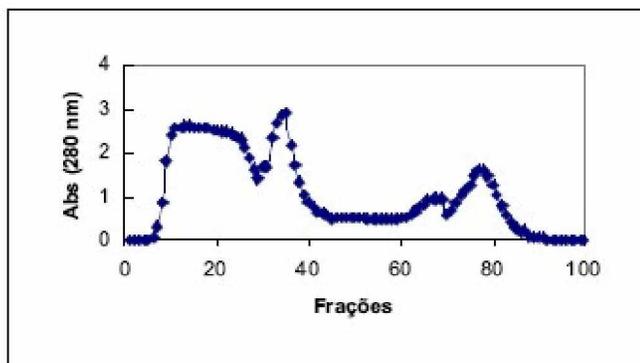


Fig 2: Cromatografia líquida de exclusão em gel de Sephadex G-100, em coluna de vidro de 1,30 x 2 cm (400 ml). A coluna foi equilibrada com tampão acetato de sódio 0,05M, pH 5,4 antes da aplicação de 400 mg do veneno bruto de *B. cotiara*, re-suspensos em 8 ml de tampão. O fluxo de eluição foi de 0,5 ml/min e as frações coletadas (5 ml) foram monitoradas pela absorbância a 280 nm.

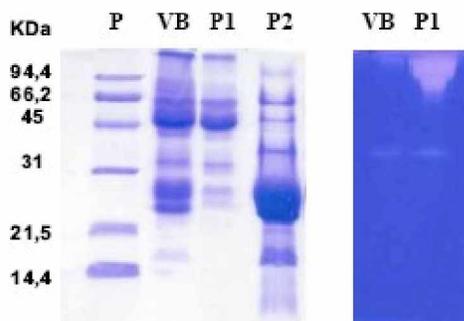


Figura 3: Comparação do perfil proteico do veneno bruto e frações principais obtidas por cromatografia de filtração em gel por SDS-PAGE e zimograma. P = padrão de massa molar; VB = veneno bruto; P1 = pico 1; P2 = pico 2. Em cada poço foi aplicado aprox. 50 µg de proteínas, reveladas por azul de coomassie.

Os ensaios de cinética enzimática foram realizados com o veneno bruto e com a fração P1. A cinética de atividade proteolítica com variação da concentração do substrato (Figura 4A e B) revelou que o veneno bruto tem atividade crescente sobre a caseína até a concentração de 0,4% (15,4 U/mg), a partir deste ponto apresenta perfil de saturação. Para P1 a atividade aumentou

progressivamente sem mostrar saturação até a concentração de 1% de caseína, com atividade máxima de 33,8 U/mg. Pelo fato da caseína de não ser muito solúvel, não foi possível preparar uma solução em concentrações superiores a 1%, fazendo com que não fosse possível observar a qual concentração de caseína P1 levaria à sua saturação.

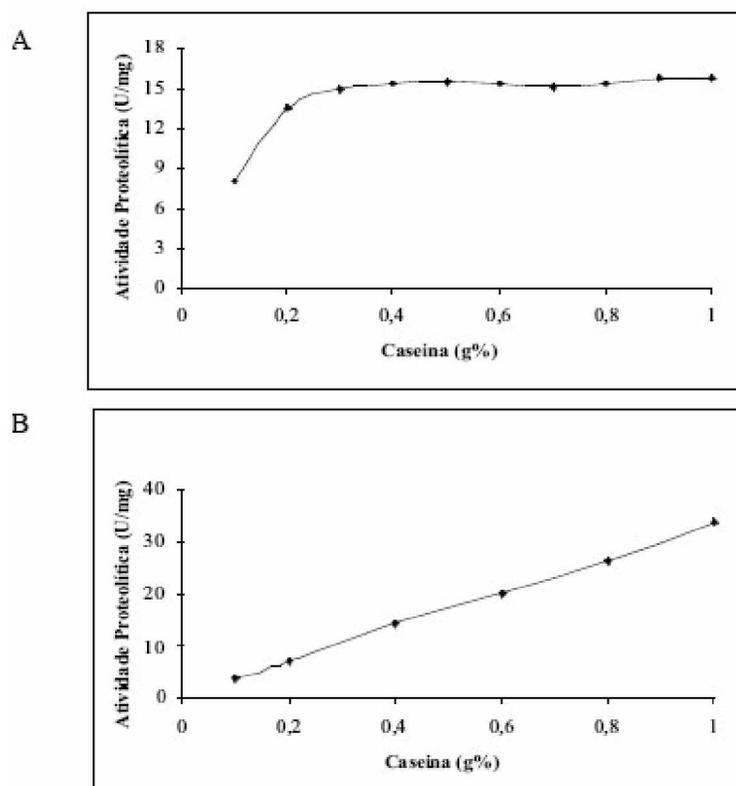
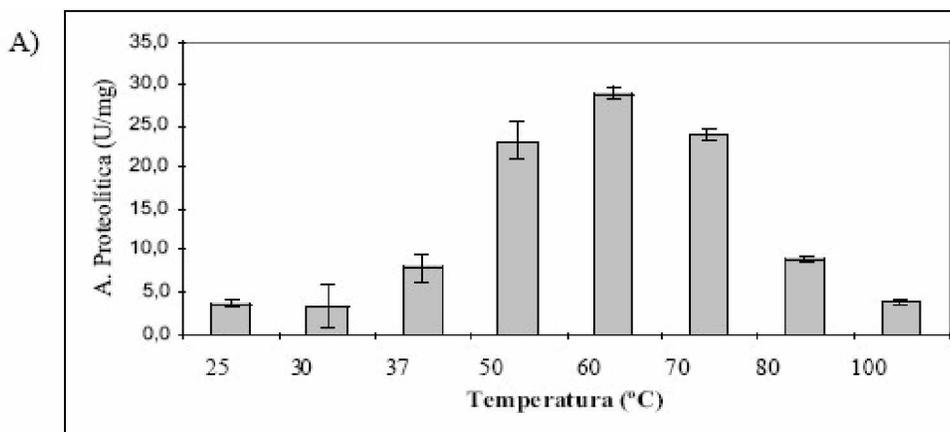


Fig 4: Cinética enzimática com variação de substrato para o veneno bruto (A) e Pico 1 (B). As amostras (1 mg/ml) em PBS foram ensaiadas sobre a solução de caseína em diferentes concentrações, com incubação por 30 min a 37°C.

A cinética de atividade proteolítica com variação de temperatura (Figura 5 A e B) foi semelhante para ambas as amostras e verifica-se que a atividade aumentou conforme o aumento da temperatura, chegando até um ponto máximo de 60°C

(25,8 U/mg para o veneno bruto e 28,8 U/mg para P1). Em temperaturas superiores a 60°C, a atividade começou a baixar, mostrando sua menor atividade na fervura, ponto em que muitas moléculas enzimáticas já se encontram desnaturadas.



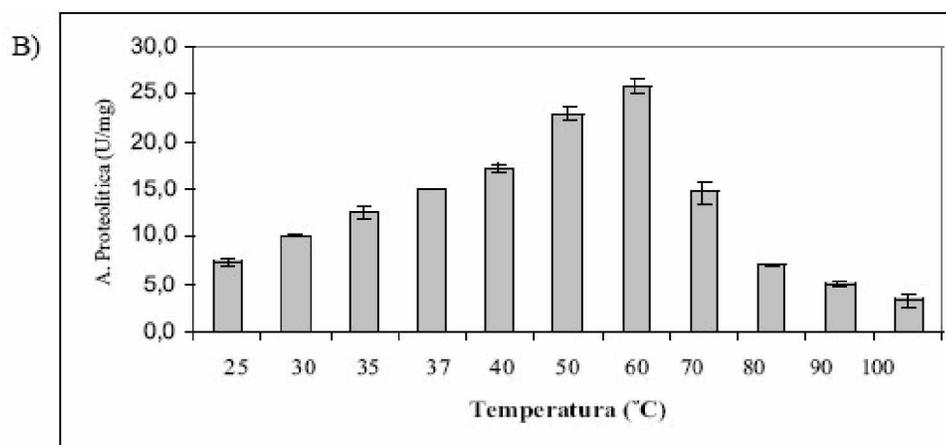


Figura 5: Cinética enzimática com variação de temperatura para: A) veneno bruto e B) Pico 1. As amostras (0,1 mg/ml) em PBS foram ensaiadas sobre a caseína (1 g%) , com incubação por 30 mi n. nas temperaturas indicadas.

Os resultados apresentados neste trabalho permitem sugerir a presença de duas famílias enzimáticas: metalo e serinoproteases, a primeira em maior proporção. O fracionamento por uma etapa cromatográfica única não foi suficiente para o total isolamento das moléculas, mas permitiu a maior concentração de metaloproteases no primeiro pico (P1). Faz-se necessária a continuação deste projeto para a purificação e caracterização completa destas enzimas. As proteases são abundantes em todos os venenos botrópicos e seu estudo é importante por vários aspectos. Por um lado se tem demonstrado que muitos efeitos tóxicos característicos do envenenamento são provocados por proteases, como é o caso de várias proteínas hemorrágicas (11,13,14). Por outro, uma vez purificadas e conhecidos seus mecanismos de ação, tais proteínas podem se tornar instrumentos úteis para o estudo da estrutura de outras proteínas e até mesmo para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes para os efeitos locais do envenenamento.

#### Agradecimentos

Agradecemos ao Instituto Butantan-SP pelo fornecimento do veneno, bem como à Dr.<sup>a</sup> Maria de Fátima Domingues Furtado (Setor de Herpetologia) e ao Dr.<sup>o</sup> Julio de Moura Leite (Museu de História Natural do Capão da Imbuia) pelas diversas sugestões e apoio. Aos responsáveis pelo

Laboratório de Química de Carboidratos (UFPR), pela liofilização das amostras e ao PIBIC/PUCPR por tornar viável este trabalho.

#### Referências

1. Furtado MFD, Colletto GMDD, Dias da Silva W. Controle de qualidade dos venenos animais e dos correspondentes antivenenos. I- Padronização dos métodos de ensaio das atividades bioquímicas e farmacológicas dos venenos de algumas espécies do gênero *Bothrops* e *Crotalus* usando amostras secas a temperatura ambiente ou liofilizadas. Mem Inst Butantan. 1991; 53(2):149-159.
2. Lomonte B, Gutiérrez JM. La actividad proteolítica de los venenos de serpientes de Costa Rica sobre la caseína. Rev Biol Trop; 1983; 31(1): 3740.
3. Barravieira B, Pereira MCP. Acidentes por serpentes do gênero *Bothrops*. In: Barravieira B. Venenos Aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos. Rio de Janeiro: EPUB 1999; 19(4): 11.
4. Theakston RDG, Kamaguti ASA. list of toxins and other natural products

- with biological activity. *Toxicon* 2002; 40: 579-651.
5. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature* 1970; 227: 680-5.
  6. Feitosa L, Gremski W, Veiga SS, Elias MCQB, Graner E, Mangili OC, et al. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. *Toxicon* 1998; 36: 1039-1051.
  7. Lowry OH, Rosenbour gh NJ, Farr IL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Trop* 1951; 193: 265-275.
  8. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA. Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 1956; 28: 350-6.
  9. Zelanis APP, Pereira LF, Elifio SL. Comparação do perfil protéico e atividade biológica in vitro de venenos de serpentes do gênero *Bothrops* (Serpentes: Viperidae). *Estudos de Biologia* 2003; 25(52): 11-5.
  10. Aragón F, Bolanões R, Vargas O. Carbohidratos del veneno de *Bothrops asper* de Costa Rica. *Estudo quantitativo*. *Ver Biol Trop* 1977; 25(2):171-8.
  11. Souza JRF, Monteiro RQ, Castro HC, Zingali RB. Proteolytic action of *Bothrops jararaca* venom upon its own constituents. *Toxicon* 2001; 39:782-792.
  12. Martins M, Araújo MS, Sawaya RJ, Nunes N. Diversity and evolution of macrohabitat use, body size and morphology in a monophyletic group of Neotropical pitvipers (*Bothrops*). *J Zool* 2001; 25(4): 529-538.
  13. Smolka MB, Marangoni S, Oliveira B, Novello JC. Purification and partial characterization of a thrombin-like enzyme, balterobin, from the venom of *Bothrops alternatus*. *Toxicon* 1998; 36: 1059-1063.
  14. Markland FS. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon* 1998; 36(12): 1749-1800.

Recebido em 12/04/2005; aceito em 17/04/2005  
Received in 04/17/2005; accepted in 47/17/2005