

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Fatores Neutralizantes das Atividades
Coagulante e Hemorrágica da Peçonha Bruta de
B.moojeni no soro da mesma espécie**

Aluno: Willian Bráulio Lopes

Uberlândia – MG
2003

SISBI/UFU



1000210959

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Fatores Neutralizantes das Atividades
Coagulante e Hemorrágica da Peçonha Bruta de
B.moojeni no soro da mesma espécie**

MON
515.919:598.126
L864
TES/MEM

Aluno: Willian Bráulio Lopes

Orientadora: Profa Dra Amélia Hamaguchi

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Uberlândia
para a obtenção do Título de Mestre
em Genética e Bioquímica (Área
Bioquímica)**

Uberlândia – MG
2003

FICHA CATALOGRÁFICA

- L864f Lopes, Willian Bráulio, 1977-
Fatores neutralizantes das atividades coagulante e hemorrágica da peçonha bruta de *B. moojeni* no soro da mesma espécie / Willian Bráulio Lopes. - Uberlândia, 2003.
69f. : il.
Orientador: Amélia Hamaguchi.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.
1. Caissaca (Cobra) - Teses. 2. Inibidores de metaloproteinases - Teses. 3. Inibidores - Teses. 4. Cobra venenosa - Teses. I. Hamaguchi, Amélia. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 615.919:598.126 (043.3)

Dedicatória

Dedico este trabalho

- 1- A Deus...
- 2- Aos meus pais, irmãs, avós, tias, enfim a todos os familiares pela confiança, apoio, educação e amor.
- 3- A Karina Marangoni e Ana Laura Marangoni pelo amor, carinho, compreensão, respeito e dedicação.
- 4- Ao grande e inesquecível amigo Marcel Resende Davi (*In Memoriam*)...
- 5- Às pessoas que acreditam: acreditam em dias melhores, acreditam em si mesmos, acreditam que fazem parte de algo grandioso. E acreditam que a vida é uma brincadeira e que não há regras, pois se pode manter o espírito de criança sem perder a responsabilidade de adulto.

Agradecimentos

- 1- A professora Amélia Hamaguchi pela orientação, amizade e dedicação durante todo este tempo de trabalho
- 2- A professora Maria Inês pela sensatez, amizade e auxílio em momentos importantes do desenvolvimento deste trabalho
- 3- A Pentapharm do Brasil LTDA e Adelheid pelo fornecimento do sangue das serpentes e camundongos.
- 4- Ao Dr. Jonas Perales por disponibilizar auxílio, espaço e tecnologias para o desenvolvimento da segunda parte deste trabalho. Ao Dr Richard Valente pela excelente orientação nos experimentos realizados no capítulo 2. A Dra Ana Gisele Neves Ferreira pelo acompanhamento nos experimentos de identificação do inibidor de SVMPs enfim, a todos os pesquisadores do Laboratório de Toxinologia do Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, Surza, Patrícia, Simone e Alexander, pelo acolhimento e presteza.
- 5- A CAPES pelo auxílio financeiro
- 6- Ao Dr. Fábio Oliveira pela disponibilização de seu tempo na elaboração e delineamento de alguns experimentos.
- 7- A Dra Veridiana de Melo Rodrigues Ávila pelo apoio, ensinamentos e sobretudo pela amizade
- 8- Ao mestre Gilvan pelo companheirismo e lealdade em todos os momentos.
- 9- Aos professores do Instituto de Genética e Bioquímica pela boa convivência e dedicação

10- A Dra. Ana Maria Bonetti pela confiança e ensinamentos.

11- Aos amigos do Laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais: Rodrigo (cavalo), Ana Flávia, Luis Fernando, Luiz Carlos, Carla, Rone, Renata, Luis Henrique, Mirian, Elisângela e Cynthia. A Cristiani Baldo pela amizade, e empréstimo de artigos (que não foram poucos), a Tianinha, D. Nenzinha, e Cleuber...

12- Aos funcionários (e também amigos) do Instituto de Genética e Bioquímica: Gérson Fraissat, D. Norita, Marlene, D. Maura e Sr. Vilmar.

13- A todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho.

Sumário

Introdução Geral	1
As serpentes.....	2
O gênero <i>Bothrops</i>	3
Epidemiologia.....	3
Metaloproteases.....	5
Mecanismo de ativação das metaloproteases.....	6
Domínios.....	6
Função dos domínios.....	8
Estrutura das SVMs.....	8
Inibidores.....	10
Referências Bibliográficas.....	12
Capítulo 1: Fracionamento do soro de serpente <i>B. moojeni</i> e identificação de atividades	
anticoagulante e anti-hemorrágica.....	14
Resumo.....	15
Abstract.....	16
Introdução.....	17
Material e Métodos.....	18
Material	18
Métodos.....	19
Soro de <i>B. Moojeni</i>	19
Dosagem de Proteínas.....	19
Fracionamento do soro total da serpente <i>B. moojeni</i> em Q-Sepharose.....	19
Atividade Anti-coagulante	19
Atividade Anti-hemorrágica.....	20
Eletroforese em gel de Poliacrilamida.....	20
Recromatografia da Fração F2 em Q-Sepharose.....	20
Resultados.....	22

Fracionamento do soro de <i>B. moojeni</i> (SBm) em cromatografia de troca iônica em Q-sepharose.....	22
SDS-PAGE 14% das frações obtidas da cromatografia de SBm em Q-sepharose.....	23
Atividade anti-coagulante das frações obtidas do fracionamento de SBm em Q-sepharose.....	24
Atividade anti-hemorrágica das frações obtidas do fracionamento SBm em Q-sepharose.....	25
Recromatografia da fração F2 em coluna de troca iônica Q-sepharose.....	29
Perfil eletroforético SDS-PAGE 14%, das frações obtidas da recromatografia de F2 em Q-sepharose.....	30
Atividade anti-hemorrágica das frações obtidas da recromatografia da fração F2 em Q-sepharose.....	31
Discussão.....	35
Conclusão.....	38
Referências bibliográficas.....	39
Capítulo 2: Purificação e caracterização parcial de uma proteína do soro de <i>B.moojeni</i> com atividade anti-hemorrágica da peçonha bruta da mesma espécie.....	41
Resumo.....	42
Abstract.....	43
Introdução.....	44
Material e Métodos.....	45
Material.....	45
Métodos.....	47
Soro de <i>B. Moojeni</i>	47
Purificação do inibidor das SVMPs.....	47
Precipitação Seletiva com Sulfato de Amônio.....	47
Fracionamento da amostra “40-60%” de saturação sulfato de amônio em Phenyl Sepharose HP.....	47
Fracionamento do Pool Bm2 em HPLC fase reversa coluna C ₄ Vydac.....	48
Dosagem de Proteínas.....	48
Eletroforese em Gel de poliacrilamida (PAGE).....	48

Preparação das amostras para SDS-PAGE 12%.....	48
Eletroforese.....	49
Identificação do Inibidor de metaloprotease do soro de <i>B. moojeni</i> (BmI)	49
Resultados.....	50
Precipitação seletiva do soro de <i>B.moojeni</i> em Sulfato de Amônio.....	50
Fracionamento da amostra 40-60% em sulfato de amônio em coluna de interação hidrofóbica Phenyl-Sepharose HP.....	51
Eletroforese das frações obtidas da cromatografia em HP Phenyl Sepharose.....	52
Cromatografia do pool Bm2 em HPLC fase reversa coluna C ₄ Vydac.....	53
Eletroforese das frações obtidas nas etapas de purificação do inibidor de SVMPs.....	54
Caracterização do inibidor de SVMPs da serpente <i>B. moojeni</i> (BmI).....	55
Discussão.....	58
Conclusão.....	60
Referência bibliográfica.....	61
Anexo 1.....	62
Anexo 2.....	66
Anexo 3.....	67
Anexo 4.....	68

Resumo Geral

Alterações no sistema hemostático, como hemorragias e alterações na cascata de coagulação constituem os principais eventos decorrentes do envenenamento por serpentes do gênero *Bothrops*. A hemorragia é provocada por metaloproteases presentes no veneno das serpentes. Alguns animais possuem resistência natural aos efeitos nocivos do veneno de serpentes. Esta resistência pode ser explicada, na maioria das vezes, pela presença de fatores neutralizantes presentes no soro destes animais. O trabalho foi subdividido em dois capítulos. O objetivo do capítulo 1 foi identificar a presença de inibidores da atividade coagulante e hemorrágica presentes no soro da serpente *Bothrops moojeni*. E o objetivo do capítulo 2 foi isolar um inibidor de hemorraginas presente no soro de *B. moojeni* utilizando-se metodologia de purificação já estabelecida para um inibidor de metaloprotease, Bj46a. No capítulo 1, o soro foi aplicado em coluna Q-Sepharose (9,5 x 2,0 cm) previamente equilibrada com tampão Bicarbonato de Amônio 0,05M pH8,0. A eluição foi realizada utilizando-se o mesmo tampão em "stepwise" nas seguintes concentrações (0.2/0.35/0.5M), resultando em 8 picos. Os picos F2 (tubos 14-16) e F6 (tubos 46-51) neutralizaram a atividade hemorrágica provocada pela peçonha bruta (1:10 m/m) e os picos F6 e F8 (tubos 71-75) neutralizaram a atividade coagulante (1:1 m/m). A fração F2 (30mg) foi recromatografada em coluna Q-Sepharose (9,5 x 2,0 cm), equilibrada com tampão Bicarbonato de Amônio 0,05M pH8,0. A eluição foi realizada utilizando-se o mesmo tampão em gradiente convexo de 0.2-0.5M, câmara de mistura de 80ml, em fluxo constante de 20ml/h, a temperatura ambiente, resultando em 3 picos F1Q2-F3Q2. O pico F2Q2 contém inibidores da atividade hemorrágica e o perfil eletroforético indicou migração de bandas semelhantes a um inibidor de metaloproteases de baixo peso molecular já descrito: Bj46a. No capítulo 2 o soro de *B. moojeni* foi precipitado com sulfato de amônio nas faixas de saturação: 0-40%; 40-60%; 60-80%; 80-100%. A fração 40-60% foi aplicada em uma coluna Hitrap Phenyl HP (1,6 x 2,5 cm) previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio 0.01M contendo sulfato de amônio 1M pH 7.0. A eluição foi realizada estabelecendo-se um gradiente salino linear decrescente até 100% de fosfato de sódio 0,1M pH 7,0 resultando em 7 pools: Bm1-Bm7. O perfil eletroforético indicou a presença de bandas em torno de 55kDa, semelhantes a Bj46a no pool Bm2. Bm2 foi submetida ao fracionamento

em HPLC coluna C4, fase reversa, resultando em um pico principal, identificado como BmI. Os resultados da espectrometria de massa e sequenciamento aminoterminal de 14 resíduos comprovam a presença do inibidor de metaloprotease.

Introdução Geral

As Serpentes

Na história da civilização, as serpentes sempre despertaram uma fascinação única e particular ao homem. Isto pode ser observado na arte, ciência. Segundo algumas civilizações antigas, as serpentes incorporavam o espírito da Terra. De acordo com as crenças Egípcias, *Atoum*, a serpente, após entregar a água primordial, deu o dia aos deuses que, por sua vez, criaram Geb e Nout, o ar e a terra. Algumas culturas acreditam haver poderes curativos nos venenos das serpentes quando a picada é acompanhada por um membro “instruído” da comunidade (Boquet, 1979).

Em tempos mais recentes da investigação científica, o estudo dos venenos de serpentes tem angariado informações importantes sobre os sistemas biológicos. Ainda, alguns componentes do veneno são utilizados no tratamento de doenças e complicações médicas (Bjarnason & Fox, 1994).

As serpentes formam a subordem Ophidia que derivam da ordem Squamata, classe Reptilia. Acredita-se que as serpentes são um grupo monofilético originado a partir dos lagartos ou de algum ancestral dos lagartos (Kochva, 1987).

A irradiação adaptativa das serpentes modernas produziu um diverso número de espécies que colonizaram habitats terrestres, marinhos e aquáticos em todo o mundo. Elas foram tradicionalmente divididas em 3 famílias: Colubridae (contendo 80% das espécies) e dois grupos de serpentes peçonhentas, Elapidae e Viperidae, com irradiação menos extensiva. O sistema de inoculação da peçonha das serpentes é um dos mais especializados aparatos de alimentação dentre os vertebrados (Cadle, 1982). Este aparato consiste primariamente de dois componentes: os dentes modificados, pelos quais o veneno é inoculado na presa e as glândulas de veneno, onde as toxinas são produzidas e armazenadas (Kardong, 1982). Geralmente, as serpentes possuem grande quantidade de veneno estocado na glândula todo o tempo. Mesmo experimentalmente é muito difícil retirar toda a quantidade de veneno acumulado e o veneno eliminado durante a picada é aparentemente restaurado rapidamente (Kochva, 1987).

O Gênero *Bothrops*

O gênero *Bothrops*, pertencente a família Viperidae, contém 31 espécies distribuídas na América do Sul, exceção a *B. asper* que ocupa além desta, a América Central e norte do México. Membros deste gênero ocupam grande variedade de habitats e são responsáveis pela maioria dos acidentes no Novo Mundo. Os principais sintomas do envenenamento por estas serpentes são geralmente os seguintes: dor local, náuseas, vômito, hemorragia, equimose, eritema, hipotensão, taquicardia, coagulopatia com hipofibrinogenemia e trombocitopenia, hematuria, distúrbios renais, necrose entre outros (Campbel & Lamar, 1983). Estes efeitos são induzidos por uma grande variedade de componentes do veneno como as fosfolipases A₂ miotóxicas, miotoxinas de baixo peso molecular, metaloproteases (Gutierrez & Rucavado, 2000) entre outros.

Bothrops moojeni é uma serpente terrestre com comprimento máximo de 1680cm. Esta espécie está distribuída principalmente na região Centro-Oeste do Brasil, preferencialmente em áreas de cerrado (Campbel & Lamar, 1989). Na zona geográfica do Triângulo e Alto Paranaíba (MG) é a espécie responsável pela maioria dos envenenamentos ofídicos (Brites e Bauab, 1989).

Epidemiologia

A partir de estudos realizados na Europa, Américas, Ásia, África e Oceania, Chippaux (1998) analisou aspectos como incidência (número total de picadas), morbidade (número de envenenamentos), taxa de casos fatais (número de mortes entre as pessoas envenenadas), mortalidade por picadas (número de mortes devido ao envenenamento entre a população em geral) e verificou que a incidência e mortalidade dos envenenamentos por serpentes pode exceder a 5 milhões por ano, com um nível de mortalidade de 125 mil pessoas por ano, sendo que metade delas procuram cuidados médicos, e provavelmente mais de 100 mil indivíduos sofrem com seqüelas graves.

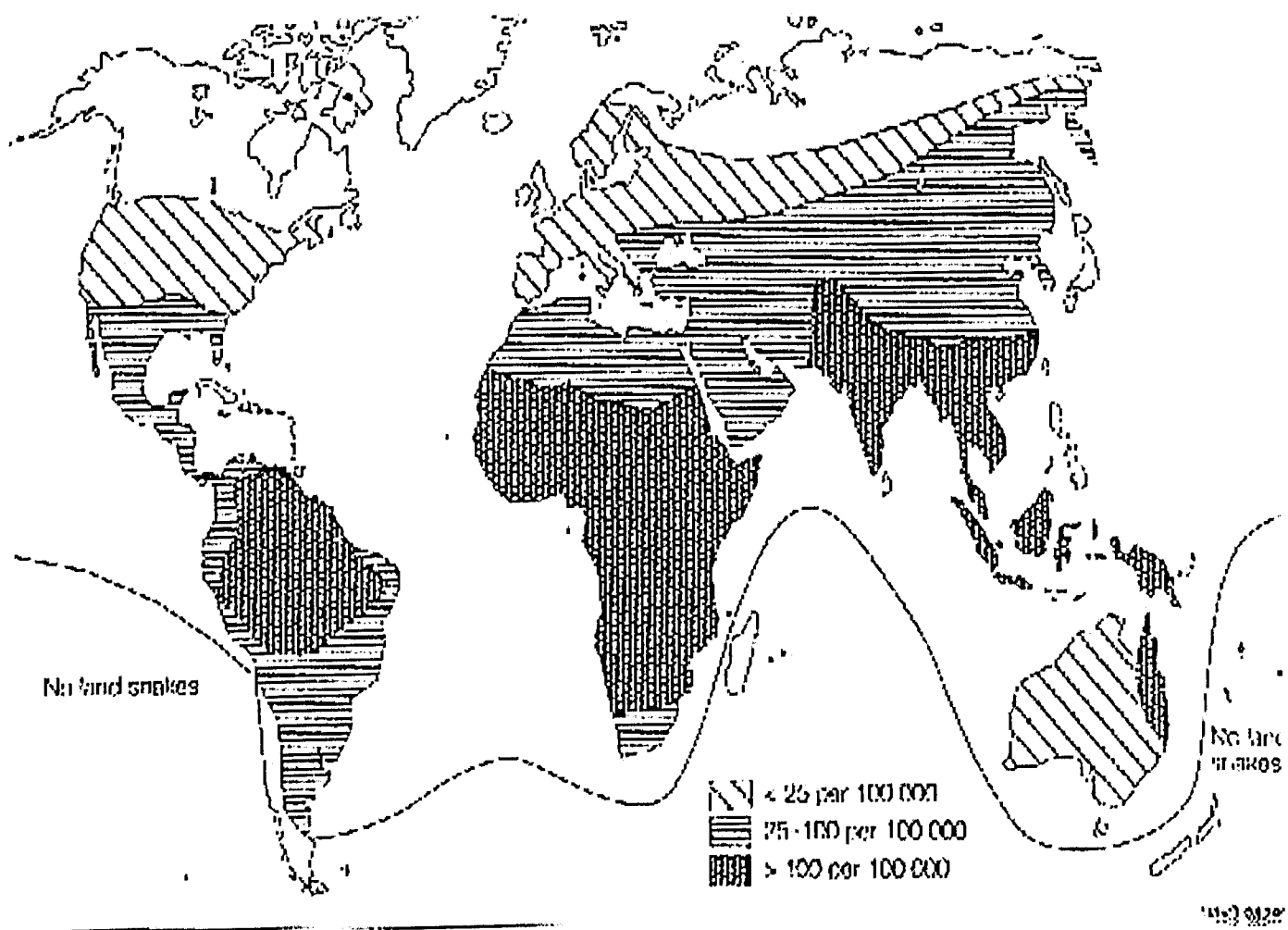


Figura 1: Mapa mostrando a distribuição global da morbidade dos envenenamentos ofídicos. Retirado de Chippaux, 1998.

A incidência de picadas é alta em regiões quentes, onde as serpentes são abundantes e a atividade econômica é basicamente a agricultura. Na maioria dos países em desenvolvimento menos de 20% das pessoas picadas por serpentes procuram tratamento médico apropriado (Chippaux, 1998).

Os acidentes ofídicos não são registrados sistematicamente em muitos países sendo que poucos destes, possuem um sistema de estudo epidemiológico eficiente capaz de fornecer dados sobre esses envenenamentos. No Brasil, a morbidade notificada é de aproximadamente 15 em cada 100.000 pessoas somente pelo gênero *Bothrops* (Chippaux, 1998).

Na América do Sul, 90% dos envenenamentos ofídicos são causados por serpentes do gênero *Bothrops* onde a taxa de mortalidade é reduzida de 8% a 2,4% após cuidados médicos adequados (Neves-Ferreira *et al.*, 1997).

Metaloproteases

Os venenos das serpentes são compostos de uma mistura complexa de componentes orgânicos e inorgânicos (Friederich & Tu, 1971) cuja função primária é matar ou imobilizar a presa enquanto o processo de digestão se inicia (Chippaux *et al.*, 1991). Os constituintes inorgânicos do veneno incluem: Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Co e Zn (Friederich & Tu, 1971). Nem todos são encontrados em qualquer veneno e a quantidade de metais varia com a espécie da serpente. A função biológica desses metais ainda não está clara, entretanto, alguns deles como Ca, Mn e Mg são importantes para a estabilidade de certas proteínas do veneno, enquanto outros, em particular, Zn, Cu, Fe e Co, participam ativamente do mecanismo catalítico de certos componentes enzimáticos, como as metaloproteases. Os componentes orgânicos do veneno incluem carboidratos (como glicoproteínas), lipídeos, (fosfolipídeos), aminas biogênicas, nucleotídeos, aminoácidos e, em maior proporção as proteínas (90% peso seco) (Bjarnason & Fox, 1994). Grande parte destas proteínas interage com componentes do sistema hemostático humano (Markland, 1998), causando inúmeras desordens (Braud *et al.*, 2000).

As manifestações no dano tecidual local, como hemorragia e mionecrose, estão entre os mais dramáticos efeitos do envenenamento por serpentes da família Viperidae. Em casos de envenenamento menos grave, o efeito hemorrágico é essencialmente localizado no sítio da picada. Entretanto, a hemorragia pode se estender a áreas distantes da extremidade envolvida. Em casos onde o envenenamento é grave, podem ocorrer sangramento em órgãos distantes do local da picada como coração, fígado, rins e cérebro (Hati *et al.*, 1999).

A hemorragia local induzida pelo veneno de serpentes da família Viperidae é provocada por metaloproteinases dependentes de zinco (hemorraginas), de domínio variável, que possuem alta especificidade pelo substrato, provavelmente atuando no tecido conjuntivo e componentes da membrana basal dos capilares sangüíneos, levando ao extravasamento do conteúdo desses capilares (Neves Ferreira *et al.*, 1997).

Mecanismo de ativação das Metaloproteases

As hemorraginas são sintetizadas na glândula de veneno sob a forma de zimogênio inativo contendo uma seqüência sinal (Pre) e uma proenzima (pro) (Shimokawa *et al.*, 1996), e um grupo tiol conservado na prosequência PKMCGV, bloqueando o sítio ativo pela ligação com o Zn^{+2} . Depois de secretado pela glândula, um processamento proteolítico converte o zimogênio em enzima ativa pela remoção deste grupo tiol. Este mecanismo é conhecido como mecanismo de ativação “Cys-Switch” (Matsui *et al.*, 2000).

Domínios

As metaloproteases de veneno de serpentes (SVMPs) são classificadas de acordo com a estrutura de seus domínios em quatro classes, P-I a P-IV (Fig. 2).

Imediatamente após a biossíntese, todas as SVMPs possuem em comum os domínios pre, pro e metaloprotease (Hati *et al.*, 1999). O domínio pré é perdido logo em seguida. Na classe P-I se encontram as SVMPs que possuem somente estes três domínios; a P-II possui além dos domínios pre, pro e metaloprotease, um domínio “desintegrin-like”; P-III: metaloprotease, “desintegrin-like” e “cystein-rich” (a classe mais potente em termos de atividade biológica) e P-IV além dos domínios presentes em P-III, possui ainda o domínio “lectin-like” (Jia *et al.*, 1996).

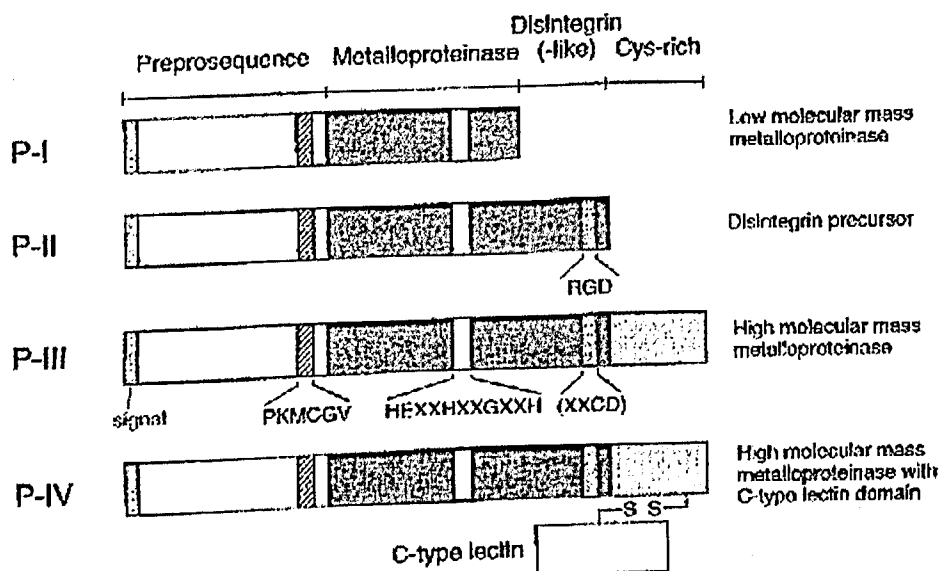


Figura 2: Estrutura esquemática das SVMPs. As SVMPs são classificadas em 4 grupos de acordo com seus domínios, PI- PIV. A pré-pro seqüência deduzida a partir do cDNA contendo o peptídeo sinal (18 resíduos) e a pro seqüência (em torno de 170 resíduos) com um motivo "Cysteine-switch" (PKMCGV) que é removido por uma peptidase sinal, autoliticamente ou pela ação de outra protease desconhecida. O domínio metaloprotease (em torno de 200 resíduos) tem um motivo ligante de zinco (HEXXHXXGXXH). O domínio "desintegrin-like" tem uma seqüência XXCD em lugar da seqüência RGD nas desintegrinas. A classe P-I consiste de metaloprotease de baixo peso molecular como a neuwiedase de *B. newwiedi* e trimereisina-II de *Trimeresurus flavoviridis*. A classe P-II possui os domínios metaloprotease e desintegrin-like como a HP-1 de *Calloselasma rhodostoma*. A classe P-III consiste de metaloproteases de alto peso molecular como a jararagina de *B. jararaca* composta dos domínios metaloprotease, "desintegrin-like" e "cysteine rich". A classe P-IV consiste de metaloproteases de alto peso molecular contendo um domínio adicional ligado por pontes de dissulfeto conhecido como domínio "lectin-like" como a russelisina de *Vipera russelli*. Retirado de Matsui *et al.*, 2000.

O domínio proteinase das SVMPs varia de 202 a 204 resíduos e todos contêm a seqüência consenso HELGHNLGX₂HDX₁₀CI/VM que torna as SVMPs membros da família reprotisina, derivados da superfamília metzincin das metaloproteinasas (Hooper, 1994).

Função dos Domínios

Toxinas hemorrágicas que possuem somente o domínio catalítico são, usualmente, menos potentes em induzir hemorragias que metaloproteases do veneno que possuem, além do domínio metaloprotease, os domínios “desintegrin-like” e “cystein-rich” (Gutierrez & Rucavado, 2000). A função precisa destes domínios adicionais em potencializar a atividade hemorrágica ainda não foi elucidada conclusivamente, e provavelmente dependem de vários fatores. O domínio “desintegrin-like” das toxinas hemorrágicas de alto peso molecular pode aumentar o extravasamento por afetar a função plaquetária. Além disso, os domínios “desintegrin-like” e “cys-rich” em hemorraginas P-III, podem conferir maior atividade tóxica por direcionar as enzimas para locais críticos nos vasos sanguíneos, possivelmente na interface entre célula endotelial e membrana basal. Estudos com metaloproteases recombinantes de *Agkistrodon hyalis* demonstraram que o domínio “desintegrin-like” modula a especificidade catalítica da enzima sobre o substrato da matriz extracelular (Gutierrez & Rucavado, 2000).

Estrutura das SVMPS

A estrutura tridimensional de metaloproteases de veneno tem sido elucidada por cristalografia de raio-X. Os resultados revelaram que são moléculas elipsoidais com uma fenda inferior no sítio ativo que separa o subdomínio inferior do domínio maior superior. O domínio superior possui enovelamento relativamente irregular, composto de 5 fitas beta pregueadas e 4 alfa hélices (Fig.3). A fenda no sítio ativo contendo o zinco catalítico é circundada por 3 resíduos de His (142,146 e 152) e uma molécula de água, que está ancorada ao Glu 143 de uma forma tetraédrica. O sítio de ligação do substrato é bordado por um “Met turn” (Met¹⁶⁶) que forma uma “base” e duas paredes formadas por uma fita (resíduos 168-172) e uma fita beta pregueada antiparalela no domínio superior (resíduos 108-112) (Fig. 4) (Matsui *et al.*, 2000).

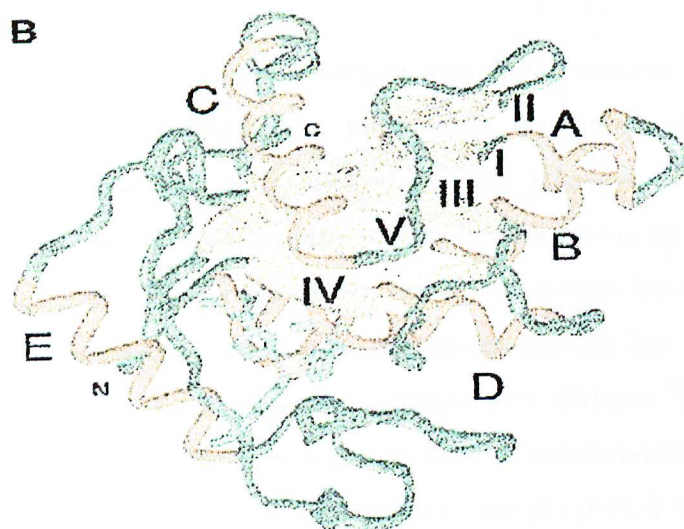


Figura 3: Estrutura cristalográfica da proteinase H₂ de *Trimeresurus flavoviridis*, uma metaloprotease da classe P-I. Ela é formada por 2 domínios separados por uma depressão ocupado pelo centro catalítico contendo Zinco. A região amino-terminal tem um domínio central composto de 5 fitas beta pregueadas (amarelo) e 4 alfa-hélices (vermelho), enquanto a região C-terminal em uma hélice e uma porção enovelada irregularmente. N e C representam as regiões N e C terminal da proteína, respectivamente. Retirado de Matsui *et al.*, 2000.

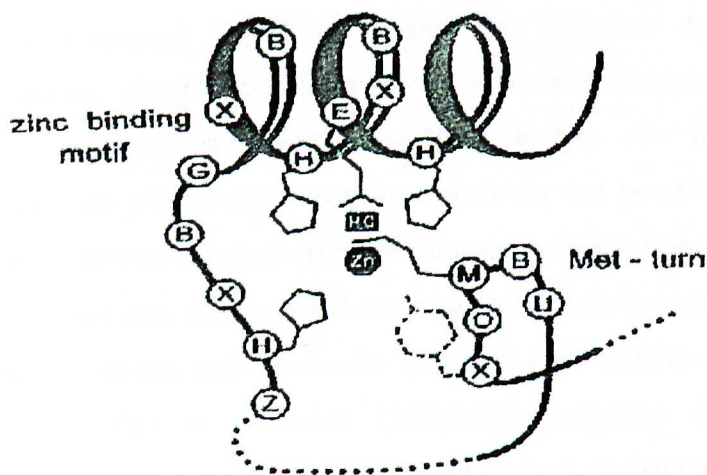


Figura 4: Representação esquemática do sítio de ligação do zinco, Met turn (volta da metionina) das metzincins. A metionina crítica, as três histidinas ligantes do Zn⁺² e a sequência comum do motivo são apresentados. Segmentos variáveis são representados pelas linhas descontínuas. Retirado de Stöcker and Bode, 1995.

Inibidores

Alguns animais possuem resistência natural aos efeitos nocivos do veneno de serpentes. Esta resistência pode ser explicada, na maioria das vezes, pela presença de fatores neutralizantes presentes no soro destes animais (Domont *et al.*, 1991; Thwin & Gopalakrishnakone, 1998). Muitos dos registros encontrados na literatura focalizam esta resistência. Em meados da década de 70, houve um avanço no entendimento bioquímico sobre a natureza dos fatores presentes no soro desses animais que inibem o efeito tóxico do veneno e das toxinas hemorrágicas. Somente nos últimos 10 anos que grupos de pesquisadores têm se dirigido a procura de fatores anti-hemorrágicos e de seu completo entendimento no que diz respeito a sua estrutura e função (Fox & Bjarnason, 1998).

Esses componentes próprios do sangue das serpentes proporcionam uma resistência natural contra o efeito tóxico do seu próprio veneno e de outras serpentes. Sugere-se que estes fatores tenham uma função fisiológica ou talvez tenham surgido somente como resultado de uma pressão evolutiva para conter o efeito tóxico destas serpentes (Lizano *et al.*, 2000). Segundo Fox & Bjarnason (1998), existem três grupos de inibidores de hemorraginas: o primeiro é constituído pelas SVMPs sintetizadas como zimogênio; o segundo é constituído por peptídeos inibidores presentes na própria peçonha e o terceiro que tem sido identificado no soro de diversos animais e inibem metaloproteases do veneno de serpentes.

Proteínas Anti-Hemorrágicas (AHP) geralmente são proteínas do soro com algumas características comuns: são glicoproteínas ácidas, altamente estáveis a variações de pH e temperatura, não possuem atividade proteolítica e não são imunoglobulinas (não apresentaram linhas de precipitação após imunodifusão das proteínas neutralizantes e o veneno). A figura 5 mostra algumas AHP isoladas de animais. Quanto a massa molecular podem ser classificadas em: fatores anti-hemorrágicos de baixo peso 52 a 90kDa, que são os mais abundantes, e de alto peso molecular até agora representados por 3 membros: beta-macroglobulina (700kDa) e erinacina (1000kDa) extraídos de *E. europaeus* e antihemorragina de *Natrix tessellata* (880kDa) (Domont *et al.*, 1991). Um inibidor, Bj46a isolado do soro de *B. jararaca* apresentou 46kDa e pI 5,74. Estudos de interação com inibidores de baixo peso molecular. Segundo Valente *et al* (2001) Bj46a é um dímero que se dissocia no momento da formação de um complexo não-covalente com o domínio

metaloprotease das SVMPs, apresentando uma estequiometria final de um monômero de inibidor para duas moléculas metaloprotease. Isto sugere que haja 2 sítios de ligação para o domínio metaloprotease em um monômero (subunidade) de BJ46a.

Propriedades	espécies											
	T.f	V.p	S.h	D.m	D.v	N.m	E.e	H.e	D.s	P.o	V.p*	B.j
Massa molecular	70	80	56/90	83.7	68	54	780	65-69	52	82.5/66.2	56	46
Ponto isoelétrico	4.0	4.7	5.4	4.0	4.1	4.1	-	-	2-11	-	4.0	4.55
Estabilidade térmica (°C)	0-56	0-85	0-55	-	0-37	0-56	-	0-60	0-60	-	0-70	-
Estabilidade pH	2-11	4-9.5	3-10	-	3-10	3-10	-	2-11	-	-	**	-
Atividade proteolítica	-	não	não	não	não	não	-	-	-	-	não	-
Glicoproteína	-	sim	-	sim	-	-	-	-	-	sim	-	sim
Imunoglobulina	não	não	não	não	não	não	-	não	-	-	não	não
Inibidor de protease	-	-	-	-	-	-	sim	-	-	-	-	-

Figura 5: Inibidores de metaloproteases do veneno de serpentes (SVMPs) isolados do soro de animais. Retirado de Domont *et al.*, 1991, com modificações.

T.f., *Trimeresurus flavoviridis* (Omori-Satoh *et al.*, 1972); V.p., *Vipera palaestinae* (Ovadia, 1978b); S.h., *Sigmodon hispidus* (Pichyangkul e Perez, 1981); D.m., *Didelphis marsupialis* (Perales *et al.*, 1989a); D.v., *Didelphis virginiana* (Menchaga e Perez, 1981); N.m., *Neotoma micropus* (Garcia e Perez, 1984); E.e., *Erinaceus europaeus* (De Witt e Weström, 1987); H.e., *Herpestes edwardsii* (Tomihara *et al.*, 1987); D.s., *Dinodon semicarinatus* (Tomihara *et al.*, 1988); P.o., *Philander opossum* (Domont *et al.*, 1989); V.p.*, *Vipera palestinae* (Ovadia *et al.*, 1977), antineurotóxica; ** Instável em pH 2,5; B.j., *Bothrops jararaca* (Valente *et al.*, 2001); - não determinado.

A soroterapia é o único tratamento indicado para os envenenamentos por serpentes. Dados clínicos e experimentais indicam que a atividade hemorrágica local não é totalmente neutralizada, mesmo quando o soro antiofídico é administrado imediatamente após o envenenamento. Além disso, há registros de alergias graves ao soro equino, impossibilitando o uso do antiveneno em alguns pacientes (Borkow *et al.*, 1995). Mediante os problemas apresentados, é imperativo que haja um esforço no sentido de se buscar alternativas terapêuticas como o desenvolvimento de novas drogas capazes de neutralizar efetivamente a ação destas toxinas hemorrágicas que ofereçam pouco ou nenhum efeito colateral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bjarnason, J.B. & Fox, J.W. (1994). Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmac. Ther.* **62**: 325-372.
- Borkow, G., Gutierrez, J.M., Ovadia, M. (1995). Isolation, characterization and mode of neutralization of a potent antihemorrhagic factor from the serum of the snake *Bothrops asper*. *BBA.* **1245**: 232-238.
- Boquet, P. (1979). History of Snake venom Research. *Snake venom*, ed: Chen-Yuan Lee, New York, 4-13.
- Braud, S., Bon, C. & Wisner, A. (2000). Snake venom proteins acting on hemostasis. *Bioch.* **82**: 851-859.
- Brites, V.L.C. & Bauab, F.A. (1989). Fauna ofidiana do município de Uberlândia-MG-Brasil. Ocorrência na área urbana. *Rev. Ciên. Biom. UFU* **4**: 3-7.
- Cadle, J.E. (1982). Problems and approaches in the interpretation of the evolutionary history of venomous snakes. *Mem Inst Butantan* **46**: 255-274.
- Campbell, J.A., and Lamar, W.W. (1983). The venomous Reptiles in Latin America.
- Chippaux, J.P. (1998). Snake-bites: appraisal of the global situation. *Bull World Health Organ* **76**: 515-24.
- Chippaux, J.P., Williams, V. and White, J. (1991). Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Tox.* **29**: 1279-1303.
- Domont, G.B., Perales, J and Moussatché, H. (1991). Natural Anti-Snake Venom Proteins. *Tox.* **29**: 1183-1194.
- Fox, J.W. & Bjarnason, J. (1998). Metalloproteinase inhibitors in Enzymes from Snake Venom. F. Grams, Ed., Fort Collins, Alaken, Inc., pp. 599-632.
- Friederich, C. & Tu, A.T. (1971). Role of metals in snake venoms for hemorrhagic, esterase and proteolytic activities. *Biochem Pharmacol* **20**: 1549-56.
- Gutierrez, J.M. & Rucavado, A. (2000). Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Bioch.* **82**: 841-850.
- Hati, R., Mitra, P., Sarker, S. & Bhattacharyya, K.K. (1999). Snake venom hemorrhagins. *Crit. Rev Tox* **29**: 1-19.
- Hooper, N.M. (1994). Families of Zinc Metalloproteases. *FEBS Letters* **354**: 1-6.

- Jia, L.G., Shimokawa, K., Bjarnason, J.B. & Fox, J.W. (1996). Snake venom metalloproteinases: structure, function and relationship to the ADAMs family of proteins. *Tox.* **34**: 1269-76.
- Kardong, K.V. (1982). The evolution of the venom apparatus in snakes from colubrids to viperids e elapids. *Mem Inst Butantan* **16**: 105-118.
- Kochva, E. (1987). The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. *Tox.* **25**: 65-106.
- Lizano, S. et al (2000). Two phospholipase A₂ inhibitors from the plasma of *Cerrophidion godmani* which selectively inhibit two different group-II phospholipase A₂ myotoxins from its own venom: isolation, molecular cloning and biological properties. *Bioch. Jour* **346**: 631-639.
- Markland, F.S. (1998). Snake venoms and the hemostatic system. *Tox.* **36**: 1749-1800.
- Matsui, T., Fujimura, Y. & Titani, K. (2000). Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1477**: 146-56.
- Neves-Ferreira, A.G.C., Perales, J., Ovidia, M., Moussatché, H. & Domont, G.B. (1997). Inhibitory properties of the antithrombotic complex from the South American opossum (*Didelphis marsupialis*) serum. *Tox* **35**: 849-863.
- Shimokawa, K., Jia, L.G., Wang, X.M. & Fox, J.W. (1996). Expression, activation, and processing of the recombinant snake venom metalloproteinase, pro-atrolysin E. *Archives Biochem Biophys* **335**: 283-94.
- Stöcker, W. and Bode, W. (1995). Structural features of a superfamily of zinc-peptidases: the metzincins. *Curr. Opin Struc Biol*, **5**: 383-390.
- Thwin, M.M. and Gopalakrishnakone, P. (1998). Snake envenomation and protective natural endogenous proteins: A mini review of the recent developments (1991-1997). *Tox* **36**: 1471-1482.
- Valente, R.H., Dragulev, B., Perales, J., Fox, J.W and Domont, G.B. (2001). BJ46a, a snake venom metalloproteinase inhibitor. Isolation, characterization, cloning and insights into its mechanism of action. *Eur. Jour Bioch.* **268**: 3042-3052.

Introdução Geral

**Capítulo 1: Fracionamento do soro da
serpente *B.moojeni* e identificação de
atividades anticoagulante e anti-
hemorrágica.**

Resumo

Alterações no sistema hemostático, como hemorragias e alterações na cascata de coagulação, constituem os principais efeitos decorrentes do envenenamento por veneno de serpentes do gênero *Bothrops*. A hemorragia é provocada por metaloproteases presentes no veneno dessas serpentes. Alguns animais possuem resistência natural aos efeitos nocivos provocados por estas toxinas que pode ser explicada, na maioria das vezes, pela presença de fatores neutralizantes presentes em seu soro. O objetivo deste trabalho foi identificar a presença de inibidores da atividade hemorrágica e coagulante presentes no soro da serpente *Bothrops moojeni*.

O soro foi aplicado em coluna Q-Sepharose previamente equilibrada com tampão Bicarbonato de Amônio 0,05M pH 8,0. A eluição foi realizada utilizando-se o mesmo tampão em "stepwise" nas concentrações 0.2/0.35/0.5M, resultando em 8 picos. Os picos F2 e F6 neutralizaram a atividade hemorrágica provocada pela peçonha bruta (1:10 m/m) e os picos F6 e F8 neutralizaram a atividade coagulante (1:1 m/m). O perfil eletroforético indicou grande quantidade de bandas protéicas nas frações com atividade inibitória. A fração F2 (30mg) foi recromatografada em coluna de Q-Sepharose equilibrada com tampão Bicarbonato de Amônio 0,05M pH 8,0. A eluição foi realizada utilizando-se o mesmo tampão em gradiente convexo de 0.2-0.5M, câmara de mistura de 80ml, em fluxo constante de 20ml/h, a temperatura ambiente, resultando em 3 picos F1Q2-F3Q2. O pico F2Q2 apresentou perfil eletroforético semelhantes a um inibidor de metaloproteases de baixo peso molecular já descrito: Bj46a.

Abstract

Haemostatic system alterations, like hemorrhage and coagulopathies are the main effects caused by Bothrops snakes envenomations. Hemorrhage is caused by metalloproteinases present in these snake venoms. Many animals are known to possess a natural resistance to the effects of snake venoms and, in many cases, this resistance can be explained by neutralizing factors present in their blood sera. The aim of this work was to identify hemorrhagic and coagulant inhibitors present in *Bothrops moojeni* sera.

The sera were applied on a Q-sepharose column previously equilibrated with Ammonium Bicarbonate buffer 0,05M, pH 8,0. The elution was carried out by the same buffer in a stepwise methodology in the following concentrations: 0,2/0,35/0,5M, resulting in 8 fractions. Fractions F2 and F6 neutralized hemorrhagic activity provoked by crude snake venom (1:10m/m) and the fractions F6 and F8 neutralized the coagulant activity. (1:1m/m). The electroforetic profile indicated many proteic bands in the inhibitory fractions. The F2 fraction was applied in a Q-sepharose column equilibrated with Ammonium Bicarbonate 0,05M pH 8,0. The elution was carried out by the same buffer in a convex gradient (0,2-0,5M), mixture chamber of 80ml, flow rate of 20ml/h, ambient temperature, resulting in 3 sub-fractions F1Q2-F3Q2. The sub-fraction F2Q2 presented neutralizing factors of hemorrhagic activity and the electroforetic profile indicated bands migration similar to a metalloproteinase inhibitor described of low molecular weight B_j46a from *Bothrops jararaca* sera.

Introdução

Os venenos de serpentes são responsáveis por uma grande variedade de atividades tóxicas como fosfolipásica, edematogênica, distúrbios no sistema hemostático, dentre outras (Markland, 1998).

Dentre as atividades tóxicas do veneno, a vasculotóxica ou hemorrágica constitui um dos mais dramáticos efeitos do envenenamento botrópico. A ação vasculotóxica é causada por fatores hemorrágicos denominados hemorraginas (Bjarnason, & Fox, 1994). Estas agem sobre os vasos sanguíneos, destruindo e rompendo a membrana basal (Hati *et al*, 1999).

Outra atividade importante do veneno botrópico é a coagulante, mediada por serino-proteases que levam a formação do coágulo pela transformação do fibrinogênio em fibrina (ação “thrombin-like”). Os venenos botrópicos ainda ativam o fator X, a protrombina e consomem os fatores V, VII e as plaquetas (Matsui *et al*, 2000).

Vários artigos têm sido publicados relatando a resistência de alguns animais ao veneno das serpentes. Esta resistência tem sido atribuída a fatores neutralizantes presentes no soro desses animais (Thwin & Gopalakrishnakone, 1998). Nesse contexto, já foram isolados vários inibidores contra as mais diversas atividades encontradas no veneno (Domont *et al*, 1991).

Dentre os inibidores descritos, as anti-hemorraginas do soro das serpentes são os mais estudados. Estes inibidores podem ser de 2 classes: baixo peso molecular, 52 a 90kDa (exemplo: Bj46a) e os de alto peso molecular, até agora representada pela beta-macroglobulina (700kDa) e erinacina (1000kDa) extraídos de *E. europaeus* e anti-hemorrágica de *Natrix tessellata* (880kDa) (Domont *et al*, 1991). O objetivo deste trabalho foi fracionar o soro de *B. moojeni* e identificar a presença de fatores neutralizantes das atividades hemorrágica e coagulante, da peçonha bruta desta mesma serpente.

Material e Métodos

Material

1- Ácido acético	Sigma
2- Ácido Fórmico	Sigma
3- Acrylamida	Sigma
4-Banho termostaticado	Thermomix Biotech International
5- Balança de precisão-	Mettler AG240
6- Bicarbonato de Amônio	Sigma
7- Bis-acrylamida	Sigma
8- Centrífuga de eppendorfs	Centrifuge 5415C
9- Coomassie Brilliant Blue R250	Sigma
10- Espectrofotômetro	Spekol Zeiss
11- Glicerol	Sigma
12- Glicina	Glicina PA Merck
13-Liofilizador	Labconco
14- 2-mercaptoetanol	2-mercaptoetanol - Sigma
15- Metanol	Sigma
16- Padrão baixo peso molecular	Pharmacia Biotech
17- pHmetro	Mettler Toledo
18- PSA	Persulfato de amônio- Sigma
19- Resina Q-sepharose	Sigma
20- SDS	Lauril Sulfato de Sódio- Sigma
21- Sistema de eletroforese	Mini Protean II- BioRad
22- TEMED	Sigma
23- Tris	ACS Merck

Métodos

1-Soro de *B. moojeni*

O soro de *B. moojeni* foi obtido a partir do sangue coletado por decapitação de 10 serpentes. O sangue permaneceu em repouso a temperatura ambiente por 2 horas e, em seguida, foi centrifugado a 3500rpm/20min. O sobrenadante (soro) foi retirado e armazenado a -20°C.

2-Dosagem de Proteínas

A determinação da concentração de proteínas das amostras foi realizada utilizando-se o método descrito por Bradford (1976). A curva padrão foi estabelecida utilizando-se BSA (10 a 60ug). A leitura da densidade óptica desenvolvida foi realizada em comprimento de onda de 595nm.

3-Fracionamento do soro total da serpente *B. moojeni* em Q-Sepharose

O soro da serpente *B. moojeni* (100mg de proteína) foi aplicado em uma coluna de Q-Sepharose (9,5 x 2,0 cm) previamente equilibrada com tampão Bicarbonato de Amônio 0,05M pH8,0. A eluição foi realizada utilizando-se o mesmo tampão em stepwise nas seguintes concentrações (0.2/0.35/0.5M) em fluxo constante de 20ml/h, a temperatura ambiente. Foi realizada a leitura da absorbância a 280nm das frações coletadas, obtendo-se 8 "pools" que foram liofilizados e armazenados a -20°C.

4-Atividade Anti-coagulante

A inibição da atividade coagulante promovida pela peçonha bruta da serpente *B. moojeni* foi realizada segundo Ware & Seegers (1949) modificado, que consiste em avaliar o tempo de coagulação do plasma bovino após administração da peçonha bruta, solução salina ou

incubações associadas ao soro e as suas frações. Cerca de 10ug de peçonha bruta (PB) em volume final de 50ul (completado com salina) foram aplicados em 200ul plasma bovino a 37°C como controle positivo. O controle negativo continha 50ul de salina. As amostras submetidas ao teste de inibição foram incubadas em associação com PB (1:1m/m) em salina a 37°C por 30 minutos, num volume final de 50 ul.

5-Atividade Anti-hemorrágica

A atividade anti-hemorrágica foi realizada de acordo com o método estabelecido por Theakston e Reid (1983) com modificações, que consiste em avaliar a intensidade do halo hemorrágico provocado por 2DMH (10ug) da peçonha bruta de *B. moojeni*, associadas ou não com as amostras de soro e frações, incubadas por 30 minutos, à temperatura ambiente. As amostras foram administradas via intradérmica em camundongos Swiss machos (5 semanas), em grupos contendo 4 animais. Após 3 horas da administração, os camundongos foram sacrificados, suas peles removidas e os halos registrados.

6- Eletroforese em gel de Poliacrilamida

Os géis de poliacrilamida a 14% em condições desnaturantes foram confeccionados de acordo com Laemmli (1970) com modificações. Foi utilizado um gel de empilhamento contendo Tris-HCl 0,5M pH6,8 e SDS 0,1% e um gel separador a 14% contendo Tris HCl 2M pH 8,8 e SDS 0,1%. As amostras foram associadas ao tampão da amostra (1:1) contendo β -mercaptoetanol 5% (v/v), SDS 2% e 0,001% de azul de bromofenol e aquecidas a 100°C por 5 minutos e aplicados no gel (Hoefer, minigel). Os géis foram submetidos a corrida a 200V, por 40 minutos e posteriormente corados com Coomassie Blue R250.

7-Recromatografia da Fração F2 em Q-Sepharose

A fração F2 (30mg de proteína) proveniente do item 3, foi aplicada em coluna de Q-Sepharose (9,5 x 2,0 cm) equilibrada com tampão Bicarbonato de Amônio 0,05M pH 8,0. A eluição foi realizada utilizando-se o mesmo tampão em gradiente convexo de 0.2-0.5M,

câmara de mistura de 80ml, em fluxo constante de 20ml/h, a temperatura ambiente. Foi realizado a leitura da absorbância das frações a 280nm, e os “pools” resultantes foram liofilizados e armazenados a -20°C .

Resultados:

1- Fracionamento do soro de *B. moojeni* (SBm) por cromatografia de troca iônica em Q-sepharose.

A figura 1 representa o perfil cromatográfico de SBm em coluna de troca iônica Q-sepharose, resultando em 8 picos. Os picos F2 (tubos 14-16) e F6 (tubos 46-51) neutralizaram a atividade hemorrágica provocada pela peçonha bruta (1:10 m/m) e os picos F6 e F8 (tubos 71-75) neutralizaram a atividade coagulante (1:1 m/m).

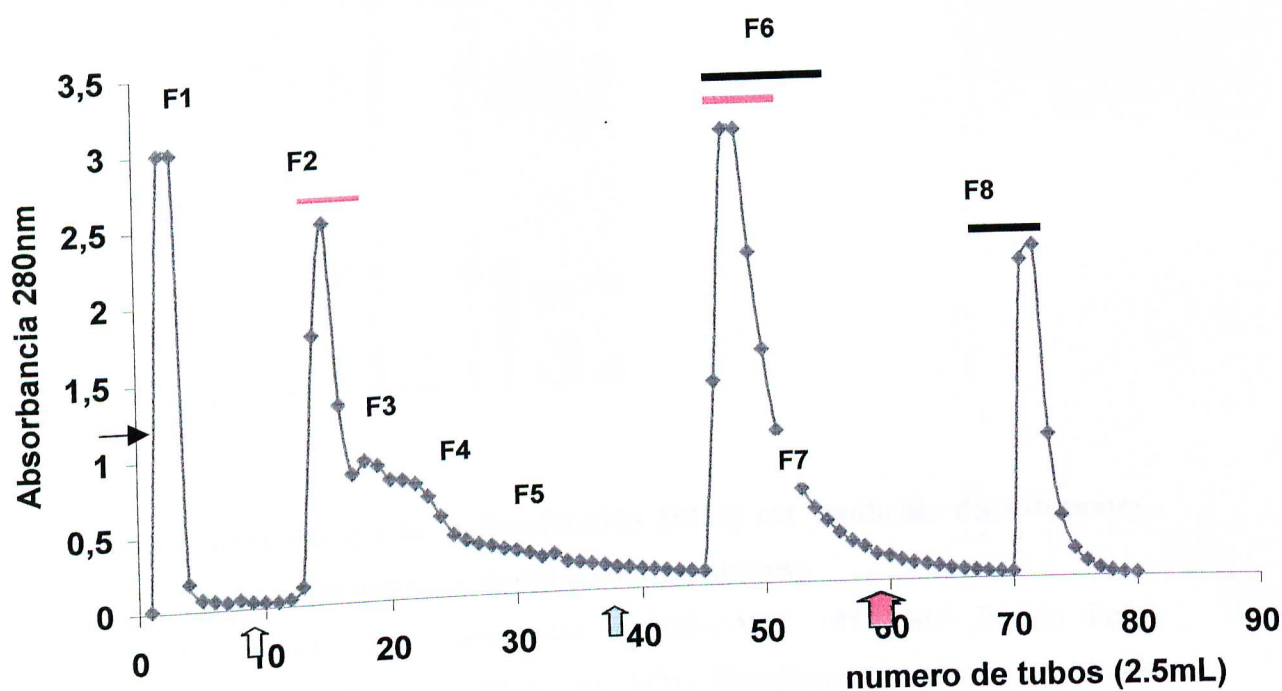


Figura 1- Fracionamento de 100mg de proteína do soro de *B. moojeni* em coluna de Q-Sepharose (9.5 X 2.0 cm), equilibrada com tampão Bicarbonato de Amônio 0.05M pH 8.0, em fluxo de 20ml/h, a temperatura ambiente. A eluição foi realizada com o mesmo tampão, em “stepwise” sendo a troca de concentração indicada pelas setas:

↑ 0.2M ↑ 0.35 M ↑ 0.5 M. As frações coletadas foram agrupadas em F1 a F8.

A linha vermelha indica presença de inibidores da atividade hemorrágica e a linha preta indica presença de inibidores da atividade coagulante da peçonha bruta de *B. moojeni*.

2- SDS-PAGE 14%, das frações obtidas da cromatografia de SBm em Q-sepharose.

As frações F1-F8 (20ug) foram submetidas a SDS-PAGE 14%. O perfil eletroforético indicou grande quantidade de bandas protéicas nas frações com atividade inibitória (Fig2).

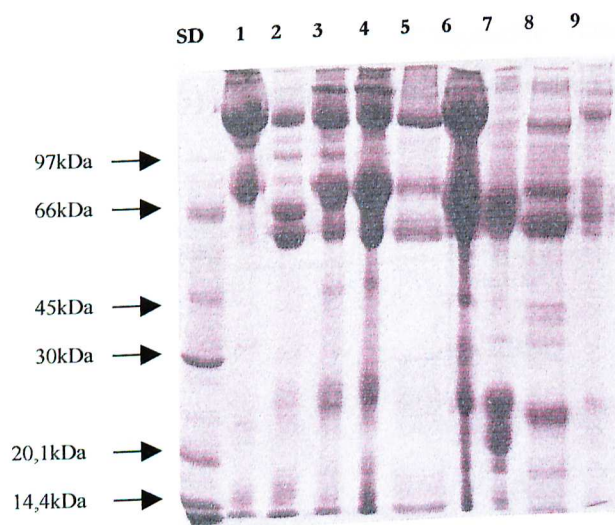


Figura 2: Eletroforese em gel de poliacrilamida (14%) em condições desnaturantes das frações obtidas da cromatografia de SBm em Q-sepharose

As frações F1-F8 (20ug) foram submetidas a SDS-PAGE 14%: **SD**- Padrão Peso Molecular: Fosforilase b- 97 kDa, BSA- 66 kDa, Ovoalbumina- 45kDa, Anidrase carbônica- 30kDa, inibidor tripsínico de soja- 20.1kDa, α -lactalbumina- 14.4kDa. **1-8** indica as frações F1- F8 e **9**: 10ug soro de *B. moojeni* (SBm) respectivamente.

3- Atividade anti-coagulante das frações obtidas do fracionamento de SBm em Q-sepharose

A atividade coagulante da peçonha bruta (PB) sobre o plasma bovino foi neutralizada pelas frações F6 e F8 obtidas no fracionamento de SBm em Q-sepharose. A fração F8 (1:1m/m) neutralizou completamente a ação coagulante da peçonha bruta (tabela 1). As frações F6, F7 e F8 apresentaram atividade anticoagulante, sendo que F8 mostrou ser a mais potente. O controle/2 (5ug PB) foi utilizado como parâmetro de comparação para 50% de inibição da atividade.

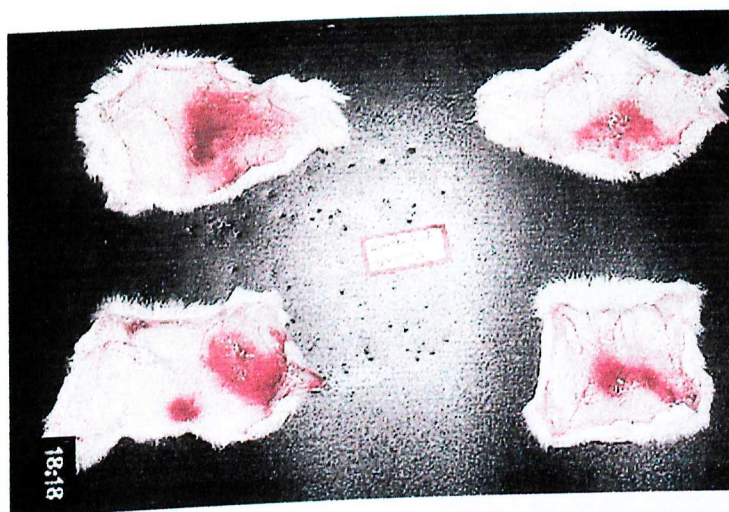
Peçonha Bruta	Amostra	Tempo de Coagulação(segundos)
10ug	salina	22
5 ug	salina	40
10ug	Soro total (10ug)	35
10ug	F1 (10ug)	24
10ug	F2 (10ug)	23
10ug	F3(10ug)	22
10ug	F4 (10ug)	22
10ug	F5 (10ug)	22
10ug	F6 (10ug)	58
10ug	F7 (10ug)	38
10ug	F8 (10ug)	>180

Tabela 1: Atividade coagulante da peçonha bruta de *B.moojeni* com e sem associações com o soro da mesma serpente e frações obtidas da cromatografia em Q-sepharose. Tempo de coagulação do plasma bovino após administração de 10ug de peçonha bruta, incubações (30') de PB + amostras 1:1(m/m). Média de ensaio em triplicata.

4- Atividade anti-hemorrágica das frações obtidas do fracionamento SBm em Q-sepharose

A atividade hemorrágica da peçonha bruta (PB) inoculada no dorso de camundongos, foi neutralizada somente pelas frações F2 e F6 nas proporções de 1:10(m/m). Não foram observadas diferenças entre o controle positivo, frações F2 e F6, nas proporções de 1:1 m/m (Fig 3). A tabela 2 expressa estes mesmos resultados e o desvio-padrão obtido, onde é possível observar a inibição da hemorragia local causada pela peçonha de *B. moojeni* quando se utilizou as frações F2 ou F6 na proporção de 1:10 (m/m)

Grupo A : controle positivo (PB)



Grupo B: controle negativo (salina)



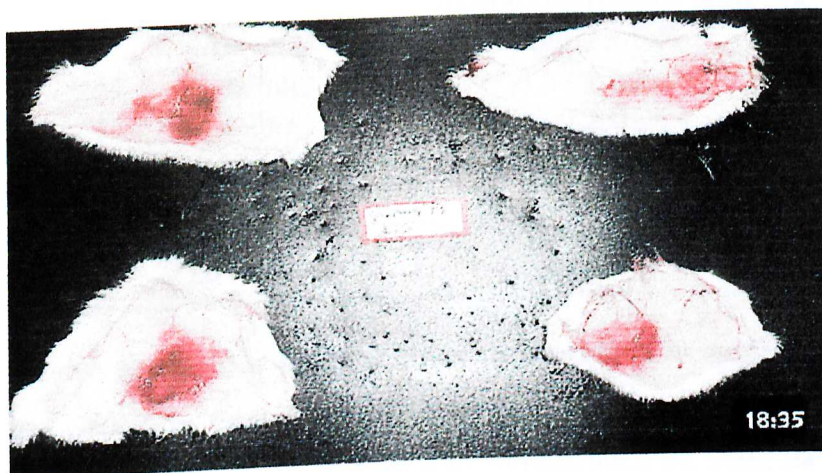
Grupo C: PB + fração F2 1:1 (m/m)



Grupo D: PB + fração F2 1:10 (m/m)



Grupo E: PB + fração F6 1:1 (m/m)



Grupo F: PB + fração F6 1:10 (m/m)

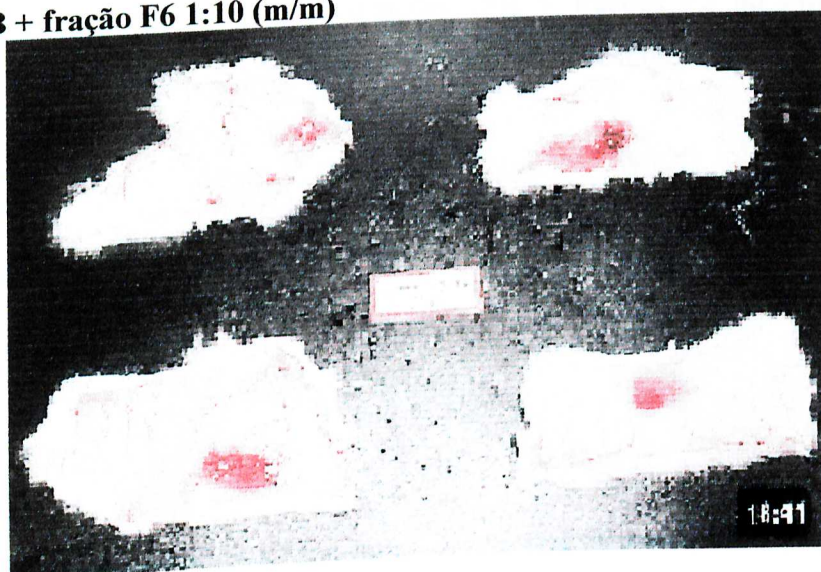


Figura 3: Inibição da atividade hemorrágica da peçonha bruta da serpente *B.moojeni* pelas frações F2 e F6 obtidas do fracionamento SBm em Q-Sepharose. Halos hemorrágicos obtidos após administração intradérmica de 10ug da peçonha bruta (controle +), salina (controle -) ou incubações (PB + frações F2 ou F6) no dorso de camundongos. Após 3 horas, os camundongos foram sacrificados, suas peles removidas e o halo registrado. Em "A" controle positivo (10ug PB+ salina), "B" controle negativo (salina registrado). Em "A" controle positivo (10ug PB+ salina), "B" controle negativo (salina registrado). Em "A" controle positivo (10ug PB+ salina), "B" controle negativo (salina registrado). Em "C" grupo tratamento utilizando associação da PB (10ug) e fração F2 (10ug), D grupo tratamento utilizando associação da PB (10ug) e fração F2 (100ug), E grupo tratamento utilizando associação da PB (10ug) e fração F6 (10ug) e F grupo tratamento utilizando associação da PB (10ug) e fração F6 (100ug).

Peçonha Bruta	Amostra	Halo Hemorrágico (cm)
		Média ± DP
10ug	salina	1.57 ± 0.21
---	salina	0 ± 0
10ug	F2 (10ug)	1.50 ± 0.20
10ug	F2 (100ug)	0.55 ± 0.23
10ug	F6 (10ug)	1.5 ± 0.13
10ug	F6 (100ug)	0.67 ± 0.15

Tabela 2: Diâmetro médio dos halos obtidos da atividade hemorrágica da peçonha bruta com e sem associação com as frações F2 e F6.

Halos hemorrágicos obtidos após administração intradérmica de 10ug da peçonha bruta (controle +), salina (controle -) e incubações (PB + frações F2 ou F6) no dorso de camundongos. Após 3 horas os camundongos foram sacrificados, suas peles removidas e o halo hemorrágico registrado.

5- Recromatografia da fração F2 em resina de troca iônica Q-sepharose

A figura 4 apresenta o perfil cromatográfico da fração F2 em Q-sepharose, resultando em 3 picos. O pico F2Q2 (tubos16-37) neutralizou a atividade hemorrágica provocada pela peçonha bruta da serpente *B. moojeni* (1:1m/m), conforme descrito no item 7 .

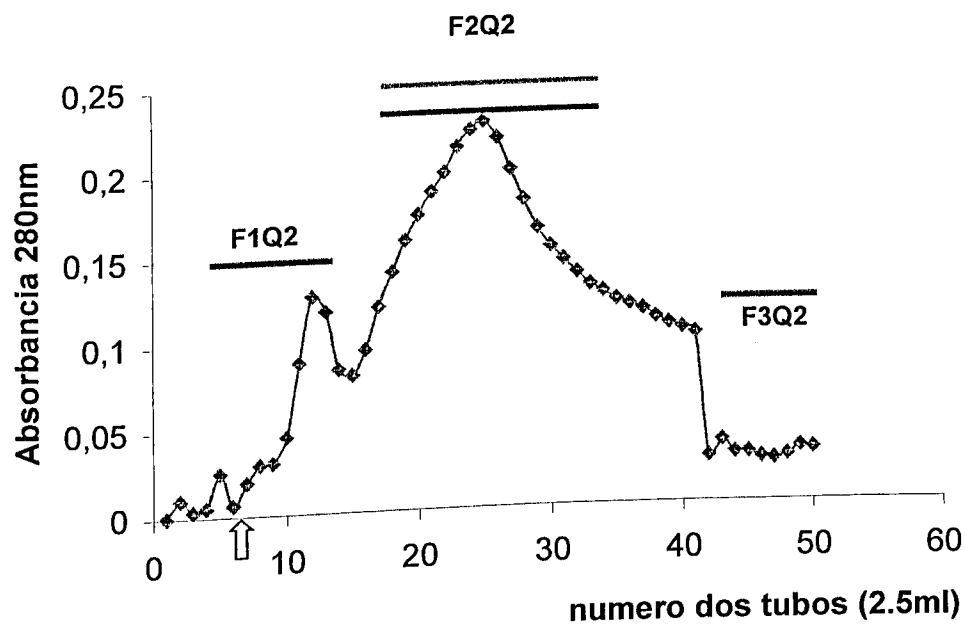


Figura 4: Recromatografia da fração F2 em coluna de troca iônica Q-sepharose A fração com propriedades inibitórias da atividade hemorrágica F2 (30mg), obtida do fracionamento de SBm em Q-sepharose, foi aplicada novamente em coluna de Q-sepharose (9.5 X 2.0 cm) equilibrada com tampão Bicarbonato de Amônio 0.05 M pH 8.0, fluxo de 20ml/h, temperatura ambiente. A eluição foi realizada com o mesmo tampão, em gradiente convexo (0.2 ~ 0.5M) e câmara de mistura de 80ml.

A seta \uparrow indica onde foi estabelecido o gradiente. A linha vermelha indica presença de inibidores da atividade hemorrágica e a linha verde representa a delimitação dos pools.

6- Perfil eletroforético das frações obtidas da recromatografia de F2 em Q-sepharose.

Os tubos 12, 20, 25, 28, 35 e 40 (10ug) provenientes do fracionamento de F2 em Q-Sepharose, foram submetidos a SDS-PAGE, 14%. O perfil eletroforético indicou bandas de migração semelhante a Bj46a que se “arrastaram” na cromatografia.

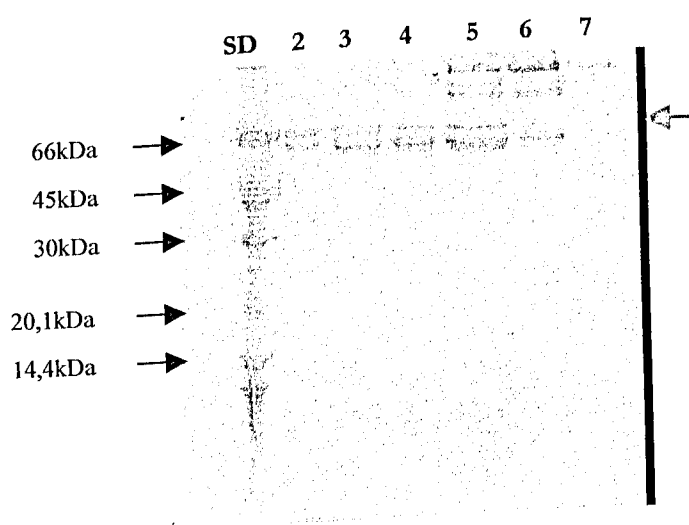


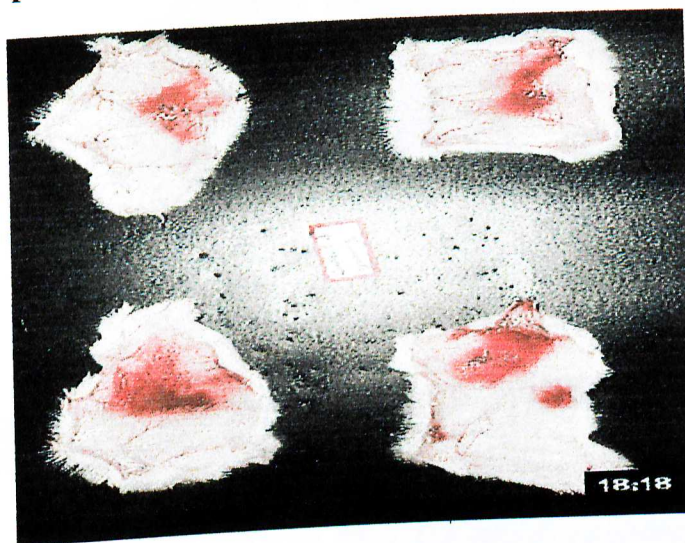
Figura 5: SDS-PAGE das amostras obtidas da recromatografia da fração F2 em Q-sepharose.

Os tubos 12, 20, 25, 28, 35 e 40 (10ug) coletados no fracionamento da fração F2 em Q-Sepharose, foram submetidos a SDS-PAGE, 14%. SD- Padrão Peso Molecular: BSA- 66 kDa, Ovoalbumina- 45kDa, Anidrase carbônica- 30kDa, inibidor tripsínico de soja- 20.1kDa, α -lactalbumina- 14.4kDa. 2 - 7: Tubos 12, 20, 25, 28, 30 e 40 respectivamente. A seta vermelha indica a presença de bandas com migração eletroforética semelhante a Bj46a, um inibidor de SVMPs do soro de *B. jararaca*.

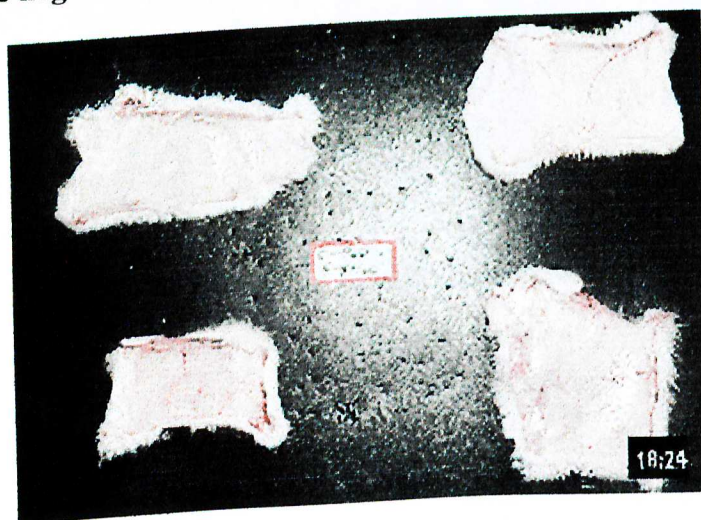
7-Atividade anti-hemorrágica das frações obtidas na recromatografia da fração F2 em Q-sepharose.

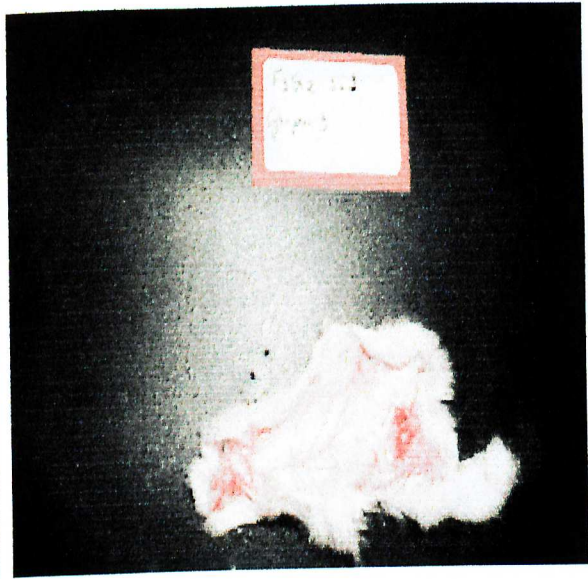
A atividade hemorrágica da peçonha bruta (PB) inoculada no dorso de camundongos, foi neutralizada pelas frações F2Q2 e F3Q2 na proporção de 1:1 (Figura 6). A fração F1Q2 apresentou rastros de atividade inibitória (dados não apresentados). A tabela 3 expressa os halos hemorrágicos e o desvio-padrão obtido.

Grupo A: controle positivo (10ug PB)



Grupo B: controle negativo (salina)



Grupo C: PB + fração F2Q2 1:1 (m/m)

Grupo D: PB + fração F3Q2 1:1 (m/m)

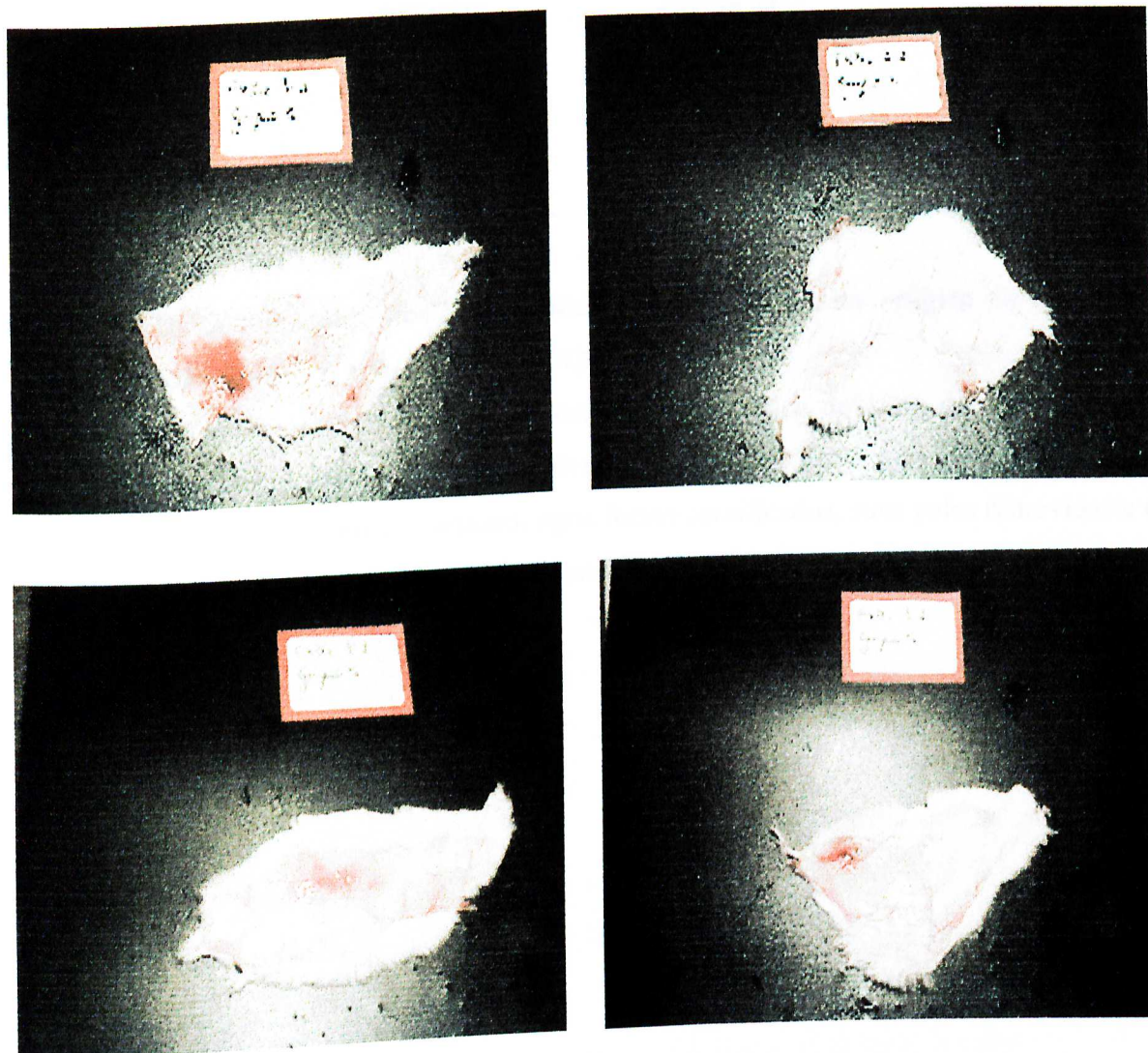


Figura 6: Neutralização da atividade hemorrágica da peçonha bruta da serpente *B.moojeni* pelas frações F2Q2 e F3Q2 obtidas da recromatografia da fração F2 em Q-sepharose. Halos hemorrágicos obtidos após administração intradérmica de 10ug da peçonha bruta (controle +), salina (controle -) e incubações (PB + frações F2Q2 e F3Q2) no dorso de camundongos. Após 3 horas os camundongos foram sacrificados, suas peles removidas e o halo registrado. Em "A" controle positivo (10ug PB+ salina), "B" controle negativo (salina 50ul), "C" grupo tratamento utilizando associação da PB (10ug) e fração F2Q2 (10ug), D grupo tratamento utilizando associação da PB (10ug) e fração F3Q2 (10ug). Ensaio realizado em quadruplicata.

Peçonha bruta	Amostra	Halo Hemorrágico
		Média \pm DP
10ug	salina	1.57 \pm 0.21
---	salina	0 \pm 0
10ug	F2Q2 (10ug)	0 \pm 0
10ug	F3Q2 (10ug)	0.5 \pm 0.10

Tabela 3: Diâmetro médio dos halos obtidos da atividade hemorrágica da PB com e sem associação com as frações F2Q2 e F3Q2.

Halos hemorrágicos obtidos após administração intradérmica de 10ug da peçonha bruta (controle +), salina (controle -) e incubações (PB + frações F2Q2 ou F3Q2) no dorso de camundongos. Após 3 horas os camundongos foram sacrificados, suas peles removidas e o halo hemorrágico registrado. Média de 4 ensaios.

Discussão

Os venenos das serpentes são constituídos de componentes tóxicos capazes de causar inúmeros distúrbios em suas vítimas (Markland, 1998).

Um dos efeitos mais dramáticos do envenenamento ofídico é causado por toxinas hemorrágicas (hemorraginas), que interagem com componentes da membrana basal, causando inúmeras desordens ao sistema hemostático (Bjarnason & Fox, 1994; Markland, 1998). Estas hemorraginas são denominadas metaloproteases do veneno de serpentes (SVMPs), dependentes de zinco, de estrutura variável e que possuem alta especificidade pelo substrato (Neves-Ferreira *et al.*, 1997).

As SVMPs não são totalmente neutralizadas pelo soro antiofídico, e em casos graves de envenenamento podem causar seqüelas permanentes (Gutierrez & Rucavado, 2000). Assim, faz-se necessário a busca de alternativas terapêuticas específicas para atenuar a ação deste grupo de toxinas, a fim de neutralizar completamente os danos induzidos por estas toxinas.

Alguns animais, possuem resistência natural aos efeitos nocivos do veneno de serpentes. Neste sentido, vários inibidores de SVMPs têm sido descritos na literatura e têm sido assunto para vários artigos de revisão (Domont *et al* 1991; Thwin & Gopalakrishnakone, 1998). Entretanto, o único inibidor de hemorraginas do gênero *Bothrops* até agora descrito é a BJ46a da serpente *B. jararaca* (Valente *et al.*, 2001). A serpente *Bothrops moojeni* é a responsável pela maioria dos acidentes ofídicos na região do Brasil Central, principalmente em áreas de cerrado (Brites & Bauab, 1988). Seu veneno é conhecido por possuir evidente atividade hemorrágica, coagulante, fosfolipásica dentre outras (Campbel & Lamar, 1989).

O objetivo principal deste trabalho foi “rastrear” a presença de inibidores das atividades coagulante e hemorrágica, no soro da serpente *Bothrops moojeni*.

Para obtenção do soro da serpente *B. moojeni*, realizamos primeiramente a coleta do sangue por meio de punção cardíaca. Este procedimento obtinha baixo rendimento, provocava sofrimento aos animais e oferecia grandes riscos aos manipuladores. Optamos portanto, pela extração do sangue por decapitação, que fornece volume de sangue suficiente, requer menor número de animais, causa menos sofrimentos e oferece menos riscos aos manipuladores.

O soro foi primeiramente fracionado em uma coluna de troca iônica Q-sepharose, onde a eluição foi realizada alterando-se bruscamente a concentração do tampão ("stepwise") (Fig. 1). As oito frações obtidas foram testadas quanto às atividades anticoagulante (tabela 2) e anti-hemorrágica (Fig. 3) em proporções de 1:1 e 10:1 (m:m) em relação à peçonha bruta. Estas relações foram estabelecidas para se obter um espectro mais amplo de atividade devido ao desconhecimento do potencial inibitório dos fatores neutralizantes. As frações F2 e F6 apresentaram propriedades anti-hemorrágicas (tabela 2) e as frações F6 e F8 anticoagulantes (tabela 1). Em SDS PAGE a 14%, foi observada a presença de bandas protéicas com migrações semelhantes nas frações com a mesma atividade. Entretanto, sugere-se que existam dois inibidores da atividade hemorrágica distintos, o primeiro eluído com tampão Bicarbonato de amônio 0,2 M (F2) e o segundo com tampão Bicarbonato de amônio 0,35 M (F6). Cabe citar que os tubos intermediários entre as duas frações também foram testados, os quais não apresentaram atividade anti-hemorrágica detectável no ensaio utilizado.

A fração F6 contém inibidores tanto de atividade coagulante, quanto de hemorrágica, e é a fração com o maior número de bandas proteicas. Entretanto, optou-se por seguir o fracionamento com a fração F2, devido ao menor número de bandas protéicas principais no gel e por apresentar somente a atividade anti-hemorrágica. Esta fração foi recromatografada em coluna de Q-sepharose (Fig. 4) e a eluição feita com tampão Bicarbonato de amônio estabelecendo-se gradiente convexo de concentração que variou de 0.2 a 0.5M. O tampão Bicarbonato de amônio pH 8,0 foi utilizado nos dois fracionamentos por possuir faixa tamponante próxima a neutralidade e por ser um tampão volátil, removível por liofilização. A fração F2 recromatografada resultou em 3 picos protéicos, denominados, F1Q2, F2Q2 e F3Q2. Em SDS-PAGE (Fig 5), proteínas com migrações comuns nas três frações, correspondentes a migração de inibidores já descritos foram observadas. Estas proteínas se "arrastaram" durante a eluição da resina de Q-Sepharose, devido a suave alteração de concentração, fato esse que pode ser atribuído a câmara de mistura de 80ml. A região indicada pela seta vermelha (Figura 5), possui bandas com migração eletroforética muito semelhantes a anti-hemorragina Bj46a (55kDa em SDS-PAGE) isolada por Valente *et al* (2001). Observa-se também a presença de bandas de peso molecular próximo a 14 kDa que também se arrastaram no perfil cromatográfico. Entretanto, não existem anti-hemorraginas

descritas com peso molecular inferior a 40kDa. A atividade anti-hemorrágica (Fig. 6) de fração F2Q2 foi mais potente que a fração F3Q2 apesar desta última também ter apresentado traços de atividade (tabela 3).

No entanto, não foi possível isolar o fator neutralizante nesta etapa do trabalho. A partir do segundo fracionamento, a quantidade de material obtida não foi suficiente para prosseguir a purificação.

Conclusão

Os resultados obtidos neste capítulo indicam que o soro da serpente *B. moojeni* apresenta proteínas capazes de neutralizar as atividades coagulante e hemorrágica da peçonha bruta da serpente da mesma espécie.

Referências Bibliográficas

- Bjarnason, J.B. e Fox, J.W. (1994). Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmac. Ther.* **62**: 325-372.
- Bradford, N.M. (1978). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem* **72**: 248.
- Brites, V.L.C. & Bauab, F.A. (1989). Fauna ofidiana do município de Uberlândia-MG-Brasil. Ocorrência na área urbana. *Rev. Ciên. Biom. UFU* **4**: 3-7.
- Campbell, J.A., and Lamar, W.W. (1983). The venomous Reptiles in Latin America.
- Domont, G.B., Perales, J e Moussatché, H. (1991). Natural Anti-Snake Venom Proteins. *Tox.* **29**: 1183-1194.
- Gutierrez, J.M. & Rucavado, A. (2000). Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Bioch.* **82**: 841-850.
- Hati, R., Mitra, P., Sarker, S. e Bhattacharyya, K.K. (1999). Snake Venom Hemorrhagins. *Crit. Rev. Tox.* **29**: 1-19.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nat.* **227**: 680-685.
- Markland, F.S. (1998). Snake Venoms and The Hemostatic System. *Tox.* **36**: 1749-1800.
- Matsui, T., Fujimura, Y., Titani, K. (2000). Snake Venom Proteases Affecting Hemostasis and Thrombosis. *Bioch. Biof. Acta* **1477**: 146-156.
- Neves-Ferreira, A.G.C., Perales, J., Ovadia, M., Moussatché, H. & Domont, G.B. (1997). Inhibitory properties of the antithrombotic complex from the South American opossum (*Didelphis marsupialis*) serum. *Tox* **35**: 849-863.
- Theakston, R.D., e Reid, H.A. (1983). Development of Simple Standard assay procedure for the characterization of snake venom. *Bull. W. H. Org.* **61**: 949-956.
- Thwin, M.M. e Gopalakrishnakone, P. (1998). Snake Envenomation and Protective Natural Endogenous Proteins: A Mini Review of the Recent Developments (1991-1997). *Tox.* **36**: 1471-1482.

Valente, R.H., Dragulev, B., Perales, J., Fox, J.W e Domont, G.B. (2001). BJ46a, a snake venom metalloproteinase inhibitor. Isolation, characterization , cloning and insights into its mechanism of action. *Eur.Jour. Bioch.* **268**: 3042-3052.

**Capítulo 2: Purificação e
caracterização parcial de uma proteína
do soro de *B.moojeni* com atividade
anti-hemorragica da peçonha bruta da
mesma espécie.**

Resumo

A hemorragia é um dos principais eventos que ocorrem no envenenamento por serpentes botrópicas. Este evento é causado por hemorraginas, metaloproteases dependentes de Zn^{+2} , capazes de atuar no tecido conjuntivo e componentes da membrana basal dos capilares, levando ao extravasamento do conteúdo sanguíneo. Alguns animais possuem resistência natural aos efeitos nocivos do veneno de serpentes. Esta resistência pode ser explicada, na maioria das vezes, pela presença de fatores neutralizantes presentes no soro destes animais. Inibidores de hemorraginas já foram descritos por vários grupos de pesquisadores. Dentre os inibidores de baixo peso molecular descritos, Bj46a isolado da serpente *B.jararaca* é o mais estudado. O objetivo deste trabalho foi isolar um inibidor de hemorraginas presente no soro de *B. moojeni* utilizando-se metodologia de purificação de Bj46a.

O soro de *B. moojeni* foi precipitado com sulfato de amônio nas faixas de saturação: 0-40%; 40-60%; 60-80%; 80-100%. A fração 40-60% foi aplicada em uma coluna Hitrap Phenyl HP (1,6 x 2,5 cm) previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio 0.01M contendo sulfato de amônio 1M pH 7.0. A eluição foi realizada estabelecendo-se um gradiente salino linear até 100% de fosfato de sódio 0,1M pH 7,0 resultando em 7 pools: Bm1-Bm7. O perfil eletroforético indicou a presença de bandas semelhantes a Bj46a no pool Bm2. Bm2 foi submetido ao fracionamento em HPLC coluna fase reversa C4, resultando em um pico principal, identificado como BmI. A espectrometria de massa e sequenciamento de 14 resíduos aminoterminais comprovam a presença do inibidor de metaloprotease.

Abstract

Haemorrhage is the principal event that occurs from Bothrops snake envenomations. This event is caused by zinc metaloproteinases (haemorrhagins) probably acting on connective tissue and basement membrane components of the capillary vessels and leading to extravasation of capillary contents. Many animals possess natural resistance to snake venoms effects. This resistance can be explained, in many cases, by neutralizing factors present in their blood sera. Haemorrhagins inhibitors were described for many researchers. The low molecular weight inhibitors described, Bj46a isolated from *B. jararaca* sera is the better know. The aim of this work was isolated a haemorrhagins inhibitor present in *B. moojeni* sera using the methodology used by Bj46a purification. The *B. moojeni* sera was precipitated with ammonium sulfate in 0-40%; 40-60%; 60-80% and 80-100% of saturation. The fraction 40-60% was applied in a Hitrap Phenyl column (1,6 X 2,5cm) previously equilibrated with Sodium Fosfate 0,1M pH7,0, resulting 7pools: Bm1-Bm7. The eletroforetic profile indicated bands with migrations similar to Bj46a in Bm2. This pool was submitted to HPLC fractionation, reverse fase C4 column, resulting in a main pic, identified BmI. The mass spectrometry results and aminoterminal sequence of 14 residues reveal the presence of metaloproteinases inhibitor.

Introdução

A hemorragia é um dos principais eventos que ocorrem no envenenamento por serpentes botrópicas (Bjarnason, & Fox, 1994). Este evento é causado por hemorraginas, metaloproteases dependentes de Zn^{+2} , capazes de atuar no tecido conjuntivo e componentes da membrana basal dos capilares, levando ao extravasamento do conteúdo sanguíneo (Hati *et al*, 1999). Estas metaloproteases do veneno de serpentes (SVMPs) são agrupadas em 4 classes de acordo com seus domínios. A classe P-I, é a de menor peso molecular, contém somente o domínio metaloprotease. A classe P-II, também de baixo peso molecular, é formada pelos domínios metaloprotease e “desintegrin-like”. A classe P-III, contém os mesmos domínios descritos em P-II além de um domínio “cysteine-rich” adicional. A classe P-IV é a de maior peso molecular e contém todos os domínios de P-III acrescido de um domínio “lectin-like”. Em termos de atividade biológica, P-III e P-IV são as classes mais potentes. É descrito que os domínios adicionais (desintegrin like, cys-rich e lectin-like) são essenciais na potencialização da atividade hemorrágica (Jia *et al.*, 1996; Matsui *et al.*, 2000).

Inibidores de hemorraginas já foram descritos por vários grupos de pesquisadores e foram relacionados em 2 classes: alto peso molecular (700-1000kDa) e baixo peso molecular (52-90-kDa) (Domont *et al*, 1991). Dentre os inibidores de baixo peso molecular descritos, Bj46a isolado da serpente *B. jararaca*, é o único até agora com seqüência primária conhecida e suposto mecanismo de ação (Valente *et al.*, 2001). O objetivo deste trabalho foi purificar um inibidor de SVMPs do soro de *B. moojeni* utilizando uma metodologia de purificação estabelecida para Bj46a.

Material e Métodos

Material

- 1- Agitador Magnético - Corning
- 2- Balança de precisão - Metter AG240
- 3- Centrífuga de eppendorfs - Centrifuge 5415C
- 4- Cromatógrafo Äkta Purifier - Pharmacia Biotech
- 5- Espectrofotômetro massa- Voyager DE-PRO Perseptive Biosystems
- 6- Sequenciador de proteínas 494 - Procise Proteins Sequencer-Perkin Elmer
- 7- Sistema de eletroforese - Mini Protean II- BioRad
- 8- Speed Vac Speed - Vac Plus SC210A Savant
- 9- Kit de dosagem de proteínas BCA - Bicinchoninic acid solution - Sigma
- 10- Sulfato de Amônio - Merck (ammonium sulfate ACS, PA)
- 11- TCA (Ácido Tricloroacético) - Sigma
- 12- Triton X-100 - Sigma
- 13- Acetona - Vetec
- 14- Coomassie Brilliant Blue R250 - Sigma
- 15- Padrão baixo peso molecular - Pharmacia Biotech
- 16- Tripsina bovina - Promega cat. V511
- 17- PVDF membrane - Seque-Blot™ BioRad
- 18- Acetonitrila - Merck
- 19- DTT (Ditiotreitol)
- 20- Iodoacetamida - Sigma
- 21- 2-mercaptoetanol - Sigma
- 22- Ácido acético - Sigma
- 23- Metanol - Sigma
- 24- Ácido Fórmico - Sigma

- 25- Tris - ACS Merck
- 26- Glicina PA - Merck
- 27- CAPS (3 cicloxilamino 1 propano sulfonic acid) - Sigma
- 28- Glicerol - Sigma
- 29- SDS (Lauril Sulfato de Sódio) - Sigma
- 30- Acrylamida - Sigma
- 31- TEMED - Sigma
- 32- Bis-acrylamida - Sigma
- 33- PSA (Persulfato de amônio) - Sigma

Métodos

1- Soro de *B. moojeni*

O soro de *B. moojeni* foi obtido a partir do sangue coletado da decaptação de 10 serpentes. O sangue permaneceu em repouso por 2 horas a temperatura ambiente e, em seguida, centrifugado a 3500rpm/20min. O sobrenadante (soro) foi retirado e armazenado a -20°C.

2- Purificação do inibidor das SVMPs

2.1- Precipitação Seletiva com Sulfato de Amônio

Foi realizada precipitação fracionada com sulfato de amônio partindo-se de 3ml de soro de *B. moojeni* nas seguintes faixas de saturação: 0-40%; 40-60%; 60-80%; 80-100%.

Para cada faixa de saturação a amostra foi agitada até a homogeneidade, permanecendo em repouso por 15 minutos, a 8°C. As amostras foram então centrifugadas a 14.000rpm/5minutos. O sobrenadante foi extraído e o volume registrado para cálculo da massa a ser adicionada, correspondente a próxima faixa de saturação. Os precipitados foram ressuspensos em PBS, pH 7.6.

2.2- Fracionamento da amostra "40-60%" de saturação sulfato de amônio em Phenyl-Sepharose HP. A fração anti-hemorrágica obtida da precipitação do soro de *B. moojeni* com sulfato de amônio (40-60%) foi ressuspensa em tampão fosfato de sódio 0.01M contendo sulfato de amônio 1M pH 7.0 e aplicada (aproximadamente 24mg de proteína) em uma coluna Hitrap Phenyl HP (1,6 x 2,5 cm) previamente equilibrada com o mesmo tampão. A eluição foi realizada estabelecendo-se um gradiente salino linear decrescente até 100% de fosfato de sódio 0,1M pH 7,0

utilizando-se fluxo linear de 2 mL/min à temperatura ambiente. O experimento foi realizado utilizando-se o cromatógrafo Äkta Purifier.

2.3- Fracionamento do Pool Bm2 em HPLC fase reversa coluna C₄ Vydac:

O pool Bm2 (tubos 22-24) resultante da etapa anterior, foi precipitado com sulfato de amônio a 80% e ressuspendido em 2,0 mL de eluente B (TFA 0.08% em acetonitrila e aplicado (1 ml por corrida) em coluna C-4 fase reversa Vydac 214TP54. A eluição foi realizada estabelecendo-se um gradiente linear crescente até 100% A (TFA 0.1% em água), fluxo de 1ml/minuto, temperatura ambiente.

3-Dosagem de Proteínas

A determinação da quantidade de proteínas das amostras foi realizada utilizando-se o Kit de dosagem de proteínas BCA (Bicinchoninic Acid) (anexo 1). A curva padrão foi estabelecida utilizando-se BSA (10 a 60ug). A leitura das amostras foi realizada em comprimento de onda de 562nm.

4- Eletroforese em Gel de poliacrilamida (PAGE)

Os géis de poliacrilamida a 12% foram confeccionados de acordo com Laemmli (1970) e corados com Coomassie Blue R250.

5- Preparação das amostras para SDS-PAGE 12%

Após a dosagem de proteínas, alíquotas correspondentes a 15ug das frações foram retiradas e realizada a precipitação com TCA (anexo 2) para concentração da amostra e aplicação no SDS-PAGE. Nas amostras livres de sais, a concentração foi realizada no concentrador SpeedVac.

Os precipitados obtidos foram ressuspensos em água destilada e tampão de amostra concentrado (1:1) e aquecidos a 95°C/5 minutos. Após este período as amostras foram centrifugadas a 14000rpm/5 minutos e aplicadas em SDS-PAGE 12%.

6- Eletroforese

O gel confeccionado no sistema Biorad foi submetido a corrida, em voltagem constante de 200v por aproximadamente 40 minutos, corados e logo após, descorados. Foi utilizado padrão de baixo peso molecular LMW- Pharmacia .

7- Caracterização do inibidor de metaloprotease do soro de *B moojeni*

7.1-Espectrometria de massa por MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization- time of flight) das amostras fracionadas em sulfato de amônio

A banda com migração semelhante a Bj46a observada em SDS-PAGE 12% (BmI) foi recortada do gel e submetida a digestão com tripsina (anexo 3) para análise em MALDI-TOF MS.

7.2- Sequenciamento do inibidor de metaloprotease do soro de *B.moojeni*

A banda BmI foi transferida para uma membrana de PVDF (western blotting anexo 4) e sequenciada a partir da degradação aminoterminal de Edman em sequenciador 494 Procise Protein Sequencer (Perkin Elmer, USA).

Resultados

1-Precipitação seletiva do soro de *B. moojeni* em Sulfato de Amônio. O soro de *B. moojeni* foi fracionado em sulfato de amônio nas faixas de saturação: 0-40%; 40-60%; 60-80% e 80-100%. Em SDS-PAGE, a fração 40-60% apresentou uma banda definida (indicada pela seta vermelha), semelhante a da B_j46a, que foi rastreada nas etapas seguintes (Fig. 1).

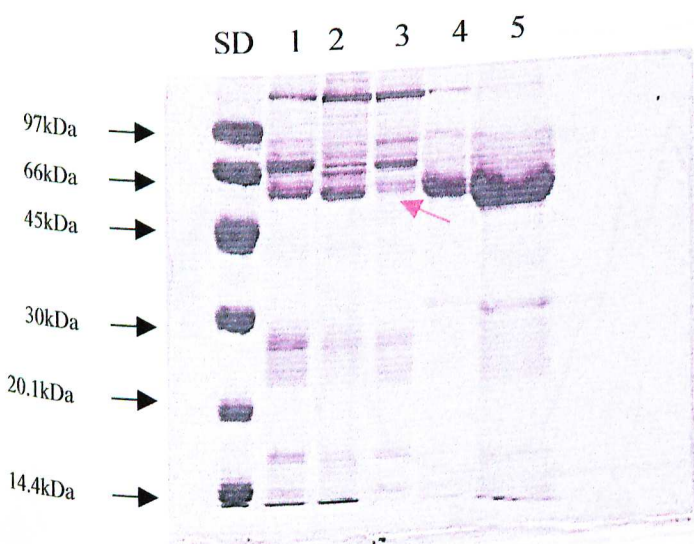


Figura 1: Eletroforese das frações obtidas por precipitação seletiva do soro de *B. moojeni* em Sulfato de Amônio. O soro de *B. moojeni* foi fracionado em sulfato de amônio em 4 faixas de saturação: SD: Padrão Peso Molecular: Fosforilase b- 94000, BSA- 67000, Ovoalbumina- 43000, Anidrase carbônica- 30000, inibidor trípico de soja- 20100, α -lactalbumina- 14400. 1: Soro *B. moojeni*; 2-5: frações precipitadas com sulfato de amônio, 0-40%; 40-60%; 60-80% e 80-100% respectivamente.

2- Fracionamento da amostra 40-60% em sulfato de amônio em coluna de interação hidrofóbica Phenyl-Sepharose HP.

A figura 2 representa o perfil cromatográfico da amostra obtida por 40-60% de saturação de sulfato de amônio em coluna de Phenyl-Sepharose. Foram obtidos 7 picos designados Bm1 a Bm7 que foram agrupados de acordo com o perfil eletroforético apresentado na figura 3.

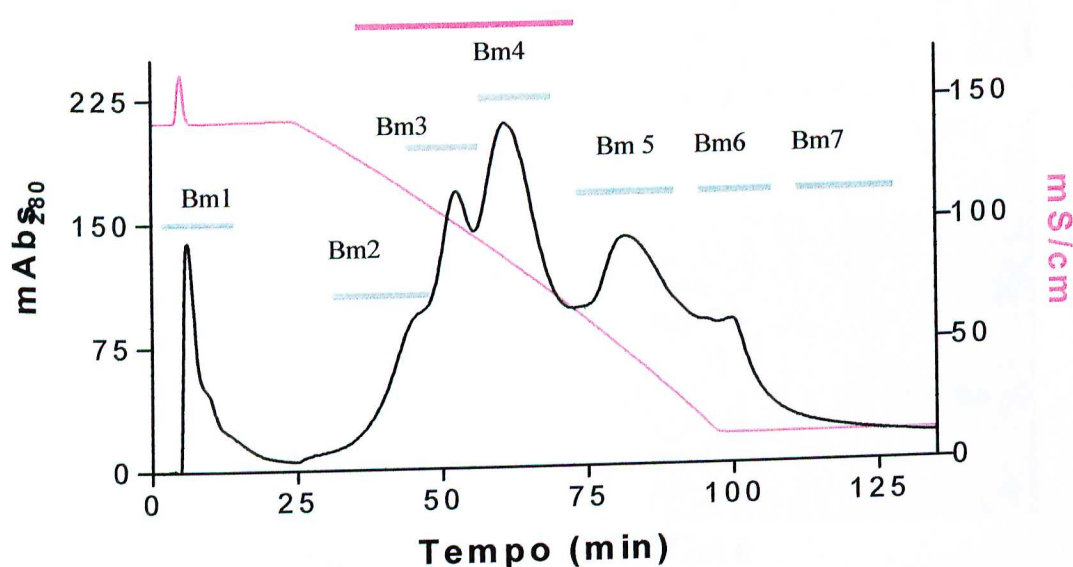


Figura 2: Fracionamento da amostra "40-60%" de saturação sulfato de amônio em Phenyl-Sepharose HP. A fração anti-hemorrágica obtida da precipitação do soro de *B. moojeni* com sulfato de amônio (40-60%) foi ressuspensa em tampão fosfato de sódio 0.01M contendo sulfato de amônio 1M pH 7.0 e aplicada (aproximadamente 24mg) em uma coluna Hitrap Phenyl HP (1,6 x 2,5 cm) previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio 0.01M contendo sulfato de amônio 1M, pH 7.0. A eluição foi realizada estabelecendo-se um gradiente salino linear decrescente até 100% de fosfato de sódio 0,1M, pH 7,0 utilizando-se fluxo linear de 2 mL/min à temperatura ambiente. A linha vermelha indica presença de inibidor e as linhas verdes os pools Bm1-Bm7 (frações agrupadas baseado em SDS-PAGE, figura 2).

3- Eletroforese das frações obtidas da cromatografia em HP Phenyl – Sephacrose.

O perfil eletroforético indicou presença de bandas com migração semelhante a Bj46a nos pools Bm2 (tubos 22-24), Bm3 (tubos 25-28) e Bm4 (tubos 29-36) (Fig. 3).

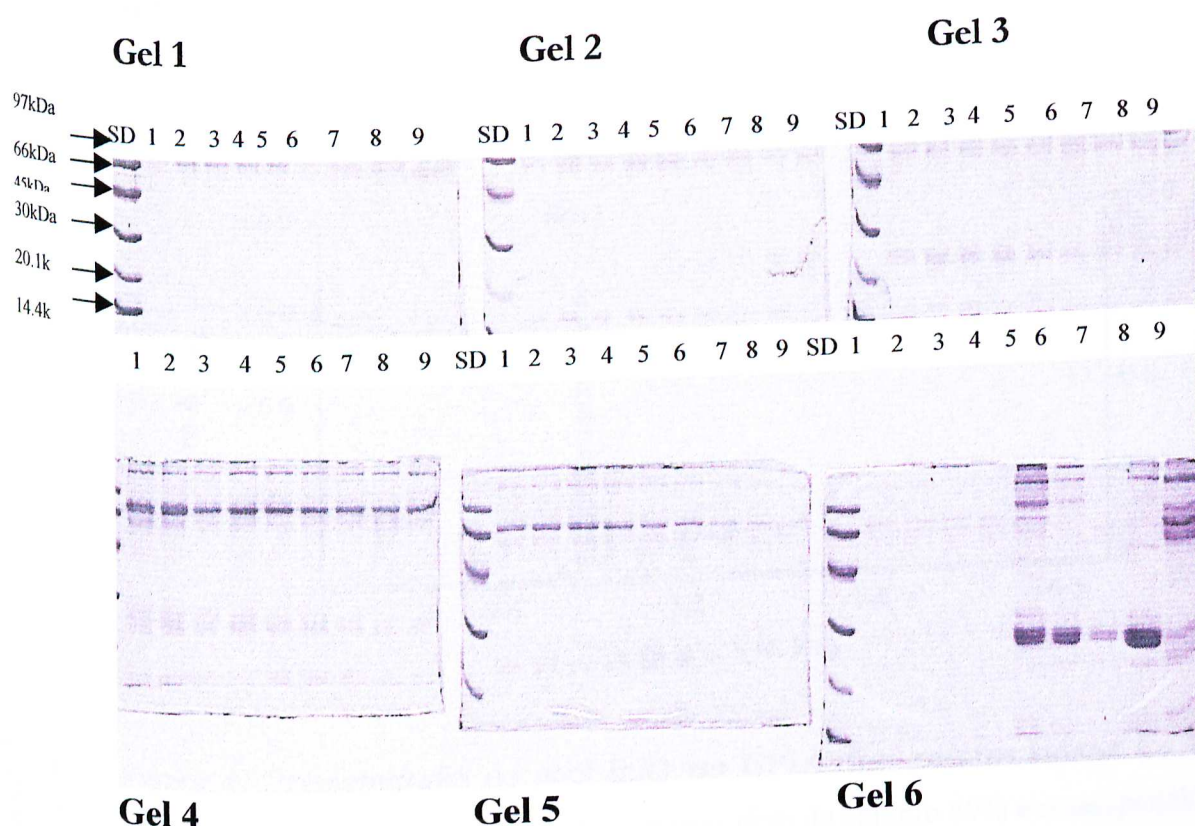


Figura 3: SDS-PAGE 12% das amostras coletadas do fracionamento em Phenyl Sepharose HP. Alíquotas referentes a aproximadamente 15 μ g foram retiradas e precipitadas com TCA (ácido tricloroacético), ressuspendida em tampão da amostra e totalmente aplicadas nos poços.

Gel 1: 1- Padrão Peso Molecular: Fosforilase b- 94000, BSA- 67000, Ovoalbumina- 43000, Anidrase carbônica- 30000, inibidor trípico de soja- 20100, α -lactalbumina- 14400. Poços 2-10: tubos 3-7;18-21. **Gel 2:** Poço 1 – Padrão Peso Molecular. Poços 2-10: tubos 22-30. **Gel 3:** Poço 1 – Padrão Peso Molecular. Poços 2-10: tubos 31-39. **Gel 4:** Poço 1 – Padrão Peso Molecular. Poços 2-10: tubos 40-48. **Gel 5:** Poço 1 – Padrão Peso Molecular. Poços 2-10: tubos 49-57. **Gel 6:** Poço 1 – Padrão Peso Molecular. Poços 1-5: tubos 58-62; Poços 6 e 7: amostras eluídas com água, Poço 8: amostra eluída com etanol 70% e 9: amostra mãe (40-60%).

4- Cromatografia do pool Bm2 em HPLC coluna de fase reversa C₄

Vydac:

O pool Bm2 obtido na etapa anterior foi submetido ao fracionamento em HPLC, coluna C₄, resultando em um pico principal, o qual foi denominado como BmI, inibidor de SVMPs, conforme item 7.

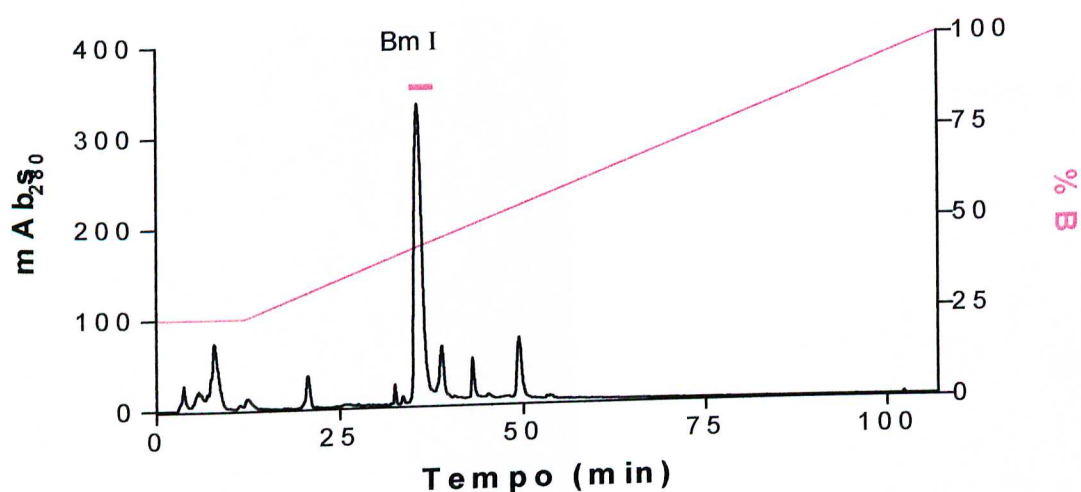


Figura 4- Cromatografia do pool Bm2 em HPLC fase reversa coluna C₄ Vydac: O pool Bm2 (tubos 22-24) foi precipitado com sulfato de amônio 80% e ressuspendido em 2,0 mL de eluente B (TFA 0.08% em acetonitrila) e aplicado (1 ml por corrida) em coluna C-4 Vydac 214TP54. A eluição foi realizada estabelecendo-se um gradiente linear crescente até 100% A (TFA 0.1% em água), fluxo de 1ml/minuto à temperatura ambiente.

5- Eletroforese das frações obtidas nas etapas de purificação do inibidor de SVMPs

O perfil eletroforético em SDS-PAGE 12% apresenta as frações obtidas na seqüência de purificação da BmI. Foram aplicados cerca de 10 μ g de proteína em cada poço (Fig. 5).

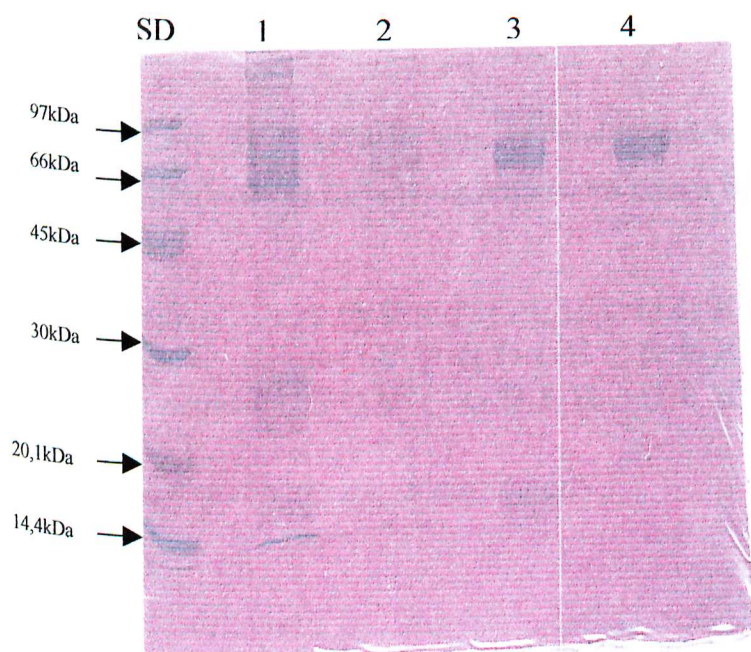


Figura 5: SDS-PAGE 12% frações obtidas nas etapas de purificação da BmI. SD- Padrão Peso Molecular: Fosforilase b- 94000, BSA- 67000, Ovoalbumina- 43000, Anidrase carbônica- 30000, inibidor tripsínico de soja- 20100, α -lactalbumina- 14400. 1- Soro *B. moojeni* , 2- amostra “40-60%”; 3- Pool Bm2 obtido em Phenyl-Sepharose HP; 4- BmI obtido do fracionamento de Bm2 em HPLC fase reversa, coluna C4.

6- Caracterização do inibidor de SVMPs da serpente *B. moojeni* (BmI).

6.1- Sequenciamento do inibidor de metaloprotease da serpente *B.moojeni*

O sequenciamento baseado na degradação aminoterminal de Edman (anexos 3 e 4) analisou 14 resíduos aminoterminais da BmI. Quando comparados com os 14 aminoácidos N-terminais de Bj46a (Fig. 6), foi observado um consenso de 12 aminoácidos. Ocorreu uma substituição no aminoácido 4 (R por K) e o aminoácido 9 não identificado, que em Bj46a é uma cisteína.

Figura 6: Seqüência dos 14 aminoácidos aminoterminais da BmI submetidos à degradação de Edman e comparados com a Bj46a.

BmI:	¹	S	Q	V	K	G	D	L	E	X	D	E	K	D	A	¹⁴
Bj46a:		S	Q	V	R	G	D	L	E	C	D	E	K	D	A	
Consenso:		S	Q	V		G	D	L	E		D	E	K	D	A	

X: aminoácido não identificado

6.2-Espectrometria de massa por MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization- time of flight) de BmI

A banda correspondente a BmI foi recortada do gel 12% e submetida à digestão com tripsina para análise dos peptídeos em MALDI-TOF MS, que analisa a relação carga/massa desses peptídeos comparando com proteínas depositadas no banco de dados. Quando analisados, os fragmentos peptídicos apresentaram homologia à Bj46a (Fig. 7).

Results Summary

MOWSE Score	#B(%) Masses Matched	% Cov	% TIC	Mean Data Err ppm	Data Tol ppm	MS-Digest Index #	Protein MW (Da)/pI	Accession #	Species	Protein Name	
1	1.294e+005	8 (100)	34.0	100.0	-25.0	21.1	29645	38779/5.7	9954438	BOTHROPS JARARACA	metalloproteinase inhibitor gjl17647799[ref]NP_524079.1
2	294	4 (50)	14.0	50.0	-4.14	33.2	991655	55782/4.7	17647799	M UNREADABLE	Protein disulfide isomerase [Drosophila melanogaster]
3	39.8	4 (50)	9.0	50.0	2.97	65.6	921881	52137/6.6	391685	INFLUENZA A VIRUS	neuraminidase
4	25.3	4 (50)	12.0	50.0	-19.5	21.3	1121978	46275/5.0	13628178	HOMO SAPIENS	thrombospondin
5	24.5	4 (50)	11.0	50.0	11.6	63.2	1233621	43130/7.8	23957432	INFLUENZA A VIRUS (A/CHICKEN/GUANGDONG/97 (H9N2))	neuraminidase

Figura7: Identificação da banda BmI em espectrometria de massa. Os fragmentos peptídicos obtidos da digestão de BmI apresentou alta similaridade com Bj46a, observada como primeira proteína listada, além de possuir um mowse score (acurácia) desejável.

Index Number: 29645

Acc. #: 9954430 Species: BOTHROPS JARARACA Name: metalloproteinase inhibitor

pI of Protein: 5.7

Protein MW: 38779

Amino Acid Composition: A16 C12 D23 E30 F11 G12 H30 I14 K23 L26 M3 N20 P18 Q9 R9 S20 T16 V38 W3 Y8

1	11	21	31	41	51	61	71
MNSLVALVLL	GQIIGSTLSS	QVRGDLRCDE	KDAKEWTDTC	VRYINEHKLH	GYKYALNVIK	NIVVVPWDGD	WVAUFLKLN
81	91	101	111	121	131	141	151
LETECHVLDP	TPVFNCTVRP	QHNHAVEMDC	DVKEMENVDT	EKEBVFARCH	STPDSVENVR	RNCPKCPILL	PSNNPQVDS
161	171	181	191	201	211	221	231
VEYVLNKINE	KLSDBHYEVL	EISRGQHKYE	PRAYYVEFAI	VEVNCTAQEL	HDDHHHCHPN	TACEDHIGFC	RATVFRSHAS
241	251	261	271	281	291	301	311
LEKPKDEQEE	SDCVILNVKE	GHAHSHLIQQ	HVEKDSISPE	HMNTALNFWH	PHNDTSTSHE	SREHLAEVPPV	AFVKKELPKD
321	331	341					
ISDRHTTPVK	GCPCGVHHFE	L					

The matched peptides cover 34% (116/341 AA's) of the protein.

Figura 8: Comparação da seqüência de aminoácidos de Bml e Bj46a em Espectrômetro de Massa (MALDI-TOF MS). Os fragmentos peptídicos de Bml foram comparados com Bj46a. As letras em vermelho indicam os aminoácidos consenso, totalizando 34% de homologia de Bml com Bj46a.

Discussão

No capítulo 1 relatamos a presença de inibidores de hemorraginas no soro e frações da serpente *B. moojeni*. Neste segundo capítulo, o enfoque está na purificação de um inibidor de hemorraginas seguindo um protocolo já descrito para o isolamento da Bj46a. Este protocolo, com algumas modificações, foi realizado no Laboratório de Toxinologia do Instituto Oswaldo Cruz- RJ, sob a supervisão do Dr. Jonas Perales e Dr. Richard Valente. O soro da serpente *B. moojeni* foi coletado a partir da decapitação de 10 indivíduos, gentilmente cedidos pela Pentapharm do Brasil e armazenado a -20°C . Uma alíquota deste material foi retirada e realizada a precipitação com sulfato de amônio nas faixas de 0-40%, 40-60%, 60-80% e 100%. No gel SDS-PAGE 12% foi observada a presença de banda equivalentes a migração eletroforética da já isolada Bj46a, na mesma faixa de saturação de sulfato de amônio encontrada para esta proteína, 40-60%. Esta amostra foi então escolhida para fracionamento em Phenyl Sepharose, utilizando como tampão de equilíbrio Fosfato de sódio 0,01M + Sulfato de Amônio 1,0M pH7,0. O perfil de bandas indicou a separação dos pools em Bm1-Bm7.

O Pool Bm 2 apresentou migração semelhante a Bj46a, foi precipitado em 80% sulfato de amônio e ressuspendido em acetonitrila e TFA (ácido trifluoroacético) 0,08%v/v (solução B). Este procedimento foi utilizado para preparar a amostra para o próximo passo de purificação do inibidor de hemorraginas presente no soro de *B. moojeni*. A amostra foi então aplicada em 2 corridas, em HPLC fase reversa coluna C4, previamente equilibrada em solução B. A eluição foi feita começando-se um gradiente com 75% solução B e 25% TFA em Água (solução A). O fluxo estabelecido foi de 2ml/minuto, a temperatura ambiente. O perfil cromatográfico apresentou 12 picos. Uma pequena alíquota do pico 9 (Bm1) foi retirada e colocada em SpeedVac para concentrar o material e visualizar em SDS-PAGE, 12%. No gel, foram visualizadas três bandas muito próximas, sendo que o perfil eletroforético de uma delas é muito semelhante a Bj46a. A massa molecular identificada pela migração eletroforética se situava em torno de 55kDa. Em Bj46a, a proteína homogênea possui uma massa molecular de 55.4 kDa em SDS-PAGE em condições desnaturantes e 46kDa pela espectrometria de massa (Valente *et al*, 2001). Essa diferença no tamanho molecular pode ser devida a presença de carboidratos associados a Bm1, que

em Bj46a é de 17% da proteína total. Espera-se que BmI tenha um comportamento semelhante, no entanto resolveu-se por não denominá-la Bm46 pela falta de dados que comprovem o tamanho molecular. A denominação BmI refere-se a “Bothrops moojeni Inhibitor”. A atividade anti-hemorrágica foi realizada com o soro e a amostra “40-60%”, identificando a presença de inibidores de hemorraginas, entretanto, ainda não foi realizada com BmI.

A banda semelhante a Bj46a foi recortada e submetida a degradação com tripsina para análise no espectrômetro de massa, identificando então no banco de dados NCBI um inibidor de Metaloproteinase hemorrágica. A espectrometria de massa identificou também a existência de proteínas contaminantes no material. Estas proteínas poderiam ser retiradas utilizando-se uma outra etapa de purificação, como refraçãoamento da BmI na mesma coluna, que será realizado oportunamente.

Foi retirada também uma alíquota do pico 9 (BmI), concentrada em speed vac para sequenciamento amino-terminal (anexo 3 e 4). O sequenciamento amino terminal também indicou semelhança a Bj46a. Dentre os 14 aminoácidos identificados, somente 2 não corresponderam a proteína já descrita. BmI apresenta uma Lys na posição 4, enquanto que Bj46a possui uma Arg, indicando uma substituição conservativa, já que esses dois aminoácidos apresentam características químicas semelhantes. O aminoácido na posição 9, não foi possível ser identificado. Em Bj46a existe uma Cys nesta posição. O aminoácido Cys não é identificado sem ser submetido a um tratamento químico, uma alquilação que permite a identificação do resíduo.

A utilização de alta tecnologia foi essencial para a identificação do inibidor e seu quase completo isolamento. A descrição do inibidor, suas características químicas e estudos de interação serão realizados oportunamente e representam uma nova etapa deste trabalho.

Conclusão

- 1- O soro de *B. moojeni* contém inibidores de hemorraginas
- 2- Seguindo-se um protocolo de purificação de um inibidor do soro de *B. jararaca* já descrito, foi possível detectar e identificar um inibidor de SVMPs utilizando-se espectrometria de massa
- 3- O inibidor, em SDS-PAGE apresentou PM de aproximadamente 55kDa
- 4- BmI apresentou identidade de 86% com Bj46a na sequência de 14 resíduos aminoterminais.

Referencias Bibliográficas:

Bjarnason, J.B. & Fox, J.W. (1994). Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmac. Ther.* **62**: 325-372.

Domont, G.B., Perales, J and Moussatché, H. (1991). Natural Anti-Snake Venom Proteins. *Toxicon* **29**: 1183-1194

Hati, R., Mitra, P., Sarker, S. & Bhattacharyya, K.K. (1999). Snake venom hemorrhagins. *Critical Reviews Toxicology* **29**: 1-19.

Jia, L.G., Shimokawa, K., Bjarnason, J.B. & Fox, J.W. (1996). Snake venom metalloproteinases: structure, function and relationship to the ADAMs family of proteins. *Tox.* **34**: 1269-76.

Matsui, T., Fujimura, Y. & Titani, K. (2000). Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochim. Biophys. Acta* **1477**: 146-56.

Valente, R.H., Dragulev, B., Perales, J., Fox, J.W and Domont, G.B. (2001). BJ46a, a snake venom metalloproteinase inhibitor. Isolation, characterization, cloning and insights into its mechanism of action. *European journal of Biochemistry.* **268**: 3042-3052.

Anexo1

BCA Protein Assay Kit
23225

3747 N. Meridian Road
P.O.Box117
Rockford,IL61105 0708

Product Description Number

Description

23225

BCA Protein Assay Kit

Contains sufficient reagents for 500 test tube or 5,000 microwell plate assays.

BCA Reagent A, 1,000 ml of reagent containing sodium carbonate, sodium bicarbonate, bicinchoninic acid and sodium tartrate in 0.1 M sodium hydroxide. Available separately as Product No. 23223.

BCA Reagent B, 25 ml of a solution containing 4% cupric sulfate. Available separately as Product No. 23224.

Albumin Standard, 10 x 1 ml ampules containing bovine serum albumin (BSA) at a concentration of 2.0 mg/ml in a solution of 0.9% saline and 0.05% sodium azide. Available separately as Product No. 23209.

When stored at room temperature, the kit has a shelf life of at least 12 months from the date of receipt. Should either Reagent A or Reagent B precipitate upon shipping in cold weather or during long-term storage, dissolve the precipitates by gently warming the solutions while stirring. If any kit reagent shows discoloration or evidence of microbial contamination, discard the reagent.

Note: If you are working with IgG samples, you may prefer our Bovine Gamma Globulin (BGG) Standard (Prod. No. 23212, 10 x 1 ml ampules, 2 mg/ml). This BGG Standard may be diluted and used as described for the BSA Standard included in this kit (Table I).

If you would like to avoid the tedious and time-consuming effort of preparing the diluted protein standards, Pierce also offers both the BSA and BGG standards in sets containing 7 x 3.5 ml bottles of pre-diluted protein standards covering the range from 125 ug/ml to 2,000 ug/ml. The Pre-Diluted Protein Standards are available separately as Prod. No. 23208 (BSA) or 23213 (BGG).

The BCA-Protein Reaction Scheme

- 1). Protein (peptide bonds) + $\text{Cu}^{+2} \xrightarrow{\text{OH}^-}$ tetradentate- Cu^{+1} complex
- 2). $\text{Cu}^{+1} + 2$ Bicinchoninic Acid (BCA) \longrightarrow BCA- Cu^{+1} complex (purple colored, read at A562)

Introduction

The Pierce BCA Protein Assay is a detergent-compatible colorimetric method based on bicinchoninic acid (BCA) for the colorimetric detection and quantitation of total protein. This method combines the well-known reduction of Cu^{+2} to Cu^{+1} by protein in an alkaline medium (the biuret reaction) with the highly sensitive and selective colorimetric detection of the cuprous cation (Cu^{+1}) using a unique reagent containing bicinchoninic acid. The purple-colored reaction product of this assay is formed by the chelation of two molecules of BCA with one cuprous ion. This water-soluble complex exhibits a strong absorbance at 562 nm that is linear with increasing protein concentrations over a broad working range of 20 pg/ml to 2,000 Hg/ml. The BCA method is not a true end-point method - the final color continues to develop but, following incubation, the rate of color development is slowed sufficiently to allow large numbers of samples to be done in a single run. The macromolecular structure of protein, the number of peptide bonds and the presence of four amino acids (cysteine-, cystine, tryptophan and tyrosine) are reported to be responsible for color formation with BCA.² Studies with di-, tri- and tetrapeptides suggest that the extent of color formation is not simply due to the sum of the contributions of the individual color-producing functional groups.²

Telephone: 800-8-PIERCE (800-874-3723) or 815-968-0747 • Fax: 815-968-7316 or 800-842-5007 Internet:

<http://www.piercenet.com> 1

"•ir

Preparation

1. Preparation of Diluted BSA Standards

Prepare a fresh set of protein standards by diluting the 2.0 mg/ml BSA stock standard (Stock), preferably in the same diluent as your sample. For a list of standard dilutions, see Table 1. The BSA Standard (1 ml ampule of the 2.0 mg/ml) is sufficient to prepare a set of diluted standards for either working range. There will be sufficient volume for three replications of each diluted BSA standard, if desired.

2. Preparation of the BCA Working Reagent (WR)

To prepare WR, mix 50 parts of BCA Reagent A with 1 part of BCA Reagent B. When BCA Reagent B is initially added to BCA Reagent A, a turbidity is observed that quickly disappears upon mixing to yield a clear-green WR. Prepare sufficient volume of WR based upon the number of tests to be done. Each test tube sample to be done requires 2.0 ml of the WR, while the microwell plate samples require only 200 μ l. The WR is stable for at least 1 day when stored in a closed container at room temperature (RT).

The Test Tube Protocol (Sample to WR ratio = 1:21)

1. Pipet 0.1 ml of each standard or unknown sample into appropriately labeled test tubes. Use 0.1 ml of the diluent for the blank tubes.
2. Add 2.0 ml of the WR to each tube, mix well.
3. Incubate all the tubes at the selected temperature and time:
 - a. Standard Protocol: 37°C for 30 minutes (working range = 20-2,000 μ g/ml)
 - b. Room Temp. Protocol: RT for 2 hours (working range = 20-2,000 μ g/ml)
 - c. Enhanced Protocol: 60°C for 30 minutes (working range = 5-250 μ g/ml)

Note: Increasing the incubation time or temperature increases the $A(562)$ for each test and decreases both the minimum detection level of the reagent and the working range of the protocol.

4. After incubation, cool all tubes to RT.
5. Measure the absorbance at 562 nm of each tube vs. a water reference.

Note: Because the BCA Reagent does not reach a true end point, color development will continue even after cooling to RT. However, because the rate of color development is low at RT, if $A(562)$ readings of all the tubes can be done in 10 minutes or less, no significant error is introduced.
6. Subtract the average $A(562)$ reading for the blanks from the $A(562)$ reading for each standard or unknown sample.
7. Prepare a standard curve by plotting the average blank corrected $A(562)$ reading for each BSA standard vs. its concentration in μ g/ml. Using the standard curve, determine the protein concentration for each unknown sample.

The Microwell Plate Protocol (Sample 10 WR Ratio = 1:9)*

1. Pipet 25 μ l of each standard or unknown sample into the appropriate microwell plate wells. Use 25 μ l of the diluent for the blank wells. (working range = 20-2,000 μ g/ml)

* Note: If sample size is limited, 10 μ l of each unknown sample and standard can be used. However, the working range of the assay will be limited to 125-2,000 μ g/ml.
2. Add 200 μ l of the WR to each well, mix the plate well on a plate shaker for 30 seconds.
3. Cover the plate and incubate the plate at 37°C for 30 minutes.
4. After incubation, cool the plate to RT.
5. Measure the absorbance at or near 562 nm on a plate reader.

the Standard Test Tube Protocol. This is due to the shorter light path employed with a plate reader. If higher A(562) readings are required: 1) increase the incubation time to 2 hours or 2) increase the incubation temperature to 60°C.

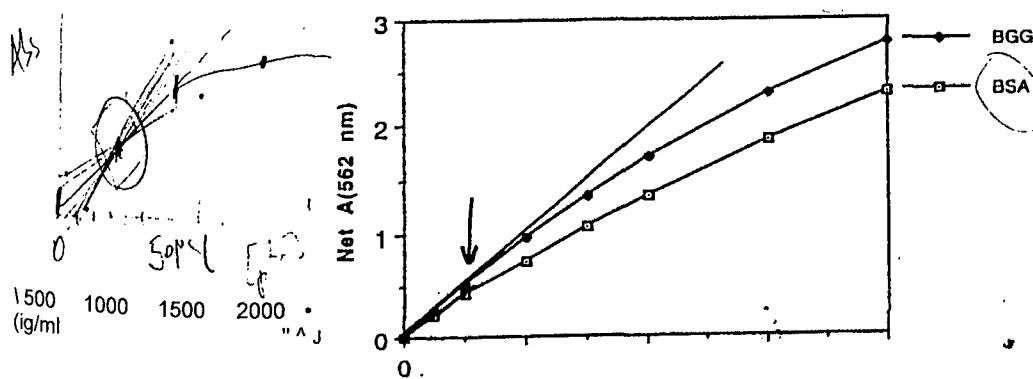
C. Increasing the incubation time, incubation temperature or ratio of sample volume to WR increases the net A(562) for each well and lowers both the minimum detection level of the reagent and the working range of the protocol.

6. Subtract the average A(562) reading for the blanks from the A(562) reading for each standard or unknown sample.
7. Prepare a standard curve by plotting the average blank-corrected A(562) reading for each BSA standard vs. its concentration in µg/ml. Using the standard curve, determine the protein concentration for each unknown sample.

Performance Characteristics of the BCA Protein Assay Reagent

1. Response Curves for BSA and BGG

Typical color response curves for BSA and bovine gamma globulin (BGG)



Protein concentration in

Figure shows the typical linear color response curves for BSA and BGG using Standard

the (37°C/30-minute) Test Tube Protocol.

2. Protein-to-protein Variation

Each of the commonly used total protein assay methods exhibits some degree of varying response toward different proteins. These differences relate to amino acid sequence, pI, structure and the presence of certain side chains or prosthetic groups that can dramatically alter the protein's color response.

Most protein assay methods utilize BSA or immunoglobulin (IgG) as the standard against which the concentration of protein in the sample is determined. Using either of these proteins as the standard works well in most assay methods. However, if great accuracy is required, the standard curve should be prepared from a pure sample of the target protein to be measured.

Table 2 shows typical BCA Protein Assay Reagent protein-to-protein variations in color response. All proteins were tested at a concentration of 1,000 µg/ml using the 30-minute/37°C Test Tube Protocol. The average net color response for BSA was nonnormalized to 1.00 and the average net color response of the other proteins is expressed as a ratio to the response of BSA.

3. Compatible Substances

The substances listed in Table 3 were found to be compatible with the Standard Tube BCA Protein Assay Protocol if the error in the estimate of the protein concentration (BSA at 1,000 µg/ml) caused by the presence of the substance in the sample was less than or equal to 10%. The substances in Table 3 were tested over a period of three weeks using freshly prepared WR with each run. The blank corrected A(562) readings (for the 1,000 µg/ml BSA standard + substance) were compared to the net A(562) of the 1,000 µg/ml BSA standard prepared in 0.9% saline.

4. Substances Known to Interfere

The following substances have been reported to interfere with the accurate estimation of protein concentration with the BCA Protein Assay Reagent. They should be avoided as components of the sample buffer.

Ascorbic Acid	Catecholamines	Creatinine	Cysteine	EGTA	Impure Glycerol	Hydrogen peroxide	Hydrazides
(Na ₂ BH ₄ and NaCNBH ₃)	Iron	Lipids	Melibiose	Phenol Red	Impure Sucrose	Tryptophan	Tyrosine
Uric Acid							

Troubleshooting

1. The Presence of Incompatible Substances in the Sample

Interference in the BCA Protein Assay may be eliminated or overcome by:

- Removing the interfering substance by dialysis or gel filtration.
- Diluting the sample to the point that the substance no longer interferes. (This works if the starting protein concentration of the sample is high.)
- Precipitating the proteins in the sample with acetone or trichloroacetic acid (TCA); the liquid containing the substance that interfered is discarded and the protein pellet is easily solubilized directly in the alkaline BCA WR.¹⁵
- Increasing the amount of copper in the WR (use 4 ml or even 6 ml of Reagent B/100 ml of Reagent A instead of the 2 ml of Reagent B/100 ml of Reagent A that is called for in the instructions for preparing the BCA WR). This may eliminate interference by copper chelating agents.

Note: For greatest accuracy of the estimate of protein concentration in the sample, the protein standards must be treated identically to the sample.

2. Alternative Total Protein Reagents

Occasionally, interference by a reducing substance or metal chelating substance contained in the sample cannot be overcome easily by any of the above methods. If that occurs, try the Pierce Coomassie® Plus Protein Assay Reagent Kit, Product No. 23236. The Coomassie® Plus Protein Assay Reagent is a modified Bradford formulation. This reagent contains the Coomassie® dye that binds to protein in an acidic medium and produces a blue color that is measured at 595 nm.

3. Reading at Wavelengths other than 562 nm

If a photometer or plate reader with a 562 nm filter is not available, the purple color may be measured at any wavelength between 540 nm and 590 nm.⁴⁻⁵ The maximum absorbance of the BCA-Cu^{II} complex occurs at 562 nm. Taking the absorbance measurements at any wavelength other than 562 nm will result in a lower slope for the standard curve and may increase the minimum detection level for the protocol.

4. Cleaning and Re-use of Glassware

Care must be exercised when re-using glassware. The BCA Reagent is sensitive to metal ions, especially copper ions. All glassware must be cleaned and then given a thorough final rinse with high-quality deionized water.

References

- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76-85.
- Wiecheinian, K., Braun, R. and Fitzpatrick, J. (1988). Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Anal. Biochem.* **175**, 231-237.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Peterson, G.L. (1979). Review of the folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal. Biochem.* **100**, 201-220.
- Kirschbaum, G. (1986). Use of the bicinchoninic acid assay in measuring urinary proteins. *Clin. Chem.* **32**, No. 3, Letter to the Editor. 572.
- Redinbaugh, M.G. and Turley, R.B. (1986). Adaptation of the bicinchoninic acid protein assay for use with microwell plates and sucrose gradient fractions. *Anal. Biochem.* **153**, 267-271.
- Sorensen, K. and Brodbeck, U. (1986). A sensitive protein assay method using micro-titer plates. *Experientia* **42**, 161-162.
- Olson, B.J., Sala, L.J., Smith, P.K. and Klenk, D.C. (1985). HPLC of proteins: Continuous post column detection with bicinchoninic acid-enhanced sensitivity and selectivity. Poster Reprint - 5th International Symposium on HPLC of Proteins, Peptides and Polynucleotides. *Anal. Biochem.* **161**, 152-156.
- Davis, L.C. and Radke, G.A. (1987). Measurement of protein using flow injection analysis with bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **161**, 152-156.
- Kaushal, V. and Barnes, L.D. (1986). Effect of zwitterionic buffers on measurement of small masses of protein with bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **157**, 291-294.

Telephone: 800-8-PIERCE (800-874-3723) or 815-968-0747 • Fax: 815-968-7316 or 800-842-5007 Internet:

<http://www.piercenet.com> 4

Anexo 2

Precipitação de proteínas com TCA

Procedimento:

- 1- Levar a amostra para uma concentração proteica maior ou igual a 100ug/ml (pode ser feito com speed vac)
- 2- para cada 1ml de amostra, adicionar 278ul de TCA 50% e 139ul de Triton X-100 1% e misturar no vórtex.
- 3- Incubar no gelo por 30 minutos
- 4- centrifugar a 14000 rpm por 10 minutos a 4 graus centígrados e remover o sobrenadante.
- 5- lavar o precipitado com 500ul de acetona gelada
- 6- centrifugar a 14000 rpm por 10 minutos a 4 graus centígrados e remover o sobrenadante
- 7- Repetir mais uma vez a lavagem com acetona gelada
- 8- Deixar o precipitado secar ao ar livre.

Anexo 3

Degradação de Edman

O seqüenciador automático de proteínas e peptídeos usa a técnica de degradação de Edman (Edman, 1950) para remover e identificar aminoácidos a partir da porção N-terminal de um polipeptídeo. Após ativação de um filtro, composto de papel e fibra de vidro, a proteína é hidrofobicamente ligada a este suporte e em seguida colocada na câmara de reação. Depois de cada ciclo degradativo, o aminoácido N-terminal é removido da cadeia polipeptídica na forma derivada de anilino-tiazolinona (ATZ). O aminoácido-ATZ é automaticamente transferido para uma segunda câmara onde ocorre a conversão para um derivado mais estável na forma de feniltiohidantoina (aminoácido-PTH). O aminoácido-PTH é transferido para um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência onde a identificação é realizada em comparação aos tempos de retenção de aminoácidos-padrão. O seqüenciador utilizado foi o modelo PSQ-23A da Shimadzu Corporation. Aplicou-se 100 picomoles de amostra a um filtro previamente ativado. A seqüência obtida foi utilizada para procuras em bancos de dados (GenBank, SwissProt e PIR) utilizando o programa BLAST (Altschul et al., 1997).

Sistema Mini Trans-Blot Bio Rad

- 1- Após a eletroforese, rinsar o gel com tampão de transferência para retirar sais e detergente e equilibrar o tamanho na nova solução.
- 2- Cortar o PVDF do tamanho do gel e colocar em metanol por 5 segundos. Transferir para H²O MQ até que ele permaneça afundado e logo equilibrar em tampão de transferência (manipular a membrana sempre com luvas e/ou pinça).
- 3- Saturar os papéis de filtro e as esponjas com tampão de transferência.
- 4- Num recipiente de plástico, colocar o cassete de blotting com o lado preto (-) voltado para baixo e o lado transparente (+) em ângulo, sustentado pela lateral do recipiente (corrida será do -->+).
- 5- Acima do lado preto colocar : esponja, papel de filtro, gel, PVDF, papel de filtro, esponja. Verificar sempre a existência de bolhas. Elas devem ser evitadas em todos os níveis do sanduíche para garantir uma transferência uniforme. Fechar o cassete.
- 6- Colocar o cassete no suporte, lado preto com lado preto.
- 7- Colocar todo o conjunto no tanque de transferência e encher com tampão de transferência gelado. Colocar um agitador magnético no fundo do tanque para que a transferência ocorra sob agitação. Colocar o recipiente contendo gelo dentro do tanque.
- 8- Ligar a fonte e fazer a transferência a 100 volts constantes (= 250 mA p/ Laemmli 12%) por 1 hora. (Para transferências mais longas, a câmara de blotting deverá ser colocada em câmara fria). Colocar o tanque sobre uma placa agitadora, (mesmas condições elétricas para 1 ou 2 géis).

*Tampões de transferência**SDS-PAGE : 25 mM tris, 192 mM glicina, 20% metanol, pH 8,3.**3.03g tris**14,4g glicina**200 ml metanol**Hft MQ qsp 11**pH deverá estar entre 8,1 e 8,4. Não ajustar o pH !**P AGE nativo : 25 mM tris, 192 mM glicina, pH 8,3.**Igual ao anterior, sem metanol.*

*Referência: Manual de Instrução do Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell
Catálogos r[^] 170-3930 e 170-3935
Bio-Rad*

REVELAÇÃO DO PVDF PARA SEQÜENCIAMENTO

- 1- Após a transferência, lavar exaustivamente a membrana com H₂O MQ para retirada dos contaminantes de tris e glicina (só manipular com luvas e/ou pinça).
- 2- Corar o PVDF por 5 minutos em azul de Coomassie R250 0,025% em metanol 50%.
- 3- Lavar o excesso de corante com metanol 50%.
- *4- Corar com Vermelho de Ponceau 0,1% em Ácido Acético 2%.
- *5- Se necessário, lavar um pouco com água.
- 6- Secar a membrana ao ar livre.
- 7- Usando bisturis novos, cortar as bandas de interesse e colocar em eppendorfs novos.
- 8- Cortar um pedaço de PVDF sem proteína para servir de controle.
- 9- Colocar diretamente no seqüenciador automático (ideal quantidades em tomo de 500 pmoles p/ o Shimadzu da UENF).

*Referência: Paul Matsudaira
The Journal of Biological Chemistry 262, J 0035-J 0038 (1987)*