

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DA FOSFOLIPASE ÁCIDA BthA-I-PLA₂ do veneno de *Bothrops jararacussu*

Área: Ciências Biológicas/Subárea: Bioquímica

RIBEIRO, João Victor Lopes de Oliveira^{2,5}; **LIMA, Anderson Maciel**^{2,3};
MARTINS, Marcos Antônio Cabral^{1,2}; **SILVA, Pricila Gomes**^{3,4, 8}; **MACEDO,**
Jamile Mariano^{2,7}; **SOUZA, Mateus Farias**^{2,4}; **AMORIM, Juliana Aparecida**
Vieira^{2,5}; **GUSMÃO, Maria Elisabeth Moreira de Lima**^{2,5}; **SOARES, Andreimar**
Martins^{2,3,5}; **KAYANO, Anderson Makoto**^{2,6}

¹ UNESC/UNAMA

² Laboratório de Biotecnologia de proteínas e compostos bioativos -LABIOPROT

³ Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz RO

⁴ Universidade Federal de Rondônia-UNIR

⁵ Centro educacional São Lucas/ Afya

⁶ Centro de Pesquisa em Medicina Tropical-CEPEM/SESAU

⁷ Instituto Federal de Rondônia-IFRO

⁸ Centro de estudos em biomoléculas aplicadas à saúde-CEBio

Introdução:

A busca por terapêuticas alternativas e complementares aos tratamentos convencionais para diferentes doenças, tem conduzido diversos grupos de pesquisa a investigarem fontes naturais para a identificação de novas moléculas, podendo ser provenientes de origem animal ou vegetal. Especificamente para a malária, um exemplo de sucesso da aplicação da biodiversidade como fonte terapêutica é representada pela artemisinina, uma molécula proveniente da flora asiática, que hoje constitui a base para os principais modelos para a terapêutica da malária. Este exemplo estimula a busca por novas biomoléculas que sejam efetivas contra este e outros parasitos causadores de distintas doenças. Além da utilização da flora, a fauna também possui potencialidades. Outra fonte biológica estudada são os venenos de serpentes, que são complexas misturas de peptídeos, proteínas, lipídeos, carboidratos, íons metálicos e compostos orgânicos, sendo que as proteínas e peptídeos representam aproximadamente 90% da massa seca. Estes compostos são utilizados para defesa, predação, afugentamento de possíveis predadores, ou até mesmo uma combinação dessas ações. As pesquisas com venenos animais tiveram início com o intuito de desvendar o envenenamento e quais eram os tratamentos médicos associados. A partir disso, distintas razões tornaram os venenos animais atraentes para pesquisas em todo o mundo, pois estes apresentaram uma grande riqueza, eficiência dos seus componentes e especialização. Além das funcionalidades

supracitadas no ambiente natural, nos últimos anos foram descritas potenciais aplicações biotecnológicas que podem ser úteis à saúde humana, servindo por exemplo, como modelos para o desenvolvimento de novos fármacos. No contexto da indústria farmacêutica, um clássico exemplo da aplicação de componentes de venenos de serpentes como fonte para o desenvolvimento de fármacos é representado pelo Captopril®, um anti-hipertensivo derivado de um peptídeo isolado do veneno da serpente *Bothrops jararaca*. A BthA-I-PLA₂ é uma fosfolipase A₂ ácida isolada do veneno de *B. jararacussu*. Caracteriza-se por ser até quatro vezes mais eficiente do ponto de vista da catálise quando comparada à sua proteoforma básica a BthTX-II Bothropstoxina-II de *B. jararacussu*, além de outras Asp49-PLA₂s do veneno de diferentes espécies botrópicas. Apesar desta característica enzimática, a BthA-I-PLA₂ é uma proteína com reduzida ação miotóxica ou letal. **Objetivo:** O presente trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar funcionalmente uma PLA₂ ácida (BthA-I-PLA₂) do veneno da serpente *B. jararacussu*. **Materiais e métodos:** O veneno de *Bothrops jararacussu* foi obtido do banco de venenos amazônicos do Laboratório de biotecnologia de proteínas e compostos bioativos LABIOPROT/FIOCRUZ-RO. A cromatografia de troca catiônica foi realizada de acordo com o método previamente descrito por Andrião-Escarso e colaboradores (2002). Aproximadamente 100 mg do veneno de *B. jararacussu* foi suspenso em 1 mL de tampão bicarbonato de amônio (NH₄HCO₃ - AMBIC) 50 mM pH 8,0 e centrifugado a 3500 xg por 5 minutos para retirada do material insolúvel. O veneno foi fracionado em uma coluna CM-Sepharose FF® (10x60 cm), cuja matriz é composta do grupo funcional de Carboximetil (OCH₂COO). A coluna foi previamente equilibrada com o mesmo tampão usado para solubilizar o veneno, bicarbonato de amônio (NH₄HCO₃ - AMBIC) 50 mM pH 8,0. A amostra eluída sob gradiente de 0 a 100% de AMBIC 500 mM pH 8,0, em 5 volumes de coluna, sob fluxo de 1 mL/min, em sistema de cromatografia Akta Purifier 10 (GE). A eluição foi monitorada em 280 nm e as frações coletadas manualmente. Depois de liofilizadas, as frações 1 e 2 (frações ácidas) obtidas da cromatografia de troca catiônica foram unidas e submetidas a um segundo passo cromatográfico – de interação hidrofóbica – em coluna n-butyl-Sepharose-HP® (1 x 15cm), cuja matriz é composta de agarose. Para tanto, as frações foram solubilizadas em tampão A (AMBIC 20 mM + NaCl 4 M), e eluídas sob um gradiente segmentado constituído por 0, 25, 50, 75 e 100% de tampão B (AMBIC 20mM) e uma última etapa utilizando apenas água. A fração 6 advinda da cromatografia de interação hidrofóbica foi

lioofilizada e solubilizada em TFA 0,1% (Solução A) e submetida a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) em coluna C18 (25 x 4.6 mm - Supelco) previamente equilibrada com a solução A e eluída sob gradiente de 0 a 70% de solução B (acetonitrila 99,9% e TFA 0,1%) em 5 volumes de coluna, sob fluxo de 1 mL/min. A eluição foi monitorada em 280nm. A eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5 % (m/v) na presença de SDS (SDS-PAGE), foi realizada em sistema descontínuo de pH, em condições redutoras com a presença do agente redutor DTT, a amostra analisada estava na concentração de [15µg/mL]. A metodologia foi previamente descrita por Laemmli, (1970). A separação eletroforética foi feita a 100 V, até que o azul de bromofenol atingisse o frente. O gel foi fixado em solução aquosa de metanol 40% (v/v) e ácido acético 7% (v/v) por 30 minutos. As bandas de proteínas foram evidenciadas através da imersão em solução contendo Coomassie Brilliant Blue G-250® 0,08 % (m/v), sulfato de alumínio 8,0 % (m/v), ácido o-fosfórico 1,6 % (m/v) e metanol 20,0 % (v/v) pelo período de 2 horas. O excesso de corantes foi retirado por imersão em solução descorante contendo etanol 4,0 % e ácido acético 7,0 % (v/v) em água. Várias trocas desta solução foram realizadas até a obtenção de gel com coloração adequada. A imagem dos géis foi obtida com uso de equipamento Image scanner® (GE Healthcare Lifesc.) e a massa molecular relativa (Mr) determinada comparando-se as distâncias relativas de migração das amostras e dos padrões de massa molecular. A atividade fosfolipásica foi realizada conforme descrito por Petrovic e colaboradores (2001), com modificações. Para o preparo do experimento, 5 mg de 4N3OBA foram diluídos em 5,4 mL de acetonitrila (ACN). Alíquotas de 0,1 mL foram secas utilizando concentrador evaporador à vácuo e mantidas a -20 °C. Cada tubo contendo a alíquota de 4N3OBA foi diluído em 1,2 mL de tampão de amostra (Tris-HCl 10 mM em pH 8,0, CaCl₂ 10 mM e NaCl 100 mM) e mantido no gelo. Para determinação da atividade fosfolipásica foi aplicado em triplicata 190 µL de reagente 4N3OBA, juntamente com 10 µg das amostras a serem avaliadas. Após a adição das amostras, a absorbância foi determinada a 425 nm utilizando um espectrofotômetro de microplacas Eon (Biotek), após 30 minutos de incubação a 37 °C. **Resultados e discussão:** O veneno de *B. jararacussu* foi submetido à cromatografia em resina de troca catiônica. Nessa etapa cromatográfica foram obtidas oito frações denominadas F1 a F8. Em seguida, um pool constituído pelas duas frações ácidas (F1 e F2) foram submetidas à cromatografia de interação hidrofóbica em coluna em coluna n-butyl-Sepharose-HP® (1 x 15cm), nesta etapa cromatográfica, foram obtidas seis frações.

Dessa maneira, observou-se a eluição de 6 frações advindas do material selecionado após a cromatografia de troca catiônica, sendo que a fração de interesse (fração 6) demonstrou uma alta interação com o grupo ligante da resina, necessitando de um ambiente aquoso com concentração salina nula. O terceiro passo cromatográfico foi a realização de uma cromatografia de fase reversa em coluna C18 (25 x 0,45 cm – Discovery), nesta etapa, apenas um pico foi obtido. A eletroforese monodimensional da amostra obtida mostrou-se com grau de pureza satisfatório e com massa molecular aparente de 15 kDa, compatível com a massa de fosfolipases A₂ encontradas em venenos de serpentes. A fração denominada BthA-I purificada com a utilização da cromatografia de fase reversa foi avaliada quanto à presença de atividade enzimática utilizando o 4N3OBA como substrato cromogênico. Os resultados obtidos mostram que a proteína isolada é enzimaticamente ativa sobre o 4N3OBA. A fosfolipase A₂ básica BthTX-II utilizada como controle positivo também apresentou atividade, porém menor que o apresentado pela molécula ácida, além disso, o veneno também se mostrou capaz de degradar o substrato sintético utilizado no experimento, pois este tem na sua composição, tanto as fosfolipases básicas, bem como as ácidas, como branco foi utilizado água. No presente estudo, a técnica utilizada para o fracionamento foi a cromatografia de troca catiônica por permitir separar os componentes ácidos do veneno, cabendo ressaltar que esta metodologia foi aplicada por Andrião-Escarso e colaboradores (2002) para a obtenção da BthA-I-PLA₂. A cromatografia de interação hidrofóbica se baseia na interação de ligantes parcialmente hidrofóbicos fixados em um suporte cromatográfico e áreas hidrofóbicas localizadas na superfície das proteínas. O uso de sais em altas concentrações induz a externalização de núcleos hidrofóbicos das proteínas, favorecendo a interação com a fase estacionária. Por meio de um decréscimo na concentração de sais durante o gradiente, os núcleos hidrofóbicos das proteínas tendem a se internalizar, reduzindo a hidrofobicidade das proteínas, culminando em sua dessorção (JACOB, 1999). Como passo seguinte, a fração obtida na cromatografia anterior, foi recromatografada em coluna de fase reversa C18. A mesma técnica foi utilizada por Andrião-Escarso e colaboradores (2002), que após esta etapa de purificação descreveram a obtenção de quatro novas frações. No presente estudo, foi obtida apenas uma fração, a distinção de resultados apresenta-se, pois no atual trabalho, resolveu-se realizar um passo cromatográfico intermediário em coluna n-butyl-Sepharose-HP® (1 x 15cm), com a realização desta cromatografia, foi possível obter uma molécula com maior índice de pureza para a

etapa seguinte, onde foi realizada a cromatografia de fase reversa em coluna C18. Em ambos os trabalhos, esta última etapa cromatográfica manteve a atividade enzimática da BthA-I-PLA₂, indicando que é uma metodologia eficaz para a purificação, e mantém as características estruturais desta enzima, preservando sua atividade catalítica, além da obtenção da molécula com alto grau de pureza (MOURA et al., 2014; STÁBELI et al., 2012). Quanto a atividade enzimática, a BthA-I apresentou maior especificidade para clivar o substrato, evidenciando que a PLA₂ ácida do veneno estudado possui alta atividade catalítica quando comparada a sua isoforma PLA₂-Asp 49 básica do mesmo veneno. Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com estudos anteriores envolvendo fosfolipases A₂ ácidas de venenos de serpentes, corroborando que as PLA₂ Asp 49 ácidas possuem maior propriedade enzimática do que suas isoformas básicas (ARIAS et al., 2017; DENEGRÍ et al., 2010; COGO et al., 2006). As pesquisas com as moléculas que compõem os venenos de serpentes podem auxiliar na elucidação de diversos processos envolvidos no envenenamento, além disso, outras aplicações para estes compostos podem surgir através dessas análises. **Conclusão:** A fosfolipase A₂ (BthA-I-PLA₂) foi isolada em elevado grau de pureza, sendo obtida após três etapas cromatográficas, apresentando massa molecular relativa de 14 kDa. O ensaio enzimático realizado sobre substrato cromogênico artificial demonstrou tratar-se de uma enzima com elevada atividade enzimática, caracterizando-se como uma SVPLA₂ Asp49. Com os resultados obtidos, bem como, nível de pureza e manutenção da atividade enzimática fica evidente que a BthA-I-PLA₂ possui potencial para ser modelo de molécula em futuras aplicações biotecnológicas, apontando que devem ser feitos novos estudos para a melhor compreensão das atividades apresentadas por esta enzima.

Agradecimentos: FAPERO, LABIOPROT, CEBio, UNIR, FIOCRUZ-RONDÔNIA
Palavras-Chave: Venenos de serpentes, SVPLA₂, proteínas, cromatografia, SDS-PAGE.

Email: Joao1470c@gmail.com