

Grande área: Ciências Biológicas/ Subárea: Bioquímica

**SEQUÊNCIA CROMATOGRÁFICA PARA PURIFICAÇÃO DE
CROTAPOTINA DE *Crotalus durissus terrificus***

GUSMÃO, Maria Elisabeth Moreira de Lima^{1,2}; MARTINS, Marcos Antônio Cabral^{2,3}; AMORIM, Juliana Aparecida Vieira^{1,2}; DE OLIVEIRA, João Victor Lopes^{1,2}; DE SOUZA, Mateus Farias²; LIMA, Anderson Maciel²; SILVA, Pricila Gomes da²; KAYANO, Anderson Makoto^{2,4}; SOARES, Andreimar Martins^{1,2}; MACEDO, Jamile Mariano^{2,5}

¹Centro Universitário São Lucas;

²LABIOPROT, FIOCRUZ Rondônia;

³UNAMA Faculdade da Amazônia de Porto Velho

⁴Centro de Pesquisa em Medicina Tropical

⁵Instituto Federal de Rondônia

Introdução: O gênero *Crotalus* abrange as serpentes conhecidas popularmente como cascavéis, no Brasil, distribuídas em seis subespécies, sendo a *Crotalus durissus terrificus* (*C.d.terrificus*) a mais popular e com relevante interesse médico. A peçonha crotálica apresenta-se como uma complexa mistura de compostos bioativos com diferentes propriedades funcionais e estruturais, que são atribuídas às ações de vários peptídeos e enzimas fosfodiesterase: L-amino oxidase, 5-nucleotidase e as seguintes neurotoxinas: convulxina, giroxina, crotoxina e crotamina. A crotoxina foi a primeira fração isolada da peçonha e estudos posteriores verificaram que esta neurotoxina é composta por duas subunidades, uma básica, a fosfolipase A2 e uma ácida, a crotapotina. A crotapotina apresenta ponto isoelétrico (pI) em torno de 3.8 e massa molecular de 9,6 KDa. Na sua forma isolada não apresenta atividade significativa para o complexo crotoxina. Sua contribuição para o efeito tóxico e enzimático do complexo é a potencialização da ação da PLA2 inibindo sua ligação à sítios de baixa afinidade e a direcionando para receptores pós-sinápticos colinérgicos ou estruturas associadas a estes. **Objetivos:** Estabelecer sequência cromatográfica para purificação da crotapotina de *Crotalus durissus terrificus*. **Material e métodos:** O *pool* da peçonha da espécie *Crotalus durissus* utilizados

no presente estudo foram obtidos no banco de venenos do LABIOPROT/FIOCRUZ-RO. A atividade de acesso ao Patrimônio Genético foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos com o número de cadastro: A45B72E. O *pool* foi inicialmente purificado em cromatografia de gel filtração, com emprego da coluna Superdex 75 10/300 GL® (GE) acoplada ao sistema de cromatografia Akta Purifier 10® (GE Lifescience Healthcare). A coluna foi previamente equilibrada com a fase móvel (Formiato de amônio 200 mM, pH 3.0). Foi injetado 10 mg do *pool* da peçonha bruta de *C.d.t.*, previamente diluído em 1 ml do volume da fase móvel, com fluxo de 0,5 mL/minuto e monitoradas a 280 nm. As frações obtidas foram levadas à microcentrífuga refrigerada com rotoevaporador, para eluição da fase móvel e após, levadas ao liofilizador. Posteriormente, foi realizada a cromatografia de fase reversa com coluna C18, de acordo com a proposta de Carvalho e colaboradores (1998). Cerca de 4 mg de cada uma das frações foram solubilizadas em TFA 0,1% (solução A) e submetidas a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) em coluna C-18 (25 mm x 4,6 mm, Supelco®), previamente equilibrada com a solução A e eluída sob gradiente 0 a 70 % de solução B (acetonitrila 99,9 % e TFA 0,1 %) em 5 volumes de coluna, sob fluxo de 1mL/min, em sistema de cromatografia Akta Purifier 10® (GE Lifescience Healthcare). A eluição foi monitorada em 280nm. As frações obtidas foram levadas à microcentrífuga refrigerada com rotoevaporador, posteriormente liofilizadas e acondicionadas a -20 °C. Posteriormente, estas frações foram recromatografadas em coluna DEAE Sepharose, (10x30cm), solubilizada em Bicarbonato de amônio (AMBIC) solução A (50 mM, pH 8,0) e solução B (500 mM, pH 8,0). Eluição monitorada a 280 nm. Foi realizada a dosagem proteica de acordo com Lowry e colaboradores, (1951). O ensaio é baseado na reação da proteína com uma solução de tartarato de cobre alcalino e reagente de Folin. O método foi adaptado para microplacas, sendo utilizados 25 µL da solução A (solução de tartarato de cobre alcalino), 200 µL da solução B (solução diluída do reagente Folin) e 5 µL da amostra, incubados a 37 °C durante 15 minutos. Posteriormente, a placa contendo as amostras foi lida em espectrofotômetro em 750 nm. A concentração final foi determinada comparando a densidade óptica da amostra com a de uma curva padrão previamente preparada utilizando albumina bovina (BSA). A etapa seguinte consistiu na Eletroforese em gel de

Poliacrilamida (SDS-PAGE) 12,5% (m/v), cujo intuito foi avaliar a pureza das frações obtidas nos sistemas cromatográficos na presença de SDS (SDS-PAGE). O procedimento foi realizado em sistema descontínuo de pH, em condições redutoras e não redutoras com a presença do agente redutor DTT e em condições nativas sem a presença de agente redutor, as amostras analisadas estavam na concentração de 15 µg/ml. O método foi previamente descrito por Laemmli, (1970). Como catalisadores da reação foram adicionados persulfato de amônio e N, N, N, N-tetrametil etilenodiamina (TEMED). A separação eletroforética ocorreu 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. Os géis foram fotografados e tiveram sua massa molecular relativa (Mr) determinada através da comparação das distâncias relativas de migração das amostras e dos padrões de massa molecular. **Resultados e discussão:** A seleção do método adequado para purificação de determinada molécula deve ser dirigida com base em características físico-químicas ou biológicas e funcionais para obtenção de resultados satisfatórios. Foi obtido o perfil cromatográfico do *pool* da peçonha através da cromatografia de exclusão ou gel filtração, contendo cinco picos principais, conforme achados na literatura, sugestivos para as frações convulxina, giroxina, crotoxina, crotamina e peptídeos, com recuperação proteica de 93%. A terceira fração, crotoxina, foi recromatografada em coluna C18 e evidenciou a separação de dois picos sobrepostos, sugestivos para as subunidades crotapotina e fosfolipase A2. Estas duas frações foram analisadas por SDS-Page e somente a banda compatível com a fosfolipase A2 foi observada, de acordo com outros trabalhos na literatura. A fração não purificada, foi submetida à cromatografia de troca iônica em coluna DEAE Sepharose® 10x30 cm e foram obtidas 5 frações (ANDRIÃOESCARSO et al., 2000). Estas frações foram submetidas à eletroforese SDS-Page e a banda da quarta fração, próximo de 10kDa, foi compatível com a massa da crotapotina

(9,8kDa). Essa sequência diverge dos trabalhos de Abrego et al. (1993), no qual a cromatografia por exclusão foi seguida de uma cromatografia em resina de troca iônica SP-Sephadex C-25, na presença de cloreto de guanidina 1M, pH 4,3. Nesse estudo, foram obtidas três frações, sendo a primeira e a terceira, crotapotina e fosfolipase A2, respectivamente. No estudo realizado por Oliveira et al. (2017), a crotapotina foi obtida por meio de cromatografia em fase reversa em coluna Luna C8 e posteriormente, reduzidas e alquiladas em coluna C18. Nos trabalhos de Rangel Santos et al. (2004) e Pimenta et al. (2019) o *pool* da peçonha foi submetido a cromatografia de troca iônica usando Mono-Q HR 5/5, em gradiente linear de NaCl (0-1 M em 50 mM Tris-HCl, pH 7,0). A cromatografia de troca iônica separa as moléculas com base nas diferenças de carga residual superficial líquida. Os grupos carregados de uma molécula, que contribuem para a carga de superfície líquida possuem diferentes valores de pKa, dependendo da sua estrutura química e microambiente. No caso das proteínas, as quais são constituídas de muitos aminoácidos diferentes que contêm grupos ácidos e básicos fracos, a sua carga líquida de superfície muda gradualmente à medida que há mudanças de pH do meio. Assim, proteínas com carga residual superficial positiva em determinado pH (abaixo de seu ponto isoelétrico), podem ser separadas com o uso de uma resina trocadora de cátions (CM-Sepharose, polímeros formados agarose com grupos carboximetil ligados). **Considerações finais:** A técnica mostra-se eficiente para separar o conteúdo ácido (eluído antes do gradiente), neutro (intergradiente) e básico (após o gradiente), sendo interessante para purificar a crotapotina da *C.d. terrificus*. Com base no exposto, observa-se que o conteúdo proteico ácido do veneno da *C.d. terrificus* foi eluído antes do gradiente de AMBIC (50 mM e pH 8,0). Nestas condições, as proteínas cujos pI são ácidos encontram-se desprotonadas, não interagindo com os grupos carboximetil da resina.

Agradecimentos: IFRO, FAPERO, LABIOPROT, CEBio, UNIR, FIOCRUZ-RONDÔNIA, CAPES/CNPq.

Palavras-Chave: *Crotalus durissus terrificus*, Crotapotina, Cromatografia, SDS-Page.

E-mail: jamile.macedo@ifro.edu.br (orientadora)

Elisabethgusmao00@gmail.com (orientanda)