

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Caracterização funcional e estrutural da
hialuronidase isolada da peçonha de serpente
*Crotalus durissus terrificus***



Karla de Castro Figueiredo Bordon

Ribeirão Preto

2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Caracterização funcional e estrutural da hialuronidase isolada da
peçonha de serpente *Crotalus durissus terrificus***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de
Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientada: Karla de Castro Figueiredo Bordon

Orientadora: Prof^a Dr^a Eliane Candiani Arantes Braga

Coorientadora: Prof^a Dr^a Maria Cristina Nonato Costa

Ribeirão Preto

2012

RESUMO

BORDON, K. C. F. **Caracterização funcional e estrutural da hialuronidase isolada da peçonha de serpente *Crotalus durissus terrificus***. 2012. 126 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Hialuronidasas são responsáveis pela hidrólise de hialuronan, o principal componente da matriz intersticial. Estas enzimas são ubíquas nas peçonhas de serpentes, contudo suas concentrações e características podem variar entre as espécies. Embora estudos indiquem a presença de atividade hialuronidásica na peçonha de *Crotalus durissus terrificus* e a hialuronidase apresente importante papel no envenenamento local e sistêmico, a enzima ainda não havia sido estudada. Os objetivos deste trabalho focaram o isolamento e a caracterização funcional e estrutural da hialuronidase (CdtHya1) presente na peçonha de serpente *Crotalus durissus terrificus*. CdtHya1 foi purificada por cromatografia de troca iônica seguida de filtração molecular e interação hidrofóbica (recuperação proteica = 0,23%), consistindo no primeiro estudo de isolamento e caracterização de uma hialuronidase crotálica. Os 44 primeiros aminoácidos do seu N-terminal foram determinados por degradação de Edman e mostraram compartilhar um elevado grau de identidade sequencial com outras hialuronidasas depositadas em bancos de dados. CdtHya1 é uma glicoproteína e apresentou atividade máxima a 37 °C, pH 5,5 e na presença de NaCl 0,2 mol/L. Seu monômero de 64,5 kDa foi estimado por SDS-PAGE sob condições redutoras. A atividade específica da peçonha solúvel foi 145 unidades turbidimétricas reduzidas por miligrama (UTR/mg), contra 5.066 UTR/mg para CdtHya1. A enzima apresentou K_{cat} de 3.781,0 min⁻¹ sobre hialuronan e em torno de 400 min⁻¹ sobre os sulfatos de condroitina A, B e C, indicando maior atividade sobre hialuronan. Cátions divalentes (Ca²⁺ e Mg²⁺) e NaCl 1 mol/L reduzem significativamente a atividade enzimática. A enzima pura (32 UTR/40 µL) diminuiu o edema provocado pela injeção subplantar de tampão, crotoxina ou fosfolipase A₂ (PLA₂), aumentando a difusão destes pelos tecidos dos camundongos. CdtHya1 potencializou a ação da crotoxina, como evidenciado pela morte de camundongos até o final do ensaio de edema de pata. A enzima nativa pura foi submetida a ensaios cristalográficos preliminares onde foram obtidos os primeiros cristais, constituindo assim um passo importante para a determinação da primeira estrutura tridimensional de hialuronidase de peçonha de serpente. Este estudo relata o procedimento de purificação da CdtHya1, a primeira hialuronidase isolada de peçonhas crotálicas com alta atividade antiedematogênica.

Palavras-chave: *Crotalus durissus terrificus*, hialuronidase, estudos cinéticos, atividade antiedematogênica, cristalografia de proteína, peçonha, fosfolipase A₂.

ABSTRACT

BORDON, K. C. F. **Functional and structural characterization of hyaluronidase isolated from *Crotalus durissus terrificus* snake venom.** 2012. 126 f. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Hyaluronidases are responsible for hyaluronan hydrolysis, the major component of the interstitial matrix. These enzymes are ubiquitous in snake venoms, however their concentrations and characteristics may vary between species. Although studies indicate the presence of hyaluronidase activity in the *Crotalus durissus terrificus* venom and hyaluronidase presents important role in local and systemic envenoming, the enzyme has not been studied yet. The objectives of this study focused on the isolation and functional and structural characterization of hyaluronidase (CdtHya1) presents in *Crotalus durissus terrificus* snake venom. CdtHya1 was purified by ion exchange chromatography followed by molecular filtration and hydrophobic interaction (protein recovery = 0.23%), consisting in the first study on the isolation and characterization of a crotalic hyaluronidase. Its first 44 N-terminal amino acids were determined by Edman degradation and showed to share a high level of sequence identity against other hyaluronidases deposited in data banks. CdtHya1 is a glycoprotein and it showed maximum activity at 37 °C, pH 5.5 and in the presence of 0.2 mol/L NaCl. Its monomer of 64.5 kDa was estimated by SDS-PAGE under reducing conditions. The soluble venom specific activity was 145 turbidity reducing units per milligram (TRU/mg), against 5,066 TRU/mg for CdtHya1. The enzyme showed K_{cat} of 3,781.0 min^{-1} on hyaluronan and about 400 min^{-1} on chondroitin sulphates A, B or C, indicating higher activity on hyaluronan. Divalent cations (Ca^{2+} and Mg^{2+}) and 1 mol/L NaCl significantly reduce the enzyme activity. The pure enzyme (32 TRU/40 μL) decreased the edema caused by subplantar injections of buffer, crotoxin or phospholipase A_2 (PLA_2), increasing their diffusion through mice tissues. CdtHya1 potentiated crotoxin action, as evidenced by mice death by the end of the paw edema assay. The pure native enzyme was subjected to preliminary crystallographic studies where the first crystals were obtained, thus providing an important step in determining the first three-dimensional structure of hyaluronidase snake venom. This study reports the purification procedure of CdtHya1, the first hyaluronidase isolated from crotalic venoms with high antiedematogenic activity.

Keywords: *Crotalus durissus terrificus*, hyaluronidase, kinetic studies, antiedematogenic activity, protein crystallography, venom, phospholipase A_2 .

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Introdução

Hialuronidases são enzimas que participam da degradação de glicosaminoglicanas, componentes fundamentais da derme (KREIL, 1995), como o hialuronan e o sulfato de condroitina. São produzidas por bactérias e fungos, estão presentes em nematoides e sanguessugas, secreções de bacteriófagos e outros vírus, tumores malignos, parasitos, crustáceos, lisossomas, esperma de mamíferos, venenos e peçonhas de animais pertencentes a diferentes famílias (STERN; CSÓKA, 2000). Estas enzimas também são encontradas em vários órgãos humanos (testículo, olho, pele, baço, fígado, rins, útero) e fluidos corporais (placenta, lágrima, sangue, esperma, urina) (STERN; JEDRZEJAS, 2006).

As hialuronidases participam de diversos processos biológicos, como fagocitose, mitose, desenvolvimento e implantação de embriões, adesão, migração, proliferação e diferenciação celular (TOOLE et al., 1984; HAKANSSON; VENGE, 1985; KNUDSON; TOOLE, 1987).

Por estarem envolvidas em inúmeros processos relativos à manutenção e integridade da matriz extracelular, têm sido aplicadas em diversas especialidades médicas (MENZEL; FARR, 1998). Estas hialuronoglicosaminidases são usadas para acelerar a difusão e absorção de fluidos (PIRRELLO; CHEN; THOMAS, 2007), promover a redução de edema (JOHNSON et al., 1999) e aumentar a eficiência de anestésicos (MARTINDALE..., 1982), entre outras aplicações.

A hialuronidase é uma enzima ubíqua nas peçonhas de serpentes (GIRISH et al., 2004), ou seja, é considerada um componente presente em todas as peçonhas ofídicas (IWANAGA; SUZUKI, 1979a), e sua atividade específica é bastante variável entre as diferentes espécies, inclusive entre aquelas pertencentes ao mesmo gênero (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2007; KUDO; TU, 2001; PUKRITTAYAKAMEE et al., 1988).

Estas enzimas não são tóxicas, mas potencializam indiretamente a toxicidade dos venenos/peçonhas (GIRISH et al., 2004; TU; HENDON, 1983) ao atuarem como "fator de espalhamento", contribuindo para o envenenamento local ou sistêmico (PUKRITTAYAKAMEE et al., 1988) por facilitar a difusão das toxinas nos tecidos e na circulação das presas/vítimas (PUKRITTAYAKAMEE et al., 1988; TU; HENDON,

1983; XU et al., 1982; YINGPRASERTCHAI; BUNYASRISAWAT; RATANABANANGKOON, 2003).

A enzima contribui para a destruição tecidual local severa em decorrência da extensa degradação de hialuronan da matriz extracelular e pode causar colapso sistêmico da vítima ao degradar o hialuronan circulante na corrente sanguínea (HARRISON et al., 2007).

Portanto, a neutralização efetiva da atividade hialuronidásica de venenos/peçonhas deve ter prioridade clínica após acidentes ofídicos, visto que há relatos de que a inibição da hialuronidase diminuiu o dano tecidual, a difusão e os efeitos letais de peçonhas ofídicas (GIRISH et al., 2004; GIRISH; KEMPARAJU, 2005, 2006; YINGPRASERTCHAI; BUNYASRISAWAT; RATANABANANGKOON, 2003).

Embora esta enzima apresente importante papel no envenenamento local e sistêmico, há poucos estudos publicados para hialuronidases de peçonhas. Diante da limitada informação com relação às hialuronidases e da importante função desta enzima para a compreensão do mecanismo de ação das peçonhas, este trabalho tem como objetivo o isolamento e a caracterização estrutural e funcional da hialuronidase presente na peçonha de serpente *Crotalus durissus terrificus*.

Os estudos sobre a hialuronidase apresentados nesta tese demonstram a importância desta enzima no envenenamento por serpentes e poderão contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas no caso de acidentes ofídicos, além de auxiliar na compreensão dos inúmeros processos fisiopatológicos nos quais a enzima está envolvida.

1.2. Revisão da Literatura

1.2.1. Serpentes peçonhentas

Há 3.395 espécies de serpentes conhecidas no mundo, das quais 441 são peçonhentas (UETZ, 2012). Serpentes peçonhentas são aquelas que produzem toxinas em glândulas especializadas e têm aparelhos apropriados para inoculá-las, causando intoxicações sérias no homem e em inúmeros outros animais (BÉRNILS,

2009; MELGAREJO, 2003). Estas serpentes são encontradas nas famílias Atractaspididae, Colubridae, Elapidae e Viperidae (WARRELL, 2012).

No Brasil são encontradas 375 espécies de serpentes, sendo que 55 são peçonhentas (BÉRNILS; COSTA, 2011). Dentre as peçonhentas, 28 espécies, distribuídas entre os gêneros *Bothrops*, *Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Bothropoides*, *Rhinocerophis*, *Crotalus* e *Lachesis*, são pertencentes à família dos viperídeos (BÉRNILS; COSTA, 2011).

A família Viperidae é responsável pela maioria dos acidentes ofídicos e pelos mais graves registrados no Brasil e, por esse motivo, é a família de serpentes que causa maior impacto na Saúde Pública (MELGAREJO, 2003). Dada à capacidade de causar acidentes graves que resultam em inúmeras sequelas, o estudo das peçonhas e serpentes é objeto de interesse entre os profissionais da área da saúde.

1.2.2. Serpentes do gênero *Crotalus*: características e distribuição geográfica

As serpentes do gênero *Crotalus* são terrestres, robustas, pouco ágeis e apresentam chocalho ou guizo no extremo caudal (CAMPBELL; LAMAR, 1989). São serpentes vivíparas, apresentando partos de ninhadas de 6 a 22 filhotes (média de 14), que ocorrem geralmente entre dezembro e fevereiro (MELGAREJO, 2003).

Depois de algumas trocas de pele, surgem anéis queratinizados formando um guizo que produz som característico de chocalho. *Crotalus*, em latim, e “cascavel”, em espanhol, significam chocalho. Acredita-se que a função do guizo esteja relacionada ao mecanismo de defesa da serpente (MUSEU INSTITUTO BUTANTAN, 2010), emitindo um som característico para afugentar possíveis predadores.

Seus habitats são regiões semi-áridas, incluindo florestas tropicais secas ou muito secas e matas de espinhos, mas também áreas abertas relativamente secas (CAMILLO, 1998). Todas as cascavéis sul-americanas são tidas como próprias de formações abertas pouco arborizadas, como formações savânicas e estépicas, contínuas e extensas ou pequenas e fragmentadas (CAMPBELL; LAMAR, 2004; WÜSTER et al., 2005a).

Seu desenho corológico¹ cobre tanto áreas naturalmente savânicas e estépicas, quanto áreas originalmente florestadas, mas atualmente transformadas em pastagens ou plantações de grande porte (BÉRNILS, 2009), proliferando-se sobre regiões ambientalmente descaracterizadas (BASTOS; ARAÚJO; SILVA, 2005; MARQUES; ABE; MARTINS, 1998; WÜSTER et al., 2005a, 2005b).

O gênero *Crotalus* está representado no Brasil por uma única espécie, a *Crotalus durissus* (*C. d.*), que tem uma ampla distribuição geográfica, desde o México até a Argentina. Habita os cerrados do Brasil central, as regiões áridas e semi-áridas do Nordeste, os campos e áreas abertas do Sul, Sudeste e Norte (MELGAREJO, 2003). De acordo com Melgarejo (2003), são encontradas cinco subespécies:

- *C. d. terrificus*: é a mais famosa; encontrada no sul oriental e meridional, desde o Rio Grande do Sul até Minas Gerais, estende-se pelo oeste, até algumas áreas abertas de Mato Grosso, Rondônia, Amazonas e Pará (campos abertos de Humaitá, Serra do Cachimbo e Santarém) (MELGAREJO, 2003; SOERENSEN, 1990); em virtude do desmatamento descontrolado, esta cascavel já é encontrada em algumas áreas alteradas, originalmente com cobertura de mata, adaptando-se bem a elas (MUSEU INSTITUTO BUTANTAN, 2010);
- *C. d. collilineatus*: distribuída nas regiões secas da zona Centro-Oeste do Brasil, desde o Distrito Federal, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais até o Norte do estado de São Paulo;
- *C. d. cascavela*: é uma serpente característica das áreas de caatinga do Nordeste do Brasil, ultrapassa 1,60 m de comprimento (MELGAREJO, 2003) e é encontrada desde o Maranhão até o Norte do estado de Minas Gerais (AUTO, 1999); em virtude do desmatamento descontrolado, já é encontrada em alguns pontos do litoral próximo a Salvador-BA (MUSEU INSTITUTO BUTANTAN, 2010).
- *C. d. ruruima*: encontrada nas savanas de Roraima e em algumas regiões do Amapá, Pará, Amazonas e Rondônia; sua peçonha apresenta peculiaridades nas atividades farmacológicas e, aparentemente, não é bem neutralizada pelos soros anticrotálicos comerciais (MELGAREJO, 2003);

¹ Corologia é a ciência que versa sobre a distribuição geográfica de comunidades nas diversas regiões do globo conforme as zonas climáticas e fatores que possibilitam a sua adaptação, principalmente fatores do meio físico (WIKIPEDIA, 2010).

- *C. d. marajoensis*: é a forma menos conhecida, sendo descrita para as áreas abertas da Ilha de Marajó, no Pará.

Alguns autores reconhecem uma sexta subespécie no território brasileiro, a *C. d. trigonicus* (AUTO, 1999; CAMILLO, 1998), encontrada em algumas regiões de Roraima e na savana de Rupununi na Guiana (RATELSLANGEN, 2010).

Segundo Bérnils (2009), não há bons mapas de distribuição das subespécies de *Crotalus durissus*, em parte porque as subespécies desse táxon estão mal definidas, mas também porque nunca foi feito um mapeamento minucioso das cascavéis sul-americanas. Além disso, em virtude do desmatamento descontrolado, as subespécies já são encontradas em algumas outras áreas, adaptando-se bem a elas (MUSEU INSTITUTO BUTANTAN, 2010).

O mapa de distribuição geográfica das subespécies de *Crotalus durissus* está representado na Figura 1.



Figura 1. Mapa de distribuição geográfica das subespécies de *Crotalus durissus* adaptado de Wüster et al. (2005a), com modificações. As áreas sombreadas em cinza indicam a distribuição da espécie *Crotalus durissus*. Legenda: **Tg**, *C. d. trigonicus*; **R**, *C. d. ruruima*; **M**, *C. d. marajoensis*; **CI**, *C. d. collilineatus*; **Cc**, *C. d. cascavella*, **T**, *C. d. terrificus*.

Por não estarem bem estabelecidas as zonas de intergradação (mutação contínua através de formas intermediárias) entre *C. d. terrificus* e outras subespécies (mormente *C. d. collilineatus*), a maioria dos autores consultados apresenta apenas mapas de distribuição para a espécie como um todo, mesmo quando, em texto, se reconhece a existência de diferentes subespécies de *Crotalus durissus* (BÉRNILS, 2009).

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

