

Perfil coagulotóxico de duas cascavéis brasileiras

Padueli, L. D.^{1,2}, Galizio, N. C.², Vidueiros, J. P.², Sant'anna, S. S.²,
Grego, K. F.², Tanaka-Azevedo, A.², Morais-Zani, K.²

¹ Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo; ²
Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan

lucaspa@usp.br e karen.zani@butantan.org.br

Objetivos

O objetivo deste estudo é analisar e caracterizar o perfil coagulotóxico dos venenos das serpentes *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) e *Crotalus durissus collilineatus* (Cdc).

Métodos e Procedimentos

Para a realização deste projeto, foram realizadas SDS-PAGE, testes de atividade enzimática, perfil de clivagem do fibrinogênio, atividade trombina-símile e HPLC.

Resultados

No teste de SDS-PAGE, foram observados, em todos os venenos, bandas de aproximadamente 125 kDa, associada à presença de lectinas C-type, 30 kDa, associada à presença de serino proteinases, 14 kDa, sendo associada com a presença de fosfolipases A₂ (PLA₂), e 10 kDa, associada a presença de crotamina, uma importante miotoxina envolvida no envenenamento por serpentes *Crotalus*. Além disso, bandas ligeiramente acima daquelas a 14 kDa foram observadas em apenas 3 serpentes (Cdc 4, 9 e 11, duas de Tocantins e uma de Goiás), estas que apresentaram tanto atividade de PLA₂ aumentada quanto picos aos 35 min em seus cromatogramas, que outros venenos não demonstraram.

Nos cromatogramas, foram observados picos a cerca de 13 min relacionados a presença de crotamina, grupos de picos a 19 min relacionados a presença de crotapotina, uma sequência ácida de crotoxina, grupos de picos a cerca de 25 min relacionados a presença da sequência básica de crotoxina (PLA₂) e grupo de picos a 40 min relacionados a presença de metaloproteases, serinoproteases e PLA₂. É importante notar que a presença do pico a 13 min (crotamina) foi observado em mais

venenos Cdc do que Cdt, 10 e 5 venenos, respectivamente, o que foi corroborado pelo teste de SDS-PAGE.

No teste de perfil de clivagem do fibrinogênio, foi observado que o veneno crotálico tende a clivar inicialmente a cadeia alfa, seguido pela cadeia beta, sem quebrar a cadeia gama.

No teste de atividade trombina-símile, foi observado que todos os venenos que apresentaram alta atividade eram do sudeste brasileiro, exceto um que é de Goiás. Um fator interessante também observado neste teste, especificamente para as serpentes Cdc, é que os venenos que apresentaram maior atividade, são provenientes de serpentes com as menores massas estudadas.

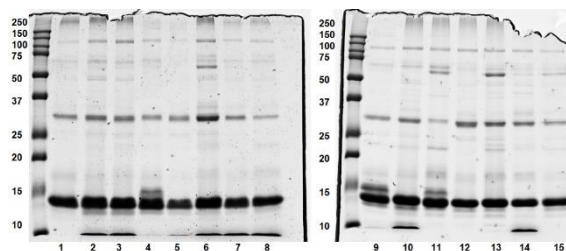


Figura 1. SDS-PAGE (15%) dos venenos Cdc sob redução com 2-mercaptoetanol. Venenos 1 a 5, 7, 8 e 12 são de serpentes machos e venenos 6, 9 a 11 e 13 a 15 são de serpentes fêmeas.

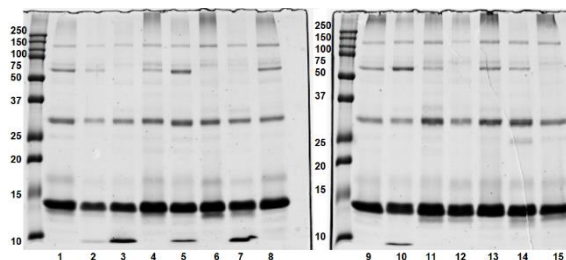


Figura 2. SDS-PAGE (15%) dos venenos Cdt sob redução com 2-mercaptoetanol. Gel a esquerda (números 1 a 8) é referente às serpentes machos e

o gel a direita (números 9 a 15) é referente às serpentes fêmeas.

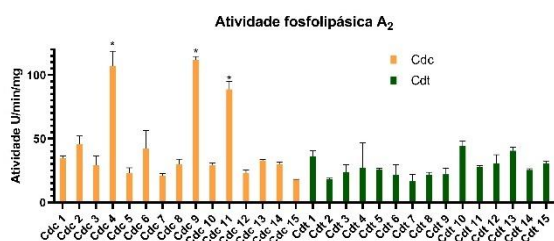


Figura 3. Gráfico da atividade fosfolipásica dos venenos de serpentes Cdc e Cdt. Os indivíduos demarcados com * (Cdc 4, Cdc 9 e Cdc 11) demonstram diferenças significativas (p -valor $<0,05$) em comparação com as demais serpentes de mesma espécie.

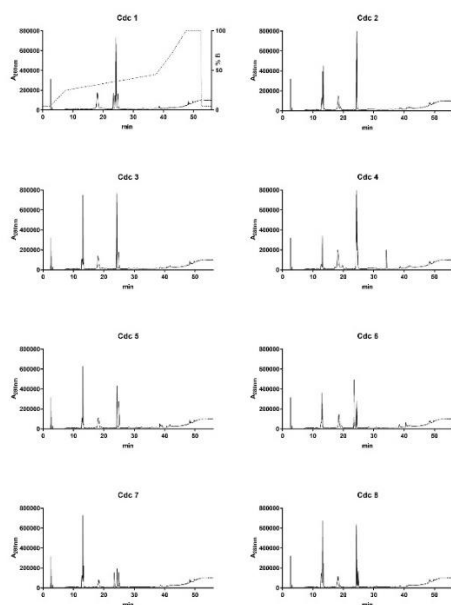


Figura 4. Gráficos de HPLC de alguns venenos das serpentes Cdc. O primeiro gráfico (Cdc 1) demonstra a variação da solução B no decorrer da corrida.

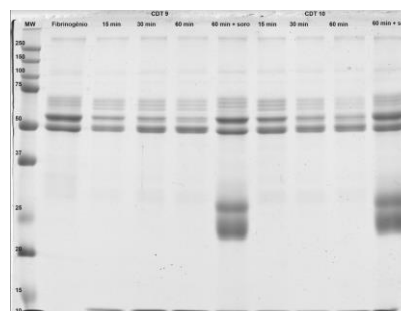


Figura 5. SDS-PAGE (12%) demonstrando o perfil de clivagem do fibrinogênio do veneno de duas serpentes Cdt. Em cerca de 60 kDa está a cadeia alfa do fibrinogênio e, abaixo dela, estão as cadeias beta e gama, respectivamente.

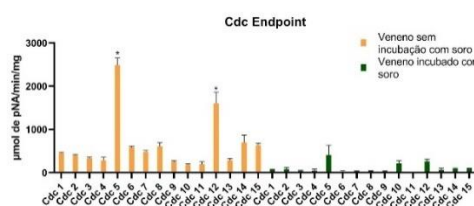


Figura 6. Gráfico de *endpoint* de atividade trombolítica do veneno das serpentes Cdc. Foi determinado que um aumento de 0.009 de absorbância equivale a liberação de 1 μ mol de pNA. Os venenos demarcados com * demonstram diferenças significativas (p -valor $<0,05$).

Conclusões

Para concluir, o estudo e a caracterização dos perfis de venenos de serpentes são extremamente importantes para a melhora de soros e para a descoberta de novas moléculas biologicamente ativas.

Referências Bibliográficas

CALVETE, J. J., SANZ, L., CID, P., de la TORRE, P., FLORES-DIAZ, M., DOS SANTOS, M. C., ... GUTIÉRREZ, J. M. (2010). Snake Venomics of the Central American Rattlesnake *Crotalus simus* and the South American *Crotalus durissus* Complex Points to Neurotoxicity as an Adaptive Paedomorphic Trend along *Crotalus* Dispersal in South America. *Journal of Proteome Research*, 9(1), 528–544; SILVA-JÚNIOR, LEANDRO NORBERTO da, et al. "Geographic variation of individual venom profile of *Crotalus durissus* snakes." *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases* 26 (2020).