

Rafael Sutti

“PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE HIALURONIDASE DA
PEÇONHA DA CARANGUEJEIRA *Vitalius dubius* (ARANEAE,
THERAPHOSIDAE)”

Campinas, 2011



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

“PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE HIALURONIDASE DA
PEÇONHA DA CARANGUEJEIRA *Vitalius dubius* (ARANEAE,
THERAPHOSIDAE)”

Rafael Sutti

Tese de Mestrado apresentada à Pós-
Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade de Campinas –
UNICAMP para obtenção de título de
Mestre em Farmacologia, sob orientação
do Prof. Dr. Stephen Hyslop

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

Su86p Sutti, Rafael, 1983 -
Purificação e caracterização de hialuronidase da
peçonha da caranguejeira *Vitalius dubius* (Araneae,
Theraphosidae) / **Rafael Sutti**. -- Campinas, SP: [s.n.],
2011.

Orientador: Stephen Hyslop
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Enzimas. 2. Proteína. 3. Purificação. 4.
Aranha. I. Hyslop, Stephen. II. Universidade Estadual
de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III.
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Purification and characterization of hyaluronidase from venom of the
brazilian spider *Vitalius dubius* (Aranease, Theraphosidae)

Palavras-chave em inglês:

Enzymes

Protein

Purification

Spider

Titulação: Mestre em Farmacologia

Banca examinadora:

Stephen Hyslop [Orientador]

Sisi Marcondes Paschoal

Marcos Hikari Toyama

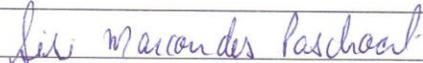
Data da defesa: 15-07-2011

Programa de Pós-Graduação: Faculdade de Ciências Médicas

Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado

Rafael Sutti

Orientadora(a): Prof(a). Dr(a). Stephen Hyslop

Membros:	
Professor (a) Doutor (a) Stephen Hyslop	
Professor (a) Doutor (a) Sisi Marcondes Paschoal	
Professor (a) Doutor (a) Marcos Hikari Toyama	

Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 15/07/2011

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais e irmãos, pois sempre me deram apoio e forças para eu sempre continuar seguindo em frente.

Ao meu avô Anésio Copette (in memorian), cujo maior sonho era o de ver um neto estudar na Unicamp.

Ao meu médico neurologista Dr. Sebastião Duarte por ter feito um verdadeiro milagre ao me operar, quando estive a beira da morte.

Dedico também aos meus amigos que sempre me apoiaram e me auxiliaram em todos os momentos de necessidade.

Ao meu grande amigo o Prof. Dr. Thomaz Augusto Alves Rocha e Silva, por ter me dado uma oportunidade de trabalhar com ele, ter acreditado em mim, me ensinado muito e por sempre me forçar a querer aprender mais.

AGRADECIMENTOS

*A Deus por sua infinita bondade e sabedoria, e por ter me dado uma
segunda chance à vida.*

*Aos meus pais por sempre colocar minha educação e formação em
primeiro plano*

*Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop por ter me aceitado em seu laboratório e
pela grande orientação que exerceu e por contribuído para minha
formação*

*Aos meus amigos André Lisboa Rennó, Igor Rapp Ferreira da Silva,
Delano Anibal da Silva, Mariana Leite Tamascia e Raquel Lorenzetti,
pela amizade companheirismo e força, ao técnico José Ilton dos
Santos por toda a ajuda e todos os ensinamentos, todos meus amigos
do laboratório de Farmacologia Bioquímica e de todo departamento,
aos amigos do Centro de Controle de Intoxicações do Hospital das
Clínicas da Unicamp*

*Ao Prof. Dr. Thomaz Augusto Alves Rocha e Silva, pela amizade,
pelos ensinamentos e pela confiança em mim depositada.*

*E ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
(CNPq) pelo apoio financeiro.*

EPÍGRAFE

“Ninguém pode voltar e criar um novo início, mas todo mundo pode começar hoje e criar um novo final.”

Chico Xavier

SUMÁRIO

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	xiv
LISTA DE FIGURAS.....	xvi
LISTA DE TABELAS.....	xviii
RESUMO	xx
ABSTRACT.....	xxii
1 – INTRODUÇÃO.....	24
1.1 – Família Theraphosidae.....	26
1.2 – A peçonha de caranguejeiras.....	29
1.2.1 – Atividades biológicas.....	29
1.2.2 – Composição.....	30
2 – OBJETIVOS.....	35
3 – MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 – Reagentes.....	38
3.2 – Animais.....	39
3.2.1 – Aranhas.....	39
3.2.2 – Ratos.....	39
3.3 – Obtenção da peçonha.....	39
3.4 – Purificação da enzima.....	40
3.4.1 – Gel filtração em Superdex 75.....	40
3.4.2 – Cromatografia por afinidade em heparina-Sepharose.....	41
3.4.3 – Cromatografia líquida de alta performance com coluna de fase reversa (RP-HPLC).....	41
3.5 – Determinação protéica.....	42
3.6 – Dessalinização.....	42
3.7 – Análise eletroforética.....	42
3.7.1 – Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).....	42

3.7.2 – Zimografia.....	43
3.8 – Atividade enzimática.....	44
3.8.1 – Ensaio enzimático.....	44
3.8.2 – Especificidade de substratos.....	45
3.8.3 – Determinação de V_{max} e K_m	45
3.8.4 – Determinação do pH ótimo.....	46
3.8.5 – Estabilidade térmica e temperatura ótima.....	46
3.8.6 – Inibição da atividade enzimática por flavonoides.....	47
3.9 – Análises imunológicas.....	47
3.9.1 – Neutralização da Hyase por antissoros.....	47
3.9.2 – ELISA.....	48
3.10 – Atividade biológica.....	48
3.10.1 – Permeabilidade vascular.....	48
3.11 – Análise estatística.....	49
4 – RESULTADOS.....	50
4.1 – Atividade hialuronidásica.....	51
4.2 – Purificação da Hyase.....	51
4.3 – Caracterização enzimática.....	55
4.4 – Atividade sobre substratos e inibição por flavonóides.....	59
4.5 – Análises imunológicas.....	60
4.6 – Atividade biológica.....	63
5 – DISCUSSÃO.....	64
6 – CONCLUSÕES.....	74
7 – REFERÊNCIAS.....	76
ANEXO.....	86

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

SIGLAS E ABREVIATURAS

ACN	- acetonitrila
ANOVA	- análise de variância
DMAB	- <i>p</i> -dimetilaminobenzaldeído
EDTA	- ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	- ensaio imunoenzimático (<i>e</i> nzyme- <i>l</i> inked <i>i</i> mmuno <u>s</u> orbent <u>a</u> ssay)
EPM	- erro padrão da média
HPLC	- cromatografia líquida de alta performance
Hyase	- hialuronidase
K_m	- constante de Michaelis-Mentem
PTH	- feniltioidantina
RP-HPLC	- cromatografia líquida de alta performance em fase-reversa
SDS-PAGE	- eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
Stains-all	- brometo de (1-etil-2[3-(1-etilnaftol[1,2-d]tiazolin-2-ilideno)-2-metilpropenil]naftol[1,2-d]) tiazólio
TEMED	- N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
TFA	- ácido trifluoracético
TRU	- unidade redutora de turbidez (<i>t</i> urbidity <i>r</i> educing <u>u</u> nit)
V_{max}	- velocidade máxima

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS

FIGURA 1 – Organização das quelíceras da ordem Araneae.....	25
FIGURA 2 – Distribuição geográfica da espécie <i>Vitalius dubius</i>	28
FIGURA 3 – Diagrama da ação da Hyase no ácido hialurônico.....	32
FIGURA 4 – Atividade hialuronidásica das peçonhas de <i>V. dubius</i> e <i>P. nigriventer</i>	51
FIGURA 5 – Perfil de eluição da peçonha de <i>V. dubius</i> após gel filtração em Superdex 75.....	52
FIGURA 6 – Perfil de eluição do pico com atividade hialuronidásica (de gel filtração) após cromatografia em coluna de heparina-Sepharose.....	53
FIGURA 7 – Perfil de eluição após RP-HPLC em coluna C18 evidenciando o pico correspondendo à enzima purificada.....	54
FIGURA 8 – SDS-PAGE da peçonha de <i>V. dubius</i> e da Hyase obtida na cromatografia por afinidade em heparina-Sepharose.....	56
FIGURA 9 – Propriedades físico-químicas da Hyase.....	57
FIGURA 10 – Estabilidade da Hyase purificada a ciclos de congelamento (-20°C) e descongelamento.....	58
FIGURA 11 – Gráficos de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk para determinação do V_{max} e K_m da Hyase usando ácido hialurônico como substrato.....	59
FIGURA 12 – Atividade enzimática da peçonha de <i>V. dubius</i> e da Hyase purificada sobre ácido hialurônico e sulfato de condroitina A.....	60
FIGURA 13 – Inibição da atividade enzimática da Hyase por flavonóides.....	61
FIGURA 14 – Neutralização da Hyase por soro anti-aracnídico e reatividade da peçonha de <i>V. dubius</i> e da Hyase no ELISA.....	62
FIGURA 15 – Aumento na permeabilidade vascular causada pela peçonha e Hyase de <i>V. dubius</i> em pele dorsal de rato	63
FIGURA 16 – Estrutura química dos flavonóides testados.....	70

LISTA DE TABELAS

TABELAS

Tabela 1 – Purificação da Hyase da peçonha de <i>V. dubius</i>	55
Tabela 2 – Comparação de algumas propriedades físico-química de Hyases purificadas de peçonhas animais.....	67

RESUMO

RESUMO

A hialuronidase (Hyase) de peçonha contribui para a difusão da peçonha do local da inoculação. Neste trabalho, foi purificada e caracterizada a Hyase da peçonha da *Vitalius dubius* (Araneae, Theraphosidae), uma aranha caranguejeira encontrada no sudeste do Brasil. A peçonha obtida por estimulação elétrica de machos e fêmeas adultas foi fracionada por cromatografia em gel filtração em uma coluna Superdex 75 (tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 6, contendo 0,15 M de NaCl), a um fluxo de 1 ml/min. O perfil de eluição foi monitorado a 280 nm e frações de 1,5 ml foram coletadas e analisadas para Hyase. As frações ativas foram reunidas e aplicadas em uma coluna de afinidade heparin-Sepharose (em acetato de sódio 0,01 M, pH 6). A coluna foi lavada com o mesmo tampão e as proteínas foram eluídas com um gradiente linear de NaCl (0-1 M). As frações ativas foram agrupadas e avaliadas quanto à pureza por SDS-PAGE e RP-HPLC. O pH ótimo, a estabilidade térmica, a presença das isoformas, e a neutralização por flavonóides e antivenenos comerciais também foram avaliadas. A Hyase foi purificada em duas etapas cromatográficas, com atividade específica de 148 unidades de redução de turbidez (TRU)/mg (peçonha: 36 TRU/mg; fator de purificação de ~ 4). A Hyase apresentou uma massa molecular estimada em 43 kDa por SDS-PAGE, que não foi afetada por β -mercaptoetanol. Zimografia em gel contendo ácido hialurônico confirmou atividade sobre o substrato. O pH ótimo foi de 4 a 5, com atividade ótima à 37°C. A Hyase manteve estabilidade até 60°C, mas perdeu rapidamente a atividade em altas temperaturas; a atividade se manteve após vários ciclos de congelamento e descongelamento. A atividade enzimática foi totalmente inibida por dois (apigenina e naringina) dos cinco flavonóides testados. A concentração de NaCl (0,05-1 M) não influenciou a atividade. A enzima apresentou maior atividade com ácido hialurônico em relação ao sulfato de condroitina A e foi totalmente neutralizada pelo antiveneno aracnídeo polivalente contra peçonha de aranha-marrom (*Loxosceles* sp.), aranha armadeira (*Phoneutria nigriventer*) e escorpião amarelo (*Tityus serrulatus*), mas não por antivenenos contra peçonha de lagarta (*Lonomia obliqua*), escorpião (*T. serrulatus* e *Tityus bahiensis*) ou serpente (*Bothrops*, *Crotalus* e *Micrurus*). A Hyase aumentou a permeabilidade vascular na pele dorsal de ratos. As propriedades bioquímicas da Hyase foram semelhantes às Hyases encontradas em outras peçonhas. A neutralização pelo antiveneno aracnídeo (mas não pelo escorpiônico) indicou que esta enzima compartilha epítomos antigênicos com enzimas semelhantes em peçonhas de outras aranhas.

ABSTRACT

ABSTRACT

Venom hyaluronidase (Hyase) contributes to the diffusion of venom from the site of inoculation. In this work, we purified and characterized Hyase from the venom of *Vitalius dubius* (Araneae, Theraphosidae), a large theraphosid found in southeastern Brazil. Venom obtained by electrical stimulation of adult male and female *V. dubius* was initially fractionated by gel filtration on Superdex 75 (in 0.1 M sodium acetate, pH 6, containing 0.15 M NaCl), at a flow rate of 1 ml/min. The elution profile was monitored at 280 nm and 1 ml fractions were collected and assayed for Hyase. Active fractions were pooled and applied to an affinity column of heparin-Sepharose (in 0.01 M sodium acetate, pH 6). The column was washed with the same buffer and proteins were eluted with a linear gradient of NaCl (0-1 M). Active fractions were pooled and assessed for purity by SDS-PAGE and RP-HPLC. The pH optimum, heat stability, presence of isoforms and neutralization by flavonoids and commercial antivenoms were also assessed. Hyase was purified in two chromatographic steps with a specific activity of 148 turbidity reducing units (TRU)/mg (venom: 36 TRU/mg; purification factor of ~4). Hyase had a molecular mass of 43 kDa by SDS-PAGE that was unaffected by β -mercaptoethanol. Zymography in gels containing hyaluronic acid indicated that there were no isoforms. The pH optimum was 4-5, with optimal activity at 37°C. Hyase was stable up to 60°C, but rapidly lost activity at higher temperatures and maintained activity after several freeze-thaw cycles. Enzyme activity was completely inhibited by two (apigenin and naringin) of five flavonoids tested. The NaCl concentration (0.05-1 M) did not influence activity. Hyase had greater activity towards hyaluronic acid compared to chondroitin sulphate and was completely neutralized by polyvalent arachnid antivenom raised against brown spider (*Loxosceles* spp.), banana spider (*Phoneutria nigriventer*) and yellow scorpion (*Tityus serrulatus*) venoms, but not by antivenoms to caterpillar (*Lonomia obliqua*), scorpion (*T. serrulatus* and *Tityus bahiensis*) or snake (*Bothrops*, *Crotalus* and *Micrurus* species) venoms. Hyase increased vascular permeability in rat dorsal skin. The biochemical properties of this Hyase were similar to other venom Hyases. The neutralization by arachnid but not scorpion antivenom indicated that this enzyme shared antigenic epitopes with similar enzymes in other spider venoms.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Atualmente são descritas aproximadamente 42.055 espécies de aranhas, em 110 famílias e 3.821 gêneros distribuídos por todos os continentes (1). A ordem Araneae é dividida em três táxons: Mesothelae, Mygalomorphae (Orthognatha) e Araneomorphae. A maioria das aranhas, incluindo as mais derivadas, é araneomorfa, com agulhões labdognatos que se movem no plano transversal, opostos um ao outro, enquanto as Mygalomorphae têm quelíceras ortognatas nas quais os agulhões se movem no plano longitudinal (e não podem mover-se transversalmente para se oporem um ao outro) (Fig. 1). As aranhas Mesothelinae são as mais primitivas de todas e têm, além de quelíceras ortognatas, um abdome segmentado (2).

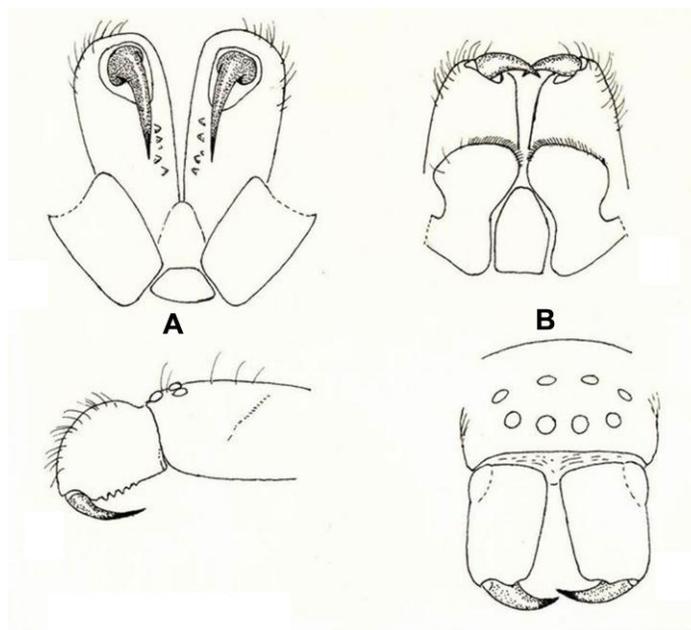


Figura 1: Organização das quelíceras da ordem Araneae. **(A)** Mygalomorphae – com quelíceras ortognatas (movimento no plano longitudinal). **(B)** Araneomorphae – com quelíceras labdognatas (movimento no plano transversal). (Fonte http://personales.ciudad.com.ar/grismado_macn/GENERALIDADES.htm.)

1.1 Família Theraphosidae

A família Theraphosidae (aranhas caranguejeiras em português e *tarantulas* em inglês) é uma grande família de aranhas com 116 gêneros e 920 espécies, compreendendo mais de um terço das espécies de Mygalomorphae (3). Cerca de 30 gêneros desta família são presentes no Brasil e outros países da América do Sul (1). As caranguejeiras são encontradas em ambientes quentes e úmidos, vivem em troncos de árvores podres, junto a raízes, em buracos naturais ou cupinzeiros, revestindo sua toca e arredores com seda (3). As fêmeas podem viver por 20 anos ou mais, já os machos raramente vivem mais do que 12 anos. As caranguejeiras possuem hábitos noturnos, como a grande maioria das aranhas, período em que realizam sua caça. Com uma visão pobre, as caranguejeiras detectam suas presas por vibrações provocadas pelas próprias presas ao andarem sobre o substrato ao redor das tocas, que são revestidas por seda (4).

A biologia e a ecologia das aranhas Theraphosidae são conhecidas em poucas espécies (5). A subfamília Aviculariinae inclui cinco gêneros: *Ephebopus* Simon, *Avicularia* Lamarck, *Pachistopelma* Pocock, *Iridopelma* Pocock e *Tapinauchenius* Ausserer. Com a exceção das espécies do gênero *Ephebopus*, essas aranhas são essencialmente arbóreas. O gênero *Pachistopelma* inclui somente duas espécies: *P. rufonigrum* Pocock, do Brasil e *P. concolor* Caporiacco, restrita a Guiana. Essas espécies representam uma exceção dentro da Aviculariinae, pois são as únicas espécies que habitam bromélias durante todo ciclo reprodutivo. O tanque das bromélias oferece proteção devido ao seu arranjo foliar característico, e também oferecem proteção contra predadores (5).

Costa e Perez-Miles (6) descreveram a biologia reprodutiva de sete aranhas da família Theraphosidae do Uruguai, incluindo a *Oligoxystre argentinense* (Ischonocolinae) e a *Acanthoscurria suína*, *Euphalaestrus weijenberghi*, *Grammostola iheringi*, *Grammostola mollicoma*, *Homoeomma uruguayens* e *Plesiopelma longisternale* (sub-família Theraphosinae). Os períodos de atividade sexual destas espécies foram estimados através da ocorrência de fêmeas e machos adultos. A corte e o descanso foram descritos de observações em campo e em laboratório. Dois ciclos completos, incluindo a muda das fêmeas, copulação, e construção da bolsa ovos e nascimento dos filhotes, foram relatados primeiro em *Euphalaestrus weijenberghi* e *Oligoxystre argentinense*. O tempo de vida foi estimado para várias destas espécies, sendo que a *G. iheringi* pode chegar a 30 anos (6).

A variação intra-específica na história de vida e estágios de acasalamento pode levar a diferenças na alocação e gastos de energia em machos e fêmeas. Shillington (7) investigou o efeito da massa corpórea, temperatura, e sexo no metabolismo basal em machos e fêmeas maduros da aranha caranguejeira *Aphonopelma anax*, uma espécie que exibe diferenças intersexuais na história de vida depois de atingir a maturidade sexual. Nestas espécies, o metabolismo basal aumenta com o aumento da temperatura e da massa corpórea, sendo que os machos possuem um metabolismo basal substancialmente maior do que as fêmeas em cada temperatura. Esse metabolismo alto pode representar uma estratégia adaptativa para suportar altas demandas energéticas para o macho durante a atividade locomotora em busca da fêmea na época de acasalamento (7).

De acordo com Platnick (1), o gênero *Vitalius* (Theraphosinae) é constituído de nove espécies encontradas no Brasil. A caranguejeira da espécie *Vitalius dubius*, descrita por Mello-Leitão em 1923, é caracterizada por não ser muito agressiva, e é encontrada nos Estados de São Paulo (regiões de Itu, Campinas e Espírito Santo do Pinhal) e sul de Minas Gerais (região de Poços de Caldas) (3) (Fig. 2).

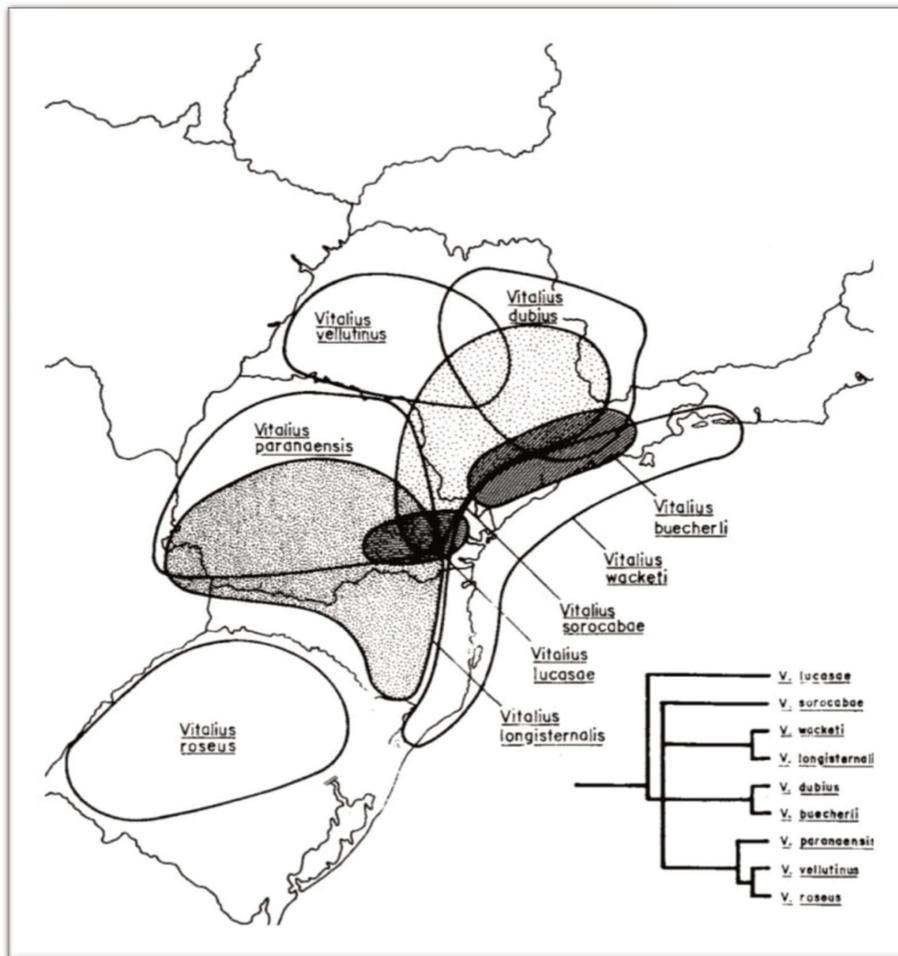


Figura 2: Distribuição geográfica da espécie *Vitalius dubius*. Fonte: (3).

1.2 A peçonha de caranguejeiras

1.2.1 Atividades biológicas

Diversas atividades biológicas têm sido relatadas nas peçonhas de caranguejeiras, tais como *Heteroscodra*, *Stromatopelma* e *Poecilotheria* (8,9). Em relação às espécies brasileiras, Fontana *et al.* (10) relataram que a peçonha da aranha *Theraphosa leblondi* produz bloqueio neuromuscular parcialmente reversível em preparações nervo frênico-diafragma de rato, talvez através da ação de toxinas que interagem com os receptores nicotínicos da acetilcolina ou de toxinas que inibem os canais de cálcio dependentes de voltagem. Posteriormente, Kalapothakis *et al.* (11) mostraram que a peçonha da aranha *Lasiadora* sp. exerce ação cardiotoxica (causando bradicardia e arritmias) no coração isolado de rato e excitotóxica em células excitáveis, possivelmente através do bloqueio de canais de sódio dependentes de voltagem. Estudos recentes usando espectrometria de massas para estudar as peçonhas de *Lasiadora parahybana* (12) e *T. leblondi* (13) revelaram a presença de diversas toxinas ativas sobre canais iônicos, bem como variações na produção de toxinas ao longo da glândula venenífera (13) e entre aranhas jovens e adultas (12).

Além das atividades sobre tecidos e células de mamíferos, as peçonhas de caranguejeiras também possuem ações inseticidas. Friedel e Nentwig (14) observaram que a peçonha de *Brachypelma albopilosum*, bem como as de outras espécies de aranha (*Atrax robustus*, *Cupiennius salei*, *Selenops mexicanus*, *Tegenaria atrica*, *Argiope bruennichi*), produziu paralisia em baratas (*Blatta orientalis*) e besouros (*Tenebrio molitor*). Já Balaji *et al.* (15) identificaram a covalitoxina-II (massa molecular: ~3.400 Daltons) da peçonha de *Coremiocnemis*

validus, com toxicidade específica para grilos mas inativa em baratas. Recentemente, foram purificados da peçonha das caranguejeiras *Selenocosmia huwena* e *Selenocosmia hainana* dois peptídeos neurotóxicos que atuam em canais de sódio de insetos (16). Foi também isolado da peçonha de *Chilobrachys jingzhao*, uma caranguejeira chinesa, um peptídeo que possui atividade neurotóxica sobre canais de sódio e potássio em camundongos (17).

Milescu *et al.* (18) sugeriram que algumas toxinas de caranguejeiras podem atuar em canais dependentes de voltagem, bloqueando-os de maneira indireta, através de mudanças na interação entre o canal iônico e os fosfolipídios que envolvem o canal.

1.2.2 Composição

As peçonhas de caranguejeiras são compostas de misturas complexas de componentes de baixa massa molecular, peptídeos biologicamente ativos e proteínas (8,9,19-21). Em relação aos componentes de baixa massa molecular, estas peçonhas contêm uma variedade de aminas, aminoácidos livres, nucleosídeos e nucleotídeos, além de diversos íons (cálcio, cloreto magnésio, potássio, sódio, etc.) (22-24). Utilizando-se uma abordagem genômica foram também identificadas na peçonha da caranguejeira *Haplopelma hainanum* 192 sequências maduras de peptídeos (25). Já na peçonha da caranguejeira *Haplopelma lividum* foram identificados ácido glutâmico, histamina, adenosina e uma poliamina, a espermina (26).

Entre os peptídeos presentes nestas peçonhas, já foram descritos pelo menos 33 tipos diferentes que atuam em canais iônicos de cálcio, potássio e sódio

(16,27), modulando a atividade elétrica de tecidos excitáveis, como é o caso de um peptídeo presente na peçonha da aranha caranguejeira *Grammostola spatulata*, que inibe a fibrilação atrial (28). Dentre as atividades enzimáticas, as mais comumente encontradas são a colagenase e a hialuronidase (Hyase), duas enzimas envolvidas na degradação da matriz extracelular que facilitam a difusão da peçonha do local de inoculação (13,29).

A Hyase tem sido detectada na peçonha de diversos animais (30-34), como aranhas (35-37), escorpiões (29,38,39), himenópteros (abelhas, formigas e vespas) (33,40,41), peixes (42), serpentes (43-51), e uma espécie de lagarto (52). Essa enzima serve como fator de dispersão por degradar o ácido hialurônico e facilitar a difusão de outros componentes da peçonha (53-58).

Além de estar presente nas peçonhas dos animais e nos espermatozóides de mamíferos, a Hyase é produzida também por vários microorganismos patogênicos como estreptococos A e C, pneumococos, estafilococos e clostridium, e também é abundante em tecidos malignos (cânceres) (59).

As Hyases constituem um grupo de enzimas que pertence às glicosidases (grupo 3.2.1 na classificação da União Internacional de Bioquímica) (60) e são representadas por duas enzimas principais: a hialuronato 4-glicanohidrolase (EC 3.2.1.35, hialuronoglucosamidase) e a hialuronato 3-glicanohidrolase (EC 3.2.1.36, hialuronoglucoronidase). A forma presente nos espermatozóides de mamíferos, nos lisossomos e nas peçonhas animais é a EC 3.2.1.35 (58). Essa enzima degrada o ácido hialurônico em tetrassacarídeos contendo ácido glucorônico, *N*-acetilglucosamina, ácido glucorônico e *N*-acetilglucosamina como produto principal, e também atua no sulfato de condroitina (58). Essa reação ocorre

através da hidrólise das ligações 1-4 entre a N-acetil-β-D-glucosamina e os resíduos de D-glucuronato no ácido hialurônico (60), como mostra a Figura 3.

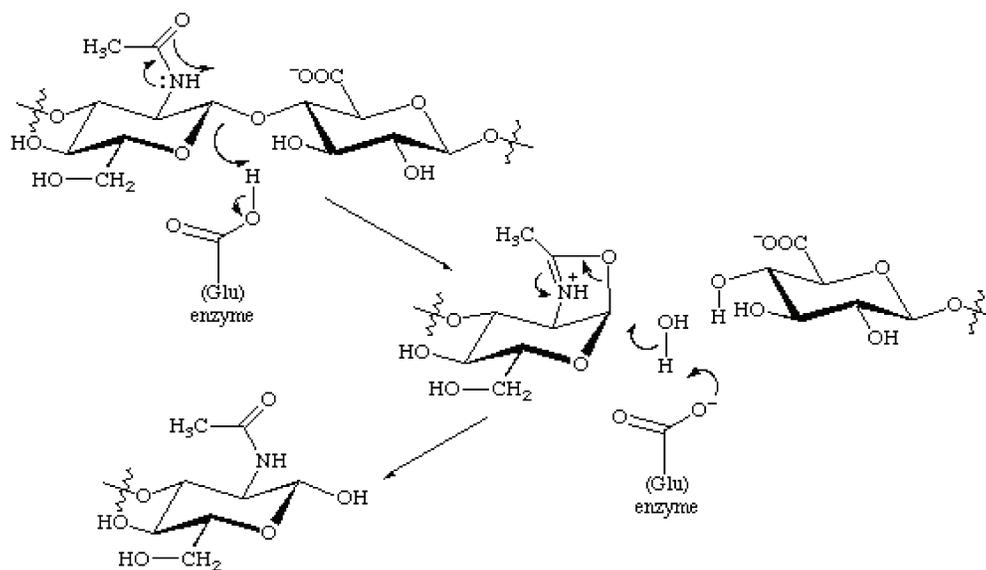


Figura 3: Diagrama da ação da Hyase no ácido hialurônico.
(Fonte: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/2/1/35.html>)

A estrutura molecular é uma estrutura próxima à formação clássica $(\alpha/\beta)_8$, que pode formar agregados de até 268 aminoácidos. Sua catálise é do tipo ácido-base onde Glu¹¹³ (conservado) atua como doador de prótons e o grupo N-acetil do substrato o receptor. Todas as Hyases possuem quatro resíduos conservados de cisteína que formam duas pontes de sulfeto, as Hyases nativas formam proteínas de estrutura terciária de 380 resíduos de aminoácidos. No caso da Hyase de peçonha de abelhas, a Cys¹⁸⁹-Cys²⁰¹ estabiliza a base de um grande grupo C-terminal, enquanto a Cys²²-Cys³¹³ unem dois elementos estruturando duas hélices N-terminal e C-terminal (61).

Kaiser (62,63) foi o primeiro a relatar a atividade hialuronidásica na peçonha das aranhas brasileiras *Lycosa raptorial* e *Phoneutria nigriventer*, e recentemente, detectamos a Hyase na peçonha da caranguejeira brasileira *V. dubius* (64). Atualmente, esta atividade é conhecida na peçonha de diversas outras aranhas como, *Cupiennius salei* (65), *Lycosa godeffroy*, *Lympoona cylindrata/murina* (8), *Loxosceles reclusa* (37), *Loxosceles rufescens* (66), *Loxosceles deserta*, *Loxosceles gaucho*, *Loxosceles laeta*, *Loxosceles reclusa* (67), e *Loxosceles intermedia* (35). Schanbacher *et al.* (68) purificaram e caracterizaram a Hyase da caranguejeira *Dugesiella hentzi* e a identificaram como o principal constituinte da peçonha desta espécie. A Hyase também tem sido isolada e caracterizada na peçonha de escorpiões (29,38,39).

Além de ser um fator de dispersão de toxinas, a Hyase atua também como alérgeno, como é o caso da Hyase presente na peçonha de himenópteros, onde a Hyase, a fosfolipase A₂ e a melitina foram identificadas como sendo os três principais causadores de reações alérgicas na peçonha de abelhas, enquanto a Hyase, fosfolipase A₁, e antígeno 5 são os principais alérgenos na peçonha de vespas, mostrando assim a importância clínica da Hyase (69,70).

Embora as caranguejeiras sejam causadoras de poucos acidentes em humanos (71-73), as peçonhas destas aranhas representam rica fonte de moléculas bioativas de interesse científico e com potencial aplicação na pesquisa básica e na terapêutica (9,22-24,74). Estudos recentes no nosso laboratório indicam que a peçonha de *V. dubius* possui uma composição bioquímica e farmacológica complexa, com a presença de diversas atividades biológicas (64).

Entretanto, não há dados sobre a purificação e caracterização da Hyase da peçonha desta espécie.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Com base nas considerações acima, este trabalho teve como objetivo purificar e caracterizar bioquímica e imunologicamente a Hyase presente na peçonha da aranha *V. dubius* (Theraphosidae), e avaliar sua atividade na permeabilidade vascular.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

N-Acetilglucosamina, ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA, sal sódico), ácido hialurônico (cordão umbilical humano), acrilamida, albumina bovina, azul de bromofenol, azul brilhante de Coomassie R250, brometo de (1-etil-2[3-(1-etilnaftol[1,2-d]tiazolin-2-ilideno)-2-metilpropenil]naftol[1,2-d]) tiazólio (“Stains-all”), brometo de hexadeciltrimetilamônio, *p*-dimetilaminobenzaldeído (DMAB), os flavonóides (apigenina, catequina, quercetina e naringina), β -mercaptoetanol, N,N'-metileno-bis-acrilamida, persulfato de amônio, N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina (TEMED), Tris base e Triton X-100, hialuronidase (testículo bovino), sulfato de condroitina A e uretana foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). A heparina foi adquirida do Laboratório Cristália (Itapira, SP), marcadores de massa molecular para SDS-PAGE foram adquiridos da BioRad (Hercules, CA, EUA). As resinas para cromatografia em coluna foram compradas da GE Lifesciences (Uppsala, Suécia). A coluna usada em HPLC foi uma C18 modelo Jupiter (4,6 mm x 250 mm x 12 μ m) adquirida da Phenomenex (Torrance, CA, EUA). Albumina humana marcada com 125 I foi fornecida pelo IPEN (São Paulo, SP). Os demais reagentes (de grau p.a.) foram obtidos de fornecedores locais. As placas de 96 poços para ELISA foram adquiridas da Corning (Corning, MA, EUA).

Os soros anti-aracnídico, anti-botrópico, anti-crotálico, anti-elapídico, anti-escorpiônico e anti-lonômico produzidos pelo Instituto Butantan (São Paulo, SP) foram fornecidos pelo Centro de Controle de Intoxicações (CCI) do HC-Unicamp.

3.2 Animais

3.2.1 Aranhas

Os espécimes de *V. dubius* foram fornecidos pelos Centros de Controle de Zoonoses das cidades da região de Campinas, e foram mantidas em terrários em uma sala com ciclo de luz de 12 h à temperatura ambiente (~23°C). As aranhas tiveram acesso livre à água e foram alimentadas com baratas semanalmente. A sexagem das aranhas foi feita através da identificação das mudas, onde é observada a presença da espermateca nas fêmeas e ausência da mesma nos machos, ou ainda puderam ser identificadas antes das mudas, pelo tamanho da aranha e pela presença do palpo copulatório (3).

3.2.2 Ratos

Os ratos machos Wistar (200-250 g) foram obtidos do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP, e foram alojados em gaiolas a 23°C com ciclo de luz de 12 h e acesso livre à água e ração. Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEUA/UNICAMP, protocolo nº 2167-1), e foram realizados de acordo com as recomendações éticas da Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL).

3.3 Obtenção da peçonha

A peçonha das aranhas machos e fêmeas foi obtida por extração manual (64). Para isso, as aranhas foram anestesiadas com CO₂ para evitar dano durante a manipulação. Em seguida, foram imobilizadas pelo cefalotórax numa tábua de

madeira para facilitar o encaixe das presas dentro de um tubo Eppendorf de polipropileno (0,5 ml) para a coleta da peçonha; este procedimento também evitou contaminação da peçonha com saliva e suco gástrico. O estímulo elétrico foi aplicado usando fios de cobre (com pontas arredondas para não machucar o animal). Os fios foram posicionados (encostados) no espaço entre as quelíceras e o cefalotórax, região onde a camada de quitina é mais fina, para facilitar o fluxo de corrente. Em seguida, foram aplicados estímulos elétricos (5-15 V, 10 segundos) com estimulador elétrico convencional (dois estímulos por extração, com intervalo de 30 segundos entre eles). A peçonha obtida foi centrifugada (3000g, 15 min, 4°C) para remover material particulado/insolúvel, e então liofilizada e estocada a -20°C até uso.

3.4 Purificação da enzima

3.4.1 Gel filtração em Superdex 75

Para o fracionamento por gel filtração, a peçonha de *V. dubius* (10 mg/fracionamento) foi inicialmente dissolvida em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 6,0 contendo NaCl 0,15 M, resultando em uma solução límpida, sem material insolúvel ou em suspensão, não sendo necessário uma limpeza prévia por filtração ou centrifugação (a centrifugação da peçonha por ocasião da extração já havia removido todo o material particulado/insolúvel). A solução de peçonha foi aplicada a uma coluna (1,0 cm x 30 cm) de Superdex 75 equilibrada e eluída com este mesmo tampão a 18°C. Frações de 1,5 ml foram coletadas a um fluxo de 1 ml/min usando um sistema cromatográfico ÄKTApurifier10 (Pharmacia). O perfil de eluição foi determinado monitorando-se a absorbância das frações a 280 nm. As

frações contendo atividade hialuronidásica foram agrupadas e dessalinizadas em temperatura ambiente antes da cromatografia por afinidade.

3.4.2 Cromatografia por afinidade em heparina-Sepharose

O pico contendo Hyase obtido na etapa anterior foi aplicado a uma coluna de heparina-Sepharose (5 ml) equilibrada com tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 6,0 a 18°C, e a coluna foi lavada com o mesmo tampão para remover material não ligado. Em seguida, as proteínas ligadas à coluna foram eluídas (1 ml/min) com tampão acetato contendo um gradiente linear de NaCl (0-1,0 M). O perfil de eluição foi monitorado a 280 nm e as frações (1,5 ml) foram testadas quanto à sua atividade enzimática. As frações ativas foram concentradas (quando necessário) e estocadas à -20°C.

A atividade enzimática, o rendimento e os fatores de purificação foram monitorados durante a purificação.

3.4.3 Cromatografia líquida de alta performance com coluna de fase-reversa (RP-HPLC)

Para avaliar a pureza da proteína, a Hyase obtida nas etapas anteriores foi dissolvida em água (concentração: 0,9 mg/ml) e filtrada por centrifugação em ultrafiltro da Millipore, à 20°C, antes de ser analisada por cromatografia de RP-HPLC em coluna C18 (4,6 mm x 250 mm x 12 µm; Phenomenex), usando um sistema de HPLC da Shimadzu que consistiu de duas bombas (modelo LC-10AD VP), um detector UV/Vis (modelo SPD-10A), um coletor de frações (modelo FRC-10A) e um controlador de sistema (modelo SCL-10A VP). A coluna foi equilibrada

com ácido trifluoracético (TFA) 0,1% (solução A) por 10 minutos antes de aplicar a amostra (20 μ l, correspondendo a 18 μ g de enzima), e a enzima foi eluída com gradiente linear (0-100%) de acetonitrila 66% em TFA 0,1% (solução B) e fluxo de 1 ml/min. O tempo de corrida foi de 40 a 50 min e o perfil de eluição foi monitorado a 280 nm.

3.5 Determinação protéica

O conteúdo protéico da peçonha e frações foi determinado pelo método de Lowry *et al.* (75) usando-se albumina bovina como padrão.

3.6 Dessalinização

Quando necessário, a preparação contendo a enzima foi dessalinizada e concentrada por centrifugação (3000 *g* x 3 vezes, 30 min cada, 4 °C) entre as etapas cromatográficas, utilizando tubo Amicon com ultrafiltro da Millipore.

3.7 Análise eletroforética

3.7.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio

(SDS-PAGE)

A eletroforese na presença de SDS foi feita em sistema descontínuo usando-se gel de empacotamento de 4% de poliacrilamida em Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, contendo SDS 0,4%, e gel de separação (resolução) de 12% de poliacrilamida Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8, contendo SDS 0,4%, em um sistema eletroforético mini-gel SE260 (Hoefler-Pharmacia), com 25 mM Tris-250 mM glicina, como tampão de

cuba (76). O tampão de amostra consistiu de glicerol, azul de bromofenol, SDS. As amostras foram diluídas neste tampão e fervidas durante 5 min antes de serem aplicadas ao gel em volume de 30µl. Para avaliar a presença de subunidades, a enzima foi incubada com β-mercaptoetanol 100 mM por 5 min a 20°C antes da corrida eletroforética. A corrida foi feita usando 100 V constantes, à 20°C, até a frente migratória de azul de bromofenol aproximar o final do gel. Terminada a corrida, os géis foram corados com nitrato de prata, depois de corados, foram fotografados usando uma máquina fotográfica digital Nikon Coolpix L10.

A massa molecular da enzima purificada foi determinada a partir de uma curva de calibração obtida usando proteínas de massa molecular conhecida (em kDa: lisosima - 14,4; anidrase carbônica - 30; ovalbumina - 45; albumina sérica bovina - 66; fosforilase b - 97) incluídas em cada corrida. A curva de calibração foi construindo plotando-se a massa molecular (\log_{10}) no eixo X versus a distância relativa de migração, R_f , no eixo Y. O valor do R_f foi calculado para as proteínas marcadoras e para a Hyase dividindo-se a distância de migração de cada proteína pela distância de migração da frente migratória do gel (banda de azul de bromofenol), usando a relação $R_f = D_m/D_f$, onde D_m é a distância de migração da proteína marcadora ou enzima purificada e D_f é a distância de migração da frente migratória.

3.7.2 Zimografia

A atividade da Hyase sobre o substrato ácido hialurônico também foi investigada conforme descrita por Cevallos *et al.* (77). O ácido hialurônico foi

incluído no gel de SDS-poliacrilamida numa concentração final de 0,6 mg/ml de solução não polimerizada. Para a separação eletroforética, foram usadas as mesmas condições (géis, tampões, etc.) descritas na seção anterior, exceto que as amostras não foram aquecidas antes da eletroforese (para conservar a atividade enzimática da proteína). Terminada a eletroforese, o gel foi lavado sequencialmente à temperatura ambiente sob agitação com Triton X-100 5% em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 5,8, contendo NaCl 0,15 M (2 x 1 h), depois com Triton X-100 0,05% no mesmo tampão (1 h) e finalmente em tampão pH 5,8 sozinho por 10 min antes de incubar num recipiente fechado à 37°C por 18-24 h. Após esta incubação, o gel foi lavado (2 x 15 min) em tampão Tris-HCl 0,015 M, pH 7,9 e então corado (sob agitação) por 18-24 h com uma solução de “Stains-all” (5 ml de 0,1% “Stains-all” dissolvida em formamida pura + 5 ml de formamida + 20 ml de isopropanol + 1,5 ml de Tris-HCl 1,0 M, pH 7,9 + água destilada para um volume de 100 ml). Após a coloração, o gel foi lavado com uma solução de Tris-HCl 0,015 M, pH 7,9, contendo formamida 5% e isopropanol 20%. Terminada esta etapa, o gel foi documentado. Usando este procedimento, as bandas com atividade hialuronidásica aparecem como zonas claras sobre um fundo azul escuro.

3.8 Atividade enzimática

3.8.1 Ensaio enzimático

A atividade hialuronidásica foi determinada pelo método turbidimétrico de Di Ferrante (78). A solução de trabalho para este ensaio consistiu em 200 µl de tampão (0,2 M acetato de sódio, pH 6,0, contendo NaCl 0,15 M), 200 µl de

substrato (ácido hialurônico de cordão umbilical humano, 1 mg/ml em tampão acetato) e 100 µl de enzima (20 µg) para dar um volume total de reação de 500 µl. Esta mistura foi incubada por 15 min à 37°C após o qual a reação foi interrompida pela adição de 2 ml de brometo de hexadeciltrimetilamônio (ou: brometo de cetrimetilamônio, CTAB) 2,5% em NaOH e a turbidez resultante lida em 400 nm leitor de microplaca SpectraMax 340 (Molecular Devices, San Diego, CA, EUA) após 30 min de incubação à temperatura ambiente. Uma unidade de atividade correspondeu à quantidade de enzima que produziu uma redução de 50% na turbidez causada por 200 µg de substrato sob as condições descritas acima.

3.8.2 Especificidade de substratos

Foi investigada a especificidade da enzima para os substratos ácido hialurônico e sulfato de condroitina A, usando-se o ensaio turbidimétrico descrito acima.

3.8.3 Determinação de V_{max} e K_m

A velocidade máxima de reação (V_{max}) e a concentração de substrato que resulta na metade da velocidade máxima (K_m) foram calculadas usando gráficos de Lineweaver-Burk, conforme descrito por Segel (79), usando dados obtidos com quantidades fixas de enzima e diferentes concentrações de substratos. A liberação de N-acetilamino foi quantificada pelo método do Reissig *et al.* (80). Inicialmente foi realizado o ensaio de atividade hialuronidásica como mencionado anteriormente, mas a reação foi interrompida colocando-se a mistura enzima:substrato em gelo ou fervendo-a. Em seguida, 0,5 ml de amostra, padrão

ou branco foi misturado com 0,1 ml de tetraborato de potássio, e após 3 min de aquecimento essa mistura foi esfriada em água corrente. Foi então adicionado 3 ml de DMAB e a mistura foi incubada a 37°C por 20 min, seguido por leitura da absorbância a 544 nm num leitor de microplaca SpectraMax 340 (Molecular Devices, San Diego, CA, EUA). A quantidade de açúcares na amostra foi calculada comparando-se a absorbância das amostras com uma curva padrão de N-acetilglicosamina.

3.8.4 Determinação do pH ótimo

O pH ótimo da enzima foi determinado usando-se três tampões: citrato de sódio 0,1 M, pH 3,0-6,0, acetato de sódio 0,1 M, pH 4,0-6,0 e Tris-HCl 0,1 M, pH 5,5-8,0 (em todos os tampões foi adicionado NaCl 0,15 M). A enzima foi incubada a 37°C no tampão com o pH desejado por 15 min e a reação foi então interrompida e a atividade residual foi determinada pelo ensaio turbidimétrico.

3.8.5 Estabilidade térmica e temperatura ótima

Para avaliar a estabilidade térmica da Hyase a ciclos de congelamento e descongelamento, a enzima foi estocada a -20°C em alíquotas durante 1, 2, 3, 6, 24 e 72 h e 7 e 15 dias e foram feitos três experimentos: **(1)** Após cada intervalo foi avaliada a atividade de uma alíquota da enzima (não sendo a alíquota recongelada ou reutilizada), comparando-a com a atividade no tempo zero (antes do congelamento), **(2)** Nos intervalos acima, novas alíquotas foram descongeladas, dosadas quanto à sua atividade, recongeladas, e então descongeladas, dosadas e congeladas no intervalo seguinte, sucessivamente até

completar a seqüência de intervalos (até 15 dias), e **(3)** Em algumas alíquotas foi adicionado glicerol (concentração final 20%) para avaliar sua influência sobre a estabilidade da enzima; estas alíquotas foram estocadas a -20°C e dosadas nos mesmos intervalos acima (nova alíquota em cada intervalo, com apenas um descongelamento). A atividade enzimática de cada alíquota foi avaliada pelo ensaio turbidimétrico.

A estabilidade térmica da enzima foi avaliada pré-incubando alíquotas da mesma por 15 min em temperaturas entre 25°C e 80°C. Em seguida, a atividade enzimática residual foi determinada pelo ensaio turbidimétrico a 37°C.

A temperatura ótima da enzima foi avaliada usando-se o ensaio turbidimétrico em diferentes temperaturas (entre 10°C e 70°C).

3.8.6 Inibição da atividade enzimática por flavonóides

Foi avaliado o efeito inibitório de vários flavonóides (apigenina, catequina, naringina e quercetina) sobre a atividade da Hyase, incluindo-se estes agentes (em concentrações variadas) na solução de reação durante a incubação a 37°C seguido da determinação da atividade residual pelo ensaio turbidimétrico.

3.9 Análises imunológicas

3.9.1 Neutralização da Hyase por antissoros

A capacidade de antissoros equinos do Instituto Butantan em neutralizar a atividade da enzima de *V. dubius* foi avaliada pré-incubando-se a enzima com proporções variadas dos soros anti-aracnídico (*Phoneutria nigriventer*, *Loxosceles gaucho* e *Tityus serrulatus*), anti-escorpiônico (*Tityus bahiensis* e *T. serrulatus*),

anti-lonômico (*Lonomia obliqua*), anti-botrópico (*B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. alternatus*, *B. neuwiedi* e *B. moojeni*), anti-crotálico (*Crotalus durissus terrificus*) e anti-elapídico (*Micrurus corallinus* e *Micrurus frontalis*) nas diluições de 1:50; 1:25; 1:12,5; 1:6,25 e 1:3, durante 30 min a 37°C antes de quantificar a atividade enzimática residual usando o ensaio turbidimétrico.

3.9.2 ELISA

A reatividade cruzada da peçonha e da Hyase com soro anti-aracnídico foi examinada por ELISA conforme descrito por Mello *et al.* (81). Resumidamente, placas de 96 poços foram sensibilizadas com diluições variadas de antisoro e, depois de lavadas e bloqueadas, foram incubadas com quantidades fixas de peçonha (10 µg) e Hyase (5 µg). Após várias lavagens, foram incubadas com IgG antiaracnídico (purificado por afinidade em proteína G-Sepharose) acoplada à peroxidase. A reação foi revelada usando-se como substrato O-fenilenodiamino + H₂O₂ e interrompida com H₂SO₄ após 30 min à temperatura ambiente. A absorbância final foi medida a 492 nm em leitor de placas SpectraMax 340.

3.10 Atividade biológica

3.10.1 Permeabilidade vascular

Para avaliar o envolvimento da Hyase na permeabilidade vascular, ratos machos Wistar foram anestesiados com tiopental sódico (30 mg/kg, i.v.) e uma vez atingido um nível de anestesia adequado, a superfície dorsal foi raspada e diferentes quantidades de enzima e 10 µg de peçonha de *V. dubius* foram injetadas usando um esquema aleatório para os sítios de injeção. Trinta minutos

antes de serem eutanasiados, os ratos receberam ^{125}I -albumina humana (i.v., via a veia peniana), e 5 min antes da eutanásia, 1 ml de sangue foi coletado para a determinação da quantidade de albumina circulante. Após a eutanásia dos ratos com uma dose supramaximal de anestésico, os sítios de pele injetados com a peçonha e a enzima foram retirados e os níveis de radioatividade determinados em contador de radiação gama. A quantidade de extravasamento protéico foi expressa em μl de plasma baseada na radioatividade detectada de sangue (82).

3.11 Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média \pm EPM para o número de ensaios ou animais. As comparações estatísticas foram feitas usando-se o teste-*t* de Student, ou ANOVA seguida do teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ indicavam significância estatística nos resultados.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Atividade hialuronidásica

A Figura 4 mostra a atividade de Hyase na peçonha de *V. dubius* comparada com a atividade na peçonha da aranha armadeira *P. nigriventer*. Ambas as peçonhas possuem atividade hialuronidásica, embora a de *P. nigriventer* seja mais potente.

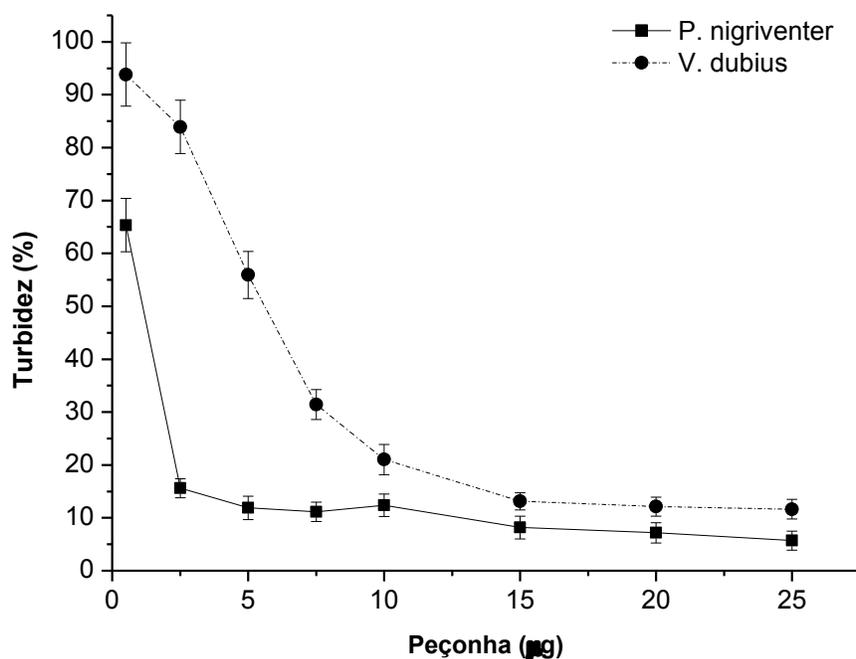


Figura 4: Atividade hialuronidásica das peçonhas de *V. dubius* e *P. nigriventer*. A atividade enzimática foi determinada pelo ensaio turbidimétrico de Di Ferrante (78). Os pontos representam a média \pm EPM (n=6 para cada peçonha).

4.2 Purificação da Hyase

A purificação da Hyase usou como primeira etapa a cromatografia de exclusão molecular, onde a atividade enzimática foi detectada em três frações (frações 7, 8 e 9) (Fig. 5).

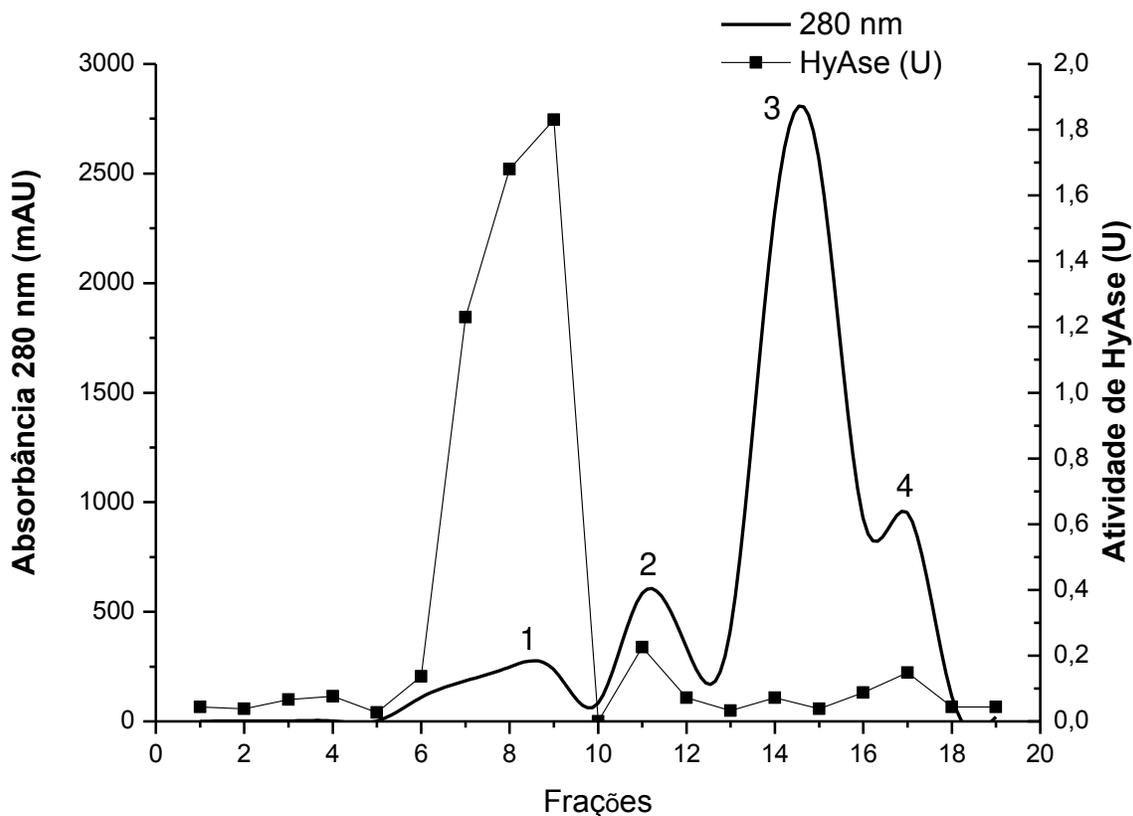


Figura 5: Perfil de eluição da peçonha de *V. dubius* após gel filtração em Superdex 75. A coluna foi equilibrada e eluída com tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 6,0 contendo NaCl 0,15 M a um fluxo de 1 ml/min e o perfil de eluição foi monitorado a 280 nm. Foram coletadas frações de 1,5 ml para determinar a atividade hialuronidásica. 1 a 4: os principais picos obtidos. A enzima foi localizada no primeiro pico.

As frações 7, 8 e 9 coletadas na primeira etapa foram agrupadas e aplicadas a uma coluna de afinidade heparina-Sepharose (5 ml). A coluna foi eluída com equilibrada e lavada com tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 6,0, seguido por eluição das proteínas com o mesmo tampão e um gradiente linear (0-1 M) de NaCl. Frações de 1,5 ml foram coletadas e testadas para atividade enzimática. A enzima foi detectada no pico 2, na fração não retida na coluna

(antes do gradiente de sal) talvez devido à baixa interação da enzima com a heparina presente na coluna (Fig. 6).

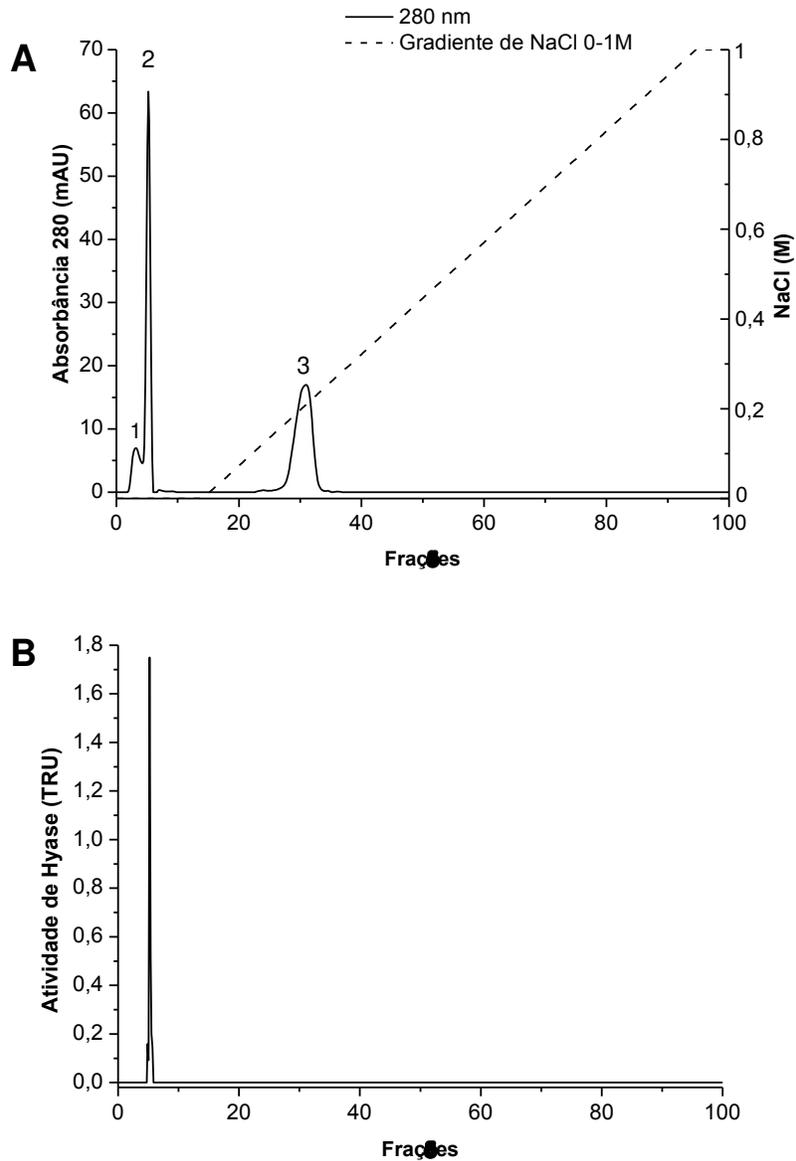


Figura 6: (A) Perfil de eluição do pico com atividade hialuronidásica (de gel filtração) após cromatografia em coluna de heparina-Sepharose (5 ml). A coluna foi equilibrada e lavada (1 ml/min) com tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 6,0, e em seguida as proteínas retidas foram eluídas com o mesmo tampão contendo um gradiente linear (0-1 M) de NaCl. O perfil de eluição foi monitorado a 280 nm e frações de 1,5 ml foram coletadas. (B) Atividade enzimática detectada no pico 2.

Na cromatografia líquida de alta performance em coluna de fase reversa (RP-HPLC), utilizando uma coluna C18 com um gradiente (0-66%) de acetonitrila + TFA 0,1%, foi detectado apenas um pico principal referente à Hyase eluída na segunda etapa (Fig. 7).

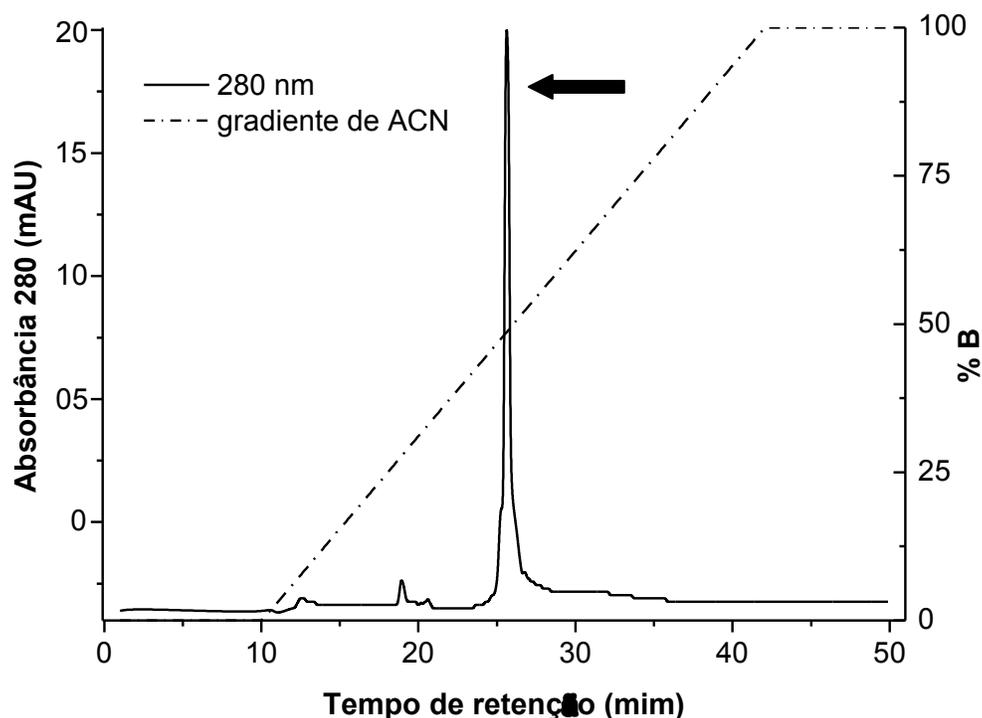


Figura 7: Perfil de eluição após RP-HPLC em coluna C18 evidenciando o pico correspondendo à enzima purificada (seta). Fase móvel: TFA 0,1% e eluente ACN (0-66%) + TFA 0,1% (solução B). Fluxo: 1 ml/min.

De aproximadamente 18 mg de proteína de peçonha usadas na primeira etapa, obteve-se cerca de 840 µg de Hyase pura, o que corresponde a aproximadamente 5% da peçonha total. A atividade total da Hyase diminuiu marcadamente na segunda etapa por motivos ainda desconhecidos (talvez devido

à retenção de parte da enzima na coluna), porém a atividade específica aumenta gradativamente durante a purificação, com fator de purificação final de 4,1 (Tabela 1).

Tabela 1: Purificação da Hyase da peçonha de *V. dubius*.

Etapa	Proteína (mg)	Rendimento (%)	Atividade total (U)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação
Peçonha	17,6±0,51	100	635,6±33,1	36,2±3,8	---
Superdex 75	6,3±0,74	35,2	615,3±20,7	97,6±5,4	2,7
Heparina-Sepharose	0,84±0,052	4,8	124,4±22,2	148±6,2	4,1

Os valores representam a média ±EPM (n=3 purificações).

A eletroforese em gel de poliacrilamida de 12% corado com nitrato de prata revelou um única banda protéica com massa molecular de ~43 kDa, sem alteração na presença de β -mercaptoetanol (β -m) (Fig. 8A,B). Este achado foi confirmado pela zimografia (banda de ~43-45 kDa) após SDS-PAGE, a qual também revelou a ocorrência de apenas uma isoforma da enzima (Fig. 8C).

4.3 Caracterização enzimática

A enzima purificada apresentou atividade máxima na faixa de pH 4 a 5 (Fig. 9A). A temperatura ótima para a atividade enzimática ficou entre 35°C e 40°C, sendo que a enzima perdeu atividade gradualmente em temperaturas $\geq 45^\circ\text{C}$ (Fig. 9B). A pré-incubação da Hyase em temperaturas entre 25°C e 80°C mostrou que em temperaturas acima de 60°C a enzima perde toda a atividade (Fig. 9C).

Na análise da resistência da atividade enzimática ao congelamento, foram usados três protocolos: (1) No primeiro protocolo, alíquotas congeladas da enzima foram descongeladas uma única vez e testadas para atividade enzimática nos

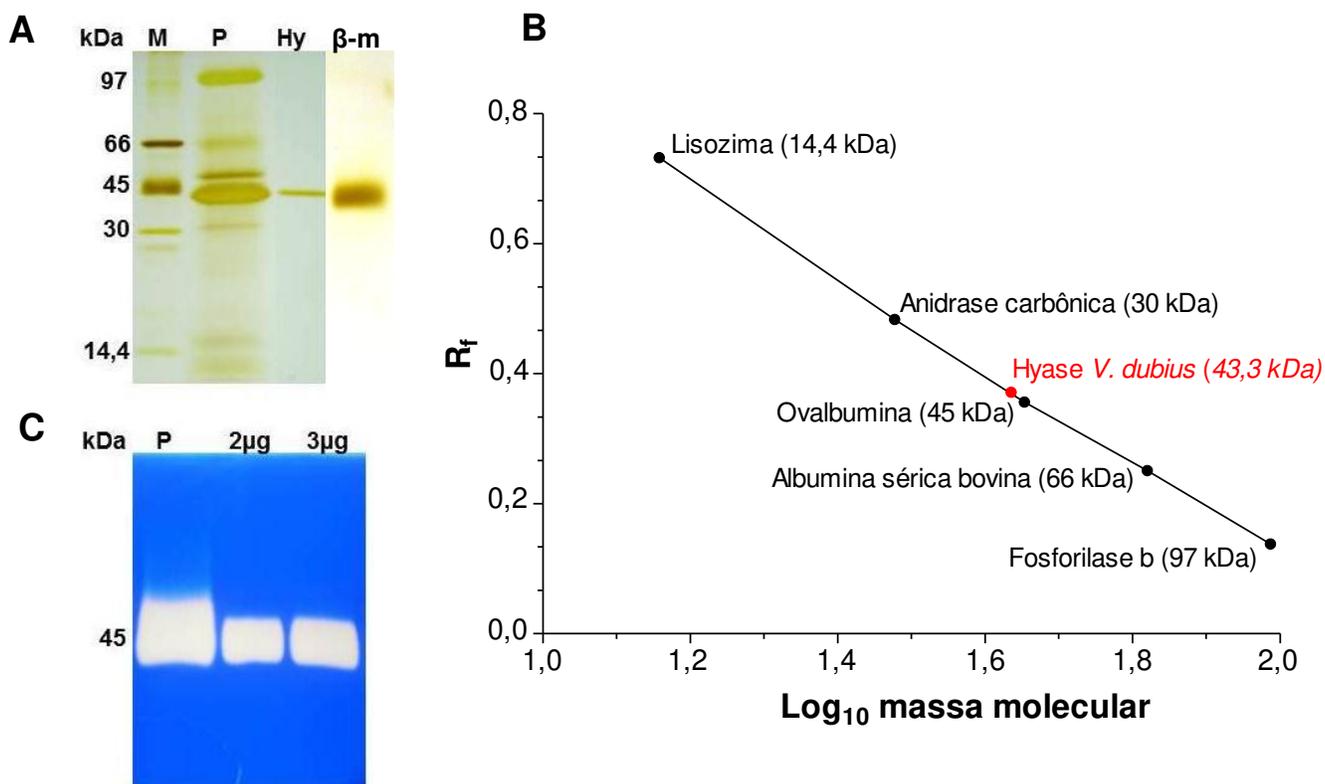


Figura 8: (A) SDS-PAGE da peçonha de *V. dubius* (P, 10 μ g), da Hyase (Hy, 2 μ g) obtida na cromatografia por afinidade em heparina-Sepharose e da Hyase (5 μ g) na presença de β -mercaptoetanol (β -m, 100 mM). O gel de 12% de poliacrilamida foi corado com nitrato de prata. M = marcadores de massa molecular. (B) Curva padrão para determinação da massa molecular da Hyase purificada. A massa estimada para a enzima foi de 43 kDa. (C) Zimograma da peçonha de *V. dubius* (P, 10 μ g) e da enzima (2 μ g e 3 μ g) após SDS-PAGE (gel de poliacrilamida a 12%), mostrando a atividade hialuronidásica da enzima.

intervalos entre 1 h a 15 dias, e (2) No segundo protocolo, alíquotas foram congeladas, descongeladas e recongeladas a cada período selecionado para análise. Ao passar por ciclos de congelamento e descongelamento a -20°C verificou-se que a enzima manteve atividade máxima até 3 h, sofrendo uma pequena redução (19,3%) na atividade em 6 h, mas depois ela se manteve estável

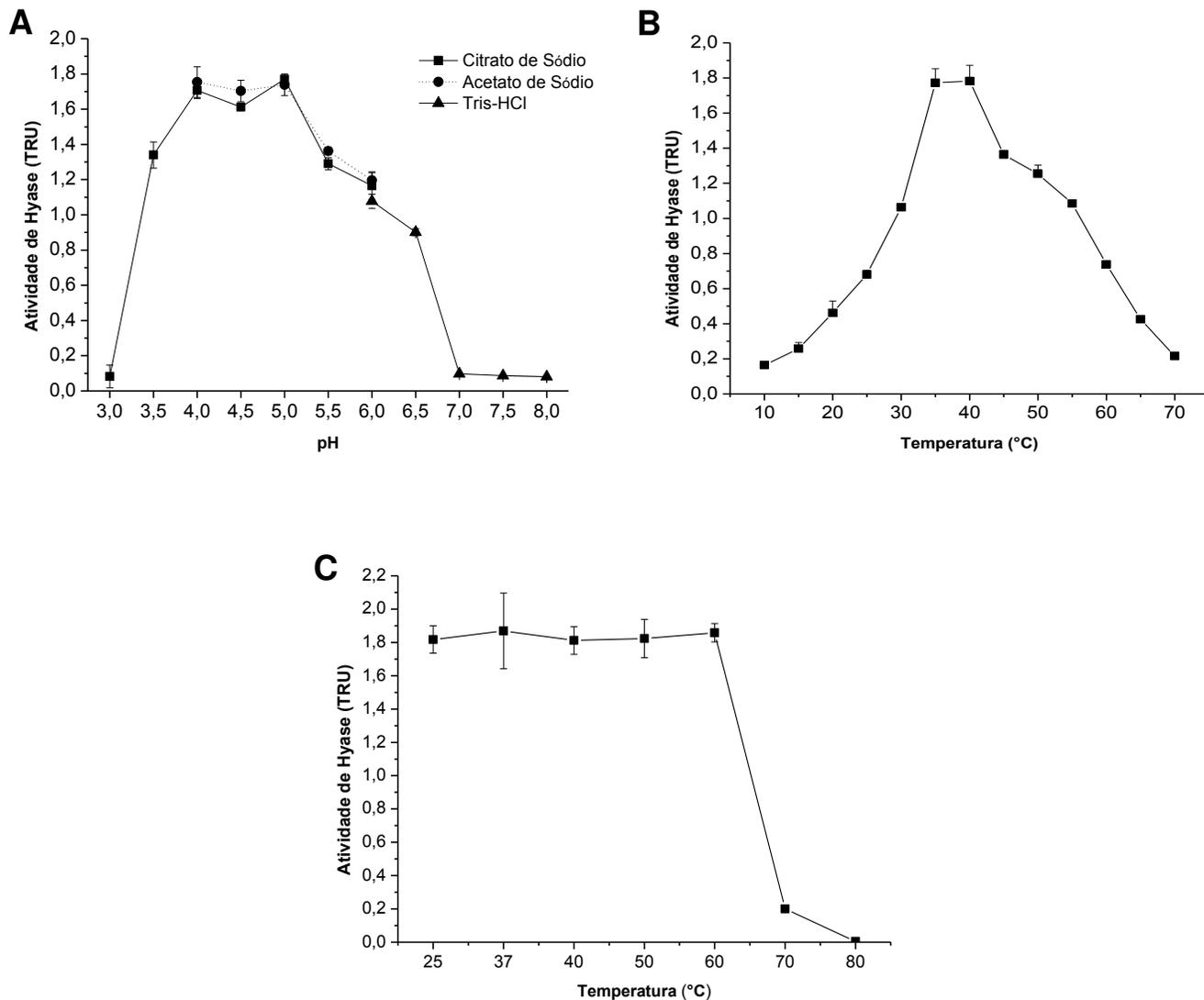


Figura 9: Propriedades físico-químicas da Hyase. **(A)** pH ótimo e **(B)** temperatura ótima e **(C)** termoestabilidade da enzima purificada. O pH ótimo foi determinado usando citrato de sódio 0,1 M, acetato de sódio 0,1 M e Tris-HCl 0,1 M, todos com NaCl 0,15 M. e o ensaio turbidimétrico. A temperatura ótima foi determinada realizando o ensaio turbidimétrico nas temperaturas indicadas (incubação de 15 min). A termoestabilidade foi determinada pré-incubando a enzima em diferentes temperaturas durante 15 min e em seguida dosando a atividade residual. Os pontos representam a média \pm EPM (n=6).

por até 15 dias. Quando armazenada continuamente na mesma temperatura, a enzima apresentou a mesma queda na atividade em 6 h vista nos ciclos de congelamento, e em 15 dias já não apresentava mais atividade (Fig. 10).

A concentração de NaCl usada no tampão não afetou de modo significativo a atividade da enzima purificada. As atividades vistas com NaCl foram: $1,84 \pm 0,06$; $1,83 \pm 0,08$; $1,82 \pm 0,14$; $1,83 \pm 0,05$; $1,83 \pm 0,06$; $1,85 \pm 0,09$; $1,79 \pm 0,12$; $1,80 \pm 0,04$; $1,78 \pm 0,09$; e $1,77 \pm 0,07$ TRU para as concentrações de NaCl de 0, 6, 12, 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 500 mM, respectivamente.

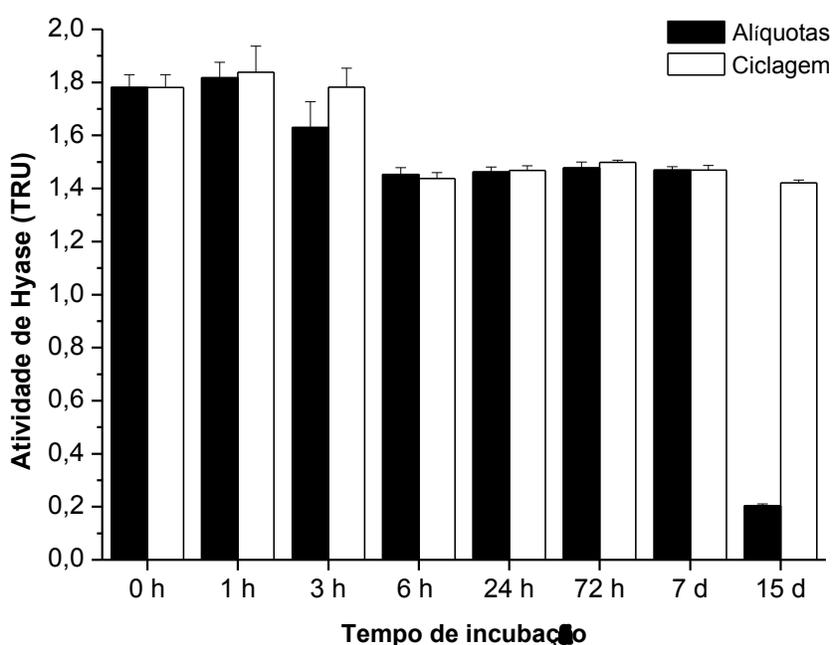


Figura 10: Estabilidade da Hyase purificada a ciclos de congelamento (-20°C) e descongelamento. A estabilidade foi avaliada conforme descrito nos Métodos. Os pontos representam a média \pm EPM ($n=6$).

A Figura 11 mostra que os valores da velocidade máxima (V_{max}) e da constante de Michaelis-Menten (K_m) da Hyase de *V. dubius* foram 11,4 $\mu\text{g}/\text{min}$ e 677,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente.

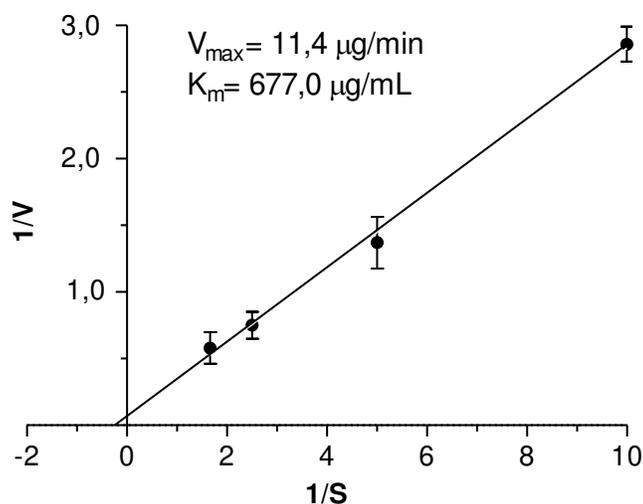


Figura 11: Gráficos de Lineweaver-Burk ($1/S$ vs. $1/V$) para determinação do V_{max} e K_m da Hyase usando ácido hialurônico como substrato. Os pontos representam a média \pm EPM ($n=6$).

4.4 Atividade sobre substratos e inibição por flavonóides

A Figura 12 mostra que tanto a peçonha como a Hyase purificada foram mais ativas sobre o ácido hialurônico do que sobre sulfato de condroitina A, indicando uma preferência maior para o primeiro substrato.

Os quatro flavonóides (apigenina, catequina, naringina e quercetina) testados inibiram a Hyase *in vitro*, especialmente em concentrações $\geq 30 \mu\text{M}$, exceto a catequina (Fig. 13). Entretanto, a capacidade de inibição variava entre compostos, sendo a catequina a menos potente, e a naringina a mais potente.

Apenas a naringina e a apigenina inibiram totalmente a atividade enzimática da Hyase, na concentração de 100 μ M.

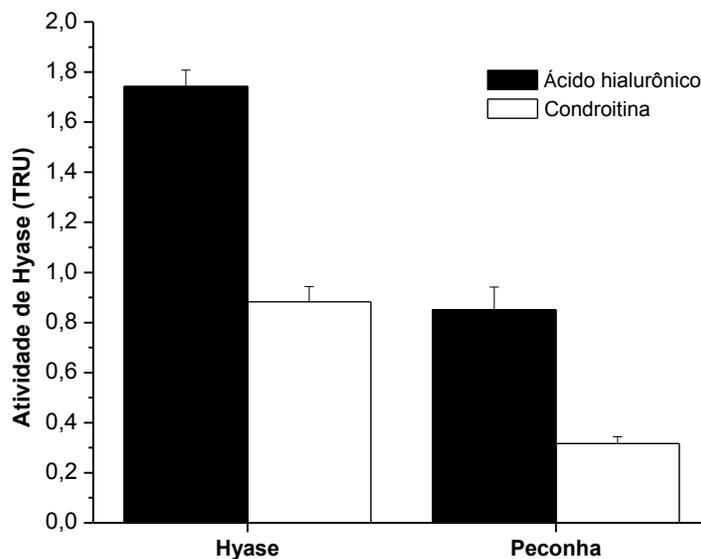


Figura 12: Atividade enzimática da peçonha de *V. dubius* (10 μ g) e da Hyase purificada (5 μ g) sobre ácido hialurônico e sulfato de condroitina A. Os pontos representam a média \pm EPM (n=6).

4.5 Análises imunológicas

Dos vários antissoros testados, apenas o soro anti-aracnídico mostrou-se eficaz em neutralizar a atividade hialuronidásica da enzima purificada; os soros anti-ofídicos e o anti-lonômico (contra a lagarta peçonhenta *L. obliqua*) não causaram neutralização (Fig. 14A,B). Considerando que o soro anti-aracnídico é produzido contra as peçonhas de três aracnídeos (a aranha armadeira *P. nigriventer*, a aranha marrom *L. gaucho* e o escorpião *T. serrulatus*), investigamos a capacidade neutralizante do soro anti-escorpiônico (*T. bahiensis* e *T. serrulatus*) contra a atividade hialuronidásica. Este antissoro mostrou-se essencialmente

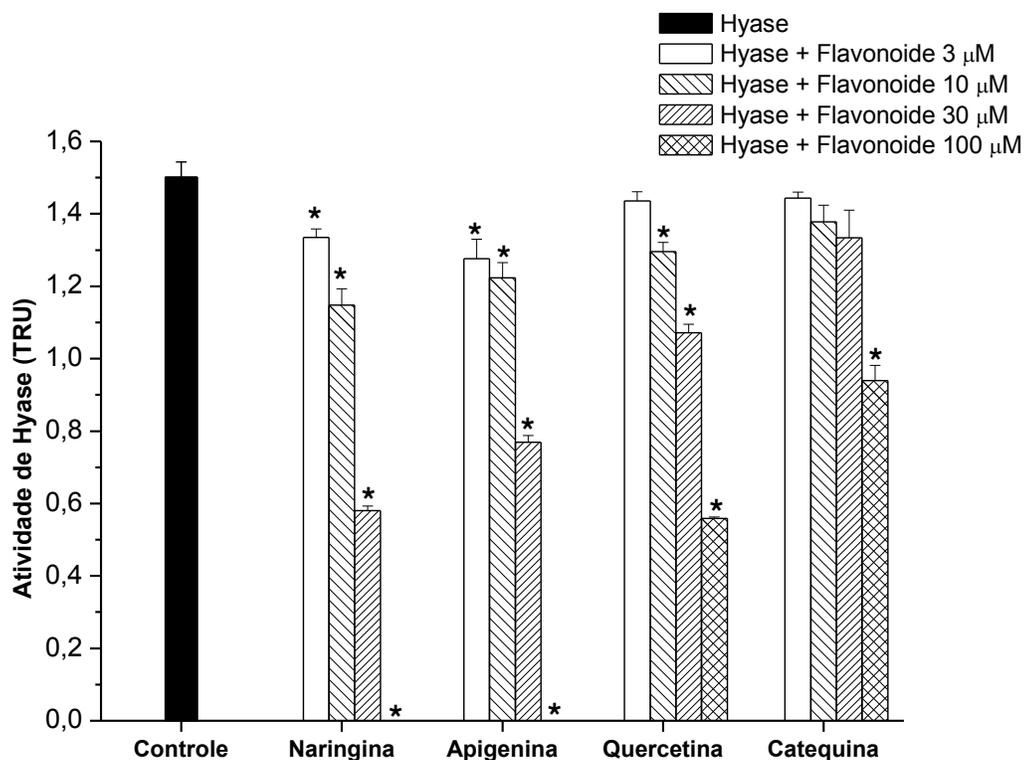


Figura 13: Inibição da atividade enzimática da Hyase por flavonóides. Os pontos representam a média \pm EPM (n=3). *p<0,05 comparado com atividade controle (sem flavonóide).

destituída da capacidade de neutralizar a Hyase (houve apenas pequena neutralização em altas concentrações do soro) (Fig. 14A). Este achado sugere que a ação neutralizante do soro anti-aracnídico seja mediada por anticorpos contra as Hyases das peçonhas de uma ou ambas das espécies de aranha usadas para produzir o antissoro, ou seja, a *P. nigriventer* e a *L. gaúcho*.

A Figura 14C mostra a reatividade da peçonha de *V. dubius* e da Hyase frente ao soro anti-aracnídico, conforme avaliada por ELISA. Observou-se boa reatividade da enzima com o antissoro quando comparado com a da peçonha.

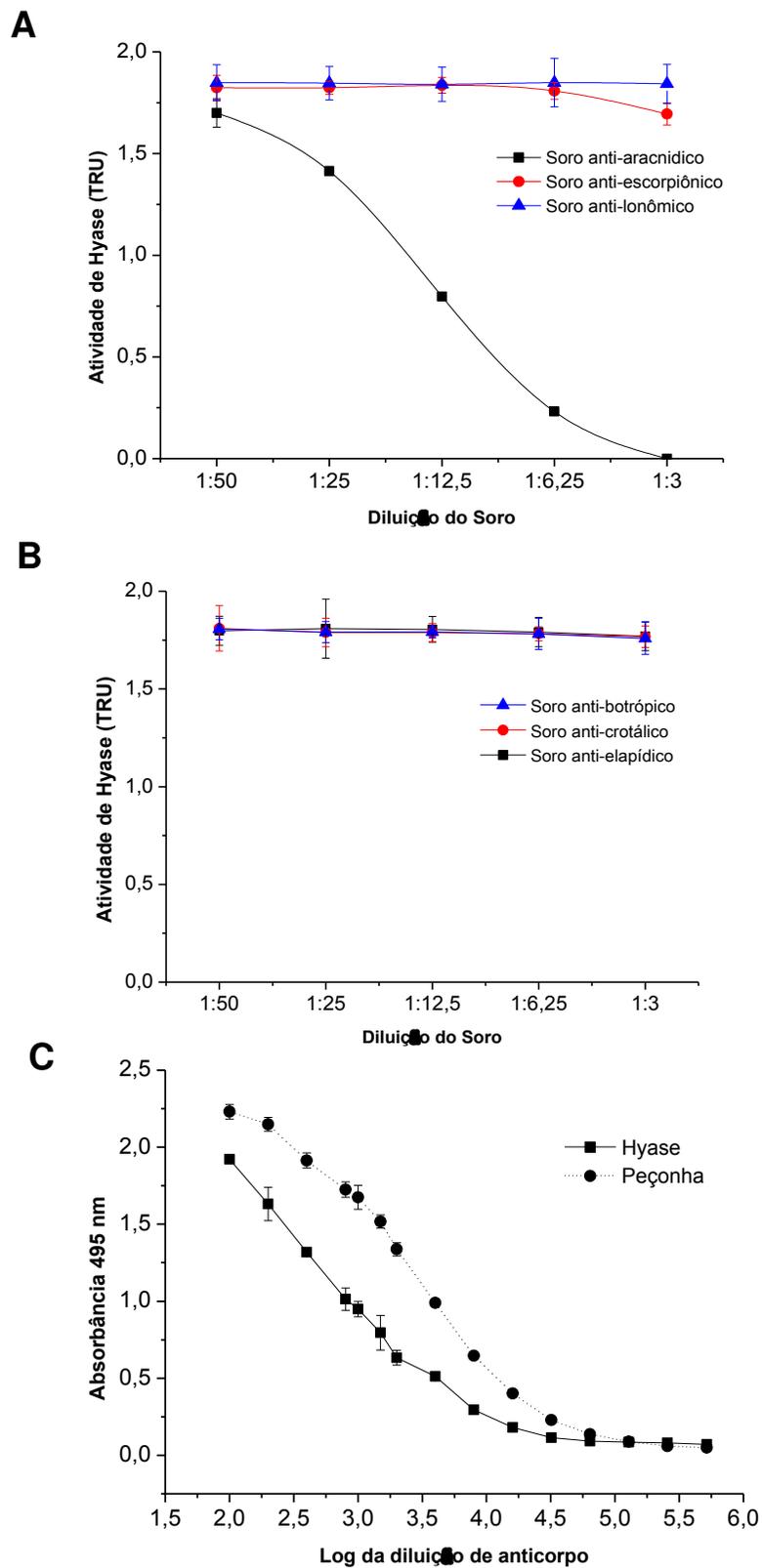


Figura 14: (A,B) Neutralização da Hyase por soro anti-aracnídico comparado com outros antissoros. **(C)** Reatividade da peçonha de *V. dubius* (10 μ g) e da Hyase (5 μ g) frente ao soro anti-aracnídico no ELISA. Os pontos representam a média \pm EPM (n=6).

4.6 Atividade biológica

A Figura 15 mostra que a peçonha de *V. dubius* (10 µg) aumentou de forma significativa a permeabilidade vascular em pele dorsal de ratos. A Hyase também provocou aumento marcante na permeabilidade nas doses de 60 µg e 30 µg, porém foi sem efeito com 10 µg da enzima quando comparado ao controle (solução Tyrode sozinha).

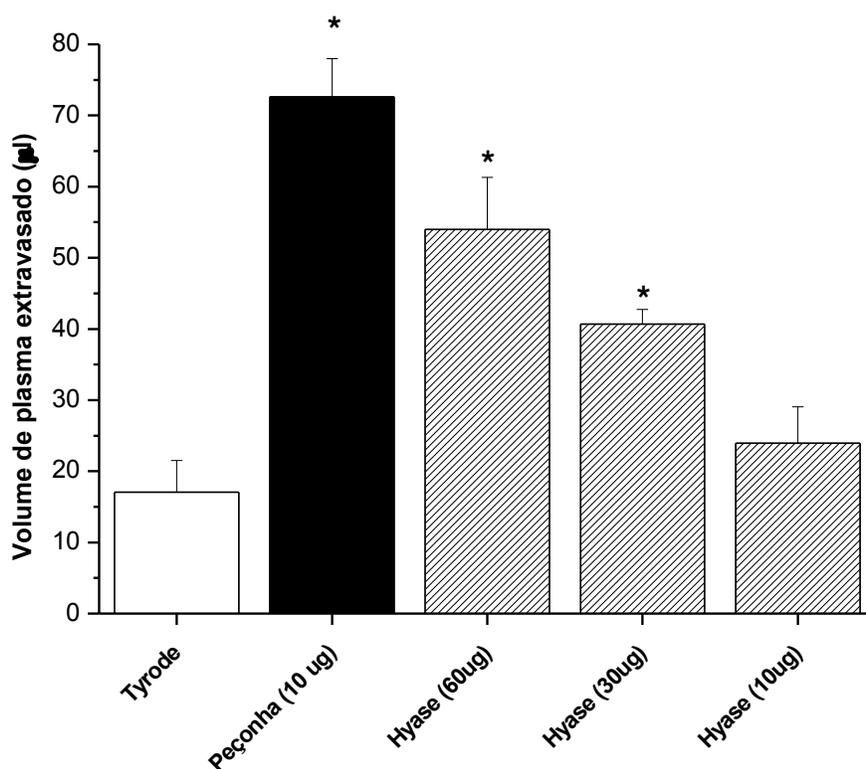


Figura 15: Aumento na permeabilidade vascular causada pela peçonha e Hyase de *V. dubius* em pele dorsal de rato. As colunas representam a média \pm EPM (n=5). *p<0,05 comparado com a solução Tyrode sozinha (controle).

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Hialuronidases têm sido descritas em muitos organismos patogênicos, em tecidos malignos e em peçonhas animais (83). Nas peçonhas, a enzima é considerada um fator de dispersão devido à capacidade de catalisar a hidrólise de glicosaminoglicanas no tecido conectivo, facilitando assim a difusão de toxinas do sítio de inoculação (53,54,84).

A Hyase de *V. dubius* foi purificada em duas etapas (gel filtração seguido por cromatografia de afinidade em heparina-Sepharose). Esta purificação foi facilitada pela escassez de proteínas de alta massa molecular na peçonha, e pelo fato da enzima ter sido eluída já na lavagem da coluna de afinidade na segunda etapa. A purificação descrita aqui foi semelhante a relatos para outras peçonhas onde a enzima foi purificada em duas etapas cromatográficas, como no caso do escorpião *Buthus martensi* (29) e do peixe *Synanceja horrida* (42), enquanto em outros casos, mais etapas foram necessários, como por exemplo, com *T. serrulatus* (3 etapas) (34) e a abelha *Apis mellifera* (8 etapas) (85).

A massa molecular da Hyase de *V. dubius* purificada pelo método acima foi de ~43 kDa (por SDS-PAGE), sem a presença de isoformas (indicado pela cromatografia RP-HPLC e pela zimografia). Adicionando β -mercaptoetanol, obteve-se uma única banda com a mesma massa molecular observada na ausência deste agente redutor, indicando que a Hyase consiste de apenas uma cadeia polipeptídica, ou seja, não possui subunidades. Entretanto, a banda observada na presença da β -mercaptoetanol foi mais espessa, provavelmente devido à quebra das pontes de sulfeto entre os resíduos de cisteína da enzima

(61, 86, 87, 88, 89), resultando numa conformação menos compacta da proteína. As massa molecular de ~43 kDa se assemelha muito à de várias outras Hyases purificadas de peçonhas animais (Tabela 2). Esta tabela indica que as Hyases de peçonhas de invertebrados tendem a ter massa molecular menor que as de vertebrados, e dentre os invertebrados, as de aranha geralmente são as menores (33 a 43 kDa).

O rendimento da enzima (em termos protéicos) indica que a enzima corresponde a aproximadamente 5% da peçonha. Este valor é semelhante àquele obtido na purificação da Hyase da peçonha da serpente *Agkistrodon contortrix contortrix* (92) e do escorpião *T. serrulatus* (39), bastante acima do rendimento obtido na peçonha da aranha *Hippasa partita* (0,4%) (36), mas consideravelmente abaixo do rendimento relatado para a Hyase do escorpião *Palamneus gravimanus* (~40% da peçonha desta espécie) (38).

O pH ótimo para a atividade da Hyase da peçonha de *V. dubius* (pH 4-5) foi semelhante à da enzima dos escorpões *B. martensi* (29) e *P. gravimanus* (38). Já para a enzima da aranha *H. partita*, o pH encontrado foi de 6 (36). A Hyase da peçonha de *L. intermedia* possui atividade máxima mesmo com uma variação na faixa de pH (6 - 8) (35); uma variação do pH ótimo (de 7 a 8), também foi observada na atividade da Hyase de *L. obliqua* (91).

A temperatura ótima para a atividade da Hyase está em torno de 37°C, dentro da faixa de temperatura fisiológica de algumas das presas, como pequenos roedores e aves (5). A enzima perdeu atividade em temperaturas $\geq 60^\circ\text{C}$ devido à desnaturação da estrutura molecular (inclusive do sítio ativo), comprometendo

Tabela 2. Comparação de algumas propriedades físico-químicas de Hyases purificadas de peçonhas animais.

Grupo	Espécie	Massa mol. (kDa)	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Rendimento (%)	Referência
<i>Invertebrados</i>						
Aranha	<i>Vitalius dubius</i>	43	4,0 - 5,0	35 - 40	4,8	Este trabalho
	<i>Hippasa partita</i>	42	5,8	37	0,4	34
	<i>Loxosceles intermedia</i>	41 e 43	6,0 - 8,0	-	-	35
	<i>Loxosceles reclusa</i>	33	6,0	-	-	37
Escorpião	<i>Buthus martensi</i>	48	-	-	-	29
	<i>Palamnaeus gravimanus</i>	52	4,5	37	39,2	38
	<i>Tityus serrulatus</i>	51	6,0	40	4,9	39
Abelha	<i>Apis mellifera</i>	50	-	-	21,0	85
Vespa	<i>Vespula germanica</i>	42	-	-	-	77
Lagarta	<i>Lonomia obliqua</i>	49 e 53	6,0 - 7,0	-	-	91
<i>Vertebrados</i>						
Peixe	<i>Synanceja horrida</i>	62	6,0	37 - 40	-	42
Serpente	<i>Naja naja</i>	70	5,0	37	0,35	90
	<i>Agkistrodon contortrix contortrix</i>	61	6,0	37	16,6	92
Lagarto	<i>Helodema horridum horridum</i>	33 e 63	5,0	37	-	52

assim sua atividade. Outras Hyases, como a da *A. c. contortrix* (88) e do *T. serrulatus* (39) têm a atividade reduzida em 60°C e perdem a atividade em temperaturas superiores.

A atividade da Hyase de *V. dubius* não foi afetada por uma larga faixa de concentrações de NaCl, indicando que este sal não exerce grande influência na atividade desta enzima. Observação semelhante tem sido relatada para a Hyase da peçonha da aranha *H. partita* (36). Por outro lado, a salinidade tem grande influência sobre a atividade da Hyase de *A. c. contortrix*, onde se observou perda de atividade com o aumento da concentração de NaCl (92).

Dos dois substratos testados, a Hyase de *V. dubius* mostrou maior atividade sobre o ácido hialurônico, que é amplamente distribuído em tecido conectivo (intersticial), comparado com a condroitina, que é encontrada principalmente em tecido cartilaginoso. A Hyase bovina possui seletividade semelhante à enzima de *V. dubius* sobre esses mesmos substratos (93), e a enzima da lagarta *L. obliqua* também mostra atividade sobre a condroitina (91). Já em Hyases das peçonhas da aranha *H. partita* (36) e da *A. c. contortrix* (92) não se observou atividade sobre a condroitina.

A Hyase de *V. dubius* possui um K_m de 677,0 µg/ml, indicando baixa afinidade do substrato para o sítio catalítico da enzima semelhante à enzima do peixe pedra *Synanceja horrida* (709 µg/ml) (42), mas diferente da Hyase de *T. serrulatus* (69,7 µg/ml) (39) e *P. gravimanus* (47,61 µg/ml) (38).

Vários estudos têm mostrado que as Hyases de peçonhas são sensíveis à inibição por flavonoides, e que a inibição destas enzimas por estes compostos atenua os efeitos locais das peçonhas (94,95). Assim, a apigenina e a naringina

neutralizaram a letalidade e hemorragia induzida pela peçonha da cascavel norte-americana *Crotalus adamanteus* quando aplicadas via subcutânea em camundongos; neste caso, a apigenina aumentou em 49% o tempo de sobrevivência dos animais de maneira dependente da dose (94).

Os resultados obtidos neste estudo mostram que a Hyase de *V. dubius* também é sensível à inibição por flavonóides, embora apenas dois (apigenina e naringina) dos quatro flavonóides testados causaram inibição total da atividade enzimática na maior concentração testada (100 μ M). A variação na potência inibitória destes compostos parece estar relacionada a algumas características estruturais das moléculas. Assim, por exemplo, os três flavonóides mais potentes (apigenina, naringina e quercetina) possuem uma função carbonila (C=O) na posição 4 do anel C, enquanto os dois mais potentes (apigenina e naringina) possuem apenas um grupo hidroxila no anel B. Por outro lado, a presença de uma dupla ligação entre posições 2 e 3 do anel C parece não ser fundamental para a atividade uma vez que a naringina, que não possui esta ligação, foi tão potente quanto a apigenina, e a quercetina, que possui esta ligação, foi menos potente que a apigenina. De modo semelhante, uma abundância de grupos hidroxila, como no caso da naringina (ver posição 7 do anel A), parece também não ser fundamental para a atividade inibidora (comparar as potências da apigenina e naringina). Esta conclusão quanto a importância dos grupos hidroxila diverge de outros estudos onde se concluiu que a presença de grupos hidroxila era importante para a inibição de Hyases por flavonóides (39,94).

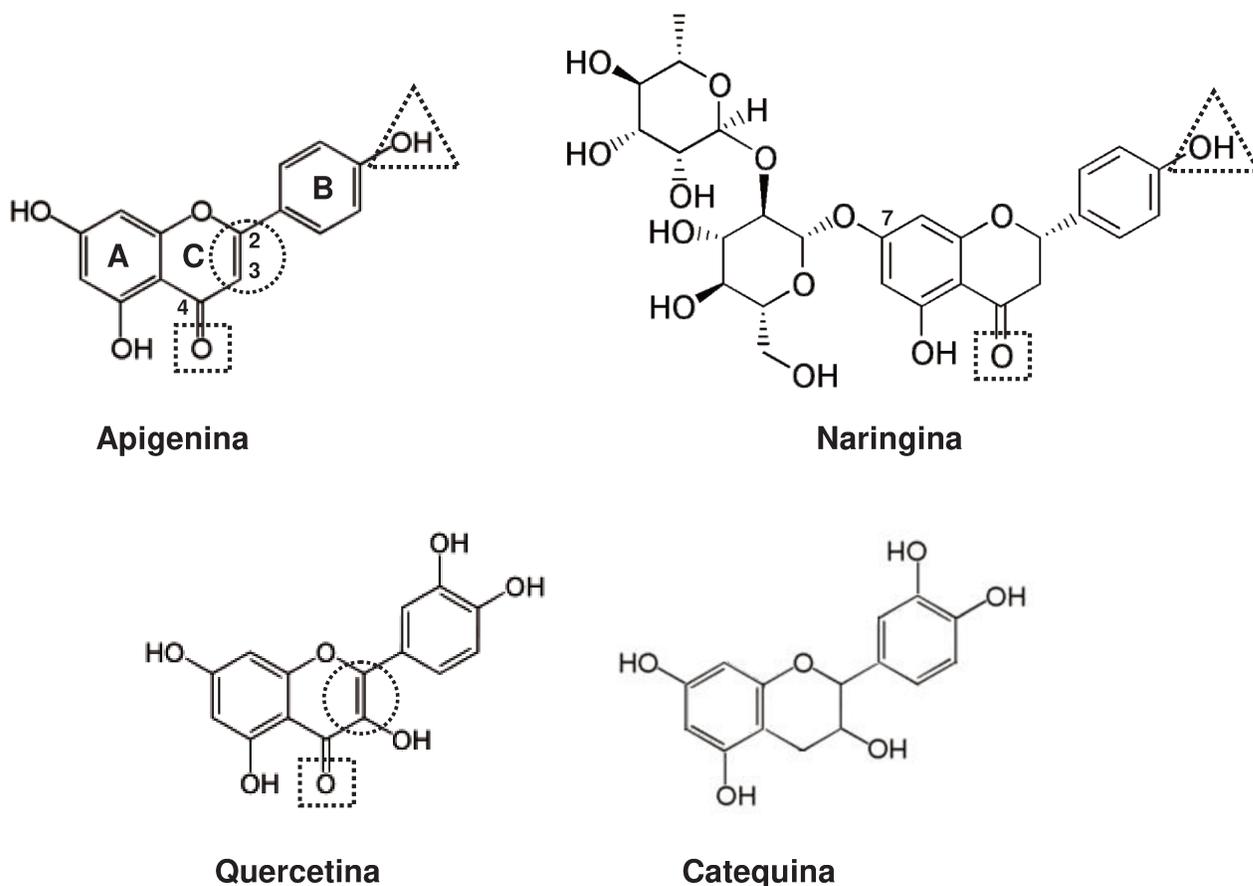


Figura 1: Estrutura química dos flavonóides testados. O círculo indica a ligação dupla entre carbonos 2 e 3 enquanto o quadrado indica a presença de oxigênio na posição 4 e o triângulo indica o grupo hidroxila no anel B.

(Fontes: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Quercetina>; <http://it.wikipedia.org/wiki/File:Apigenin.png>; http://it.wikipedia.org/wiki/File:Naringin_structure.png; http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=s036616442001000300011&script=sci_arttext).

A neutralização da Hyase por soros comerciais não tem sido muito estudada. Gené *et al.* (96) mostraram que antissoros comerciais neutralizam a atividade hialuronidásica de peçonhas de serpentes da América Central, e Pukrittayakamee *et al.* (43) relataram a neutralização da atividade hialuronidásica da peçonha de *Vipera russelli* por antissoro monoclonal. Na peçonha de abelhas a

Hyase foi identificada como um alérgeno, além da fosfolipase A₂ e a melitina, enquanto nas vespas os alérgenos são a Hyase, a fosfolipase A₁ e o antígeno 5. (69).

Os resultados apresentados aqui mostram que a Hyase de *V. dubius* foi reconhecida pelo soro anti-aracnídico, mas não por soros anti-ofídicos, anti-escorpiônico ou anti-lonômico. A ausência de reatividade da Hyase com estes outros soros sugere que há diferenças significativas na antigenicidade e epítomos imunogênicos entre esta enzima e as Hyases de serpentes, escorpião (39) e *Lonomia* (91). A neutralização vista com o soro anti-aracnídico provavelmente foi mediada por anticorpos contra as Hyases das peçonhas das duas espécies de aranha (a aranha armadeira – *P. nigriventer*, e a aranha marrom, *L. gaúcho*) usadas na produção deste antissoro; ambas destas peçonhas possuem Hyase (35,62,63).

O teste de permeabilidade vascular mostrou que a Hyase é capaz de aumentar este parâmetro, porém em doses 3 a 6 vezes maiores que a peçonha (30-60 µg vs. 10 µg). Considerando as altas doses de enzima necessárias para aumentar a permeabilidade vascular, é possível que esta resposta seja inespecífica, isto é, um reflexo apenas da quantidade de proteína injetada e não da atividade enzimática da Hyase propriamente dito; este é um aspecto que precisa ser esclarecido. De qualquer forma, estes achados indicam que a Hyase não é o componente mais importante no aumento de permeabilidade vascular causado pela quantidade de peçonha usada neste ensaio; é provável que haja outras toxinas envolvidas neste fenômeno – talvez peptídeos neurogênicos, como

no caso da peçonha da *P. nigriventer* (97). De fato, quando a Hyase foi testada na proporção em que ocorre na peçonha (~5%, ou seja, 0,5 µg em 10 µg de peçonha, cálculo baseado no rendimento protéico durante a purificação) não houve alteração na permeabilidade vascular (dado não mostrado); a Fig. 15 mostra que a dose de 10 µg de Hyase também não afetou de modo significativo a permeabilidade vascular. Entretanto, considerando que o rendimento médio de peçonha por aranha é de ~1,3 mg, correspondendo a ~62 µg de Hyase, é possível que, em casos de envenenamento, ocorra a inoculação de uma quantidade suficiente de enzima para aumentar a permeabilidade vascular.

Deve-se lembrar ainda da possibilidade de haver um sinergismo entre a ação da Hyase e outras toxinas da peçonha presentes em picos cromatográficos diferentes do da Hyase. O sinergismo na ação de diferentes componentes da mesma peçonha foi observado quando a TsTX1 (toxina do escorpião *T. serrulatus*) e Hyase foram injetadas em roedores, o que resultou em aumento significativamente maior nos níveis séricos de creatinoquinase (CK), lactato desidrogenase (LD) e asparato aminotransferase (AST) quando comparado àqueles observados em ratos injetados apenas com TsTX1; esse aumento reforçou a ação da Hyase como fator de dispersão uma vez que a enzima sozinha não alterou de forma significativa os níveis basais de CK, LD e AST (39).

Conforme demonstrado por diversos estudos (30-32, 54, 90, 94, 95), a Hyase contribui para a difusão de peçonha do local de inoculação, podendo potencializar os efeitos locais e sistêmicos da peçonha (98). Estas observações sobre a ação difusora, e outras semelhantes usando Hyases de diferentes fontes,

serviram de base para a introdução destas enzimas na terapêutica, onde são amplamente usadas para aumentar a permeabilidade tecidual durante a aplicação tópica, subcutânea, intradérmica e intramuscular de fármacos (99), sendo que a Hyase empregada na clínica é isolada de testículo bovino onde é abundante. Por outro lado, a inibição da atividade desta enzima tem sido proposta como abordagem terapêutica para o tratamento de lesões locais após o envenenamento e em diversas patologias (98, 100, 101). Neste contexto, os resultados do presente estudo representam a caracterização de mais uma Hyase de peçonha animal que possa servir para entender melhor o funcionamento desta enzima no envenenamento.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

A peçonha de *V. dubius* contém uma Hyase de ~43 kDa, sem isoformas. A enzima tem pH ótimo de pH 4 a 5, temperatura ótima de 35 a 40 °C e estabilidade térmica até 60 °C. Sua atividade não é influenciada pela concentração de NaCl e ela tem preferência para o ácido hialurônico como substrato; o V_{max} e K_m para este substrato são 11,4 µg/min e 677,0 µg/ml, respectivamente. A enzima é inibida por flavonóides, principalmente apigenina e naringina, e por soro anti-aracnídico. A Hyase aumenta a permeabilidade vascular em pele dorsal de ratos.

Baseado nestes achados, concluímos que a peçonha de *V. dubius* contém uma Hyase com características físico-químicas e bioquímicas semelhantes a outras Hyases de peçonhas. Esta enzima pode contribuir para alterações locais causadas pela peçonha através de uma ação na microvasculatura da pele.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

1. Platnick NI. The World Spider Catalog, Version 11.5. 2011. Disponível em <http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/COUNTS.html>. [Acesso em 05 de março de 2011]
2. Ruppert EE, Barnes RD, Fox RS. Zoologia dos Invertebrados: uma Abordagem Funcional-Evolutiva. 7ª ed. São Paulo: Roca; 2005. 1028p
3. Bertani R. Revision, cladistic analysis, and zoogeography of *Vitalius*, *Nhandu*, and *Proshapalopus*, with notes on other theraphosine genera (Araneae, Theraphosidae). Arq Zool S Paulo. 2001;36(3):266-350.
4. Foelix, R.F. Biology of Spiders. Cambridge: Harvard University Press; 1982. 330p.
5. Dias SC, Brescovit AD. Note on the behavior of *Pachistopelma rufonigrum* Pocock (Araneae, Theraphosidae, Aviculariinae). Rev Bras Zool. 2003;20(1): 13-7.
6. Costa FG, Perez-Miles F. Reproductive biology of Uruguayan theraphosids (Araneae, Mygalomorphae). J Arachnol. 2002;30(3):571-87.
7. Shillington C. Intersexual differences in resting metabolic rates in the Texas tarantula, *Aphonopelma anax*. Comp Biochem Physiol A Mol Interg Physiol. 2005;124(4):439-45.
8. Rash LD, Hodgson WC. Pharmacology and biochemistry of spider venom. Toxicon. 2002;40(3):225-54.
9. Escoubas P, Rash L. Tarantulas: eight-legged pharmacists and combinatorial chemists. Toxicon. 2004;43(5):555-74.
10. Fontana MD, Lucas HSM, Vital Brazil O. Neuromuscular blocking action of the *Theraphosa blondii* spider venom. J Venom Anim. Toxins 2002;8(2): 317-18.
11. Kalapothakis E, Kushmerick C, Gusmão DR, Favaron GO, Ferreira AJ, Gómez MV, Pinto de Almeida A. Effects of the venom of a mygalomorph spider (*Lasiadora* spp.) on the isolated rat heart. Toxicon. 2003;41(1):23-8.
12. Guette C, Legros C, Tournois G, Goyffon M, Célérier ML. Peptide profiling by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry of the *Lasiadora parahybana* tarantula venom gland. Toxicon. 2006;47(6):640-9.

13. Legros C, Célérier ML, Henry M, Guette C. Nanospray analysis of the venom of the tarantula *Theraphosa leblondi*: a powerful method for direct venom mass fingerprinting and toxin sequencing. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2004; 18(10):1024-32.
14. Friedel T, Nentwig W. Immobilizing and lethal effects of spider venoms on the cockroach and the common mealbeetle. *Toxicon.* 1989;27(3):305-16.
15. Balaji RA, Sasaki T, Gopalakrishnakone P, Sato K, Kini RM, Bay BH. Purification, structure determination and synthesis of covalitoxin-II, a short insect-specific neurotoxic peptide from the venom of the *Coremiocnemis validus* (Singapore tarantula). *FEBS Lett.* 2000;474(2-3):208-12.
16. Wang RI, Yi S, Liang S. Mechanism of action of two insect toxins huwentoxin-III and hainantoxin-VI on voltage-gated sodium channels. *J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)* 2010;11(6):451-7.
17. Deng M, Kuang F, Sun Z, Tao H, Cai T, Zhong L, Chen Z, Xiao Y, Liang S. Jingzhaotoxin-IX, a novel gating modifier of both sodium and potassium channels from Chinese tarantula *Chilobrachys jingzhao*. *Neuropharmacology* 2009;57(2):77-87.
18. Milesescu M, Bosmans F, Lee S, Alabi ARA, Kim J, Swartz KJ. Interactions between lipids and voltage sensor paddles detected with tarantula toxins. *Nat Struct Mol Biol.* 2009;16(10):1080-5.
19. Savel-Niemann A. Tarantula (*Eurypelma californicum*) venom, a multicomponent system. *Hoppe Seyler's Biol. Chem.* 1989;370(5):485-98.
20. Escoubas P, Chamot-Rooke J, Stöcklin R, Whiteley BJ, Corzo G, Genet R, Nakajima T. A comparison of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight and liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry methods for the analysis of crude tarantula venom in the *Pterinochilus* group. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1999;13(18):1861-8.
21. Escoubas P, Corzo G, Whiteley BJ, Celerier ML, Nakajima T. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and high-performance liquid chromatography study of quantitative and qualitative variation in tarantula spider venoms. *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* (2002) 16(5):403-13.
22. Windley MJ, Escoubas P, Valenzuela SM, Nicholson GM. A novel family of insect-selective peptide neurotoxins targeting insect BKCa channels isolated from the venom of the theraphosid spider, *Eucratoscelus constrictus*. *Mol Pharmacol.* 2011; doi:10.1124/mol.110.070540

23. Bosmans F, Martin-Eauclaire MF, Swartz KJ. Deconstructing voltage sensor function and pharmacology in sodium channels. *Nature*. 2008;456(13):202-9.
24. Edgerton GB, Blumenthal KM, Hanck DA. Inhibition of the activation pathway of the T-type calcium channel CaV3.1 by ProTxII. *Toxicon*. 2010;56(4):624-36.
25. Xing Tang X, Yongqun Zhang Y, Weijun Hu W, Dehong Xu D, Huai Tao H, Yang X, Yan Li Y, Jiang L, Liang S. Molecular diversification of peptide toxins from the tarantula *Haplopelma hainanum* (*Ornithoctonus hainana*) venom based on transcriptomic, peptidomic, and genomic analyses. *J Proteome Res*. 2010;9(5):2550-64.
26. Moore S, Smyth WF, Gault VA, O'Kane Eand, McClean S. Mass spectrometric characterisation and quantitation of selected low molecular mass compounds from the venom of *Haplopelma lividum* (Theraphosidae). *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2009;23(12):1747-55.
27. Grishin E. Polypeptide neurotoxins from spider venoms. *Eur J Biochem*. 1999;264(2):276-80.
28. Bode F, Sachs F, Franz MR. Tarantula peptide inhibits atrial fibrillation. *Nature*. 2001;409(6816):36.
29. Feng L, Gao R, Gopalakrishnakone P. Isolation and characterization of a hyaluronidase from the venom of Chinese red scorpion *Buthus martensi*. *Comp Biochem Physiol*. 2008;148(3):250-7.
30. Favilli G. Occurrence of spreading factors and some properties of hyaluronidases in animals, parasites and venoms. In: Buckley EE, Porges N (eds.) *Venoms*. Washington, DC: American Association for the Advancement of Science (Publication number 44), 1956. pp. 281-9.
31. Jaques R. The hyaluronidase content of animal venoms. In: Buckley EE, Porges N (eds.) *Venoms*. Washington, DC: American Association for the Advancement of Science (Publication number 44), 1956. pp. 291-3.
32. Boquet P, Izard Y, Detrait J. Recherches sur le facteur de diffusion des venins de serpents. *C R Séanc Soc Biol*. 1958;152(10):1363-5.
33. Tan NH, Ponnudurai G. Comparative study of the enzymatic, hemorrhagic, procoagulant and anticoagulant activities of some animal venoms. *Comp Biochem Physiol*. 1992a;103C(2):229-302.
34. Girish KS, Kemparaju K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. *Life Sci*. 2007;80(21):1921-43.

35. Bertoni-da-Silveira R, Chaim OM, Mangili OC, Gremski W, Dietrich CP, Nader HB, Veiga SS. Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom are endo- β -N-acetyl-d-hexosaminidases hyaluronidases. *Toxicon*. 2007;49(6): 758-68.
36. Nagaraju S, Devaraja S, Kemparaju K. Purification of hyaluronidase from *Hippasa partita* (funnel web spider) venom gland extract. *Toxicon*. 2007;50(3): 383-93.
37. Wright RP, Elgert KD, Campbell BJ, Barrett JT. Hyaluronidase and esterase activities of the venom of poisonous brown recluse spider. *Arch Biochem Biophys*. 1973;159(1):415-26.
38. Morey SS, Kiran KM, Gadag JR. Purification and properties of hyaluronidase from *Palamneus gravimanus* (Indian black scorpion) venom. *Toxicon*. 2006;47(2):188-95.
39. Pessini AC, Takao TT, Cavalheiro EC, Vichnewski W, Sampaio SV, Giglio JR, Arantes EC. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. *Toxicon*. 2001;39(10):1495-505.
40. Allalouf D, Ber A, Ishay J. Hyaluronidase activity of extracts of venom sacs of a number of Vespinae (Hymenoptera). *Comp Biochem Physiol*. 1972;43B(1):119-23.
41. Schmidt JO, Blum MS, Overal WL. Comparative enzymology of venoms from stinging hymenoptera. *Toxicon*. 1986;24(9):907-21.
42. Poh CH, Yuen R, Chung MC, Khoo HE. Purification and partial characterization of hyaluronidase from stonefish (*Synanceja horrida*) venom. *Comp Biochem Physiol B*. 1992;101(1-2):159-63.
43. Pukrittayakamee S, Nontprasert A, White NJ, Warrell DA, Bunnag D. Characterization of a monoclonal antibody that neutralizes the hyaluronidase activity of Russell's viper venom. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1990;21(2):231-7.
44. Tan NH, Poh CH, Tan CS. The lethal and biochemical properties of *Bungarus candidus* (Malayan krait) venom and venom fractions. *Toxicon*. 1989;27(9): 1065-70.
45. Tan NH, Ponnudurai G. A comparative study of the biological properties of krait (genus *Bungarus*) venoms. *Comp Biochem Physiol*. 1990a;95C(1):105-9.
46. Tan NH, Ponnudurai G. A comparative study of the biological activities of venoms from snakes of the genus *Agkistrodon* (moccasins and copperheads). *Comp Biochem Physiol*. 1990b;95B(3):577-82.

47. Tan NH, Ponnudurai G. A comparative study of the biological properties of Australian elapid venoms. *Comp Biochem Physiol.* 1990c;97C(1):99-106.
48. Tan NH, Ponnudurai G. A comparative study of the biological activities of rattlesnake (genera *Crotalus* and *Sistrurus*) venoms. *Comp Biochem Physiol.* 1991a;98C(2-3):455-61.
49. Tan NH, Ponnudurai G. A comparative study of the biological properties of *Dendroaspis* (mamba) snake venoms. *Comp Biochem Physiol.* 1991b; 99C(3):463-6.
50. Tan NH, Ponnudurai G. A comparative study of the biological properties of venoms of some Old World vipers (Subfamily Viperinae). *Int J Biochem.* 1992b;24(2):331-6.
51. Queiroz GP, Pessoa LA, Portaro FC, Furtado MF, Tambourgi DV. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. *Toxicon.* 2008;52(8):842-51.
52. Tu AT, Hendon RR. Characterization of lizard venom hyaluronidase and evidence for its action as a spreading factor. *Comp Biochem Physiol.* 1983; 76B(2):377-87.
53. Duran-Reynals F. The invasion of the body by animal poisons. *Science.* 1936;83(2151):286-7.
54. Duran-Reynals F. Content in spreading factor and toxins in organs and poisonous secretions of snakes. *Proc Soc Exp Biol.* 1938;38:763-5.
55. Madinaveitia J. Studies on diffusing factors. *Biochem J.* 1939;33(9):1470-7.
56. Madinaveitia J. Diffusing factors. 7. Concentrations of the mucinase from testicular extracts and from *Crotalus atrox* venom. *Biochem J.* 1941;35(4):447-52.
57. Tarabini-Castellani G. Recent investigations of diffusion factors in snake venom: specificity of the neutralization with immune serum. *Boll Inst Sieroterap Milan.* 1940;19:332-7.
58. Kreil G. Hyaluronidases – a group of neglected enzymes. *Protein Sci.* 1995;4(9):1666-9.
59. Lokeshwar VB, Selzer MG. Hyaluronidase: both a tumor promoter and suppressor. *Semin Cancer Biol.* 2008;18(4):281-7.
60. Enzyme Nomenclature (2011) Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Disponível em

<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/2/1/35.html>. [Acessado em 14 de dezembro de 2009.]

61. Markovic-Housley Z, Miglierini G, Soldatova L, Rizkallah PJ, Muller U, Schirmer T. Structure of hyaluronidase, a major allergen of bee venom. *Structure* 2000;8(10):1025-35.
62. Kaiser E. The enzymatic activity of spider venom. *Mem Inst Butantan*. 1953;25(1):35-9.
63. Kaiser E. Enzymatic activity of spider venoms. In: Buckley EE, Porges N (eds.) *Venoms*. Washington, DC: American Association for the Advancement of Science (Publication number 44), 1956. pp. 91-3.
64. Rocha-e-Silva TAA, Sutti R, Hyslop S. Milking and partial characterization of venom from the Brazilian spider *Vitalius dubius* (Theraphosidae). *Toxicon*. 2009;53(1):153-61.
65. Kuhn-Nentwig L, Schaller J, Nentwig W. Purification of toxic peptides and the amino acid sequence of CSTX-1 from the multicomponent venom of *Cupiennius salei* (Areneae: Ctenidae). *Toxicon*. 1994;32(3):287-302.
66. Young AR, Pincus SJ. Comparison of enzymatic activity from three species of necrotizing arachnids in Australia: *Loxosceles rufescens*, *Badumma insignis* and *Lampona cylindrata*. *Toxicon*. 2001;39(2-3):391-400.
67. Barbaro KC, Knysak I, Martins R, Hogan C, Winkel K. Enzymatic characterization, antigenic cross reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. *Toxicon*. 2005;45(4):489-99.
68. Schanbacher FL, Lee CK, Wilson DE, Odell GV. Purification and characterization of tarantula, *Dugesiella hentzi* (Girard) venom hyaluronidase. *Comp Biochem Physiol*. 1973;44B(2):389-96.
69. Lu G, Kochoumian L, King TP. Sequence identity and antigenic cross-reactivity of white face hornet venom allergen, also a hyaluronidase, with other proteins. *J Biol Chem*. 1995;270(9):4457-65.
70. Kolarich D, Léonard R, Hemmer W, Altmann F. The N-glycans of yellow jacket venom hyaluronidases and the protein sequence of its major isoform in *Vespula vulgaris*. *FEBS J*. 2005;272(20):5182-90.
71. Lucas S. Spiders in Brazil. *Toxicon*. 1988;26(9):759-72.

72. Lucas S, da Silva Junior PI, Bertani R, Cardoso H. Mygalomorph spider bites: a report on 91 cases in the state of São Paulo, Brazil. *Toxicon*. 1994;32(10):1211-5.
73. Isbister GK, Seymour JE, Gray MR, Raven RJ. Bites by spiders of the family Theraphosidae in humans and canines. *Toxicon*. 2003;41(4):519-24.
74. Escoubas P. Molecular diversification in spider venoms: a web of combinatorial peptide libraries. *Mol Divers*. 2006;10(4):545-54.
75. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-75.
76. Hames BD. One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In: Hames BD, Rickwood D (eds.). *Gel Electrophoresis of Proteins – a Practical Approach*. 2nd ed. Oxford:IRL Press, 1990. pp 1-147.
77. Cevallos MA, Navarro-Duque C, Varela JM, Alagon AC. Molecular mass determination and assay of venom hyaluronidases by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Toxicon*. 1992;30(8):295-30.
78. Di Ferrante N. Turbidimetric measurement of acid mucopolysaccharides and hyaluronidase activity. *J Biol Chem*. 1956;220(1):303-6.
79. Segel I. *Biochemical Calculations*. New York: John Wiley & Sons, 1972. 454p
80. Reissig JL, Strominger JL, Leloir LF. A modified colorimetric method for the estimation of *N*-acetylamino sugars. *J Biol Chem*. 1955;217(2):959-66.
81. Mello SM, Linardi A, Rennó AL, Tarsitano CA, Pereira EM, Hyslop S. Renal kinetics of *Bothrops alternatus* (urutu) snake venom in rats. *Toxicon* 2010;55(2-3):470-80.
82. Costa SK, de Nucci G, Antunes E, Brain SD. *Phoneutria nigriventer* spider venom induces oedema in rat skin by activation of capsaicin sensitive sensory nerves. *Eur J Pharmacol*. 1997;339(2-3):223-6.
83. Mio K, Stern R. Inhibitors of the hyaluronidases. *Matrix Biol*. 2002;21(1):31-7.
84. Elliott WB. Chemistry and immunology of reptilian venoms. In: Gans C, Gans KA (eds.). *Biology of the Reptilia*. Vol 8. Physiology B. New York: Academic Press, 1978. pp. 163-436.
85. Kemeny DM, Dalton N, Lawrence AJ, Pearce FL, Vernon CA. The purification and characterisation of hyaluronidase from the venom of the honey bee, *Apis mellifera*. *Eur J Biochem*. 1984;139(2):217-23.

86. Ng HC, Ranganathan S, Chua KLK, Khoo HE. Cloning and molecular characterization of the first aquatic hyaluronidase, SFHYA1, from the venom of stonefish (*Synanceja horrida*). *Gene* 2005;346:71-81
87. Harrison RA, Ibison F, Wilbraham D, Wagstaff SC. Identification of cDNAs encoding viper venom hyaluronidases: Cross-generic sequence conservation of full-length and unusually short variant transcripts. *Gene* 2007;392(1-2):22-33
88. Feng L, Gao R, Meng J, Gopalakrishnakone P. Cloning and molecular characterization of BmHYA1, a novel hyaluronidase from the venom of Chinese red scorpion *Buthus martensii* Karsch. *Toxicon* 2010;56(3):474-9
89. Madokoro M, Ueda A, Kiriake A, Shiomi K. Properties and cDNA cloning of a hyaluronidase from the stonefish *Synanceia verrucosa* venom. *Toxicon* 2011, 4151_proof
90. Girish KS, Shashidharamurthy R, Nagaraju S, Gowda TV, Kemparaju K. Isolation and characterization of hyaluronidase, a "spreading factor" from Indian cobra (*Naja naja*) venom. *Biochimie*. 2004;86(3):193-202.
91. Gouveia AICB, Bertoni da Silveira R, Nader HB, Dietrich CP, Gremski W, Veiga SS. Identification and partial characterization of hyaluronidases in *Lonomia obliqua* venom. *Toxicon*. 2005;45(4):403-10.
92. Kudo K, Tu AT. Characterization of hyaluronidase isolated from *Agkistrodon contortrix contortrix* (southern copperhead) venom. *Arch Biochem Biophys*. 2001;386(2):154-62.
93. Meyer MF, Kreil G, Aschauer H. The soluble hyaluronidase from bull testes is a fragment of membrane-bound PH-20 enzyme. *FEBS Lett*. 1997;413(2):385-8.
94. Kuppusamy UR, Khoo HE, Das NP. Structure-activity studies of flavonoids as inhibitors of hyaluronidase. *Biochem Pharmacol*. 1990;40(2):397-401.
95. Kuppusamy UR, Das NP. Inhibitory effects of flavonoids on several venom hyaluronidases. *Experientia*. 1991;47(11-12):1196-200.
96. Gené JA, Gomez M, Gutiérrez JM, Cerdas L. Neutralization of hyaluronidase and indirect hemolytic activities by antivenom of Costa Rica snake venoms by a polyvalent antivenom. *Toxicon*. 1985;23(6):1015-8.
97. Esquisatto LCM, Costa SKP, Camargo EA, Ribela MTCP, Brain SD, De Nucci G, Antunes E. The plasma protein extravasation induced by adenosine and its analogues in the rat dorsal skin: evidence for the involvement of capsaicin sensitive primary afferent neurones and mast cells. *Br J Pharmacol*. 2001;134(1):108-15.

98. Girish KS, Kemparaju K. Inhibition of *Naja naja* venom hyaluronidase: role in the management of poisonous bite. *Life Sci.* 2006;78(13):1433-40.
99. Laugier JP, Shuster S, Rosdy M, Csoka AB, Stern R, Maibach HI. Topical hyaluronidase decreases hyaluronic acid and CD44 in human skin in reconstituted human epidermis: evidence that hyaluronidase can permeate the stratum corneum. *Br J Dermatol.* 2000;142(2):226-33.
100. Kemparaju K, Girish KS. Snake venom hyaluronidase: a therapeutic target. *Cell Biochem Funct.* 2006;24(1):7-12.
101. Girish KS, Kemparaju K, Nagaraju S, Vishwanath BS. Hyaluronidase inhibitors: a biological and therapeutic perspective. *Curr Med Chem.* 2009;6(18):2261-88.

ANEXO



CEUA/Unicamp

**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp**

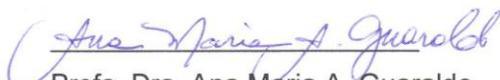
CERTIFICADO

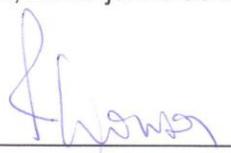
Certificamos que o Protocolo nº **2167-1**, sobre "**Purificação e caracterização da enzima hialuronidase presente na peçonha da caranguejeira *Vitalius dubius* (Araneae, Theraphosidae)**", sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Stephen Hyslop / Rafael Sutti**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em **28 de junho de 2010**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **2167-1**, entitled "**Purification and characterization of hyaluronidase from *Vitalius dubius* (Araneae, Theraphosidae) venom**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **June 28, 2010**.

Campinas, 28 de junho de 2010.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva