

Este estudo — intitulado objetivo ob obtemperado
é encarregado de comprovar se existem e obtemperar ob estabilidade noq
-mínimos ob obter o efeito sup (GI) salvo ob obter o sup efeito para
obtendo em ob obter.

612.3141

PROTEASE DO VENENO DA *BOTHROPS JARARACA*

POR

ARMANDO TABORDA & LAURA C. TABORDA

O papel das enzimas proteolíticas ou proteases dos venenos de cobra começa, à luz de recentes investigações, a assumir aspecto de grande importância, especialmente na aplicação dos venenos em terapêutica.

Assim é que IYENGAR, SEHRA & MUKHERJEE (1) procuraram explicar, pela presença destas enzimas no veneno, o fato observado por CHOPRA, MUKHERJEE & CHOWHAN (2) de variações da viscosidade e tensão superficial do sangue de macacos (*Silenus rhesus*) após injeção de veneno de *Naja tripudians* e logo uma normalização em cerca de 24 horas.

Admitem eles que as enzimas proteolíticas do veneno digerem o excesso de proteínas que ocasiona tais variações, excesso esse devido, possivelmente, a um aumento da concentração de proteínas no plasma pela própria injeção de veneno.

No estudo da protease do veneno da *Cobra* chamam a atenção para a presença de um inibidor dessa protease que, associado a uma baixa concentração do veneno, acreditam ser de grande interesse no tratamento do câncer.

Imaginam que esses fatores possam ser os responsáveis pela digestão seletiva das células dos tumores pelo veneno, sem afetar o tecido original.

Diante desses estudos e de inúmeros outros, que nos mostram a notável importância das enzimas proteolíticas dos venenos de cobras fomos levados a estudar as proteases das serpentes brasileiras, começando pelo da *Bothrops jararaca*, uma das mais frequentes entre nós.

A atividade proteolítica deste veneno, já há muito constatada por LACERDA (3), LAUNOY (4), VITAL BRAZIL & RANGEL PESTANA (5), DELEZENNE (6), CALMETTE (7), NOC (8), HOUSSAY e NEGRETE (9), etc., não fôr até agora identificada sob as leis da atividade enzimática.

Conhecia-se-lhe apenas a propriedade de digerir proteínas como gelatina, fibrina, caseína, albumina de ovo, etc., e algumas influências de alcalis, ácidos, sais, etc. sobre esta digestão, porém investigações puramente qualitativas.

Estudamô-la, então, sob as leis que regem as enzimas, determinando-lhe os ótimos de atividade.

Nossas determinações foram baseadas no aumento de nitrogenio não proteico por hidrolise do caseinato de sodio, segundo a tecnica de IYENGAR, MUKHERJEE & SEHRA, posto que o metodo de BAYLISS (10) que mede a variação da condutividade eletrica não deu bons resultados.

Concentrações otimas do *substratum* e da protease

O *substratum* que usamos, segundo a tecnica de IYENGAR, SEHRA & MUKHERJEE, foi uma solução de caseinato de sodio a 2% (caseina de Hammarsten).

Variando, porém, para percentagens maiores ou menores a concentração do *substratum*, verificamos que precisaríamos variar proporcionalmente a percentagem de enzima e o nosso interesse era exatamente usar concentrações mais baixas.

A nossa protease comportou-se magnificamente numa concentração de 0,01% sobre um *substratum* de caseinato de sodio a 1%.

pH otimo da protease

Para a determinação do pH otimo, fizemos variar o pH do *substratum* de 2 a 10 e dosamos o aumento do nitrogenio não proteico por micro-Kjeldhal.

Para tal, empregamos uma solução de caseinato de sodio a 2% como *substratum*.

5 ccs. deste *substratum* ajustados aos pH de 2 a 10 com H_2SO_4 N/10 ou NaOH N/10 foram postos em diversos tubos de ensaio, adicionados de 2 ccs. de "buffer" de mesmo pH e 1 cc. de solução de veneno seco 0,1% e completado a 10 ccs. o volume final.

A concentração final do veneno é então de 0,01% e do caseinato 1%.

Após, 2 ccs. são retirados, a caseina precipitada por 5 ccs. de ácido tricloroacético a 10% e no filtrado dosado o nitrogenio não proteico inicial.

Os diversos tubos foram postos em estufa a 35°C por 24 horas após adição de 0,05 cc. de toluol como antisепtico.

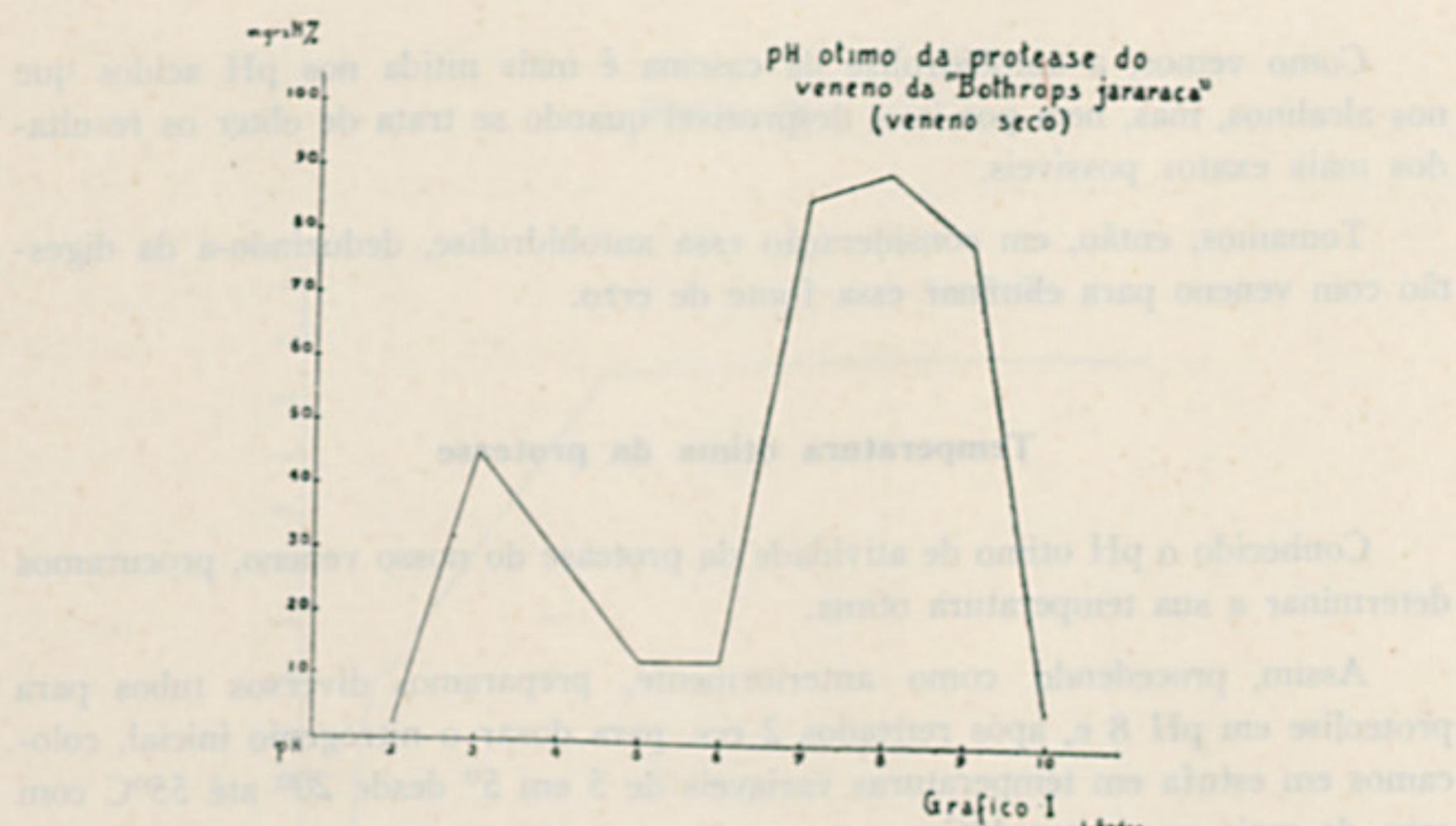
Exatamente ao completar as 24 horas de digestão, mais 2 ccs. foram retirados de cada tubo, procedendo-se como anteriormente para a dosagem do nitrogenio.

Pelo aumento deste nitrogenio podemos apreciar o grau da proteólise nos diversos pH.

Queremos observar aqui que todas as nossas dosagens foram precedidas de provas em branco e os nossos resultados representam uma media de 3 dosagens.

O acréscimo de nitrogenio não proteico em mg.% pode ser apreciado pelo Gráfico I.

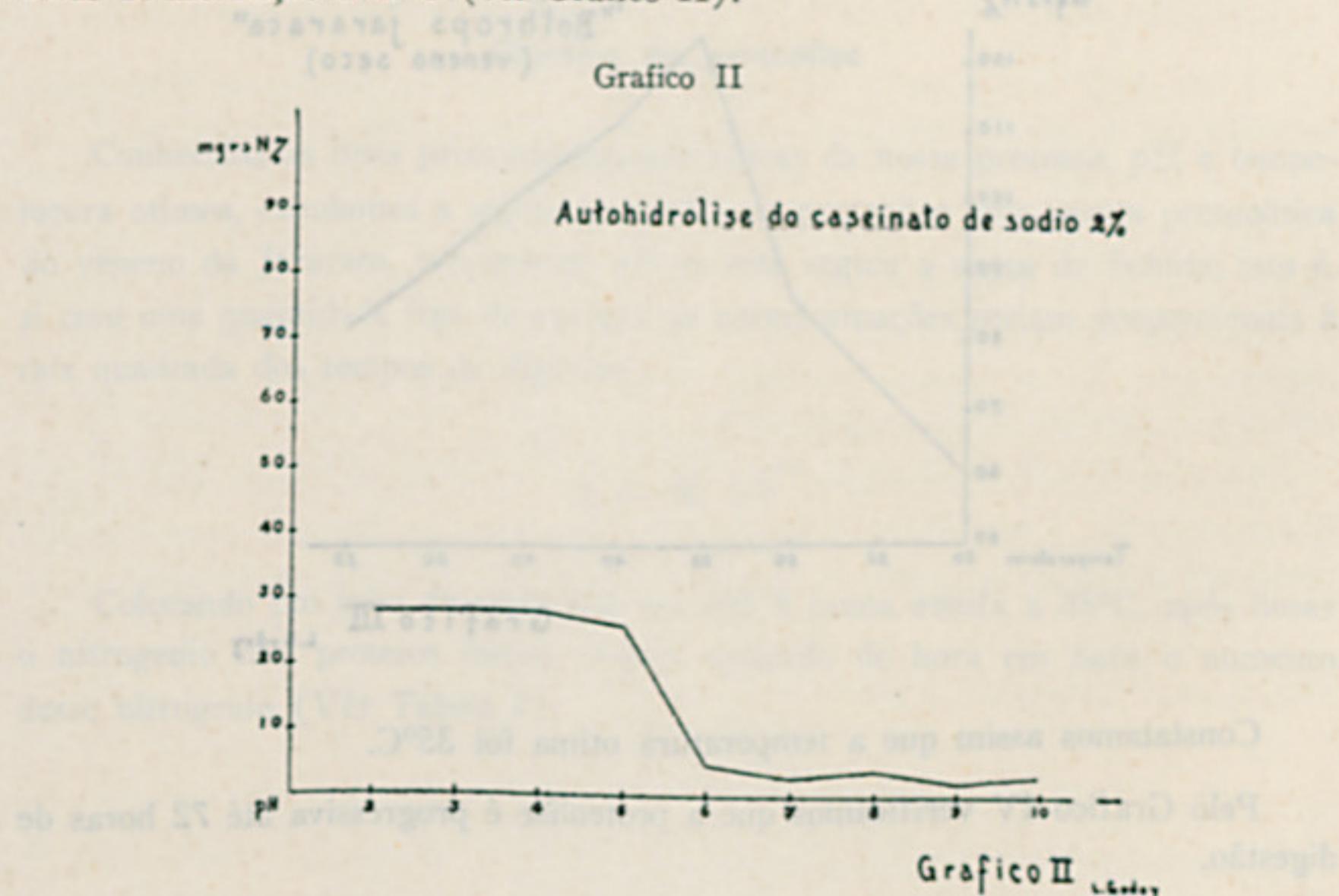
Grafico I — pH ótimo da protease do veneno da Bothrops jararaca (veneno seco)



Verificamos por este Grafico que o otimo de atividade da nossa enzima é em pH 8.

Conhecido, porém, o fato de que a propria caseina se autodigere (11), procuramos conhecer o grau dessa autohidrolise nos diversos pH de 2 a 10, tal como fizemos para o estudo da protease do veneno da Jararaca.

Verificamos então o seguinte aumento de nitrogenio não proteico em 24 horas de incubação a 35°C (vêr Grafico II).



Como vemos, a autohidrolise da caseina é mais nítida nos pH ácidos que nos alcalinos, mas, nem por isso, desprezível quando se trata de obter os resultados mais exatos possíveis.

Tomamos, então, em consideração essa autohidrolise, deduzindo-a da digestão com veneno para eliminar essa fonte de erro.

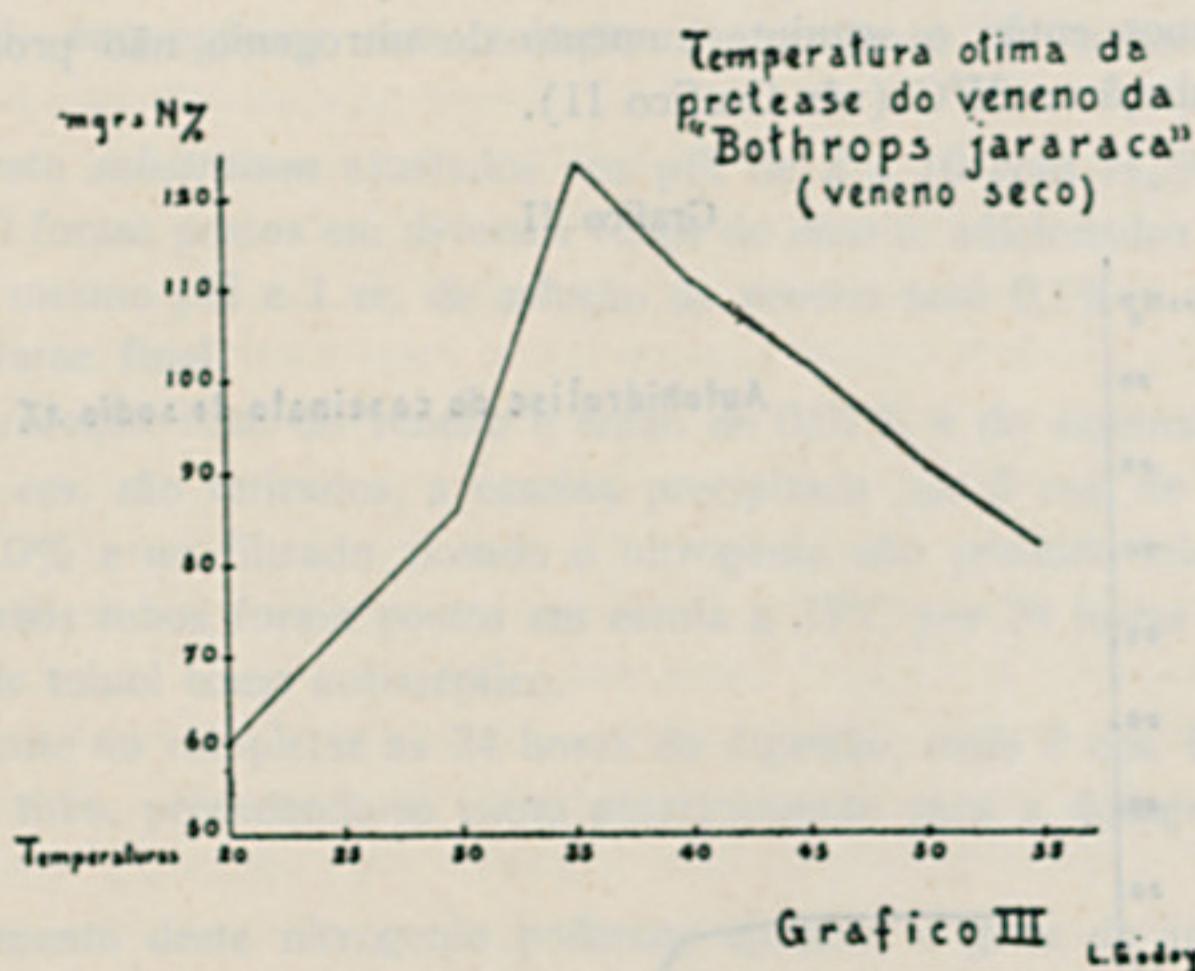
Temperatura otima da protease

Conhecido o pH ótimo de atividade da protease do nosso veneno, procuramos determinar a sua temperatura ótima.

Assim, procedendo como anteriormente, preparamos diversos tubos para proteólise em pH 8 e, após retirados 2 ccs. para dosar o nitrogênio inicial, colocamos em estufa em temperaturas variáveis de 5 em 5° desde 20° até 55°C com erro de mais ou menos 1°C.

O aumento de nitrogênio não proteico em mg.% podemos apreciar no Gráfico III.

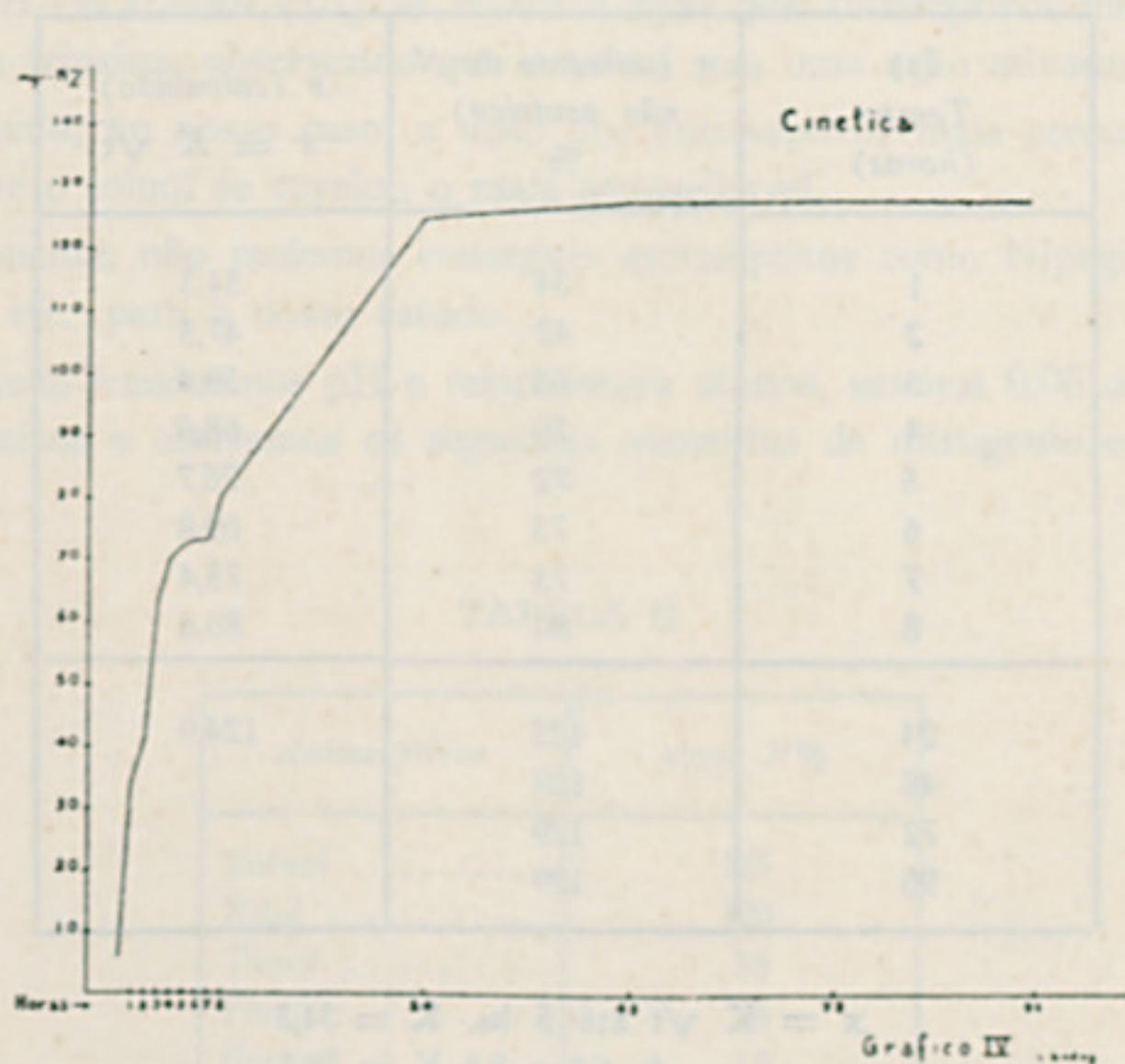
Gráfico III



Constatamos assim que a temperatura ótima foi 35°C.

Pelo Gráfico IV verificamos que a proteólise é progressiva até 72 horas de digestão.

Grafico IV

**Cinetica da proteolise**

Conhecidas as duas principais características da nossa protease, pH e temperatura otimos, estudamos a seguir a cinetica da proteolise pela enzima proteolitica do veneno da Jararaca, procurando vér se esta seguia a regra de Schütz, isto é, si com uma quantidade fixa de enzima, as transformações seriam proporcionais à raiz quadrada dos tempos de digestão:

$$x = K \sqrt{t}$$

Colocando um tubo de proteolise em pH 8 numa estufa a 35°C, após dosar o nitrogenio não proteico inicial, fomos dosando de hora em hora o aumento desse nitrogenio (Vêr Tabela I).

TABELA I

(t) Tempo (horas)	x (aumento de N não proteico) %	x (calculado) $x = K \sqrt{t}$
1	34	34,3
2	42	47,5
3	63	59,4
4	70	68,6
5	72	76,7
6	73	69,8
7	73	75,4
8	80	80,6
24	125	124,9
48	128	
72	129	
96	129	

$$x = K \sqrt{t} \text{ até } 5 \text{ hs. } K = 34,3$$

$$\text{da } 6.^{\text{a}} \text{ a } 8.^{\text{a}} \text{ } K = 28,5$$

$$\text{após } 24 \text{ hs. } K = 25,5$$

e daí vai baixando para 15, após 72 hs. de digestão, quando não há mais hidrolise.

Verificando que a partir da quinta hora a proteólise prosseguia lentamente, continuamos as nossas dosagens até a oitava hora e, depois, só ao completar 24, 48, 72 e 96 horas.

Depois de 72 horas a proteólise estacionou, possivelmente, devido à formação de algum inibidor durante a digestão. Aliás, WALDSCHMIDT-LEITZ (12), citando ARRHENIUS, diz que a velocidade de reação não é unicamente proporcional à concentração do *substratum* existente neste tempo, mas é, além disto, inversamente proporcional à quantidade já transformada.

E' interessante observarmos que, tal como no exemplo citado por WALDSCHMIDT-LEITZ, a velocidade da proteólise pelo veneno de Jararaca corre regularmente até a quinta hora, isto é, exatamente até 50% de hidrolise do *substratum*.

Antissepticos

Sempre que estudamos a ação de uma enzima, temos necessidade do emprego de um antisseptico para evitar as ações bacterianas.

Não é, porém, indiferente que se empregue tal ou qual antisепtico.

Ha os que funcionam como verdadeiros ativadores e outros como inibidores.

Já E. H. WALTERS (13) se refere à ação dos antisепticos na digestão da caseina pela tripsina, observando que o toluol tem uma ação ativante.

Estudando, no nosso caso, a ação dos antisепticos mais comuns, pudemos observar que o toluol se revelou o mais aconselhável.

Infelizmente, não pudemos conseguir antisепticos como Nipagina, Nipazol, Mertiolato, etc. para o nosso estudo.

Realizando ensaios nos pH e temperatura ótimos, usamos 0,05 cc. dos diversos antisепticos e obtivemos os seguintes aumentos de nitrogenio constantes da Tabela II.

TABELA II

<i>Antisепticos</i>	<i>mgs. N%</i>
Toluol	125
Xilol	120
Timol	95
Fenol	94
Formol	14
Cresol	14

Podemos dizer, apreciando os resultados da Tabela I, que o formol e o cresol funcionam como verdadeiros inibidores da protease do veneno.

Ativadores e inibidores

Pesquisando, sob todos os aspectos, a natureza da nossa protease, procuramos submetê-la à ação de ativadores e inibidores específicos de proteases conhecidas.

Realizamos as ativações e inibições nos pH e temperatura ótimos (pH 8 a 35°C.), incubando em estufa a 35°C por 24 horas.

Pelo bicloreto de mercurio obtivemos uma inibição completa, empregando 1 cc. de solução 0,1% de $HgCl_2$.

Pelo KCN (1 cc. sol. 0,1%) pudemos constatar apenas um aumento de 18 mgs. N% e pelo H_2S (1 cc. sol. saturada), um aumento de 94 mgs..

Finalmente, pela fervura durante 1 hora obtivemos uma grande diminuição de atividade, pois, o aumento de nitrogenio foi apenas de 8 mgs. N%.

Fazendo agir, porém, 1 cc. de uma solução da mucina do proprio veneno, após 6 vezes lavada em agua distilada, obtivemos uma pequena ativação, isto é, um aumento de 132 mgs. N%..

Fazendo ainda agir uma solução 0,1% de acido ascorbico, obtivemos um aumento de 131 mgs. N%. Na Tabela III podemos apreciar melhor estes resultados, calculados em % de inibição e ativação.

TABELA III

Inibidores e Ativadores	mgs. N%	%
KCN	18	85,5 de inibição
Ebulição	8	93,5 " "
HgCl ₂	1	99,2 " "
H ₂ S	94	24,2 " "
Acido ascorbico....	131	5,6 " ativação
Mucina	132	6,4 " "

Constatada a inibição por HgCl₂, KCN e H₂S verificamos que a protease do veneno da Jararaca não é do genero das papainases e pelo seu pH otimo em 8 tambem não é do genero das pepsinases, mas, tal como a protease do veneno da *Cobra*, pertence ao genero das triptases.

Desejavamos verificar tambem a ação da enteroquinasa sobre a protease do veneno, mas não pudemos obter tal produto na praça.

Resolvemos então prepará-lo e voltaremos noutro artigo a tratar dos ativadores e inibidores.

Hidrolise pela tripsina

Pela semelhança de ação entre as triptases e a protease do veneno da Jararaca, procedemos tambem à hidrloise da caseina pela tripsina, nas mesmas condições em que para o veneno.

5 ccs. de caseinato de sodio, ajustados aos diversos pH de 2 a 10 com $H_2SO_4N/10$ ou $NaOH N/10$, foram postos em diversos tubos, adicionando-se 2 ccs. de "buffer" dos diversos pH, 1 cc. de solução de tripsina a 0,1% e completamos o volume a 10 ccs., de sorte que a concentração final da tripsina fosse de 0,01% e do caseinato 1%.

Dosando o nitrogenio não proteico inicial e após 24 horas de digestão a $35^{\circ}C$, verificamos o seguinte aumento (vêr Grafico V):

Grafico V

pH ótimo da hidrolise do
caseinato de sodio 2%
pela tripsina

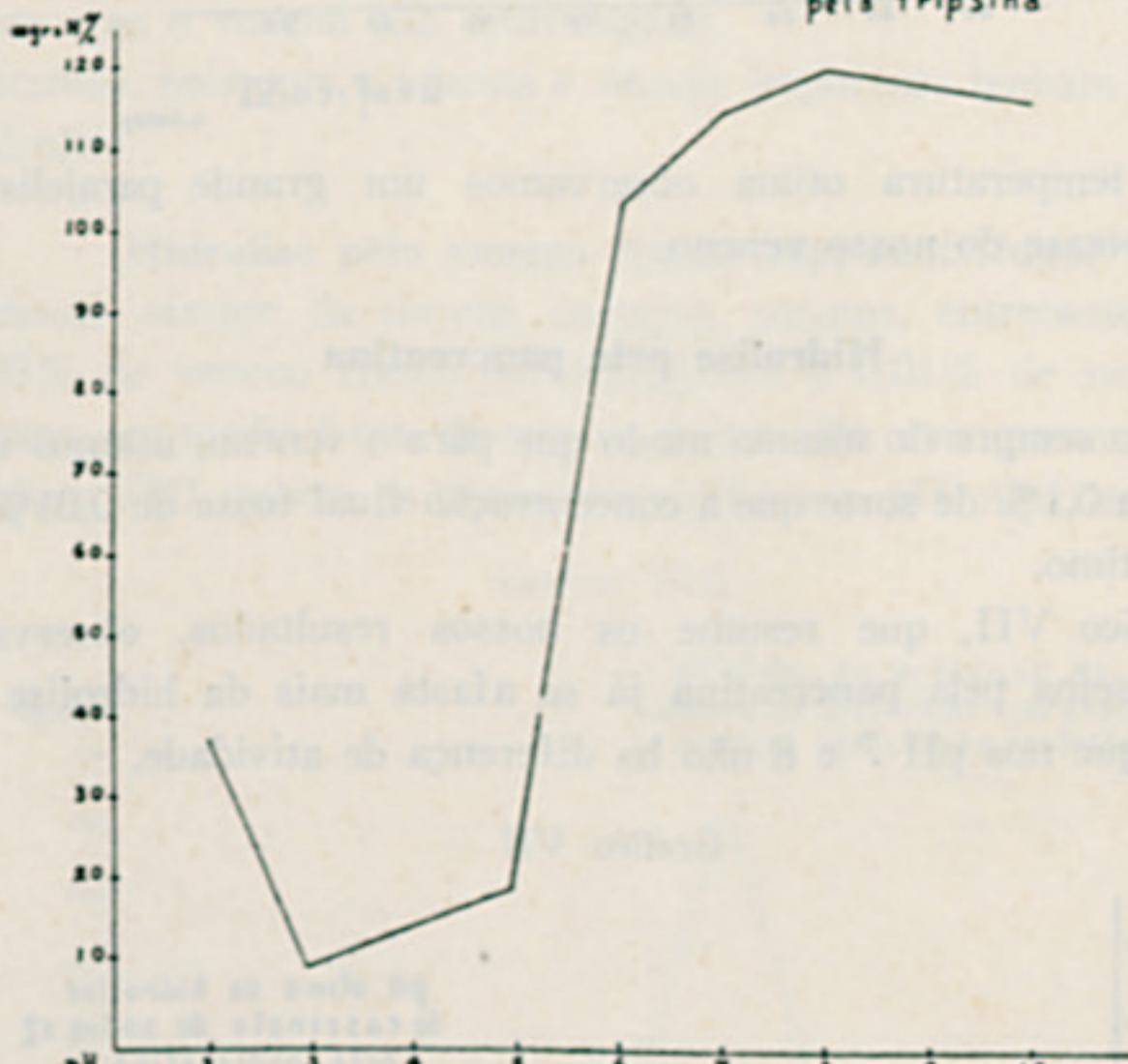


Grafico V

Como vemos pelo Grafico V, também para a tripsina obtivemos um ótimo de atividade em pH 8.

Temperatura ótima

Procedendo ainda da mesma maneira que para o veneno, obtivemos a seguinte variação do nitrogenio não proteico, conforme o Grafico VI.

Grafico VI

Temperatura otima da hidrolise
do caseinato de sodio $\pm \%$
pela tripsina

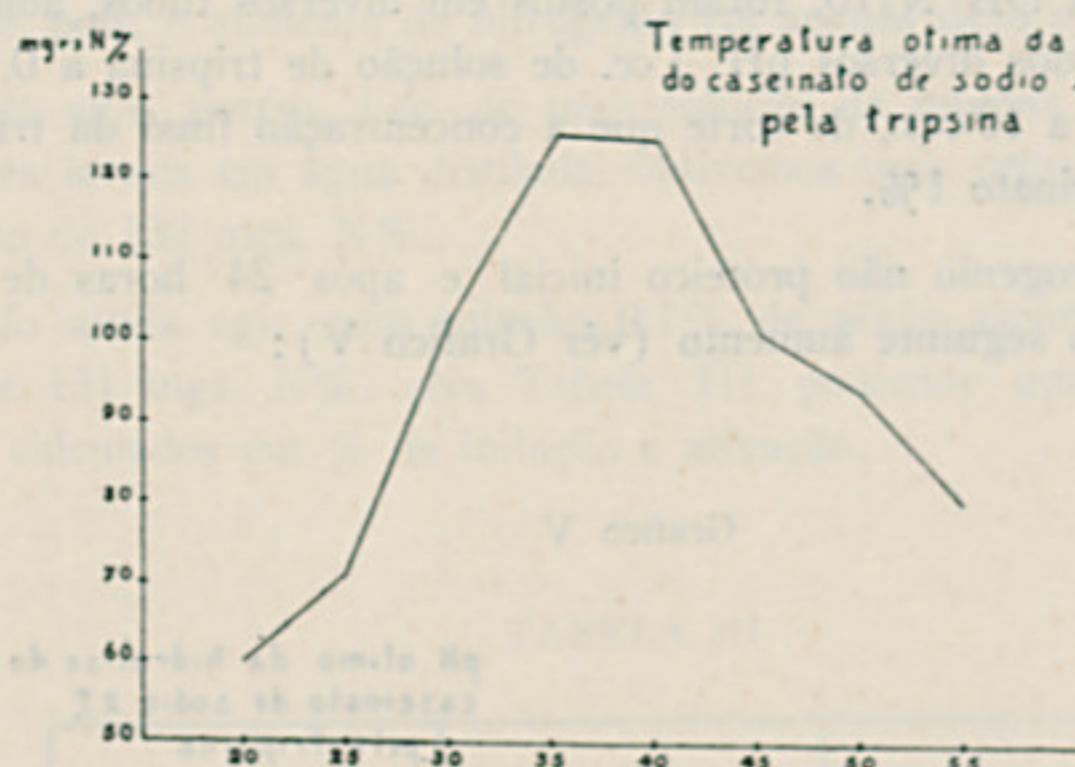


Grafico VI

Ainda na temperatura otima observamos um grande paralelismo entre a tripsina e a protease do nosso veneno.

Hidrolise pela pancreatina

Procedendo sempre do mesmo modo que para o veneno, usamos uma solução de pancreatina a 0,1% de sorte que a concentração final fosse de 0,01% e determinamos o pH otimo.

Pelo Grafico VII, que resume os nossos resultados, observamos que a hidrolise da caseína pela pancreatina já se afasta mais da hidrolise da caseína pelo veneno e que nos pH 7 e 8 não ha diferença de atividade.

Grafico VII

pH otimo da hidrolise
do caseinato de sodio $\pm \%$
pela pancreatina

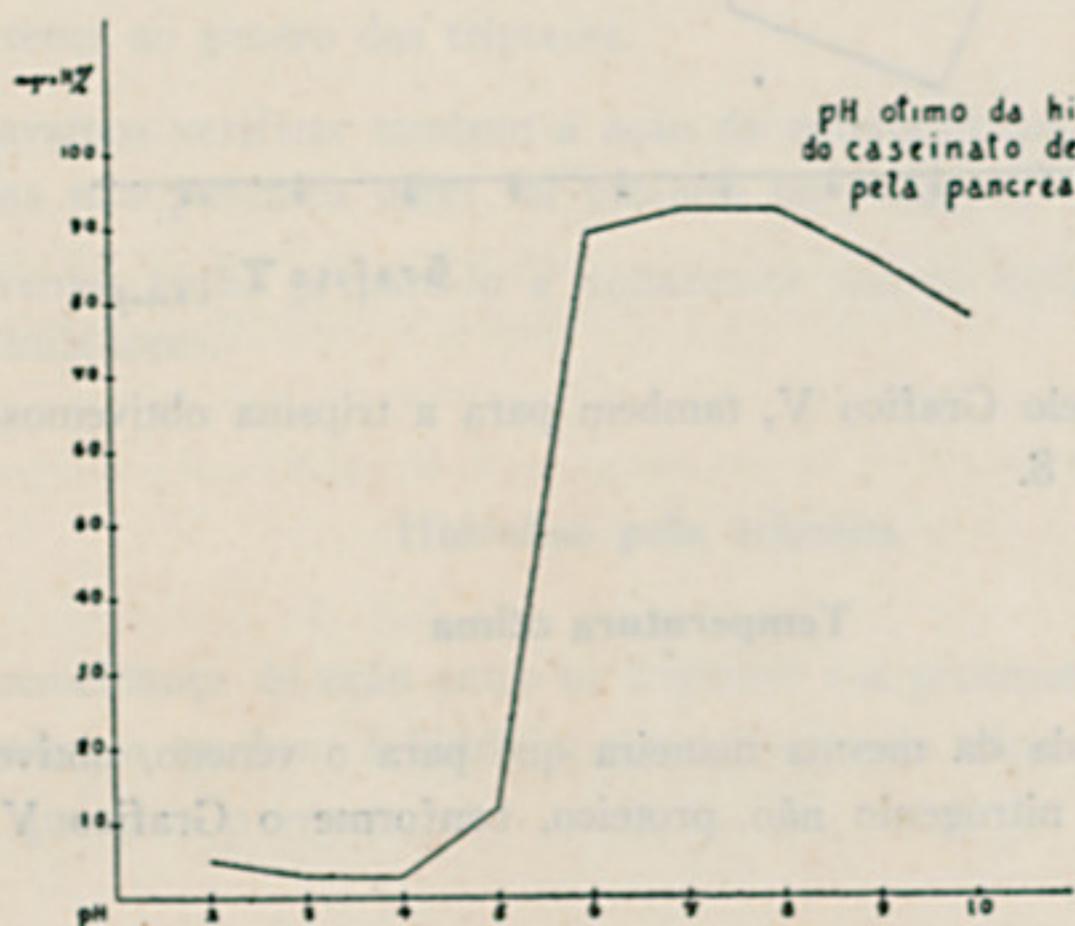


Grafico VII

Até aqui as nossas pesquisas foram feitas com soluções de veneno seco de um "stock" de um ano.

Esse veneno foi dessecado a 37°C e em media 5 ccs. de veneno fresco produzem 1 g. de veneno seco. Antes, porém, da secagem o veneno é centrifugado, separando-se dessa forma a mucina e outras impurezas.

Desejando verificar o comportamento do veneno fresco em relação à sua atividade proteolítica, realizamos digestões pelo veneno centrifugado e sem centrifugar.

Um fato curioso pudemos observar no tocante ao veneno fresco e sem centrifugar.

Embora o pH otimo de atividade seja realmente 8, os resultados da hidrolise com venenos de diferentes extrações não são absolutamente concordantes, e os aumentos de nitrogenio não proteico são bem maiores que com o veneno seco, especialmente com o veneno não centrifugado.

Acreditamos, pois, que a mucina e demais impurezas tenham uma ação ativadora da hidrolise.

Hidrolise pelo veneno fresco sem centrifugar

Procedendo sempre da mesma maneira, usamos, entretanto, 1 cc. de uma solução 0,05% de veneno fresco correspondente a 0,01% de veneno seco, pois, como dissemos, em media 5 ccs. de veneno fresco dão uma grama de veneno seco.

O Grafico VIII mostra os nossos resultados e o pH otimo em 8.

Grafico VIII

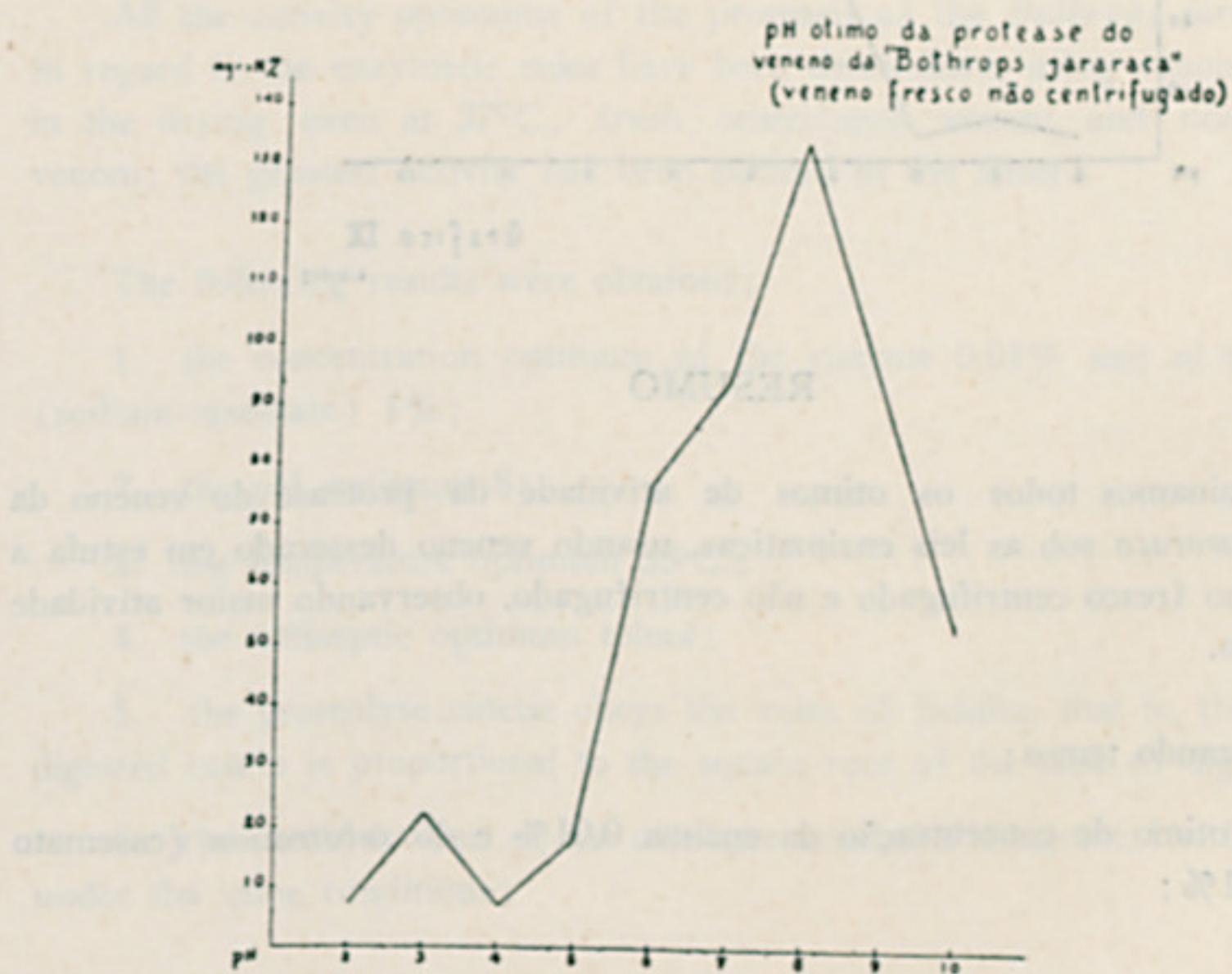


Grafico VIII

Hidrolise pelo veneno fresco centrifugado

Realizamos aqui os nossos ensaios como no caso do veneno sem centrifugar e obtivemos os resultados que se vêm no Grafico IX.

Grafico IX

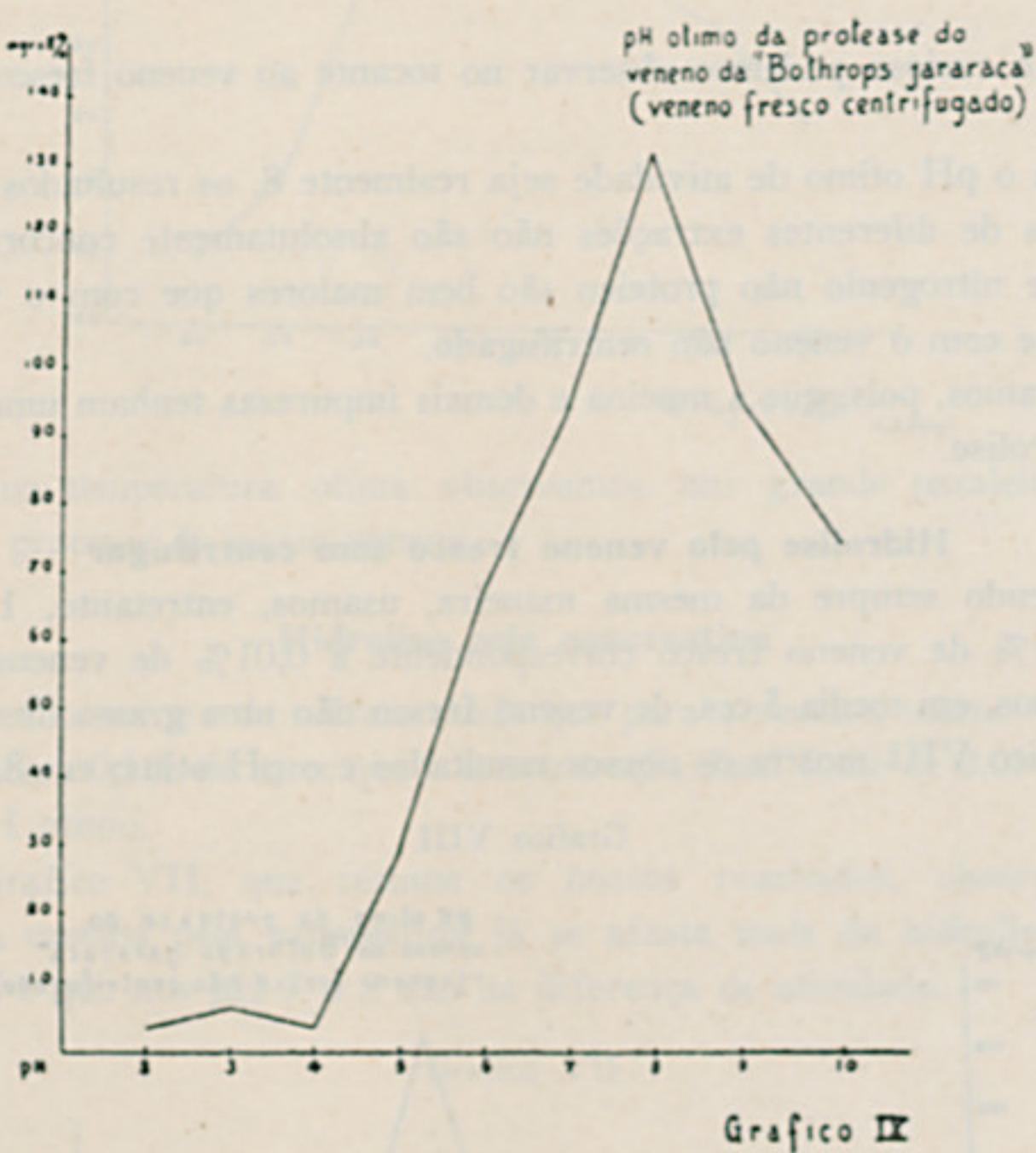


Grafico IX

RESUMO

Determinamos todos os otimos de atividade da protease do veneno da *Bothrops jararaca* sob as leis enzimáticas, usando veneno dessecado em estufa a 37°C, veneno fresco centrifugado e não centrifugado, observando maior atividade neste ultimo.

Sintetizando temos:

- 1) o otimo de concentração da enzima 0,01% e do substratum (caseinato de sodio) 1%;

- 2) o pH otimo 8;
- 3) a temperatura otima 35° C;
- 4) o antisепtico otimo, toluol;
- 5) a cinetica da proteolise obedece à regra de Schütz, ou seja, a caseina digerida é sensivelmente proporcional à raiz quadrada dos tempos de digestão;
- 6) realizamos a autohidrolise do caseinato nas mesmas condições em que serviu de *substratum*;
- 7) estudamos alguns ativadores e inibidores específicos de proteases conhecidas, conseguindo inibições pelo $HgCl_2$, KCN e por ebulação, e ativações pelo ácido ascórbico e pela mucina;
- 8) determinamos, nas mesmas condições que para a protease do veneno, o pH e temperatura otimos da hidrolise do caseinato pela tripsina e o pH pela pancreatina, notando uma grande analogia entre a hidrolise pela tripsina e pelo veneno;
- 9) pelos seus otimos de atividade, suas ativações e inibições, a protease do veneno da *Bothrops jararaca* pertence ao genero das triptases.

ABSTRACT

All the activity optimums of the proteasis of the *Bothrops jararaca* venom in regard to the enzymatic rules have been determined, using venom dehydrated in the drying oven at 37°C., fresh centrifuged venom and non-centrifuged venom; the greatest activity has been noticed in the latter.

The following results were obtained:

1. the concentration optimum of the enzyme 0.01% and of the substract (sodium-caseinate) 1%;
2. the pH optimum 8;
3. the temperature optimum 35°C.;
4. the antiseptic optimum toluol;
5. the proteolyse kinetic obeys the rules of Schütz, that is, the amount of digested casein is proportional to the square root of the time of digestion;
6. the autohydrolysis of the caseinate used as a substract, has been effected under the same conditions;

7. a few specific activators and inhibitors of known proteasis have been studied; inhibition by $HgCl_2$, KCN and boiling, as well as activation by ascorbic acid as mucine have been secured;
8. under the same conditions as for the proteasis of the venom, the optimum pH and temperature for the hydrolysis of the caseinate by trypsin and the pH by the pancreatin have been determined, a great analogy between the hydrolysis by the venom and the trypsin having been observed;
9. on account of its optimum of activity, activations and inhibitions, the proteasis of the *Bothrops jararaca* venom belongs to the tryptasis type.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Aktivitäts-Optima der Protease des *Bothrops jararaca*-Giftes sind unter Berücksichtigung der enzymatischen Gesetze bestimmt worden; die Verwendung von im Trockenschrank bei $37^{\circ}C$ getrocknetem Gift, auszentrifugiertem frischen und unzentrifugiertem Gift erwies grösste Aktivität des letzteren.

1. Das Konzentrations-Optimum des Enzyms 0.01% und des Substraktes (Natrium-Kaseinat) 1%;
2. das pH-Optimum, 8;
3. das Temperatur-Optimum, $35^{\circ}C$;
4. das Antisepticum-Optimum, Toluol;
5. die Kinetik der Proteolyse gehorcht der Regel von Schütz, d. h., das digerierte Kasein ist der Quadrat-Wurzel der Verdauungszeiten deutlich proportional;
6. die Autohydrolyse des Kaseinats, das als Substrakt diente, wurde unter gleichen Bedingungen ausgeführt;
7. einige spezifische Aktivitäts- und Hemmungs-Faktoren bekannter Proteasen wurden untersucht; durch $HgCl_2$, KCN und Kochen wurde Hemmung und durch 1-Ascorbin-Säure und Mucin Aktivierung festgestellt;
8. Unter den gleichen Versuchsbedingungen wie für die Protease des Giftes, wurden pH- und Temperatur-Optima für die Hydrolyse des Kaseinats durch Trypsin und das pH durch Pancreatin bestimmt, wodurch eine grosse Ähnlichkeit zwischen der Hydrolyse des Trypsins und des Giftes festgestellt werden konnte;

9. Nach den Optima der Aktivität, Aktivierung und Hemmung zu schliessen, gehört die Protease des *Bothrops jararaca*-Giftes zu der Klasse der Tryptasen.

BIBLIOGRAFIA

1. *Iyengar, N. K.; Sehra, K. B. & Mukherjee, B.* — Indian J. of Med. Res. 26 (2) : 487. 1938.
2. *Chopra, R. N.; Mukherjee, S. N. & Chowhan, J. S.* — Indian J. of Med. Res. 25 (1) :137. 1397.
3. *Lacerda, J. B.* — Leçons sur le venin des serpents du Brésil :126.1938.
4. *Launoy, L.* — C. R. Acad. Sciences 135:401.1902.
5. *Brasil, Vital & Rangel Pestana, B.* — Coletanea de Trabs. Instituto Butantan 1:151. 1901-07.
6. *Delezene, C.* — Bull. Acad. Med. 1910 (6 Dec.).
7. *Calmette, A.* — Les venins :214.1907.
8. *Noc, F.* — Ann. Inst. Pasteur 18:387.1904.
9. *Houssay, B. A. & Negrete, J.* — Rev. Inst. Bact. Bs. Aires 1(3) :341.1918.
10. *Bayliss, W. M.* — J. of Physiology. 1907-08.
11. *Walters, E. H.* — J. of Biol. Chemistry 12:43.1912.
12. *Waldschmidt-Leitz* — Enzyme actions and properties :29.1929.
13. *Walters, E. H.* — J. of Biol. Chemistry 11:267.1912.

(Trabalho de colaboração das Secções de Físico-Química e Química e Farmacologia Experimentais do Instituto Butantan e apresentado à Sociedade de Biologia de S. Paulo em 8-2-940. Dado à publicidade em dezembro de 1940).

