

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

*Caracterização parcial de uma fração
proteolítica da peçonha da serpente Bothrops
moojeni*

Marília da Costa Oliveira

Monografia apresentada à coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, Universidade Fe-
deral de Uberlândia, para a obtenção do grau
de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia-MG
Julho—2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

*Caracterização parcial de uma fração
proteolítica da peçonha da serpente Bothrops
moojeni*

Marília da Costa Oliveira

Dra. Maria Inês Homs-Brandenburg

Monografia apresentada à coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, Universidade Fe-
deral de Uberlândia, para a obtenção do grau
de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia-MG
Julho—2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

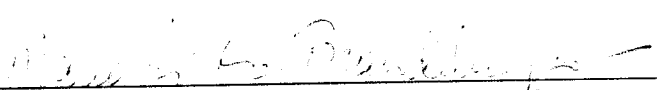
Marília da Costa Oliveira

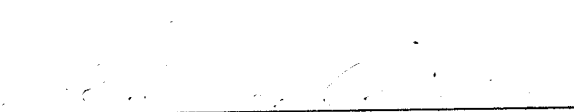
***Caracterização parcial de uma fração
proteolítica da peçonha da serpente *Bothrops
moojeni****

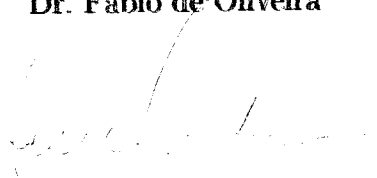
Nota: 100,0

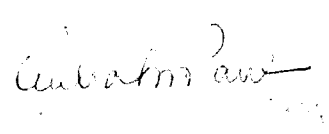
Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Uberlândia

Banca Examinadora:


Dra. Maria Inês Homsi-Brandenburg


Dr. Fábio de Oliveira


Luiz Fernando Moreira Izidoro



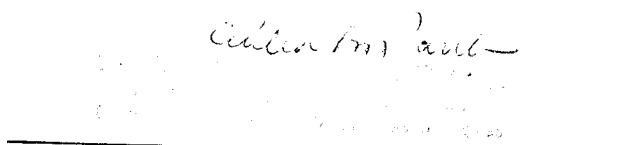
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

***Caracterização parcial de uma fração
proteolítica da peçonha da serpente *Bothrops
moojeni****

Marília da Costa Oliveira


Dra. Maria Inês Homs-Brandenburg
Instituto de Genética e Bioquímica

Homologado pela coordenação do Curso de
Ciências Biológicas em 25/06/05


Dra. Cecilia Lomônaco de Paula
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

Uberlândia-MG
Julho—2005

Dedico este trabalho aos meus pais, Edina e Agapito, pessoas extraordinárias, que sempre foram meus modelos, sempre me deram seu apoio, e sem os quais eu jamais teria chegado até aqui. Ter pais como vocês é uma benção para mim. Toda a minha admiração, agradecimento e amor sinceros.

Agradecimentos

Aos meus queridos irmãos Thiago e Helder, por me ajudarem (mesmo quando não queriam), por sempre terem participado da minha vida, pela convivência, pelos cuidados e por serem meus amigos. Obrigada por todas as palhaçadas que vocês fazem especialmente para mim, trazendo grande alegria ao meu coração. Obrigada por serem tão dedicados (ainda que queiram disfarçar).

À professora Maria Inês pelas oportunidades e pelo acolhimento, pela orientação, paciência, carinho, disposição e aprendizado. Obrigada pela convivência e por sempre ter acreditado em mim. Sua presença em minha vida foi indispensável e marcante.

À professora Veridiana por ter ajudado sempre que precisei, pela co-orientação, pelo esclarecimento de dúvidas, pela disposição e por ser um exemplo para todos nós. Obrigada pelas conversas, se não as tivemos mais foi por falta de oportunidades. Saiba que todas elas foram de grande valia para mim.

À professora Amélia pela co-orientação, ajudas, esclarecimento de dúvidas, disposição e convivência.

Ao Professor Fábio, que apesar dos poucos encontros sempre me incentivou e me ajudou. Minha admiração e agradecimento.

À amiga distante Júnia, que foi graças a quem comecei esse trabalho. Obrigada pela ajuda, pela oportunidade, por ter me ensinado tanto, pelo tempo de convivência que tivemos, pela disposição enorme que você sempre teve para mim.

Aos colegas de trabalho do laboratório Luis Carlos, Luis Henrique, Luiz Fernando, Luís Antônio, Rodrigo, Carla, Cristiani, Mirian e Ricardo, Danilo, Carol, Daiana, André, Mário, Luciana pelas ajudas, pela convivência por todo esse tempo.

Às amigas e colegas de trabalho Johara e Renata, pela ajuda indispensável, pela amizade descoberta no laboratório, pela convivência, pelo carinho, pela companhia.

Ao amigo e colega Fábio Lucas, que sempre esteve disposto a ajudar, com quem sempre dividi minhas dúvidas, meus erros, acertos e com quem sempre pude contar.

À amiga Cristiane Moreira, que me ajudou a scanear géis, fazer gráficos, formatar resumos e tudo mais que eu precisei. Obrigada por ter sempre estado disposta a me ajudar e se mostrado tão companheira. Obrigada pela sua amizade verdadeira.

Às Células Companheiras Malu, Lórex, Carol e Cris (de novo para não ficar fora do time), por terem tornado através da sua presença e companheirismo esta etapa da minha vida tão especial. Vocês foram os melhores presentes que a faculdade me deu.

Aos funcionários do laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais Tiani-nha, D. Nenzinha, Cleuber, pela ajuda e colaboração diárias.

Aos amigos Rone, Carlos e Guilherme, que afinal foi com quem tudo começou... meu primeiro grupo de trabalho. Obrigada pelos ensinamentos (que foram muitos) e pelas risadas também... Vocês foram os primeiros a me fazerem descobrir que queria ser pesquisadora e tenho apenas boas lembranças de todos os momentos que passei com vocês.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram com a realização deste trabalho.

Sumário

1	Introdução	1
2	Material e métodos	6
2.1	Obtenção da peçonha bruta de <i>Bothrops moojeni</i>	7
2.2	Fracionamento da peçonha bruta de <i>Bothrops moojeni</i>	7
2.3	Cromatografia de uma fração em gel de Sephadex G-75	7
2.4	Determinação quantitativa de proteínas	7
2.5	Caracterização Química	8
2.5.1	Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes	8
2.5.2	Eletroforese em gel de poliacrilamida sem agentes desnaturantes para proteínas ácidas	8
2.6	Ensaio Biológicos e Enzimáticos	9
2.6.1	Teste de degradação do fibrinogênio bovino	9
2.6.2	Teste de degradação da caseína	9
2.6.3	Teste com os Inibidores Enzimáticos	9
2.6.4	Teste com íons metálicos	9
2.6.5	Atividade hemorrágica	10
2.6.6	Atividade coagulante sobre o plasma bovino	10
2.6.7	Teste de incoagulabilidade sanguínea	10
2.6.8	Atividade fosfolipásica	10
2.6.9	Atividade edematogênica	10
3	Resultados	12
3.1	Fracionamento da peçonha bruta de <i>Bothrops moojeni</i> em DEAE-Sephacel	13
3.2	Cromatografia da fração D4 em gel de filtração Sephadex G-75	14

Lista de Figuras

1	Fracionamento de 200 mg da peçonha bruta de <i>Bothrops moojeni</i> em coluna de DEAE-Sephacel	13
2	Perfil cromatográfico da fração D4 em gel de filtração Sephadex G-75	14
3	Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes (PAGE-SDS)	15
4	Reta de regressão linear, mobilidade eletroforética relativa (MER) em função do logaritmo das massas moleculares	16
5	Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% em condições nativas (PAGE-ácida)	17
6	Atividade edematogênica	18
7	Atividade caseinolítica	19
8	Atividade fibrinogenolítica de D4, G1 e G2	20
9	Atividade fibrinogenolítica tempo dependente da fração D4	21
10	Atividade fibrinogenolítica tempo dependente da fração G1	22
11	Atividade fibrinogenolítica da fração G1 na presença de inibidores de proteases	23
12	Atividade fibrinogenolítica da fração G1 na presença de íons metálicos	24
13	Atividade fibrinogenolítica tempo dependente da fração G2	25
14	Atividade fibrinogenolítica da fração G2 na presença de inibidores de proteases	26
15	Atividade fibrinogenolítica da fração G2 na presença de íons metálicos	27

Lista de Abreviaturas

Bis-acrilamida	N,N' metileno-bis-acrilamida
DEAE	grupo dietilaminoetil
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético, sal dissódico
M	molar
PB	peçonha bruta
PBS	tampão fosfato, em salina
SDS	dodecil sulfato de sódio
Tris	tris [hidroxilmetil] aminometano

Resumo

Este trabalho teve como objetivos fracionar a peçonha bruta de *Bothrops moojeni* e caracterizar parcialmente a atividade proteolítica de uma de suas frações. A peçonha foi fracionada em DEAE-Sephacel, previamente equilibrada em tampão bicarbonato de amônio (0,05 M), da qual obteve-se quatro frações principais, denominadas D1 a D4. D4 foi recromatografada em Sephadex G-75, dando origem à G1, G1a, G2, G2a e G3. A fração D4 e subfrações não apresentaram atividade coagulante, fosfolipásica A2, hemorrágica ou desfibrinogenante. A sub-fração G2 mostrou maior grau de pureza na eletroforese em gel de poliacrilamida, com uma banda majoritária de peso molecular aparente de 28.900. A fração D4 e subfrações apresentaram atividade edematogênica, sendo que D4 e G2 foram as que induziram maior edema. D4, G1 e G1a foram as frações que apresentaram maior atividade caseinolítica. Dentre as amostras analisadas, D4 foi a que apresentou maior atividade fibrinogenolítica, hidrolisando a cadeia A- α . A atividade fibrinogenolítica de G1 foi totalmente inibida por EDTA, ZnCl_2 e HgCl_2 ; enquanto a de G2 foi parcialmente inibida por EDTA.

Palavras-chave: Atividade proteolítica, *Bothrops moojeni*, edema

1 Introdução

No Brasil, as serpentes das famílias Viperidae e Elapidae são as responsáveis por mais de 20.000 acidentes ofídicos notificados anualmente no Ministério da Saúde. A família Elapidae é representada pelo gênero *Micrurus* (corais) e a Viperidae compreende as principais serpentes peçonhentas, representadas pelos gêneros: *Bothrops* (jararaca, jararacuçu, cotiara, etc.), *Crotalus* (cascavéis) e *Lachesis* (surucucu). Os acidentes ofídicos ocorrem com maior frequência no início e no final do ano, em pessoas do sexo masculino e atingindo, sobretudo, os membros inferiores. As serpentes do gênero *Bothrops* são encontradas em todo o território brasileiro, sendo responsáveis por 85% dos acidentes ofídicos^[1].

As serpentes do gênero *Bothrops* são encontradas em todo o território brasileiro, sendo responsáveis por 85% dos acidentes ofídicos^[1]. Elas habitam preferencialmente ambientes úmidos, como matas, áreas cultivadas e locais de proliferação de roedores. Possuem hábitos noturnos, são muito agressivas e, quando se sentem ameaçadas, atacam em silêncio. Embora sejam raros os acidentes fatais causados por elas, os casos se agravam devido à intensidade dos efeitos locais^[2].

A espécie *Bothrops moojeni*, descrita por HOGE (1965)^[3], de nome popular jararaca, jararacão ou caigaca, possui distribuição geográfica restrita às áreas de formação aberta, estendendo-se do Brasil central até o sul do Estado do Paraná. No triângulo Mineiro, na região de Uberlândia, os acidentes ofídicos causados por serpentes botrópicas são devidos principalmente às serpentes *B. neuwiedi* e *B. moojeni*^[4].

O aparelho produtor de peçonha das serpentes é formado por glândulas exócrinas modificadas que produzem a peçonha tóxica. Esta é uma complexa mistura de proteínas e peptídeos que possuem variada atividade biológica, compondo de 90% a 95% do peso seco da peçonha. Outros de seus componentes são íons metálicos, carboidratos, nucleosídeos, aminas e, em menor proporção, aminoácidos e lipídeos^[5].

O quadro patofisiológico após o envenenamento botrópico se caracteriza por efeitos locais e sistêmicos. Ocorre no local da picada dor, edema, vermelhidão, hemorragia local, bolhas, abscesso e necrose tecidual, que dependendo do local afetado, tempo decorrido entre o acidente e aplicação do soro e quantidade de peçonha injetada, podem levar à perda do tecido e amputação do membro afetado. Manifestações sistêmicas são hemorragias, insuficiência renal aguda, choque (principal causa de morte), desordens na coagulação sanguínea, alterações cardiovasculares, hemorragias gastrointestinais, náuseas, vômitos e hematúria^[6, 7, 8].

A complexa lesão causada por essas peçonhas se deve à somatória dos efeitos isolados dos diferentes componentes, com ações biológicas distintas ou com ação sinérgica. Os principais constituintes das peçonhas relacionados com os efeitos locais são as proteases, fosfolipases e miotoxinas^[9].

As peçonhas de serpentes botrópicas são ricas em enzimas proteolíticas, que atuam numa grande variedade de substratos, tais como: caseína, hemoglobina, colágeno, gelatina, elastina, fibrinogênio, insulina e glucagon^[10]. Algumas enzimas proteolíticas são hemorraginas que degradam proteínas da matriz extracelular^[11], outras afetam a coagulação do sangue, agindo como procoagulante, convertendo o fibrinogênio em fibrina^[12], enquanto outras agem como anticoagulante por exercer atividade fibrinogenolítica e fibrinolítica^[13].

Essas enzimas proteolíticas podem promover o desequilíbrio da hemostasia após o envenenamento e são geralmente classificadas por suas estruturas em serinoproteases e metaloproteases^[14].

As serinoproteases são enzimas que possuem atividades fibrinogenolítica e fibrinolítica. Algumas são conhecidas como “thrombin-like” por possuírem a habilidade em clivar o fibrinogênio de forma semelhante à trombina, liberando fibrinopeptídeos A, fibrinopeptídeos B ou ambos. Estas proteases possuem a capacidade de interferir em pontos distintos da coagulação sanguínea causando desordem no sistema hemostático das vítimas^[14].

As metaloproteases de peçonhas de serpentes são altamente tóxicas, na sua grande maioria apresentam atividade fibrinogenolítica e são responsáveis pelo quadro hemorrágico verificado após o envenenamento^[14]. Apresentam também indução de edema, mionecrose e dermonecrose^[15].

As metaloproteases da peçonha de serpentes podem ser classificadas em dois grupos, de acordo com sua especificidade ao substrato: toxinas hemorrágicas, enzimas com alta especificidade ao substrato que induzem hemorragia quando injetadas em animais^[16, 17] e toxinas não hemorrágicas, enzimas com ampla especificidade de substrato e que não induzem hemorragia^[18, 17].

As metaloproteases hemorrágicas são responsáveis pelas hemorragias locais e sistêmicas comuns ao envenenamento por serpentes das famílias Crotalidae e Viperidae. Essas enzimas degradam as proteínas da matriz extra celular e causam efeito citotóxico direto sobre as células endoteliais; sua ação ocorre basicamente em nível da membrana basal dos vasos capilares, levando à perda da integridade capilar e resultando em sangramento no local. As toxinas hemorrágicas são enzimas capazes de degradar as proteínas da membrana basal inclusive fibronectina, laminina e colágeno do tipo IV. Elas também degradam gelatina e fibrinogênio^[19].

As metaloproteases induzem a liberação de citocinas envolvidas na inflamação como $\text{TNF}\alpha$ (fator de necrose tumoral α), $\text{IL-1}\beta$ e IL-6 ^[20], e algumas inibem a agregação plaquetária^[21]. Essas enzimas também podem degradar alguns dos fatores da cascata da coagulação sanguínea, incluindo o fibrinogênio e o fator de von Willebrand, aumentando o efeito hemorrágico^[22].

O fibrinogênio é uma proteína plasmática solúvel formada por três pares de cadeias polipeptídicas não idênticas, constituídas por duas meia-moléculas simétricas que são unidas por pontes dissulfeto. Cada meia-molécula contém três cadeias designadas como A- α , B- β e γ , com massas moleculares de 63.500, 56.000 e 47.000, respectivamente. A molécula como um todo tem uma massa molecular de 340 KDa^[23]. O fibrinogênio apresenta longas extensões de aminoácidos que são expostos a enzimas proteolíticas, inclusive às proteases da peçonha de serpentes. A fibrina, porém, apresenta uma estrutura unida por ligações cruzadas e é menos suscetível a proteólise.

Tanto as metaloproteases hemorrágicas como as não-hemorrágicas são enzimas fibrin(ogen)olíticas, assim como as serinoproteases. Elas são capazes de degradar a molécula de fibrinogênio, sendo classificadas em α ou β -fibrinogenases, dependendo da sua preferência enzimática em degradar a cadeia A- α ou a B- β da molécula de fibrinogênio^[24, 19]. A maioria das metaloproteases hemorrágicas são fibrinogenases.

Muitas enzimas fibrin(ogen)olíticas foram caracterizadas como metaloproteases zinco dependentes. Elas são membros da família metzincin descrita por STÖCKER & ZWILLING (1995)^[25]. Essas enzimas apresentam uma estrutura contendo um átomo de zinco, uma metionina comum voltada à porção inferior da molécula e apresentam na região C-terminal um segmento helicoidal que contém dois dos três resíduos de histidina envolvidos no sítio ligante de zinco. A metionina forma um porão hidrofóbico embaixo da hélice, onde se encontra o sítio central. Membros dessa família incluem metaloproteases de mamíferos, bactérias e de peçonhas de serpentes (Adamalysin). O sítio ligante de zinco tem uma sequência de aminoácidos (HEBXHXBGBGBXHZ) comum nos diferentes membros dessas famílias, onde H é uma histidina, E um ácido glutâmico, G uma glicina, B um resíduo hidrofóbico volumoso, X é qualquer aminoácido e Z é diferente em todas as famílias, mas é conservado em suas respectivas subfamílias^[25].

As metaloproteases fibrin(ogen)olíticas são aparentemente armazenadas na glândula de peçonha na forma de zimogênio inativo e são ativadas por um mecanismo denominado "cysteine-switch". O grupo tiol da cisteína, na pro-sequência do zimogênio inativo, é capaz de inibir a atividade catalítica destas enzimas bloqueando seu sítio ativo por se ligar ao átomo de zinco. Após serem secretadas, essas enzimas sofrem um processamento proteolítico que converte o zimogênio na forma enzimaticamente ativa. Este mecanismo de ativação, é similar ao modelo proposto para as metaloproteases de matriz^[26, 27].

As metaloproteases apresentam uma massa molecular que varia de 20 a 100 kDa e podem ser classificadas em quatro grupos principais, de acordo com seus domínios estruturais. Todas elas apresentam uma pré-pro-sequência, deduzida a partir de cDNA, contendo a pré-sequência (peptídeo sinal) com 18 resíduos de aminoácidos, a pró-sequência com aproximadamente 170 resíduos de aminoácidos e o domínio protease ligante de zinco^[14].

A classe P-I compreende as metaloproteases que contém somente o domínio metaloprotease, correspondendo a toxinas pequenas com atividade hemorrágica relativamente fraca ou inexistente e com massas moleculares de 20 – 30 kDa. Na classe P-II, as enzimas possuem o domínio metaloprotease seguido por um domínio desintegrina e tem massas moleculares de 30 – 60 kDa. A classe P-III contém os domínios metaloprotease, desintegrina e um terceiro domínio rico em cisteína, são toxinas altamente hemorrágicas com massas moleculares de 60 – 100 kDa. Na última classe, P-IV, as enzimas possuem um domínio adicional representado por um polipeptídeo semelhante à lectina, ligado por pontes dissulfeto com o domínio rico em cisteína^[28, 14]. A remoção do zinco por agentes quelantes, como EDTA ou 1,10-fenantrolina, eliminam completamente a atividade proteolítica e hemorrágica dessas enzimas^[14].

O domínio desintegrina dessas enzimas apresenta uma sequência altamente idêntica às desintegrinas das peçonhas, que inibem a agregação plaquetária pela ligação com receptores presentes na membrana plasmática das plaquetas (integrinas). Entretanto, o domínio desintegrina das metaloproteases não contém a sequência típica das desintegrinas Arg-Gly-Asp (RGD); nesta região encontram-se diferentes sequências, como Glu-Cys-Asp (ECD)^[29].

A alta seletividade das proteínas das peçonhas de serpentes por fatores individuais da coagulação sanguínea torna estes componentes ferramentas potencialmente úteis para o estudo do mecanismo de ação, regulação e estrutura-função dos fatores da coagulação sanguínea^[30].

Vários estudos, in vivo, com as enzimas fibrin(ogen)olíticas revelaram que essas enzimas induzem trombólise de forma consistente, eficaz e segura. Elas atuam por um mecanismo completamente diferente dos ativadores de plasminogênio, que são os únicos agentes atualmente aprovados para uso clínico^[31] e apresentam algumas vantagens com relação a eles: elas não são inativadas pelos inibidores de serinoproteases, presentes no plasma e não ativam a plasmina. Portanto, não induzem a agregação plaquetária relacionada com formação de plasmina. A falta de alterações patológicas e a ausência de alterações histológicas sugerem o uso terapêutico dessas enzimas^[9].

Muitas proteínas das peçonhas apresentam promissores usos clínicos. O estudo dessas novas moléculas abre perspectivas para o desenvolvimento de aplicações eficazes no tratamento de desordens humanas que incluem doenças cardiovasculares, câncer e AIDS^[5].

Este trabalho teve como objetivos fracionar a peçonha bruta de *Bothrops moojeni* e caracterizar parcialmente uma de suas frações proteolíticas.

2 Material e métodos

2.1 Obtenção da peçonha bruta de *Bothrops moojeni*

Primeiramente a peçonha de *Bothrops moojeni* utilizada foi de um “pool” proveniente do estado de São Paulo e posteriormente foi utilizada uma proveniente de Minas Gerais, da Pentapharm.

2.2 Fracionamento da peçonha bruta de *Bothrops moojeni*

Cerca de 200 mg da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* foram dissolvidos em 2,0 mL de tampão bicarbonato de amônio 0,05 M, pH 7,8, centrifugados a 10.000 gravidades por 10 minutos, a 4 °C e o sobrenadante aplicado em uma coluna DEAE-Sephacel (1,4 x 10,5 cm). A eluição da amostra foi realizada com um gradiente convexo de concentração de bicarbonato de amônio (0,05 a 0,5 M) pH 7,8, utilizando-se uma câmara de mistura com um volume aproximado de 80 mL. Foram coletadas frações de 3,0 mL/tubo à temperatura ambiente, num fluxo de 20 mL/h. A absorbância de cada fração foi lida a 280 nm, num espectrofotômetro Speckol.

2.3 Cromatografia de uma fração em gel de Sephadex G-75

A fração denominada D4, proveniente do fracionamento anterior, foi liofilizada e res-suspendida em de tampão bicarbonato de amônio 0,05 M, pH 7,8, e centrifugada a 10.000 gravidades por 10 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi aplicado em uma coluna de Sephadex G-75 (96x 1,5 cm), equilibrada com o tampão de eluição. A eluição da amostra foi realizada com o mesmo tampão (bicarbonato de amônio 0,05 M, pH 7,8). Foram coletadas frações de 3 mL/tubo a temperatura ambiente, num fluxo de 20 mL/h. A absorbância de cada fração coletada foi lida a 280 nm, num espectrofotômetro Speckol.

2.4 Determinação quantitativa de proteínas

A concentração de proteínas na fração e subfrações foi determinada pelo método de BRADFORD (1976)^[32], usando-se como padrão a soroalbumina bovina. Neste método, uma alíquota de cada fração ou subfrações foi diluída para 100 µL com água deionizada. Após a diluição, foram adicionados 3,0 mL do reagente de Bradford. Para o preparo deste reagente, foram utilizados 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G, 50 mL de etanol 95% e 100 mL de ácido fosfórico 85%. Posteriormente, esta solução foi diluída, completando-se seu volume para um litro com água deionizada.

As determinações foram feitas em triplicatas e a absorbância medida em 595 nm. Paralelamente à dosagem de proteínas da fração e subfrações, foi feita uma curva padrão

de soroalbumina bovina. A concentração de proteínas em mg/mL foi determinada a partir de cálculos de regressão linear baseados nos valores obtidos a partir da curva padrão.

2.5 Caracterização Química

2.5.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes

A determinação da massa molecular aparente das amostras foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida a 14%, com agentes desnaturantes, conforme a técnica descrita por LAEMMLI (1970)^[33]. O tampão do eletrodo continha Tris 0,025 M, glicina 0,192 M e SDS 0,1% (m/v), pH 8,3.

As amostras de proteína foram dissolvidas no tampão da amostra: Tris-HCl 0,06 M e pH 6,8; SDS 2% (m/v), β -mercaptoetanol 5% (v/v); azul de bromofenol 0,005% (m/v) e glicerol 10% (v/v). Em seguida foram aquecidas durante 3 a 5 minutos em água fervente. Foram aplicados no gel cerca de 5 a 30 μ L de cada amostra de proteínas ou de padrão de massa molecular contendo sempre 10 μ g de proteínas.

Foi utilizado o Padrão de Peso Molecular LMW (Low Molecular Weight) contendo: Fosforilase b (97.000), Albumina bovina (66.000), Ovoalbumina (PM 45.000), Anidrase Carbônica (30.000), Inibidor de Tripsina (20.100) e α -lactoalbumina (14.400).

A mobilidade eletroforética relativa de cada padrão foi determinada em centímetros e a curva padrão para a determinação da massa molecular aparente foi traçada relacionando os logaritmos dos valores da massa molecular dos padrões com as distâncias de migração.

2.5.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida sem agentes desnaturantes para proteínas ácidas

Para proteínas de caráter ácido, a eletroforese seguiu a técnica descrita por DAVIS (1964)^[34], utilizando-se géis de poliacrilamida a 14%. O tampão do eletrodo é constituído de Tris 0,05 M e Glicina 0,38 M, pH 8,3, diluído 10 vezes para o uso. As amostras de proteína foram dissolvidas no tampão do eletrodo já diluído e 10% de glicerol (v/v). O azul de bromofenol 0,1% (m/v) foi utilizado como indicador de migração.

Os géis foram corados em Coomassie Blue R-250 0,2% (m/v) dissolvido em água:metanol:ácido acético (6:3:1 v/v). Em seguida, foram secos em papel celofane.

2.6 Ensaios Biológicos e Enzimáticos

2.6.1 Teste de degradação do fibrinogênio bovino

Foi realizado como descrito por EDIGAR & PRENTICE (1973)^[35], com modificações de OLIVEIRA et al. (1999)^[8]. Em 50 μL de uma solução de fibrinogênio bovino (1,5 mg/mL salina) foram adicionados 5 μg de amostra e a solução incubada por até 1 hora a 37 °C. O término da reação ocorreu após a adição do tampão da amostra: Tris-HCl 0,06 M, pH 6,8, contendo glicerol a 10% (v/v), β -mercaptoetanol a 5% (v/v), SDS a 2% (m/v) e azul de bromofenol 0,005%. Em seguida as amostras foram aquecidas por 3 a 5 minutos a 100 °C, e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com SDS como agente desnaturante, como descrito anteriormente.

2.6.2 Teste de degradação da caseína

Amostras contendo 10 μg de proteínas foram incubadas a 37 °C por 1 hora com 50 μL de uma solução de caseína (1,5 mg/mL) diluída em Tris-HCl 0,05 M, pH 7/8. O término da reação ocorreu após a adição do tampão da amostra: Tris-HCl 0,06 M, pH 6,8, contendo glicerol a 10% (v/v), β -mercaptoetanol a 5% (v/v), SDS a 2% (m/v) e azul de bromofenol 0,005%. Em seguida as amostras foram aquecidas por 3 a 5 minutos a 100 °C, e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com SDS como agente desnaturante.

2.6.3 Teste com os Inibidores Enzimáticos

Foi analisado o efeito dos inibidores enzimáticos (EDTA 10 mM, leupeptina 1 mM, aprotinina 10 mM e β -mercaptoetanol 10 mM) sobre a degradação do fibrinogênio bovino. Em cada ensaio, 1,5 μL (10 μg) da fração foram previamente incubados por 30 minutos a temperatura ambiente com 10 μL de cada inibidor e o ensaio realizado como descrito para a atividade fibrinogenolítica.

2.6.4 Teste com íons metálicos

Foi analisado o efeito dos íons metálicos (HgCl_2 10 mM; BaCl_2 10 mM; ZnCl_2 10 mM; MgCl_2 10 mM; CaCl_2 10 mM) sobre a degradação do fibrinogênio bovino. A atividade foi realizada como descrita anteriormente.

2.6.5 Atividade hemorrágica

Essa técnica foi realizada segundo método descrito por NIKAI et al. (1984)^[36]. As amostras com cerca de 50 µg de proteínas foram injetadas num volume de 0,1 mL de salina por via intradérmica no dorso de camundongos machos de 20,0 g. Após 3 horas os animais foram sacrificados e seu dorso retirado para análise da atividade.

2.6.6 Atividade coagulante sobre o plasma bovino

O plasma bovino utilizado foi gentilmente cedido pelo Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

Amostras contendo 5 µg de proteínas foram diluídas para um volume final de 50 µL em salina e aplicadas a 200 µL de plasma bovino citratado incubados a 37 °C.

A atividade foi caracterizada pelo imediato aparecimento da rede de fibrina em comparação com o tempo de coagulação do controle contendo cloreto de cálcio 0,2 M.

2.6.7 Teste de incoagulabilidade sanguínea

O teste de desfibrinogenação foi realizado segundo o método descrito por Rosenfeld (1965)^[37], com algumas modificações. Cerca de 20 µg da amostra foram injetadas em camundongos, via intraperitônea, num volume final de 200 µL de salina. Após uma hora, os animais foram sacrificados com éter de petróleo, o sangue esgotado por punção cardíaca na ausência de anticoagulante, em seguida depositado imediatamente em tubo de vidro e o tempo gasto para formar um coágulo de fibrina visível foi cronometrado.

2.6.8 Atividade fosfolipásica

Descrita por DE HASS et al. (1968)^[38], utiliza-se como substrato uma emulsão aquosa de gema de ovo em presença de desoxicolato de sódio 0,03 M e de CaCl_2 0,6 M. Os ácidos graxos liberados enzimaticamente foram titulados com uma solução padrão de NaOH (0,1208 N) em pH 8,0, à temperatura ambiente. A atividade fosfolipásica específica foi determinada utilizando-se 10 µg da amostra, e calculada pela quantidade de microequivalentes de base consumida, por minuto, por miligrama de proteínas (meq/min/mg).

2.6.9 Atividade edematogênica

Essa atividade foi realizada injetando-se as amostras na região subplantar de camundongos Swiss. A formação de edema foi avaliada medindo-se o volume das patas

dos camundongos (mm) a diferentes intervalos de tempo (30 minutos, 1, 2 e 3 horas) utilizando-se um paquímetro (CALIPER). Foi realizado em triplicata.

3 Resultados

3.1 Fracionamento da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* em DEAE-Sephacel

O fracionamento da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* foi realizado em gel de DEAE-Sephacel em um gradiente convexo de concentração em tampão bicarbonato de amônio 0,05 M a 0,5 M em pH 7,8. O perfil cromatográfico está mostrado na figura 1. Os principais picos protéicos obtidos foram: D1, D2, D3 e D4. Na tabela 1 estão expressos os percentuais de recuperação protéica das frações obtidas.

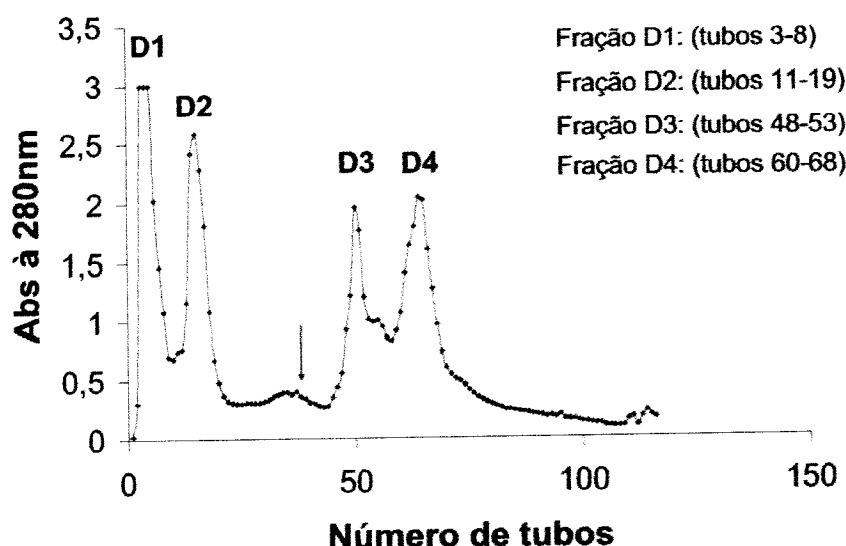


Figura 1: Fracionamento de 200 mg da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* em coluna de DEAE-Sephacel (1,4 x 10,5 cm), equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,05 M, pH 7,8, estabelecendo-se um gradiente convexo de concentração 0,05 a 0,5 M (seta) a partir do 40º tubo, com fluxo de 20 mL/h à temperatura ambiente. Frações de 3 mL foram coletadas.

Tabela 1: Percentual de recuperação protéica das frações obtidas no fracionamento em DEAE-Sephacel.

Amostras	Dosagem de proteínas pelo método de Bradford	Recuperação protéica (%)
PB	123 mg	100
D1	28,65 mg	23,29
D2	19,56 mg	15,90
D3	11,15 mg	9,07
D4	18,85 mg	15,32
TOTAL	78,21 mg	63,58

3.2 Cromatografia da fração D4 em gel de filtração Sephadex G-75

A fração D4 foi recromatografada em gel de Sephadex G-75 em tampão bicarbonato de amônio 0,05 M, pH 7,8 e o perfil está mostrado na figura 2. Os principais picos obtidos foram G1, G1a, G2, G2a e G3. Na tabela 2 estão expressos os percentuais de recuperação protéica das frações obtidas neste fracionamento.

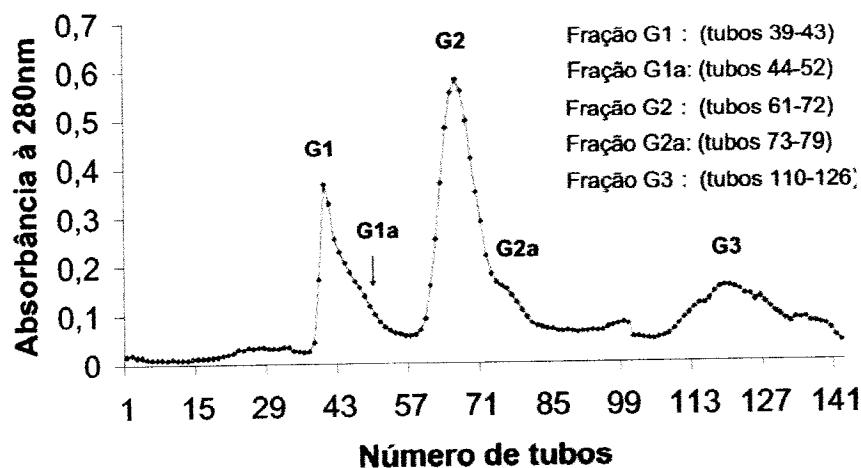


Figura 2: Perfil cromatográfico da fração D4 em gel de filtração Sephadex G-75 (1,5 x 96 cm), equilibrada em tampão bicarbonato de amônio 0,05 M, pH 7,8, com fluxo de 20 mL/h e coletadas frações de 3 mL/tubo, à temperatura ambiente.

Tabela 2: Recuperação protéica por dosagem de proteínas pelo método de Bradford das subfrações obtidas do fracionamento da fração D4 em Sephadex G-75.

Amostras	Dosagem de proteínas pelo método de Bradford	Recuperação protéica (%)*
D4	13,8 mg	100
G1	2,25 mg	16,3
G1a	1,5 mg	10,86
G2	4,15 mg	30,07
G2a	1,82 mg	13,18
G3	1,68 mg	12,17
Total	11,4 mg	82,58

3.3 Caracterização química

3.3.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% em condições desnaturantes e reta padrão para determinação da massa molecular

A figura 3 mostra o resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% em condições desnaturantes da fração D4 e suas subfrações obtidas a partir do fracionamento em gel de Sephadex G-75.

A fração G2 evidencia uma banda principal de massa molecular de aproximadamente 28,7 kDa. Observa-se também uma outra banda protéica em menor concentração acima da banda principal.

1 2 3 4 5 6

Figura 3: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes da fração D4 e subfrações G1, G1a, G2 e G2a. Linha 1 – Padrão de Peso Molecular LMW (Low Molecular Weight): Fosforilase b (97.000), Albumina bovina (66.000), Ovoalbumina (PM 45.000), Anidrase Carbônica (30.000), Inibidor de Tripsina (20.100) e α -lactoalbumina (14.400); linha 2 – D4; linha 3 – G1; linha 4 – G1a; linha 5 – G2; linha 6 – G2a.

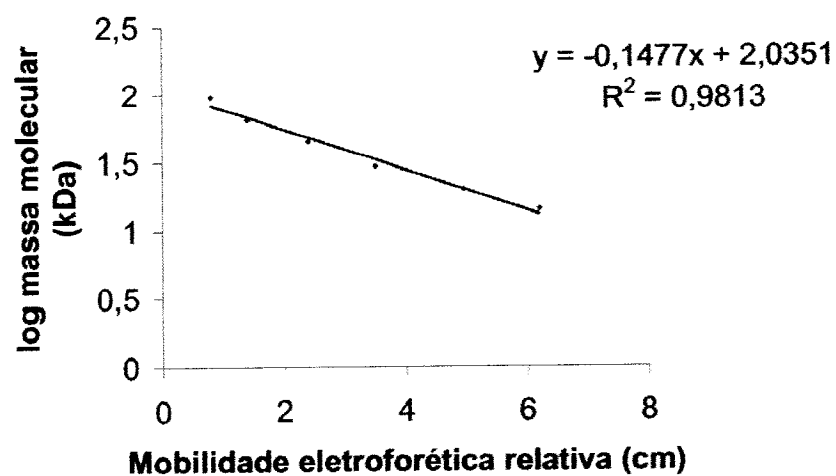


Figura 4: Reta de regressão linear utilizada para a estimativa da massa molecular, utilizando-se a mobilidade eletroforética relativa (MER) das proteínas em função dos logaritmos das massas moleculares.

3.3.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida sem agentes desnaturantes para proteínas ácidas

A figura 5 mostra o resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas ácidas a 14%, em pH 8,3 (PAGE-ÁCIDA) da fração D4 e subfrações G1, G1a, G2 e G2a. A fração G2 mostra uma banda protéica principal e, abaixo dela, uma banda em menor concentração.

1 2 3 4 5

Figura 5: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% para proteínas ácidas. Tampão Tris-glicina pH 8,3. Tempo de corrida 40 minutos a 20 mA. Corante: solução 0,2% de Coomassie Brilhante Blue R-250 em metanol 50%; solução descorante: água:etanol:ácido acético (6:3:1-v/v) Linha 1 – D4; linha 2 – G1; linha 3 – G1a; linha 4 – G2; linha 5 – G2a

3.4 Ensaios biológicos e enzimáticos

3.4.1 Atividade edematogênica

A figura 6 está mostrando o perfil da atividade edematogênica sobre a pata de camundongos causado pela peçonha bruta de *Bothrops moojeni* e as frações D4, G1, G1a, G2 e G2a. O edema produzido foi medido (mm) a diferentes intervalos de tempo utilizando-se um paquímetro. A peçonha bruta e as frações G2 e G2a apresentaram o pico de atividade com 30 minutos, enquanto as frações D4, G1 e G1a tiveram o pico com 1 hora. D4 e G2 foram as amostras que causaram maior edema.

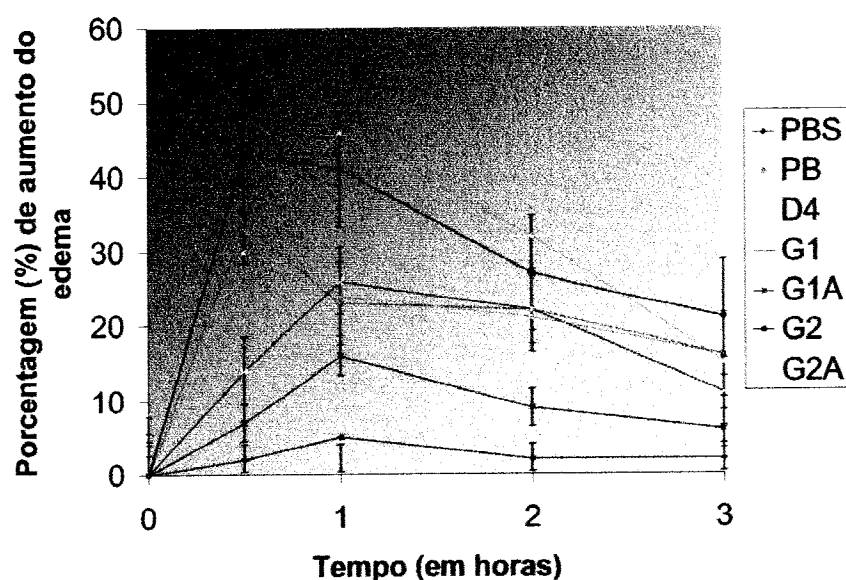


Figura 6: Perfil da atividade edematogênica realizada com a peçonha bruta de *Bothrops moojeni*, as frações D4, G1, G1a, G2, G2a e PBS. O edema foi medido utilizando-se um paquímetro nos intervalos de 30 minutos, 1, 2 e 3 horas. O gráfico representa a porcentagem do aumento da pata do camundongo em função do tempo.

3.4.2 Atividade caseinolítica

A figura 7 mostra os resultados obtidos para a atividade proteolítica sobre a caseína da fração D4 e subfrações após eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes. O tempo de incubação foi de 1 hora. A fração D4 e subfrações G1 e G1a hidrolisaram completamente a caseína enquanto G2 e G2a tiveram uma atividade caseinolítica menor observada pelo não desaparecimento total das cadeias da caseína controle e por menor número de produtos de degradação.

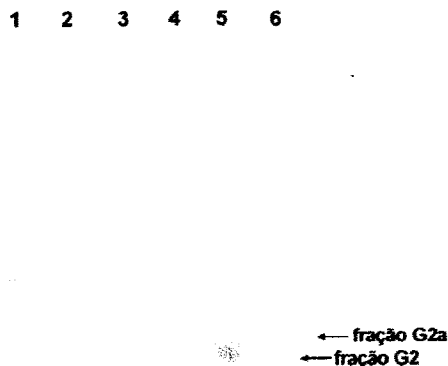


Figura 7: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes. Fração D4 e sub-frações G1, G1a, G2, G2a incubadas com caseína por 1 hora. Tempo de corrida de 60 minutos a 20 mA de corrente. Linha 1 – caseína controle; linha 2 – caseína incubada com 10 mg da amostra D4; linhas 3 a 6 – caseína incubada com G1, G1a, G2 e G2a respectivamente.

3.4.3 Atividade proteolítica das frações D4, G1 e G2 sobre o fibrinogênio bovino

Como as frações G1a e G2a eram o final do pico na cromatografia, esse material se mostrou insuficiente para a realização dos ensaios posteriores.

A figura 8 mostra os resultados da eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% da atividade proteolítica das frações D4, G1 e G2 sobre o fibrinogênio por um período de 60 minutos. Todas as amostras testadas hidrolisaram a cadeia A- α , sendo que D4 apresentou maior atividade degradando também parte da cadeia B- β .

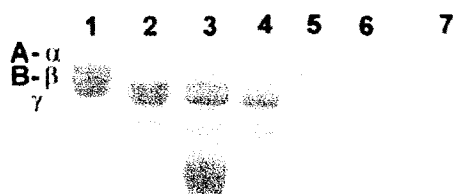


Figura 8: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes dos produtos de hidrólise do fibrinogênio bovino, causada pelas frações D4, G1 e G2. Linha 1 – fibrinogênio bovino controle, linhas 2 a 4 – fibrinogênio incubado por 60 minutos com G1, G2 e D4, respectivamente. Linha 5 – G1; linha 6 – G2; linha 7 – D4

3.4.4 Atividade fibrinogenolítica da fração D4 tempo dependente

A figura 9 mostra o teste de degradação do fibrinogênio bovino incubado com a fração D4 por um período de 5 a 60 minutos. A hidrólise do fibrinogênio começa a ocorrer com cinco minutos, aumentando com o decorrer do tempo. A fração D4 aqui utilizada, proveniente da peçonha de Minas Gerais, degrada somente a cadeia A- α .

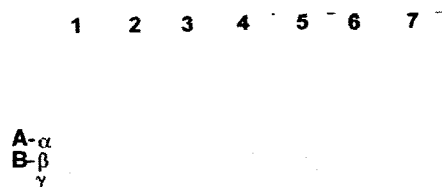


Figura 9: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes dos produtos de hidrólise do fibrinogênio bovino, causada pela fração D4. Linha 1 – fibrinogênio bovino controle; linhas 2 a 6 – fibrinogênio incubado com D4 por 5, 15, 30, 45 e 60 minutos respectivamente; linha 7 – fração D4

3.4.5 Atividade proteolítica da fração G1 sobre o fibrinogênio bovino tempo dependente

A figura 10 mostra o teste de degradação do fibrinogênio bovino incubado com a fração G1 por um período de 5 a 60 minutos. A atividade fibrinogenolítica de G1 é restrita à cadeia A- α , que é hidrolisada somente com 60 minutos de incubação. Isso é possível perceber pois o único produto de degradação da cadeia A- α está logo abaixo desta, e a intensidade da banda desse produto se intensifica com o decorrer do tempo.

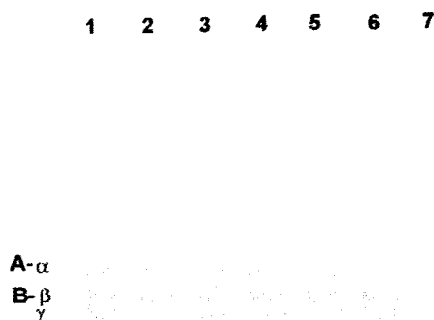


Figura 10: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes dos produtos de hidrólise do fibrinogênio bovino, causada pela fração G1. Linha 1 – fibrinogênio bovino controle; linhas 2 a 6 – fibrinogênio incubado com G1 por 5, 15, 30, 45 e 60 minutos respectivamente; linha 7 – fração G1

3.4.6 Atividade proteolítica da fração G1 sobre o fibrinogênio bovino na presença de inibidores enzimáticos

A figura 11 mostra a inibição da atividade fibrinogenolítica de G1, após eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes, com tempo de incubação de 60 minutos. Dentre os inibidores enzimáticos testados, somente o EDTA mostrou proteção da degradação da cadeia A- α , do fibrinogênio.

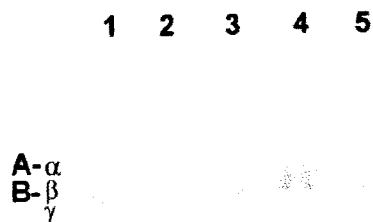


Figura 11: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes dos produtos de degradação do fibrinogênio bovino, causada pela fração G1 tratada com inibidores de proteases. Linha 1 – fibrinogênio controle, linha 2 – fibrinogênio incubado com G1 por 60 minutos, linhas 3 a 5 – fibrinogênio mais com G1 incubado com leupeptina, EDTA e β -mercaptoetanol, respectivamente.

3.4.7 Atividade proteolítica da fração G1 sobre o fibrinogênio bovino na presença de íons metálicos

A figura 12 mostra a hidrólise do fibrinogênio bovino pela fração G1 na presença de íons metálicos, após eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes, com tempo de incubação de 60 minutos. Dentre os íons testados, o HgCl_2 e ZnCl_2 foram capazes de inibir a atividade proteolítica de G1.

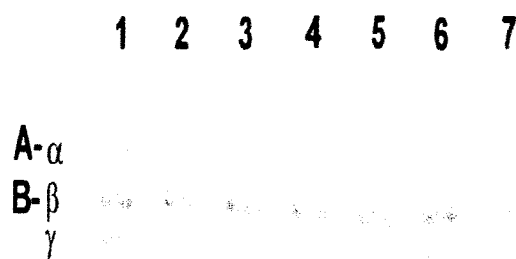


Figura 12: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes dos produtos de degradação do fibrinogênio bovino, causada pela fração G1 tratada com íons metálicos. Linha 1 – fibrinogênio bovino controle; linhas 2 a 6 – fibrinogênio mais G1 incubado com MgCl_2 10 mM; CaCl_2 10 mM; BaCl_2 10 mM; HgCl_2 10 mM e ZnCl_2 10 mM, respectivamente; linha 7 – fibrinogênio incubado com G1 por 60 minutos

3.4.8 Atividade proteolítica da fração G2 sobre o fibrinogênio bovino tempo dependente

A figura 13 mostra o teste de degradação do fibrinogênio bovino incubado com a fração G2 por um período de 5 a 60 minutos. G2 hidrolisa apenas a cadeia A- α do fibrinogênio começando com 15 minutos de incubação e aumentando com o decorrer do tempo.

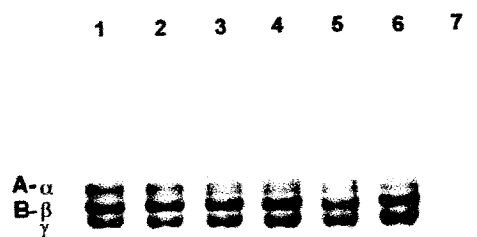


Figura 13: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes dos produtos de hidrólise do fibrinogênio bovino, causada pela fração G2. Linha 1 – fibrinogênio bovino controle; linhas 2 a 6 – fibrinogênio incubado com G2 por 5, 15, 30, 45 e 60 minutos, respectivamente; linha 7 – fração G2.

3.4.9 Atividade proteolítica da fração G2 sobre o fibrinogênio bovino na presença de inibidores enzimáticos

A figura 14 mostra a hidrólise do fibrinogênio bovino pela fração G2 na presença de inibidores enzimáticos, após eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes, com tempo de incubação de 60 minutos. Dentre os inibidores testados, somente o EDTA foi capaz de inibir parcialmente a degradação do fibrinogênio pela fração G2.

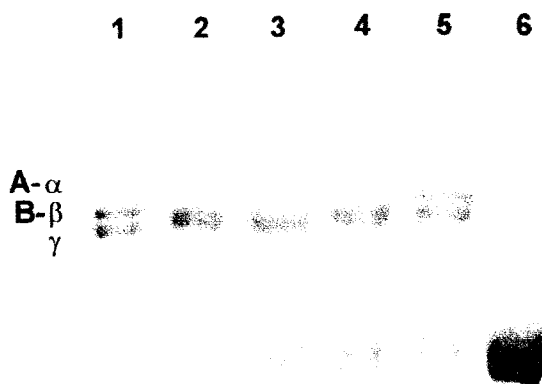


Figura 14: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes dos produtos de degradação do fibrinogênio bovino, causada pela fração G2 tratada com inibidores de proteases. Linha 1 – fibrinogênio controle, linha 2 – fibrinogênio incubado com 10 μ g de G2 por 60 minutos, linhas 3 a 5 – fibrinogênio mais 10 μ g de G2 incubada por 30 minutos com leupeptina 1 mM, β -mercaptoetanol 10 mM e EDTA 10 mM, respectivamente. Linha 6 – fração G2 (10 μ g).

3.4.10 Atividade proteolítica da fração G2 sobre o fibrinogênio bovino na presença de íons metálicos

A figura 15 mostra a hidrólise do fibrinogênio bovino pela fração G2 na presença de íons metálicos, após eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes, com tempo de incubação de 60 minutos. Dentre os íons testados nenhum apresentou efeito sobre a atividade proteolítica da amostra.

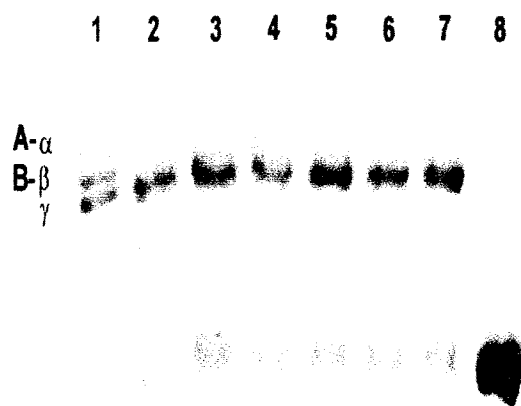


Figura 15: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes dos produtos de degradação do fibrinogênio bovino, causada pela fração G2 tratada com íons metálicos. Linha 1 – fibrinogênio bovino controle; linha 2 – fibrinogênio incubado com G2 por 60 minutos; linhas 3 a 7 – fibrinogênio mais G2 incubado com MgCl_2 10 mM; HgCl_2 10 mM; ZnCl_2 10 mM; BaCl_2 10 mM e CaCl_2 10 mM, respectivamente; linha 8 – fração G2 (15 μg).

4 Discussão

A peçonha de *Bothrops moojeni* tem sido amplamente estudada por inúmeros pesquisadores nas ultimas décadas. Ela apresenta muitas atividades, causadas por uma diversidade de enzimas.

Essa peçonha apresenta uma grande variedade de enzimas proteolíticas responsáveis pelos efeitos locais e sistêmicos observados durante o envenenamento^[5].

Este trabalho teve como objetivo caracterizar parcialmente uma fração com atividade proteolítica da peçonha de *Bothrops moojeni*.

No início deste trabalho a peçonha utilizada foi de um "pool" proveniente do estado de São Paulo e quanto este material acabou passamos a trabalhar com a peçonha proveniente do estado de Minas Gerais. Isso gerou algumas alterações, pois o resultado do fracionamento das peçonhas foi o mesmo, mas o perfil eletroforético das amostras fracionadas se mostrou diferente. O nosso objetivo não era avaliar a variabilidade intraespecífica, mas sim a atividade proteolítica de uma fração (D4), que se mostrou modificada. A atividade proteolítica da fração D4 da peçonha do estado de São Paulo era maior do que a da peçonha de Minas Gerais (figuras 8 e 9).

Para obtenção da fração D4 e suas subfrações foi realizada uma cromatografia de troca-iônica em DEAE-Sephacel da peçonha bruta de *B. moojeni*, seguida por uma gel filtração em Sephadex G-75. Para esses fracionamentos foi utilizado o tampão bicarbonato de amônio, pois este sal é volátil, e, portanto, facilmente retirado das amostras durante a liofilização. Dessa forma, não houve necessidade de submeter as frações obtidas ao processo de diálise após cada etapa cromatográfica.

Após a cromatografia, as proteínas das frações isoladas foram quantificadas pelo método de Bradford, liofilizadas e armazenadas a -20°C até o momento da realização dos ensaios enzimáticos.

Dentre as sub-frações de D4, G2 foi a que apresentou maior grau de pureza, quando analisada por eletroforese na ausência de agentes desnaturantes. A banda majoritária de G2 mostrou um peso molecular aparente da ordem de 28.700.

Nenhum resultado satisfatório por eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas básicas foi obtido para essas frações (resultado não mostrado). Isso era esperado, pois a fração D4 apresenta proteínas com caráter levemente ácido, o que condiz com o perfil cromatográfico obtido em DEAE-Sephacel (resina aniônica), já que as proteínas dessa fração foram eluídas com força iônica elevada, demonstrando alta interação com a resina^[39].

A fração D4 e subfrações não apresentaram atividade coagulante, fosfolipásica A2, hemorrágica ou desfibrinogenante.

A fração D4 assim como G1, G1a, G2 e G2a apresentaram atividade edematogênica. A peçonha bruta de *B. moojeni* apresenta um pico de edema após 30 minutos, assim como

G2 e G2a. As outras frações apresentaram maior atividade 1 hora após a inoculação da amostra. As amostras D4 e G2 foram as que induziram maior edema, no entanto G2 apresentou uma atividade edematogênica diferenciada. Isso porque esta fração causou um pico de edema com 30 minutos e o manteve até 1 hora, apresentando um platô de atividade, enquanto as outras frações e a peçonha bruta apresentaram apenas um pico de edema. Provavelmente o pico de atividade edematogênica de G2 está presente entre 30 minutos e 1 hora. Isso indica que G2 contém algum componente que está sendo purificado e que se mostra diferente das outras frações testadas.

A atividade caseinolítica das frações D4, G1 e G1a foi considerada alta, pois estas foram capazes de hidrolisar totalmente a caseína. G2 e G2a apresentaram atividade proteolítica menor, degradando apenas parcialmente as cadeias da caseína.

A fração D4 proveniente da peçonha do estado de São Paulo apresentou elevada atividade fibrinogenolítica, pois com 60 minutos de incubação houve degradação total da cadeia A- α e parcialmente da cadeia B- β do fibrinogênio. G1 degrada totalmente a cadeia A- α e G2 apresentou uma degradação parcial. Nenhuma das amostras foi capaz de hidrolisar a cadeia γ .

Nos ensaios realizados posteriormente (peçonha proveniente de Minas Gerais), D4 apresentou menor atividade fibrinogenolítica, pois não foi capaz de degradar a cadeia B- β do fibrinogênio. Com cinco minutos de incubação já é possível perceber a hidrólise da cadeia A- α , sendo esta degradada totalmente em quinze minutos. Com o aumento do tempo observa-se um aumento nos produtos de degradação. Essa fração não mostrou atividade sobre a cadeia B- β ou γ do fibrinogênio. Estes resultados indicam que essa amostra contém uma α -fibrinogenase. Esse padrão de especificidade não é comum para a maioria das fibrinogenases isoladas de peçonhas de serpentes, pois estas hidrolisam preferencialmente a cadeia A- α e, em seguida, a cadeia B- β ^[8, 9].

G1 e G2 apresentam uma fraca atividade fibrinogenolítica. G1 apresenta uma leve degradação da cadeia A- α do fibrinogênio somente com 60 minutos de incubação; já G2 em 15 minutos começa a hidrolisar a cadeia A- α do fibrinogênio. Com o aumento do tempo ocorre o aumento da degradação da cadeia A- α , mas esta não é totalmente hidrolisada. As cadeias B- β e γ do fibrinogênio permanecem inalteradas.

Dentre os inibidores enzimáticos testados, o EDTA foi capaz de inibir totalmente a atividade proteolítica de G1 sobre o fibrinogênio e parcialmente a atividade de G2. O EDTA atua como agente quelante de íons metálicos e isso indica que as α -fibrinogenases presente nas amostras são metaloproteases^[40].

As α -fibrinogenases presentes nas frações utilizadas neste trabalho não são nenhuma das fibrinogenases isoladas por OLIVEIRA (2001)^[9], pois estas foram capazes de degradar

totalmente a cadeia A- α do fibrinogênio com menos de 15 minutos de incubação, e após 45 minutos a cadeia B- β também era totalmente digerida.

Dentre os íons metálicos testados, nenhum apresentou efeito significativo sobre a atividade fibrinogenolítica de G2, enquanto o HgCl_2 e ZnCl_2 inibiram parcialmente a atividade proteolítica de G1.

Os íons metálicos da série IIB, como o Zn e Hg, são conhecidos por regular atividades enzimáticas e interações protéicas interferindo nos resíduos de cisteína no sítio ativo. É o caso do ZnCl_2 , que bloqueia de forma específica a atividade proteolítica da cisteína-protease presente em *Entamoeba histolytica*^[41]. AMARANT et al. (1991)^[42] também demonstraram que o Hg^{+2} inibe a atividade de proteases fibrinolíticas (Achelase I e II) presentes na lagarta *Lonomia achelous* (taturana).

A incoagulabilidade sanguínea observada em muitos envenenamentos ofídicos é causada pelo consumo total do fibrinogênio plasmático pelas enzimas fibrinogenolíticas, que provocam ação desfibrinogeuante in vivo^[43]. A fração D4, apesar de degradar a molécula de fibrinogênio in vitro, não foi capaz de causar incoagulabilidade sanguínea. Isso pode ser explicado pelo fato de haver inibidores endógenos, capazes de neutralizar a atividade proteolítica de metaloproteases de peçonhas, como é o caso da $\alpha 2$ -macroglobulina (uma glicoproteína plasmática) demonstrado para a jararagina^[44].

Nossos resultados para G2 indicam uma similaridade com os obtidos por ANDRADE (2003)^[45], que purificou uma proteína da peçonha de *Bothrops moojeni* através dos mesmos passos cromatográficos aqui utilizados. Essa proteína apresentou atividade fibrinogenolítica semelhante e também não causou incoagulabilidade sanguínea in vivo. A fração D4G2 isolada pelo autor apresentou maior atividade proteolítica que G2 degradando também a cadeia B- β do fibrinogênio, mas com o dobro de tempo de incubação e o dobro da quantidade de amostra utilizados neste trabalho.

A proteína purificada por ANDRADE (2003)^[45] é derivada de uma metaloprotease da classe P-III que contém somente os domínios desintegrina e rico em cisteína.

Segundo PETRETSKI et al. (2000)^[46], quando ocorre a separação entre os domínios desintegrina e protease em algumas metaloproteases de classe P-III, o resultado é uma baixa atividade proteolítica. Apesar disso, os fragmentos protéicos contendo somente os domínios desintegrina e rico em cisteína são capazes de induzir atividade edematogênica, sugerindo que haja um mecanismo não enzimático desconhecido responsável pelo aumento da permeabilidade vascular, e conseqüentemente, do edema.

Isso explica a alta atividade edematogênica da fração G2 e baixa atividade proteolítica, reforçando a hipótese de ANDRADE (2003)^[45] de que predomina nessa fração apenas os domínios desintegrina e rico em cisteína de uma metaloprotease da classe P-III.

5 *Conclusão*

- A fração D4, obtida através da cromatografia da peçonha de *Bothrops moojeni*, é rica em enzimas proteolíticas, capazes de degradar a caseína e o fibrinogênio bovino e de causar edema.
- A subfração G1 apresentou baixa atividade proteolítica sobre o fibrinogênio bovino, mas elevada atividade sobre a caseína.
- A subfração G2 contém uma proteína majoritária de massa molecular de aproximadamente 28,7 kDa. Essa subfração contém os domínios desintegrina e rico em cisteína de uma metaloprotease da classe P-III e mostrou elevada atividade edematogênica.

6 *Referências Bibliográficas*

- 1 BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Snake bite epidemiology in the last 100 years in brazil: a review. **Cad. Saúde Pública**, v. 19, n. 1, p. 07–16, 2003.
- 2 PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 47, n. 1, p. 24–29, 2001.
- 3 HOGE, A. R. Preliminary account on neotropical crotalinae (serpentes-viperidae). **Mem. Inst. Butantan**, v. 32, p. 109, 1965.
- 4 NISHIOKA, S. A.; SILVEIRA, P. V. P. A clinical and epidemiologic study of 292 cases lance-headed viper bite in a brazilian teaching hospital. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 47, p. 805–810, 1992.
- 5 MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, p. 1749–1800, 1998.
- 6 RUSSEL, F. E. The clinical problem of crotalid snake venom poisoning. in: Snake venom. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 52, p. 978, 1979.
- 7 RIBEIRO, L. A.; JORGE, M. T. Bites by snakes in the genus *Bothrops*: A series of 3,319 cases. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 30, n. 6, p. 475–480, 1997.
- 8 OLIVEIRA, F.; RODRIGUES, V. M.; BORGES, M. H.; HAMAGUCHI, A.; GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRAMDEBURGO, M. I. Purification and characterization of a new proteolytic enzyme from the venom of *Bothrops moojeni* (Caissaca). **Biochemistry Molecular Biology Interactional**, n. 47, p. 1069–1077, 1999.
- 9 OLIVEIRA, F. Novas proteases da peçonha de *Bothrops moojeni* (caiçaca): Purificação de quatro isoformas de fibrinogenases (Bth α s) e caracterização bioquímica da BthTl. 141 f. Tese (Doutorado) — Departamento de Biologia Molecular-Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília (UNB), Brasília-DF, 2001.
- 10 IWANAGA, S.; SUZUKI, T. Enzymes in snake venoms. In: LEE, C. Y. (ed.). **Handbook of Experimental Pharmacology**. Berlin: Springer, 1979. v. 52, p. 61–158.
- 11 GARCÍA, L.; E., P.; SILVA, L. T. et al. The effect of post-translational modifications on the hemorrhagic activity of snake venom metalloproteinases. **Comp. biochem. physiol. Part C: Toxic. Pharmac.**, v. 1, p. 23–32, 2004.
- 12 OUYANG, C.; TENG, C. M.; HUANG, T. F. Characterization of snake venom components acting on blood coagulation and platelet function. **Toxicon**, v. 30, p. 945–966, 1992.
- 13 BAJWA, S. S.; MARKLAND, F. S. A new method for purification of the thrombin-like enzyme from the venom of the eastern diamondback rattlesnake. **Thromb. Res.**, v. 16, p. 11–23, 1979.

- 14 MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1477, n. 1, p. 146–156, 2000.
- 15 RUCAVADO, A.; FLORES-SÁNCHEZ, E.; FRANCESCHI, A.; MAGALHÃES, A.; GUTIÉRREZ, J. M. Characterization of the local tissue damage induced by LHF-II, a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity isolated from *Lachesis muta muta* snake venom. **Toxicon**, v. 37, p. 1297–1312, 1999.
- 16 MANDELBAUM, F. R.; ASSAKURA, M. T.; REICHI, A. P. Characterization of two hemorrhagic factor isolated from the venom of *Bothrops neuwiedi* (jararaca pintada). **Toxicon**, v. 22, p. 193, 1984.
- 17 SANCHES, E. F.; MAGALHÃES, A.; DINIZ, C. R. Purification of a hemorrhagic factor (LHF-1) from the venom of the bush master snake, *Lachesis muta muta*. **Toxicon**, v. 25, p. 611, 1987.
- 18 ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P.; ASPERTI, M. C. et al. Isolation of the major proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops moojeni* (caissaca). **Toxicon**, v. 23, p. 691–706, 1985.
- 19 MARKLAND, F. S. Snake venom fibrinogenolytic and fibrinolytic enzymes: An updated inventory. **Thromb. Haemost.**, v. 3, p. 668, 1998.
- 20 CLISSA, P. B.; D., G.; THEAKSTON, R. D. G.; MOTA, I.; TAYLOR, M. J.; MOURA-DA-SILVA, A. M. The effect of jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom, on pro-inflammatory cytokines released by murine peritoneal adherent cells. **Toxicon**, v. 39, p. 1567–1573, 2001.
- 21 KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R. M.; THEAKSTON, R. D. G.; ZUZEL, M. Insights into the mechanism of hemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, n. 34, p. 627–642, 1996.
- 22 MARUYAMA, M.; SUGIKI, M.; YOSHIDA, E.; MIHARA, H.; NAKAJIMA, N. Broad substrate specificity of snake venom fibrinolytic enzymes: Possible role in hemorrhage. **Toxicon**, v. 30, p. 1387–1397, 1992.
- 23 GREENBERG, C. S. Fibrin formation and stabilization. In: LOSCALZO, J.; SCHAFER, A. I. (ed.). **Thrombosis and Hemorrhage**. Oxford: Blackwell Scientific, 1994. p. 106.
- 24 MARKLAND, F. S. Inventory of α and β -fibrinogenases from snake venom. **Throm. Haemost.**, v. 65, p. 438–443, 1991.
- 25 STÖCKER, W.; ZWILLING, R. Astacin. **Meth. Enzymol.**, v. 248, n. 305–345, 1995.

- 26 HITE, L. A.; JIA, L. G.; BJARNASON, J. B. et al. cDNA sequences for four snake venom metalloproteinases: structure, classification, and their relationship to mammalian reproductive proteins. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 308, p. 182–191, 1994.
- 27 GRAMS, F.; HUBER, R.; KRESS, L. F.; MORODER, L.; BODE, W. Activation of snake venom metalloproteinase by a cysteine switch-like mechanism. **FEBS**, n. 335, p. 76–80, 1993.
- 28 BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmac. Ther.**, v. 62, p. 325, 1994.
- 29 KINI, R. M.; EVANS, J. S. Structural domains in venom proteins: Evidence that metalloproteinases and nonenzymatic platelet aggregation inhibitors (disintegrins) from snake venom are derived by proteolysis from a common precursor. **Toxicon**, v. 30, p. 265–293, 1992.
- 30 BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**, v. 82, p. 851–859, 2000.
- 31 COLLEN D.; LIJNEN, H. New thrombolytic agents and strategies. **Baillieres Clin. Haematol.**, v. 8, p. 425, 1995.
- 32 BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, n. 72, p. 248–254, 1976.
- 33 LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.
- 34 DAVIS, B. J. Disc electrophoresis II: Method and application to human serum proteins. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 121, p. 404–427, 1964.
- 35 EDIGAR, W.; PRENTICE, C. R. M. The proteolytic action of ancrod on human fibrinogen and its polypeptide chains. **Thrombosis Research**, n. 2, p. 85–89, 1973.
- 36 NIKAI, T.; MORI, N.; KISHIDA, M. et al. Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin F from the venom of *Crotalus atrox* (western diamondback rattlesnake). **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 231, p. 309–319, 1984.
- 37 ROSENFELD, G. Técnica padrão da determinação do tempo de coagulação. **J. Bras. Med.**, v. 7, p. 695–711, 1965.
- 38 DE HASS, G. H.; POSTEMA, N. M.; NIEUWENHUIZEN, W.; DEENEN, L. L. M. V. Purification and properties of phospholipase A from porcine pancreas. **Biochem. Biophys. Acta.**, v. 159, p. 103, 1968.

- 39 LENINGER. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. [S.l.]: Sarvier, 2002. ISBN 85-7378-125-4.
- 40 OWNBY, C. L.; TERRY, R. C.; QUANZHI, L. Presence of heat-stable hemorrhagic toxins in snake venoms. **Toxicon**, v. 32, n. 8, p. 945–954, 1994.
- 41 FRANCO, E.; SOARES, R. M. A.; MEZA, I. Specific and reversible inhibition of *Entamoeba histolytica* Cysteine-Proteinase activities by Zn^{2+} : Implications for adhesion and cell damage. **Arch. Med. Res.**, v. 30, p. 82–88, 1999.
- 42 AMARANT, T.; BURKCHART, W.; LEVINE, H. et al. Isolation and complete amino acid sequence of two fibrinolytic proteinases from the toxic *Saturnid* caterpillar *Lonomia Achelous*. **Bioch. et Biophys. Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 2, p. 214–221, 1991.
- 43 ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: BÜCHERL, W.; BUCKLEY, E. E. (ed.). **Venomous animals and their venoms**. New York: Academic Press, 1971. II, p. 345–384.
- 44 BARAMOVA, E. N.; SHANNON, J. D.; BJARNASON, J. B. et al. Interaction of hemorrhagic metalloproteinases with human $\alpha 2$ -macroglobulin. **Biochemistry**, v. 29, p. 1069–1074, 1990.
- 45 ANDRADE, R. M. **Caracterização bioquímica parcial e sequenciamento da região N-terminal de uma nova toxina da peçonha da serpente *Bothrops moojeni* (VIPERIDAE, CROTALINAE)**. 67 f. Dissertação (Mestrado) — Genética e Bioquímica-Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia-MG, 2003.
- 46 PETRETSKI, J. H.; HANASHIRO, M. M.; RODRIGUES, F. R.; ALVES, E. W.; MACHADO, O. L. T.; KIPNIS, T. L. Edema induction by desintegrin-like/cystein-rich domains from a *Bothrops atrox* hemorrhagins. **Biochemistry and Biophysics Research Communication**, n. 276, p. 29–34, 2000.