

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**FRACIONAMENTO DA PEÇONHA DA SERPENTE *Bothrops
moojeni* (Caiçaca): CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE
FRAÇÕES PROTEOLÍTICAS E PURIFICAÇÃO DE UMA
MIOTOXINA (BmTx)**

Lara França Vieira

Monografia apresentada à coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Uberlândia, para a
obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas.

Uberlândia – MG
Setembro – 2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**FRACIONAMENTO DA PEÇONHA DA SERPENTE *Bothrops*
moojeni (Caiçaca): CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE
FRAÇÕES PROTEOLÍTICAS E PURIFICAÇÃO DE UMA
MIOTOXINA (BmTx)**

Lara França Vieira

Dr. Fábio de Oliveira

Monografia apresentada à coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Uberlândia, para a
obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas.

Uberlândia – MG
Setembro – 2006

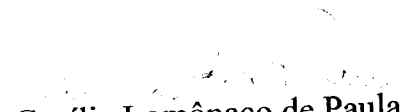
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**FRACIONAMENTO DA PEÇONHA DA SERPENTE *Bothrops*
moojeni (Caiçaca): CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE
FRAÇÕES PROTEOLÍTICAS E PURIFICAÇÃO DE UMA
MIOTOXINA (BmTx)**

Lara França Vieira

Dr. Fábio de Oliveira
Instituto de Ciências Biomédicas

Homologado pela coordenação do curso de
Ciências Biológicas em 06 / 10 / 06.


Cecília Lomônaco de Paula

Uberlândia – MG
Setembro – 2006

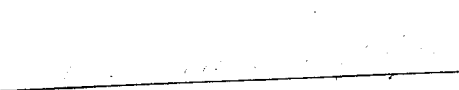
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**FRACIONAMENTO DA PEÇONHA DA SERPENTE *Bothrops
moojeni* (Caiçaca): CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE
FRAÇÕES PROTEOLÍTICAS E PURIFICAÇÃO DE UMA
MIOTOXINA (BmTx)**

Lara França Vieira

Aprovada pela banca examinadora em 10/10

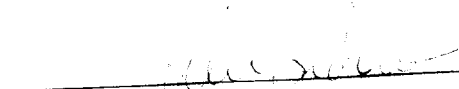
Nota 10



Dr. Fábio de Oliveira



Ms. Rogério de Freitas Lacerda



Ms. Luiz Fernando Moreira Izidoro

Uberlândia-MG
Setembro – 2006

DEDICATÓRIA

A você vovó...

Sempre imaginei o dia da minha formatura, com todas as pessoas que eu amo celebrando comigo este marco tão importante da minha vida. Sei que você sempre teve muito orgulho de mim, e queria muito estar presente, mas não deu tempo...

Por isso, dedico esta monografia a você, que sempre me apoiou e me amou incondicionalmente.

Sinto saudades todos os dias...

AGRADECIMENTOS

É inestimável o valor de muitas pessoas em minha vida. A importância delas é tão grande, que se não estivessem presentes, provavelmente eu seria uma pessoa bem diferente do que sou. Sempre digo que não há como duas pessoas conviverem e não influenciarem uma à outra. Por isso, agradeço a todos que me rodeiam por quem sou hoje, vocês contribuíram enormemente em minha vida, espero que eu possa sempre retribuir.

Sou muito grata por todas as experiências que vivi, porque ao sentir na pele a felicidade, a dor, o sofrimento, o amor, a amizade e muitas outras coisas, aprendi que posso tudo, que sou capaz de tudo. Aprendi que se a acreditarmos em nós mesmos, tudo fica mais fácil, mais bonito.

Agradeço a Deus, por me encher de luz, por ser a representação do amor e por sempre direcionar meus caminhos.

Agradeço em especial, a meu pai e minha mãe por sempre acreditarem em mim e me apoiarem. Pelo sustento físico e psicológico, que me permitiram chegar até aqui. Por todos os sacrifícios feitos, todas as incansáveis horas de trabalho, às vezes longe de casa por vários dias, mas sempre com o pensamento na família. Mamãe, obrigada por sempre querer o melhor pra mim, ainda que nem sempre eu compreenda. Papai, obrigada por ser essa pessoa tão pura e boa, e obrigada por estar sempre presente.

Ao meu irmão, por todas as risadas e todas as brigas. Aliás, essa monografia resultou em muitas brigas pelo computador, mas no fim acabou tudo bem! Obrigada por toda a ajuda que me deu.

Agradeço à titia Sandra, por ser minha segunda mãe. Obrigada por sempre torcer por mim, em todos os momentos da minha vida. Agradeço a você também Luís, por ser o companheiro que a titia escolheu e assim, se tornar família também.

A minha avó Nilza, que não está mais comigo, mas de certa forma sempre estará.

A minha amiga Isabela, por todos os momentos que vivemos juntas. Na sua casa eu dei risada, chorei de alegria e de tristeza, festejei muitas coisas e lamentei outras. Isso tudo representa a importância que você tem na minha vida, lembrarei para sempre de todos esses momentos. E muito obrigada por dividir seus avós comigo!

A Fernanda que agora está um pouco longe fisicamente, mas também é muito importante pra mim. Como ela mesma disse, tivemos uma pequena falta de comunicação em nossos pensamentos, mais foi passageiro, espero que nunca se repita.

A Dani e ao Gian, amigos que adoro, mas que infelizmente estão muito longe, lá no Japão. Espero que um dia possamos conviver novamente para que todos aqueles momentos de diversão se repitam!

Ao Cris, por ser minha inspiração de dedicação e por fazer minha amiga Isabela feliz!

A todos os meus companheiros de laboratório. A Patrícia por ser sempre tão meiga e generosa, adoro você. Ao Norival, por tantos favores prestados. A Carol em especial, por tantos e tantos anos de amizade. Ao técnico Helinho, por sempre conseguir tudo que eu precisava, com a maior boa vontade.

A tantas outras amizades cultivadas durante esses anos de faculdade, Thaíse, Michele, Olívia, Janaína, Adriana, Furinho, Raoni, e toda à 56ª Turma de Ciências Biológicas. Nunca vou esquecer das festas, das viagens, das aulas, das cachoeiras!

A todos os meus professores, desde o início da minha vida escolar, sem vocês nunca chegaria a este ponto.

Agradeço ao professor Marcelo Belletti e a minha companheira de laboratório Carla, pela confecção das lâminas.

Agradeço especialmente ao meu orientador Prof. Dr. Fábio de Oliveira. Continue sempre sendo essa pessoa maravilhosa que você é! Sempre acessível, companheiro, prestativo... Agradeça a Vitória por mim, por sempre atender meus telefonemas pra sua casa, cheios de dúvidas! E também a Lucimar, por ser uma ótima pessoa! Sei que você já é muito feliz, mas desejo ainda mais alegrias, espero que todos os seus desejos se realizem. Você merece tudo!

Por fim, agradeço à Universidade Federal de Uberlândia por me proporcionar uma educação de qualidade e também muitos momentos inesquecíveis!

RESUMO

As peçonhas das serpentes botrópicas são ricas em enzimas proteolíticas associadas com atividades biológicas específicas, como atividades hemorrágica, miotóxica, coagulante e anticoagulante (fibrinogenolítica e fibrinolítica). O presente trabalho descreve o fracionamento da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* e a caracterização de suas frações isoladas quanto ao perfil eletroforético, quanto a atividade proteolítica sobre o fibrinogênio bovino e sobre a azocaseína e atividade miotóxica. A peçonha bruta foi submetida a uma cromatografia de troca iônica (DEAE Sephacel), equilibrada com tampão bicarbonato de amônio (AMBIC) 0,05 M pH 7,8 e eluída em gradiente convexo de concentração com o mesmo tampão (0,05- 0,3 M). Esta cromatografia resultou em cinco frações principais denominadas E1 a E5. A fração E1 foi refracionada em resina de exclusão molecular (Sephadex G-75) e resultou em cinco subfrações denominadas de E1G1 a E1G5. A fração E1G4 foi aplicada a uma resina de afinidade Heparina Agarose, e a proteína purificada neste passo, foi submetida a uma nova filtração em resina Sephadex G-25 para a retirada do sal. Todas as frações foram testadas quanto à atividade proteolítica sobre o fibrinogênio bovino e sobre a azocaseína. Na atividade sobre o fibrinogênio, cerca de 5µg de cada fração foram incubadas por 60 minutos a 37 °C, com 50 µL de uma solução de fibrinogênio (1,5 mg/ 1mL de salina). A atividade proteolítica foi analisada em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 14%. Na atividade sobre a azocaseína, cerca de 50 µg de cada fração foram incubadas por 60 minutos a 37 °C, com uma solução de azocaseína diluída em tampão Tris-HCl 50 mM pH = 7 e CaCl₂ 0,004 M (1 mg/ 1mL). As absorbâncias de cada fração foram lidas a 366 nm. Um aumento de 0,01 na absorbância corresponde a um aumento de uma unidade de atividade sobre a azocaseína. Os resultados mostraram que todas as frações e subfrações foram capazes de degradar o fibrinogênio bovino, em maior ou menor intensidade, degradando as cadeias α e B-β. Curiosamente, a fração E1 foi capaz de degradar a cadeia γ do fibrinogênio, fato incomum na literatura. Todas as frações e subfrações também foram capazes de degradar a azocaseína. Uma proteína foi isolada da fração E1G4 após cromatografia em Heparina Agarose. Esta proteína mostrou uma alta atividade necrosante sobre o músculo gastrocnemius de camundongo. Observando o corte histológico através de microscopia óptica, podemos notar a presença de hemorragia, degeneração hialina, necrose celular e infiltrado leucocitário. Os resultados deste estudo mostraram que a peçonha da serpente *Bothrops moojeni* é muito

rica em proteases capazes de degradar o fibrinogênio bovino e a azocaseína. Uma proteína miotóxica foi isolada e caracterizada parcialmente.

Palavras Chaves: *Bothrops moojeni*, proteases, miotoxina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
3. METODOLOGIA.....	5
3.1. Obtenção das peçonhas.....	5
3.2. Fracionamento da peçonha bruta de <i>Bothrops moojeni</i>.....	5
3.2.1. Cromatografia de troca iônica da peçonha bruta de <i>Bothrops moojeni</i> em gel de DEAE Sephacel.....	5
3.2.2. Cromatografia de exclusão molecular da fração E1 em Sephadex G-75.....	6
3.2.3. Cromatografia em gel de afinidade da fração E1G4 em resina Heparina Agarose.....	6
3.2.4. Cromatografia de exclusão molecular da toxina BmTx em Sephadex G-25.....	6
3.3. Determinação quantitativa de proteínas.....	6
3.4. Caracterização Química: Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes.....	7

3.5. Ensaios enzimáticos e biológicos.....	7
3.5.1. Atividade proteolítica sobre o fibrinogênio bovino.....	7
3.5.2. Atividade proteolítica sobre a azocaseína.....	8
3.5.3. Atividade miotóxica da peçonha bruta de <i>Bothrops moojeni</i> e da toxina BmTx em músculo esquelético de camundongos.....	8
4. RESULTADOS.....	9
4.1. Fracionamento da peçonha bruta de <i>Bothrops moojeni</i>.....	9
4.1.1. Cromatografia de troca iônica da peçonha bruta de <i>Bothrops moojeni</i> em gel de DEAE Sephacel.....	9
4.1.2. Cromatografia de exclusão molecular da fração E1 em gel Sephadex G-75.....	11
4.2. Caracterização Química.....	13
4.2.1. Eletroforese da peçonha bruta de <i>Bothrops moojeni</i> e das frações E1 a E5 em gel de poliacrilamida a 14% em condições desnaturantes.....	13
4.2.2. Eletroforese das subfrações E1G1 a E1G5 em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes.....	14

4.3. Ensaio Enzimáticos e Biológicos.....	15
4.3.1. Atividade proteolítica da peçonha bruta de <i>Bothrops moojeni</i> e de suas frações sobre o fibrinogênio bovino.....	15
4.3.2. Atividade Proteolítica da peçonha bruta de <i>Bothrops moojeni</i> e de suas frações sobre a azocaseína.....	17
4.4. Purificação e caracterização parcial da miotoxina BmTx.....	19
4.4.1. Cromatografia de afinidade da fração E1G4 em resina Heparina Agarose.....	19
4.4.2. Eletroforese da toxina BmTx em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes.....	20
4.4.3. Atividade miotóxica da peçonha bruta de <i>Bothrops moojeni</i> e da toxina BmTx em músculo esquelético de camundongos.....	21
5. DISCUSSÃO.....	22
6. CONCLUSÃO.....	26
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

1. INTRODUÇÃO

As serpentes são animais vertebrados e pertencentes ao grupo dos répteis. Elas subdividem-se em peçonhentas e não peçonhentas. Esta classificação se dá através de estruturas como a fosseta loreal, a presença ou ausência de guizo na extremidade final da cauda, tamanho dos olhos em relação à boca, disposição das escamas e os desenhos que estas formam nos animais, entre outras (SINITOX, 2005). A principal característica presente nas serpentes peçonhentas são os dentes especializados, denominados presas, pelos quais elas inoculam a peçonha. Esta é produzida por uma glândula e levada às presas através de um ducto (STORER, 1995). O envenenamento por serpente peçonhenta é uma intoxicação exógena em que a peçonha é inoculada no momento da picada (BELLUOMINI et al., 1987).

Os acidentes ofídicos são muito comuns em várias regiões do globo terrestre, das quais se destacam as regiões tropicais e subtropicais. Estes acidentes representam um significativo problema de Saúde Pública, pela frequência com que ocorrem e pela morbi-mortalidade que ocasionam. Existem no mundo aproximadamente 3000 espécies de serpentes, das quais 10% a 14% são consideradas peçonhentas. A Organização Mundial de Saúde (OMS) calcula que ocorram em nível mundial aproximadamente 2.500.000 acidentes por serpentes peçonhentas por ano, com 125.000 mortes. Já no Brasil, ocorrem por ano, entre 19.000 a 22.000 acidentes ofídicos com aproximadamente 115 óbitos (PINHO et al., 2004; BARRAVIEIRA, 1993).

No Brasil, as espécies de serpentes peçonhentas pertencem aos gêneros *Bothrops*, *Lachesis*, *Crotalus* e *Micrurus*, sendo que o primeiro é responsável por cerca de 90% dos acidentes (CARDOSO et al., 1993). As serpentes do gênero *Bothrops* têm como habitat locais úmidos e onde há a presença de roedores, como matas, plantações e terrenos baldios. São animais agressivos, que atacam silenciosamente quando ameaçados (BOCHNER & STRUCHINER, 2003). A espécie *Bothrops moojeni*, conhecida popularmente como Caiçaca, é a principal causadora de acidentes ofídicos em nossa região, principalmente no período de dezembro a junho (BRITES & BAUAB, 1988).

Peçonhas de serpentes são um complexo de agentes tóxicos e não tóxicos que possuem efeitos fisiológicos no sistema cardiovascular, na permeabilidade vascular, na função renal e na hemostase (ESTÊVÃO-COSTA, 2000). Elas podem apresentar variações na composição, diferenciando-se entre as famílias, gêneros e espécies ou mesmo dentro de uma mesma espécie. Diferenças intra-específicas na composição do veneno são decorrentes de variações geográficas, sexuais, ontogenéticas e sazonais (ROCHA & FURTADO, 2005). Proteínas e

peptídeos são os principais componentes das peçonhas, constituindo de 90 a 95% de seu peso seco. Além destes, há uma porção não protéica representada por íons metálicos, carboidratos, nucleosídeos, aminas e uma baixa proporção de lipídeos e aminoácidos livres (MARKLAND et al., 1998; SCHIMDT et al., 1976).

Os acidentes provocados por serpentes botrópicas provocam efeitos locais e sistêmicos devido às proteases presentes nesta peçonha. Várias proteases atuam numa grande variedade de substratos, tais como: fibrinogênio, fibrina, insulina e glucagon. Os efeitos locais são equimoses, isquemia, necrose e eventualmente gangrena. As manifestações sistêmicas mais comuns são a indução do estado de choque, distúrbios na coagulação sanguínea, alterações cardiovasculares, hemorragias gastrintestinais, náuseas, vômitos e hematúria (BARRAVIEIRA, 1999; MEBS & OWNBY, 1990).

Diferentes peçonhas contêm múltiplos componentes que induzem ou inibem a agregação plaquetária causando complicações comuns na coagulação do sangue ou hemorragia descontrolada. Esta atividade controversa vem sido atribuída à presença simultânea nas peçonhas de serpentes, de enzimas fibrinogenolíticas e algumas outras que promovem a coagulação. Por outro lado, enzimas que promovem a agregação plaquetária geralmente impedem a ação das enzimas fibrinogenolíticas, mas podem agregar plaquetas diretamente no plasma (HUNG & CHIOU, 2001).

Markland (1991) considera que o fibrinogênio é um importante cofator na agregação plaquetária, e tem-se proposto que a inibição desta função causada por enzimas fibrinogenolíticas é provocada pela degradação do fibrinogênio em fibrina, sendo que esta degradação representa um papel de destaque na coagulação e na hemostase, as proteases podem prolongar o tempo de coagulação direta do fibrinogênio presente no plasma (HUNG & CHIOU, 2001).

O fibrinogênio é uma glicoproteína plasmática solúvel composta por três pares de cadeias não idênticas: A- α , B- β e γ (MARKLAND et al., 1998). As enzimas fibrinogenolíticas são classificadas de acordo com a especificidade de hidrólise das cadeias do fibrinogênio. A primeira classe de fibrinogenases possui especificidade pela cadeia A- α do fibrinogênio. Várias enzimas já foram isoladas de peçonhas botrópicas, inclusive da serpente *Bothrops moojeni* (OLIVEIRA et al., 1999; OLIVEIRA, 2001). A segunda classe degrada a cadeia B- β do fibrinogênio. Elas são serinoproteases e são mais estáveis ao calor que as fibrinogenases cadeia A- α (MARSHALL & HERRMANN, 1983). A terceira classe tem

afinidade pela cadeia γ . Este tipo de fibrinogenase é rara e foi isolada da peçonha de *Crotalus atrox* (NIKAI, 1984). As fibrinogenases, presentes nas peçonhas botrópicas, agem diretamente e não dependem de componentes do sangue para sua ação. Estas proteínas são metaloproteases com preferência pela cadeia alfa do fibrinogênio e fibrina, tendo menor atividade na cadeia beta (ESTÊVÃO-COSTA, 2000).

A complexa lesão causada por peçonhas botrópicas 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.

A necrose muscular é um efeito local relevante e uma séria consequência de envenenamentos botrópicos, que pode levar a uma perda irreversível da função ou do próprio tecido, podendo ser necessária à amputação do membro afetado. A mionecrose pode ocorrer de duas maneiras, indireta ou direta. A indireta ocorre como uma consequência da isquemia e degeneração dos vasos sanguíneos causados por metaloproteases hemorrágicas. A direta ocorre através do efeito de enzimas fosfolipásicas A_2 (PLA_2 s) miotóxicas nas membranas plasmáticas das células musculares (STÁBELI et al., 2006; SOARES et al., 2003). Supõe-se que as miotoxinas agem no sarcoplasma, desorganizando os fosfolípidos e o influxo de íons Ca^{2+} (RODRIGUES et al., 1998).

As fosfolipases A_2 são enzimas extensamente distribuídas na natureza e de alto interesse médico-científico devido ao seu envolvimento em várias doenças inflamatórias humanas e no envenenamento por peçonhas de serpentes e abelhas (NEVALAINEN et al., 2004). Estas enzimas são encontradas tanto no interior quanto no exterior das células. As PLA_2 s extracelulares são abundantes em tecidos pancreáticos e nas peçonhas de serpentes e artrópodes (SOARES, 1997).

As PLA_2 s constituem uma superfamília de diferentes enzimas, cujos grupos são baseados na sua fonte, na sequência de aminoácidos e nas suas características bioquímicas (SIX, 2000). As enzimas PLA_2 s das classes I, II e III são extracelulares, têm baixo peso molecular (de 13.000 a 18.000), são Ca^{2+} - dependentes e estruturalmente diferentes das PLA_2 s da classe IV. Estas são intracelulares, Ca^{2+} - dependentes e possuem alto peso molecular (85.000). Enzimas recentemente descobertas, tanto extracelulares quanto citosólicas, foram identificadas e não se adequaram em nenhuma das classes acima, deste

modo, novas classes estão sendo propostas (MURAKAMI, 2004).

As enzimas PLA₂s são classificadas em onze grupos, sendo que as provenientes de peçonhas de serpentes pertencem aos grupos I e II (SIX, 2000). O último grupo ainda é dividido em dois grupos principais, um com enzimas cataliticamente ativas que contêm um resíduo conservado de ácido aspártico na posição 49 (Asp49 PLA₂s) e outro, de enzimas homólogas com um substituinte da lisina na mesma posição (Lys49 PLA₂s), as quais são cataliticamente inativas (ÂNGULO, 2005).

Em adição ao seu papel miotóxico primário, as enzimas PLA₂s mostram outros efeitos tóxicos e farmacológicos importantes, incluindo atividades neurotóxica, cardiotoxica, hemolítica, hemorrágica, hipotensiva, anticoagulante, inibidora de agregação plaquetária e indutora de edemas (STÁBELI et al., 2006). Durante os últimos 10 anos houve um aumento no interesse em se estudar os componentes da peçonha responsáveis pela mionecrose. O isolamento e caracterização de várias miotoxinas botrópicas foi uma consequência natural (RODRIGUES et al., 1998).

A peçonha da serpente *Bothrops moojeni* é rica em compostos farmacológicos ativos, principalmente proteases que interferem de diferentes maneiras no sistema hemostático humano provocando diversas alterações. Este foi o principal motivo que nos induziu ao interesse pelo estudo dos componentes com ação proteolítica e miotóxica que participam da constituição dessa peçonha.

2. OBJETIVOS

Fracionar a peçonha bruta da serpente *Bothrops moojeni* e caracterizar suas frações isoladas quanto ao perfil eletroforético e quanto à atividade proteolítica sobre o fibrinogênio bovino e sobre a azocaseína, além da purificação de uma toxina necrosante.

3. METODOLOGIA

3.1. Obtenção das peçonhas

A peçonha da serpente *Bothrops moojeni* foi adquirida do Serpentário Bioagents, Batatais-SP, sob responsabilidade da bióloga Alexandra Jardim Sandrin. Após a coleta, a peçonha foi imediatamente dessecada à vácuo em temperatura ambiente e conservada à -20°C até o momento do uso.

3.2. Fracionamento da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* e frações

3.2.1. Cromatografia de troca iônica da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* em gel de DEAE Sephacel

O fracionamento da peçonha bruta de *B. moojeni* foi realizado conforme técnicas descritas por OLIVEIRA (2001). Cerca de 200 mg da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* foram dissolvidos em 2,0 mL de tampão bicarbonato de amônio (AMBIC) 0,05 M pH 7,8, centrifugados a 10.000g por 10 min em temperatura ambiente e aplicados a uma coluna de DEAE Sephacel (1,5 X 15 cm). As amostras foram eluídas com um gradiente convexo de concentração de bicarbonato de amônio (0,05 – 0,3 M) pH 7,8, utilizando uma câmara de mistura com um volume de 150 mL. As frações, contendo 3,0 mL cada, foram coletadas num fluxo de 20 mL/hora, por um coletor de frações Bio Rad. A absorbância de cada fração foi acompanhada em 280 nm, num espectrofotômetro ULTROSPEC 1000E (Pharmacia Biotech). Em seguida um gráfico foi construído, sendo as amostras delimitadas, reunidas em “pools”, dosadas, liofilizadas e armazenadas a - 20 °C até o momento de uso. A fração E1 foi recromatografada em resina de exclusão molecular.

3.2.2. Cromatografia de exclusão molecular da fração E1 em Sephadex G-75

A primeira fração obtida na cromatografia de troca iônica, denominada E1, foi reunida em um “pool”, liofilizada, ressuspensa em 3 mL de tampão AMBIC 0,05M e aplicada a uma coluna de Sephadex G-75 (1,0 X 100 cm), equilibrada com o mesmo tampão (bicarbonato de amônio 0,05 M, pH 7,8). As frações foram coletadas, monitorizadas e reunidas conforme descrito no item 3.2.1.

3.2.3. Cromatografia em gel de afinidade da fração E1G4 em resina Heparina Agarose

A quarta fração obtida na cromatografia de gel filtração, denominada E1G4, foi aplicada a uma coluna de Heparina Agarose (1,7 X 15 cm). A amostra foi eluída com tampão Tris-HCl 20 mM em CaCl_2 5 mM pH 7,0 e, posteriormente em tampão Tris-HCl 20 mM em NaCl 1,0 M pH 7,0. Frações de 3,0 mL foram coletadas num fluxo de 20 mL/hora, por um coletor de frações Bio Rad. As absorvâncias das frações isoladas foram avaliadas a 280 nm.

3.2.4. Cromatografia de exclusão molecular da toxina BmTx em Sephadex G-25

A segunda fração obtida na cromatografia em Heparina Agarose (BmTx) foi submetida a uma exclusão molecular para a retirada do sal proveniente do tampão de eluição utilizado anteriormente (Tris-HCl 20 mM em NaCl 1,0 M pH 7,0). As amostras foram eluídas em tampão AMBIC 0,03 M num fluxo de 20 mL/hora. A coleta e monitorização das amostras foram realizadas conforme descrito no item 3.2.1.

3.3. Determinação quantitativa de proteínas

As dosagens protéicas foram realizadas pelo método do microbiureto, conforme descrito por Itzhaki e Gill (1964).

3.4. Caracterização Química: Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes

A eletroforese em gel de poliacrilamida a 14%, com agentes desnaturantes, foi realizada conforme a técnica descrita por Laemmli (1970). Foi utilizado um gel de empilhamento a 5 % em pH 6,8 contendo 0,125 M de Tris-HCl e 0,1 % de SDS e um gel de separação a 14 % em pH 8,8 e 0,1 % de SDS, mantendo a relação acrilamida:bis-acrilamida de 30:0,8 (m/m).

Os géis foram corados por 15 minutos numa solução de Coomassie Blue R-250 a 0,2% (m/v) dissolvidas em água: metanol: ácido acético (4:5: 1 v/v) e descoradas em água: etanol: ácido acético (6:3:1 v/v).

3.5. Ensaio enzimáticos e biológicos

3.5.1. Atividade proteolítica sobre o fibrinogênio bovino

Esta atividade foi realizada conforme a metodologia descrita por Oliveira *et al.* (1999). Em 50µL de uma solução de fibrinogênio bovino (1,5 mg/mL salina) foram adicionados 5 µg de proteínas e a solução foi incubada por até 60 min a 37°C. As amostras foram dissolvidas em 25 µL de tampão Tris HCl 0,06 M, pH 6,8, contendo glicerol a 10% (v/v), β-mercaptoetanol a 10% (v/v), SDS a 2% (m/v) e azul de bromofenol 0,05%. Em seguida, foram aquecidas a 100 °C por 3 minutos e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com SDS, como agente desnaturante.

3.5.2. Atividade proteolítica sobre a azocaseína

A atividade foi realizada segundo a técnica descrita por Markland et al (1988). Cerca de 50 µg de amostra foram adicionados a 200 µL de Tris-HCl 50 mM pH = 7,8 em NaCl 150 mM e incubada por 60 minutos com 100µL de uma solução de azocaseína (1 mg/mL). A reação foi parada pela adição de 100 µL de ácido tricloro acético 15 % e depois de centrifugadas a 10.000g por 10 minutos, as absorbâncias dos sobrenadantes foram lidas a 366 nm. Uma unidade de atividade azocaseinolítica corresponde a um acréscimo de 0,01 em absorbância 366 nm nas condições de reação acima definidas.

3.5.3. Atividade miotóxica da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* e da toxina BmTx em músculo esquelético de camundongos

A atividade miotóxica foi determinada com base nas alterações morfológicas induzidas por injeções de 50 µg de peçonha bruta ou da proteína BmTx no músculo gastrocnemius de camundongos Swiss (25-30g). Depois de 24 horas de incubação os animais foram sacrificados com éter de petróleo. Fragmentos do tecido foram cortados e fixados numa solução de formol 10% (v/v), por 24 horas. As peças foram desidratadas com concentrações crescentes de etanol e então processadas para a inclusão em parafina.

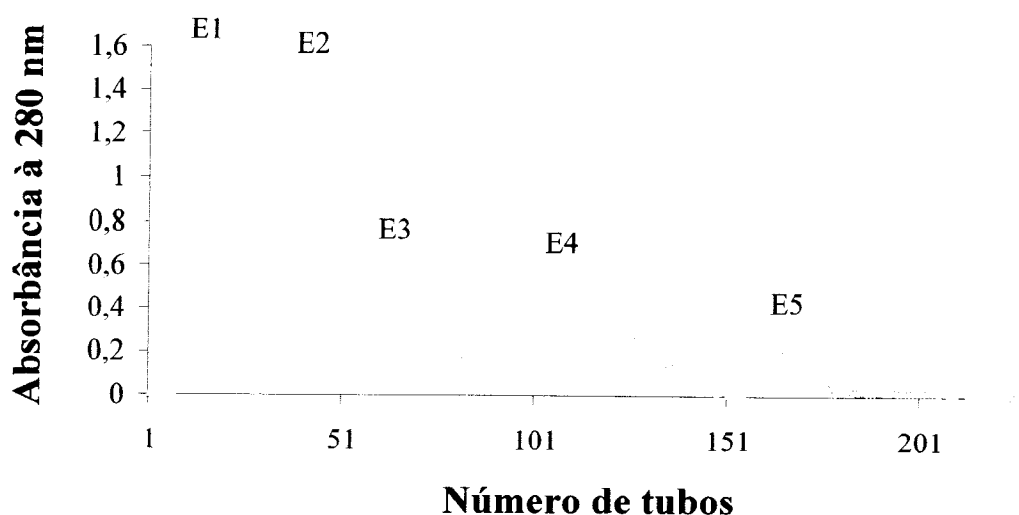
Os blocos obtidos foram cortados com o auxílio de um micrótomo. Cortes com cerca de 5,0 µm de espessura foram corados com hematoxilina/eosina, montados em lâmina e lamínula, examinados ao microscópio óptico (aumento de 10X e 40X) e fotografados.

4. RESULTADOS

4.1. Fracionamento da peçonha bruta de *Bothrops moojeni*

4.1.1. Cromatografia de troca iônica da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* em resina DEAE Sephacel

A cromatografia da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* foi inicialmente realizada em resina DEAE-Sephacel com um gradiente convexo de concentração de tampão bicarbonato 0,05 M a 0,3 M em pH 7,8. O perfil cromatográfico está mostrado na figura 1. A peçonha total resultou em cinco frações principais denominadas de E1 a E5. Sua recuperação protéica realizada por absorbância total a 280 nm foi de aproximadamente 80% (tabela I).



Cromatografia de 200 mg da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* em coluna de DEAE Sephacel (1,5 cm x 15,0 cm), equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,05 M, pH7,8. As amostras foram eluídas num gradiente convexo de concentração (0,05 M-0,3 M) do mesmo tampão, num fluxo de 20 mL/h à 4 °C. Frações de 3mL foram coletadas. O gradiente de concentração foi estabelecido a partir do início da cromatografia.

Recuperação protéica das frações obtidas do fracionamento da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* em DEAE Sephacel.

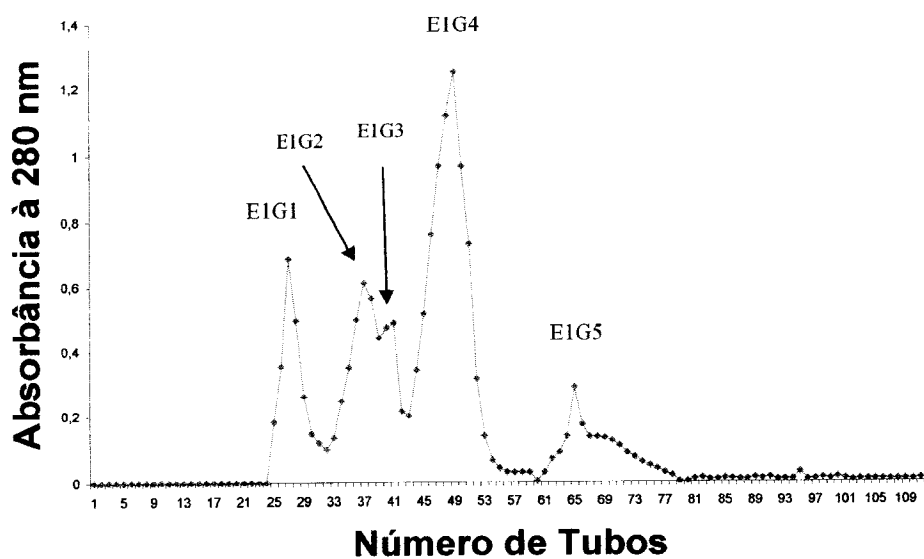
***PB** – Peçonha bruta de *Bothrops moojeni*.

** Recuperação protéica realizada pela absorbância total a 280 nm de cada fração.

Amostras	A _{280nm} totais	Recuperação (%) **
PB*	242.4	100
E1	56,59	23,34
E2	53,69	22,14
E3	36,03	14,86
E4	33,0	13,6
E5	13,19	5,44
Total	192.5	79.38

4.1.2. Cromatografia de exclusão molecular da fração E1 em resina Sephadex G-75

A fração E1 foi submetida a um novo passo de purificação em resina de exclusão molecular, Sephadex G-75, em tampão bicarbonato de amônio 0,05 M, pH=7,8. O perfil cromatográfico está mostrado na figura 2. A fração E1 foi resolvida em cinco subfrações principais denominadas de E1G1, E1G2, E1G3, E1G4 e E1G5, respectivamente.



Cromatografia da fração E1 em coluna de Sephadex G-75, equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,05 M, pH7,8. As amostras foram eluídas num fluxo de 20 mL/h à 4 °C. Frações de 3mL foram coletadas.

A recuperação protéica dessa cromatografia foi de aproximadamente 76%. Esta recuperação foi similar àquela realizada em resina DEAE Sephacel.

Recuperação protéica das subfrações obtidas do fracionamento da fração E1 em resina Sephadex G-75.

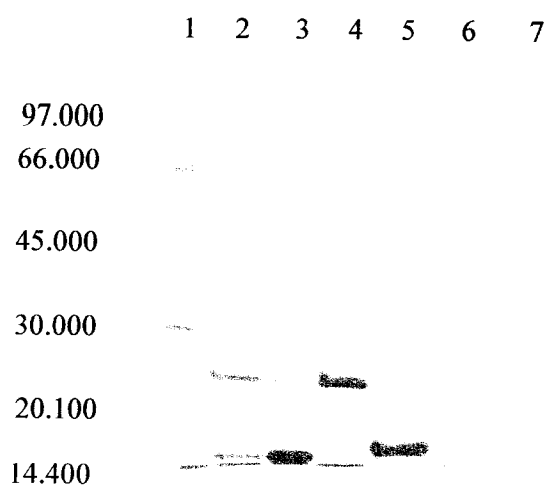
* Recuperação protéica realizada pela absorbância total a 280 nm da cada fração.

Amostras	A _{280nm} totais	Recuperação (%)*
E1	57,6	100
E1G1	2,964	5,14
E1G2	7,81	13,5
E1G3	22,104	38,375
E1G4	7,429	12,9
E1G5	3,465	6,01
Total	43.772	75,99

4.2. Caracterização Química

4.2.1. Eletroforese da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* e das frações E1 a E5 em gel de poliacrilamida a 14% em condições desnaturantes

Após a cromatografia em resina DEAE-Sephacel, as frações obtidas foram submetidas a uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% em condições desnaturantes, para visualização de seus componentes protéicos. O perfil eletroforético é mostrado pela figura 3.

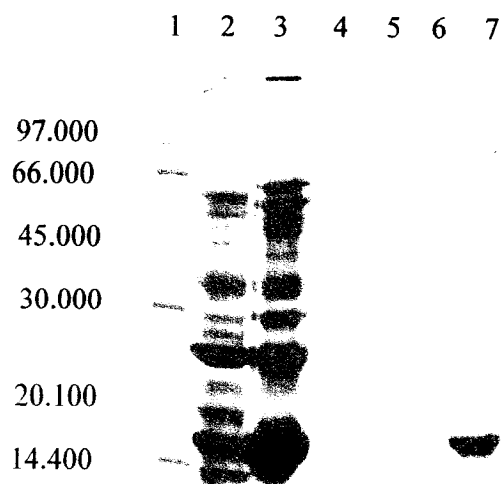


Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* e das frações obtidas no fracionamento com a resina DEAE Sephacel. Linha 1- Padrão de peso molecular LMW (Low Molecular Weight): fosforilase b (97.000), albumina bovina (66.000), ovoalbumina (45.000), anidrase carbônica (30.000), inibidor de tripsina (20.100) e α -lactoalbumina (14.400); 2- Peçonha bruta de *Bothrops moojeni*; 3-E1; 4-E2; 5- E3; 6- E4; 7- E5.

O resultado mostrou ampla variedade de proteínas, com pesos moleculares variando de 14.000 a 97.000. Observamos também que a fração E1 tem a maior quantidade de proteínas, com maior evidência para uma proteína de baixo peso molecular, aproximadamente 16.000.

4.2.2. Eletroforese das subfrações E1G1 a E1G5 em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes

As subfrações obtidas a partir da cromatografia da fração E1 em resina Sephadex G-75 foram aplicadas a um gel de poliacrilamida 14% em condições desnaturantes. Na figura 4 podemos observar que a grande maioria das proteínas contidas na fração E1 foi encontrada na subfração E1G1. Curiosamente, a fração E1G4 apresentou banda única, fortemente corada, e com peso molecular 15.750. O peso molecular foi determinado através do software de análise de imagem Kodak 1D. A fração E1G5 não apresentou proteínas visíveis no gel, o que indica que ela é formada de pequenos peptídeos.



Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* e das subfrações obtidas no refraçãoamento com a resina Sephadex G-75. Linha 1- Padrão de peso molecular LMW (Low Molecular Weight): fosforilase b (97.000), albumina bovina (66.000), ovoalbumina (45.000), anidrase carbônica (30.000), inibidor de tripsina (20.100) e α -lactoalbumina (14.400); 2- Peçonha bruta de *Bothrops moojeni*; 3- Fração E1; 4-E1G1; 5-E1G2; 6- E1G3; 7- E1G4.

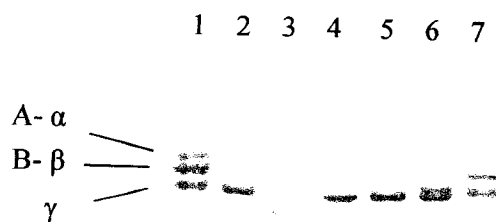
4.3.1. Atividade proteolítica da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* e de suas frações sobre o fibrinogênio bovino.

A atividade fibrinogenolítica foi realizada incubando cada fração com o fibrinogênio bovino. As figuras 5 e 6 mostram o resultado da atividade fibrinogenolítica realizada com todas as frações (E1 a E5) e subfrações (E1G1 a E1G5) obtidas do fracionamento da peçonha bruta de *Bothrops moojeni*. Esta atividade é evidenciada pelo desaparecimento das cadeias do fibrinogênio e também pelo aparecimento de produtos de degradação, na parte inferior do gel.

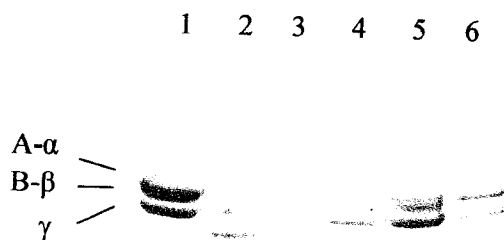
Pode-se observar que todas as frações foram capazes de degradar as cadeias do fibrinogênio bovino em maior ou menor intensidade. As frações de E1 e E2 degradaram completamente as cadeias A- α e B- β , enquanto que as frações E3 e E4 degradaram a cadeia A- α completamente e a B- β parcialmente. A fração E5 apresentou baixa atividade fibrinogenolítica, degradando, aparentemente, somente a cadeia A- α do fibrinogênio. Nossos resultados sugerem que a fração E1 foi capaz de degradar parcialmente a cadeia γ do fibrinogênio bovino (Figura 5).

De acordo com a figura 6 podemos observar que as todas as subfrações, exceto E1G5, foram capazes de degradar o fibrinogênio. As subfrações E1G1 e E1G2 degradam a cadeia A- α mais rapidamente que B- β e parecem degradar parcialmente a cadeia γ do fibrinogênio. Aparentemente, a subfração E1G4 foi capaz de degradar somente a cadeia A- α do fibrinogênio.

Nossos resultados sugerem que a fração E1G5 não possui enzimas proteolíticas capazes de degradar o fibrinogênio.



Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes dos produtos de hidrólise do fibrinogênio bovino, resultante da ação da peçonha bruta de *Botrhops moojeni* e suas frações. 1 - Fibrinogênio bovino controle; 2 a 7- Fibrinogênio incubado por 60 minutos com a peçonha bruta e as frações E1 a E5, respectivamente.

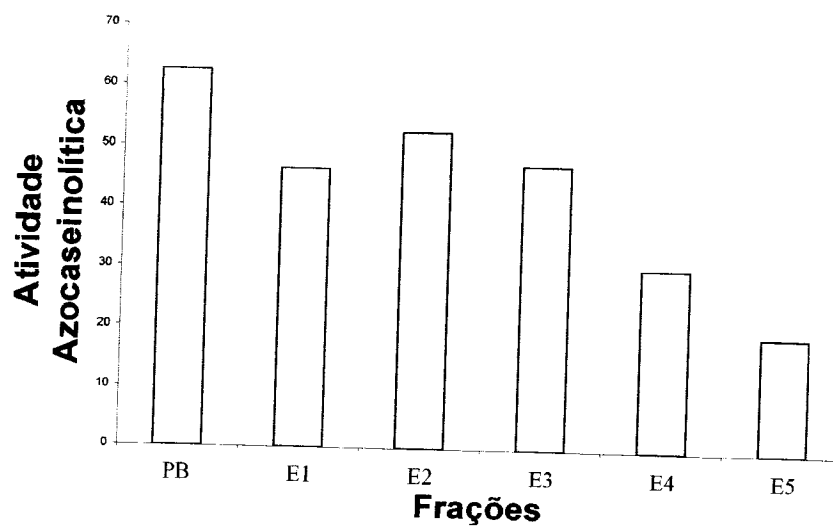


Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes dos produtos de hidrólise do fibrinogênio bovino, resultante da ação das subfrações da peçonha de *Botrhops moojeni*. 1- Fibrinogênio bovino controle; 2 a 6 - Fibrinogênio incubado por 60 minutos com E1G1 a E1G5, respectivamente.

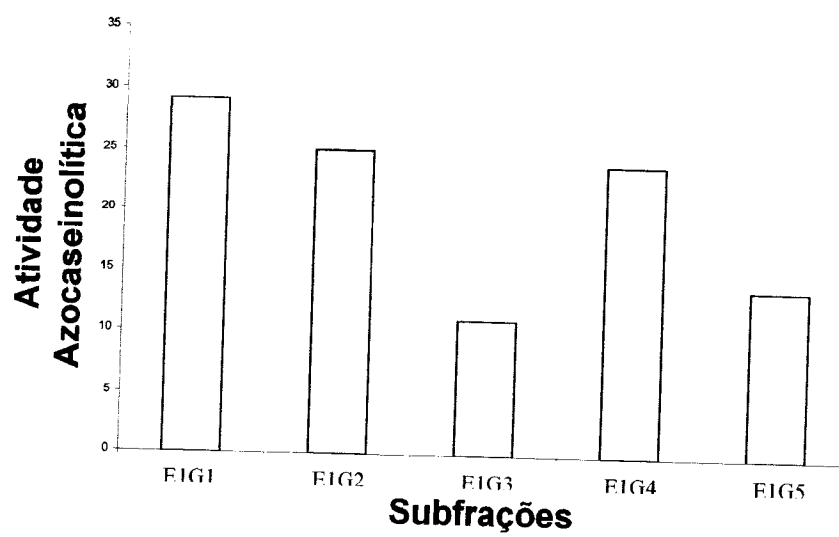
4.3.2. Atividade Proteolítica da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* e de suas frações sobre a azocaseína.

Todas as frações e subfrações foram testadas quanto à atividade proteolítica sobre a azocaseína. Nossos resultados (figura 7) mostraram que as frações E1, E2 e E3 apresentaram elevada atividade azocaseinolítica (46, 5, 52,6 e 47,4 unidades proteolítica, respectivamente), enquanto que as frações E4 e E5 apresentaram uma atividade um pouco menor (30,3 e 19,4 unidades, respectivamente).

Podemos observar na figura 8, que dentre as subfrações, a E1G1, E1G2 e E1G4 apresentaram as atividades azoproteolíticas mais altas, com 29,2, 25,1 e 24 unidades proteolíticas, respectivamente. As subfrações E1G3 e E1G5 apresentaram uma baixa atividade sobre a azocaseína (11,1 e 13,9 respectivamente).



Atividade proteolítica sobre a azocaseína da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* e das frações de E1 a E5.

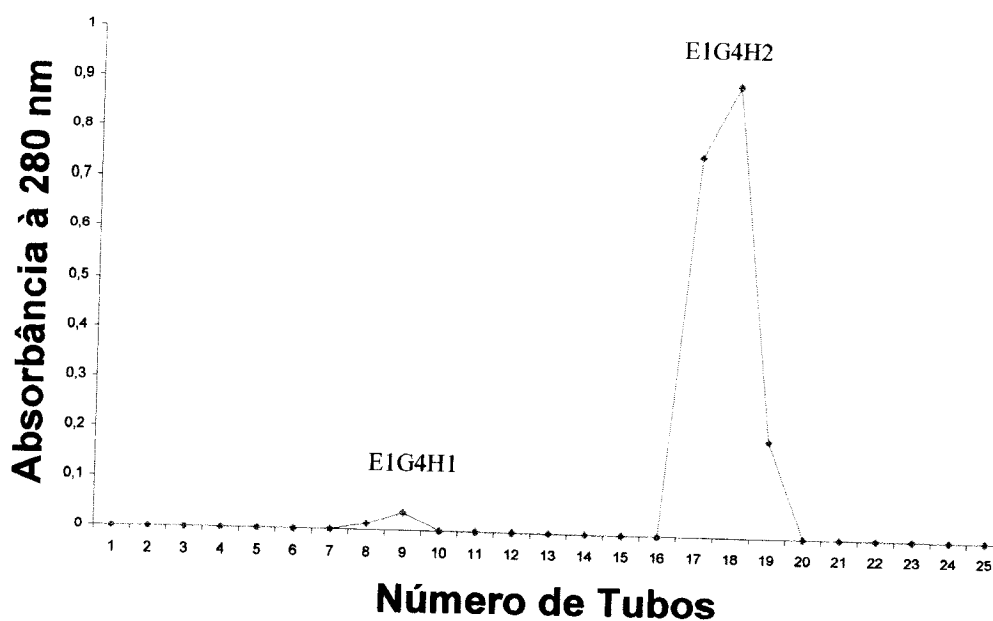


Atividade proteolítica sobre a azocaseína das subfrações de E1G1 a E1G5.

4.4. Purificação e caracterização parcial da miotoxina BmTx

4.4.1. Cromatografia de afinidade da fração E1G4 em resina Heparina Agarose

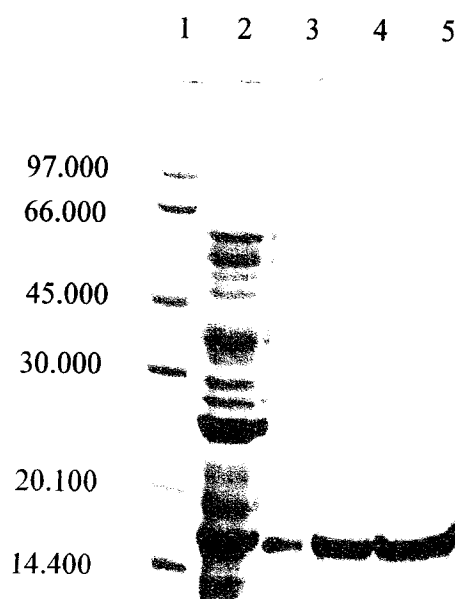
A fração E1G4 foi refracionada em resina de afinidade Heparina Agarose. O perfil cromatográfico é mostrado na figura 9. Foram obtidas duas frações denominadas E1G4H1 e E1G4H2. A fração E1G4H2, que corresponde à toxina purificada, foi renomeada como BmTx.



Cromatografia da fração E1G4 em coluna de Heparina Agarose, equilibrada com tampão TRIS-HCl 20mM em CaCl_2 5,0 mM, pH 7,0. As amostras foram eluídas com tampão TRIS-HCl 20 mM em NaCl 1,0 M, pH 7,0, num fluxo de 20 mL/h. Frações de 3mL foram coletadas.

4.4.2. Eletroforese da toxina BmTx em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes

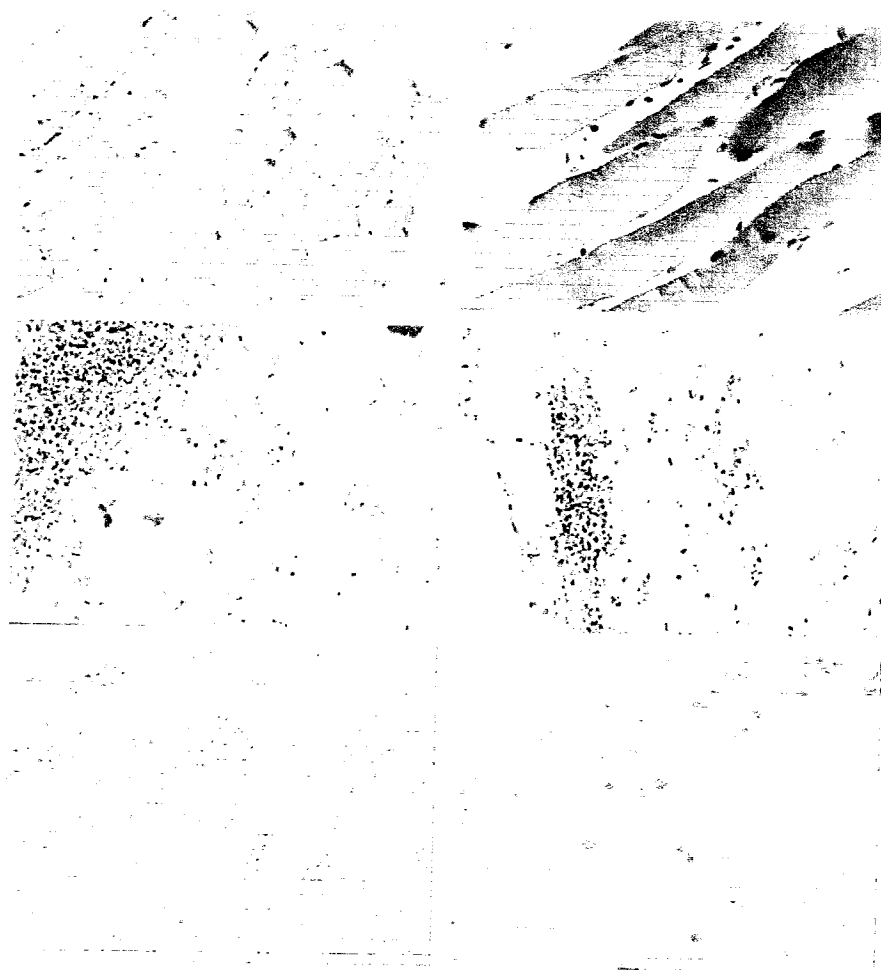
A proteína obtida na cromatografia de afinidade em resina Heparina Agarose foi submetida a uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com SDS como agente desnaturante. Podemos observar nas linhas 3, 4 e 5 da figura 10 uma única banda, de peso molecular de 15.750, sem a presença de contaminantes visíveis.



Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* e da toxina obtida no refractionamento com a resina Heparina-Agarose. Linha 1 - Padrão de peso molecular LMW (Low Molecular Weight): fosforilase b (97.000), albumina bovina (66.000), ovoalbumina (45.000), anidrase carbônica (30.000), inibidor de tripsina (20.100) e α -lactoalbumina (14.400); 2- Peçonha bruta de *Bothrops moojeni*; 3- Fração BmTx, 6 μ g; 4-BmTx, 19 μ g; 5-BmTx, 32 μ g.

4.4.3. Atividade miotóxica da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* e da proteína BmTx em músculo esquelético de camundongos

As alterações morfológicas causadas pela peçonha bruta de *Bothrops moojeni* e pela BmTx sobre o músculo gastrocnemius direito de camundongos estão mostrados na figura 11. A peçonha bruta e a BmTx, após 24 horas de inoculação intramuscular, foi capaz de destruir as fibras musculares, causando hemorragia, degeneração hialina, necrose celular e invasão de infiltrado leucocitário. Podemos observar que em algumas células somente o limite da fibra é evidenciado.



Análise histológica das fibras musculares (músculo gastrocnemius) de camundongos após 24 horas de inoculação intramuscular com a peçonha bruta de *Bothrops moojeni* ou BmTx. Fotomicrografia de seção com 5,0 μ m de espessura após a inoculação com (A-B) 50 μ l de salina; (C-D) 50 μ g de peçonha bruta de *Bothrops moojeni*; (E-F) 50 μ g de BmTx, sendo que à esquerda aumento de 10X, e à direita aumento de 40X. I: Infiltrado Leucocitário; N: Necrose.

5. DISCUSSÃO

A peçonha da serpente *Bothrops moojeni*, popularmente chamada de caíçaca, possui uma considerável gama de proteínas que apresentam diversas funções, como coagulante, anticoagulante, hemorrágica, proteolítica e necrosante. A elevada atividade proteolítica e miotóxica apresentadas pelas peçonhas botrópicas são as principais responsáveis pela maioria dos efeitos locais e sistêmicos ocorridos como consequência de um acidente ofídico (ROSENFELD, 1971; KAMIGUTI; CARDOSO, 1989; STOCKER, 1990; HUTON; WARREL, 1993; KAMIGUTI; SANO-MARTINS, 1995). A caíçaca é a principal responsável pelos acidentes ofídicos que ocorrem em nosso município, e por isso despertou nosso interesse em estudar as propriedades de sua peçonha.

O trabalho proposto teve como objetivo principal fracionar a peçonha bruta de *Bothrops moojeni*, caracterizando suas frações e subfrações quanto ao perfil eletroforético, quanto à atividade proteolítica sobre o fibrinogênio bovino e a azocaseína, e também quanto à atividade miotóxica de uma proteína isolada sobre o músculo estriado de camundongo.

A cromatografia em resina de DEAE-Sephacel utilizou o tampão bicarbonato de amônio, por ser volátil e, portanto, de fácil retirada pelo processo de liofilização, dispensando processos posteriores como diálise ou filtração em gel para eliminar o sal. Esta cromatografia foi realizada em pH 7,8, pois vários trabalhos indicam que neste pH as enzimas proteolíticas presentes nas peçonhas de serpente possuem atividade ótima (ZAGANELLI et al., 1996; LOBO ARAÚJO; DONATO; BON, 1998; SMOLKA et al., 1998; OLIVEIRA et al., 1999).

Este processo resultou em cinco frações distintas denominadas E1 a E5. De acordo com o perfil eletroforético apresentado na figura 3, a fração E3 possui uma protease, denominada de BthTl, isolada por Oliveira (2001). Esta enzima apresenta peso molecular aparente de 36.000 e foi classificada como uma “thrombin-like”. As enzimas “trombin-like” possuem especificidade de hidrólise semelhante à trombina, porém ela é incapaz de ativar o fator XIII, formando somente o coágulo “frouxo” que é rapidamente removido da circulação através da fibrinólise ou do sistema retículo endotelial (BELL, 1988). Por esse motivo, essa enzima tem despertado grande interesse para a clínica médica e apresenta um grande potencial para o desenvolvimento de drogas para tratamento de várias desordens trombóticas, como por exemplo, infarte do miocárdio, trombozes de veias profundas e derrame cerebral. É importante dizer que o processo de purificação e o uso da enzima BthTl foi patenteada junto

ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial – MG (Processo nº PI0406273-6).

O mesmo perfil eletroforético apresentado pela figura 3 (linha 6), mostra ainda que a fração E4 apresenta uma outra protease, também purificada no Laboratório de Biofísica, pela acadêmica Fernanda Silva Torres (comunicação pessoal). A protease, denominada de Moo-42, possui peso molecular aparente de 27.500 na presença e na ausência do agente redutor β -mercaptoetanol, e foi caracterizada como uma α -fibrinogenase de cadeia simples. Esta enzima também se mostrou capaz de degradar a azocaseína.

De acordo com a figura 5, podemos sugerir que as frações E1 a E5 foram capazes de degradar o fibrinogênio bovino. Curiosamente, nossos resultados sugerem que a fração E1 foi capaz de hidrolisar a cadeia γ do fibrinogênio. Esse padrão de hidrólise não é comum para a maioria das fibrinogenases isoladas de peçonhas de serpentes descritas na literatura, pois comumente as proteases fibrinogenolíticas são capazes de degradar somente as cadeias A- α e B- β do fibrinogênio (OLIVEIRA et al., 1999; XIUXIA et al., 2001).

A peçonha bruta e as frações também apresentaram atividade proteolítica sobre a azocaseína, o que demonstra que as proteases presentes na peçonha de *Bothrops moojeni* são capazes de atuar sobre vários substratos (Figura 7). As frações E1, E2 e E3 degradaram em maior intensidade a azocaseína (46,5, 52,6 e 47,4 unidades proteolíticas, respectivamente).

A primeira fração obtida na cromatografia em resina de DEAE-Sephacel (E1) foi submetida a um segundo passo cromatográfico, dessa vez em uma resina de exclusão molecular Sephadex G-75. A análise do perfil eletroforético das subfrações (Figura 4), mostra que esta segunda cromatografia resultou em cinco subfrações denominadas E1G1 a E1G5. Todas as subfrações foram testadas quanto à ação proteolítica sobre o fibrinogênio. Nossos resultados mostraram que a subfração E1G2 tem a maior atividade fibrinogenolítica, acompanhada de perto pela subfração E1G1 (figura 6).

Verificamos também, que as subfrações também são capazes de degradar a azocaseína (Figura 8). A subfração E1G1, E1G2 e E1G4 foram as que apresentaram as maiores atividades (29, 2, 25,1 e 24,0 unidades proteolíticas, respectivamente), e coincidentemente estas subfrações foram também as que mais degradaram o fibrinogênio bovino. As subfrações E1G3 e E1G5 também foram capazes de degradar a azocaseína, porém demonstraram as menores atividades (11,1 e 13,9 unidades proteolíticas, respectivamente).

Bjarnason e Fox (1994) dividiram as enzimas proteolíticas da peçonha de serpentes em três classes de acordo com seus pesos moleculares. A classe P-I corresponde a toxinas

pequenas com atividade hemorrágica relativamente fraca e com pesos moleculares de 20.000 – 30.000. Essas enzimas possuem três domínios estruturais: pré e pró-domínio, além do domínio protease ligante de zinco. Na classe P-II estão as toxinas de tamanho médio com massas moleculares de 30.000 – 60.000 e na classe P-III as toxinas são altamente hemorrágicas com massas moleculares de 60.000 – 100.000.

É interessante ressaltar que não há, descrito na literatura, enzimas proteolíticas de peso molecular abaixo de 20.000. Entretanto, nossos resultados (figura 4 – linha 7) mostram que a fração E1G4 possui uma única proteína de baixo peso molecular (15.750) e que apresenta atividade proteolítica sobre o fibrinogênio (figura 6 – linha 5) e sobre a azocaseína (figura 8 – coluna 4). No entanto, não podemos atribuir à atividade proteolítica à única proteína encontrada nessa fração, pois podem existir outras proteínas que não foram visualizadas no gel, por conta da baixa concentração e da sensibilidade da técnica do corante (Coomassie Blue R-250).

Sendo assim, a fração E1G4 foi refractionada em resina Heparina Agarose. De acordo com o perfil eletroforético mostrado na figura 10, a fração obtida é constituída de uma única proteína, bastante concentrada, com ótimo grau de pureza. Podemos nos certificar da pureza da amostra, através do perfil cromatográfico do fracionamento em resina Heparina Agarose, traçado através das absorbâncias individuais dos tubos coletados a 280 nm (figura 9), onde podemos ver claramente a presença de um contaminante, especificamente nos tubos 8 e 9, o qual estava presente no “pool” total da fração E1G4 e foi então separado da toxina purificada (BmTx). A presença deste contaminante pode explicar a atividade proteolítica apresentada pela subfração E1G4, lembrando que a BmTx não é uma protease.

Deste modo, essa proteína obtida, livre do contaminante, foi testada quanto à sua atividade miotóxica, pois o seu peso molecular (15.736) era um forte indicativo de que ela poderia ser uma miotoxina. Para que o teste pudesse ser realizado, foi necessária a retirada do sal presente na amostra. Esse sal é proveniente do tampão utilizado para eluir a amostra da coluna de resina Heparina Agarose. Constatou-se que esta proteína tem afinidade com o ligante da resina, no caso a Heparina, e para que ela pudesse se desligar da resina, foi necessário que o sal NaCl competisse com a proteína pelo ligante.

Para a retirada do NaCl, a proteína BmTx, foi aplicada a uma coluna de exclusão molecular em resina Sephadex G-25. Esta resina possui poros muito diminutos, nos quais só entram moléculas com peso molecular abaixo de 5.000. Como a proteína possui um peso

molecular de 15.736, ela passa pela coluna sem entrar nos poros, enquanto as moléculas de sal são atrasadas, pois fazem um caminho mais longo por dentro dos poros.

O resultado do teste miotóxico (figura 11), mostrou que houve hemorragia, degeneração hialina, necrose celular e a presença de infiltrado leucocitário, sendo predominantemente mononuclear (monócitos que migram da corrente sanguínea para o tecido e se tornam macrófagos). A presença deste tipo celular indica que o músculo foi irreversivelmente necrosado, pois a função dos macrófagos é “limpar” a área para que possa haver a substituição do tecido morto pelo tecido conjuntivo denso (cicatrização). No entanto, também foi possível a observação de polimorfos nucleados (principalmente neutrófilos), o que indica a presença de bactérias. Estas podem ser provenientes da agulha utilizada para a inoculação da proteína ou ainda, podiam estar presentes no músculo, mas sem condições apropriadas para se proliferarem, e com a necrose causada pela toxina, puderam se multiplicar.

Comparando a ação da peçonha bruta e da proteína isolada, podemos perceber que são praticamente indistinguíveis visualmente. Isso sugere que a proteína BmTx é altamente tóxica, causando a necrose tecidual total e reação inflamatória em um tempo de 24 horas. Esse período de tempo, em termos de processos fisiológicos, é considerado curto, o que é outro indicativo da alta atividade miotóxica apresentada pela proteína purificada.

Pode-se inferir que a proteína interage diretamente com a membrana do sarcoplasma, alterando sua integridade e conseqüentemente aumentando sua permeabilidade. Isso ocasiona um influxo de íons, em particular o cálcio, podendo então induzir mecanismos intrínsecos que levariam à morte celular (RODRIGUES et al., 1998). É interessante observar que a toxina BmTx não apresentou atividade fosfolipásica (dados não mostrados).

6. CONCLUSÃO

Podemos concluir que a peçonha da serpente *Bothrops moojeni* é rica em proteases capazes de degradar o fibrinogênio bovino e a azocaseína. Uma toxina, denominada BmTx, com peso molecular de 15.750 e capaz de degradar o músculo esquelético foi isolada e caracterizada parcialmente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGULO, Y.; GUTIÉRREZ, J.M.; M. SOARES, A M., CHO, W.; LOMONTE, B. Myotoxic and cytolytic activities of dimeric Lys49 phospholipase A₂ homologues are reduced, but not abolished, by a pH-induced dissociation. **Toxicon**, Volume 46, Issue 3, 1 September 2005, Pages 291-296.

BARRAVIEIRA, B. Estudo clínico dos acidentes ofídicos. Revisão. **Jornal Brasileiro de Medicina** 65:209-250, 1993.

BARRAVIEIRA, B. Venenos: aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos. Rio de Janeiro. **EPUB**, 411p. 1999.

BELL, W. R. Clinical trials with ancrod. In: **Hemostasis and animal venoms**, p. 541. (Pirkle, H; Markland, F. S., Jr Edds). New York: Marcel Dekker, 1988.

BELLUOMINI, H. E.; WAKAMATSU, C. T.; LUCAS, S. M. & CARDOSO, J. L. C., 1987. Acidentes do trabalho por animais peçonhentos. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, 60: 38-42.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 62, p. 325-372, 1994.

BRITES, V. L. C.; BAUAB, F. A. Fauna ofídiana do município de Uberlândia, Minas Gerais-Brasil. In: **Ocorrência na área urbana**, 1988.

- BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil. **Reviews**, Rio de Janeiro, v.19, p.7-16, jan-fev, 2003.
- CARDOSO, J. L.; FAN, H. W.; FRANÇA, F. O.; JORGE, M. T.; LEITE, P. P.; NISHIOKA, S. A.; ÁVILA, A.; SANO-MARTINS, I. S.; TOMY, S. C.; SANTORO, M. L. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brasil. **Q. J. Med.**, v.86, p.315-325, 1993.
- ESTÊVÃO-COSTA, M. I.; DINIZ, C. R.; MAGALHÃES, A.; MARKLAND, F. S.; SANCHEZ, E.: Action of Metalloproteinases Mutalysin I and II on Several Components of the Hemostatic and Fibrinolytic Systems. **Thrombosis Research**, Vol.99, Issues 4, p.363-373, 15 de agosto de 2000.
- HUNG, C. C.; CHIOU, S. H.: Fibrinogenolytic Proteases Isolated from the Snake Venon of Taiwan Habu: Serine Proteases with Kallikrein-like and Angiotensin-Degrading Activities 1. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Vol. 281, No. 4, p.1012-1018, 2001.
- HUTTON, R. A., WARRELL, D. A. Action of snake venom components on haemostatic sytem. **Blood Rev.**, 7: p. 176. 1993.
- ITZHAKI, R. F.; GILL, D. M. A micro- biuret method for estimating proteins. **Anal. Biochem.**, 9: p 401, 1964.
- KAMIGUTI, A. S.; CARDOSO, J. L. C. Haemostatic changes caused by the venom South American snakes. **Toxicon**, 27: p. 955. 1989.

- KAMIGUTI, A. S.; SANO-MARTINS, I. S. South American snake venoms affecting haemotasis. **J. Toxic-Toxin Rev.**, 14: p. 359. 1995.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. **Nature**, 227: p. 680, 1970.
- LOBO DE ARAÚJO, A. DONATO, J. L.; BON, C. Purification and characterization of two hemorrhagic metalloproteinases from the venom of the long-nosed viper, *Vipera ammodytes ammodytes*. **Toxicon**, v. 40, n. 1, p. 55-92, 1998.
- MARKLAND, F. S.; REDDY, K. N. N.; GUAN, A. L. Purification and characterization of a direct-acting fibrinogenolytic enzyme from Southern copperhead venom. In: **Hemostasis and Animal Venoms**, PIRKLE, H.; MARKLAND, F. S. (Eds.), Marcel Dekker, New York, 1988.
- MARKLAND, F.S.: Inventory of α - and β -fibrinogenase from snake venoms. **Thrombosis and Haemostasis**. 65: p.438-443, 1991.
- MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, n.12, p.1749-1998, 1998.
- MARSHAL, L. R.; HERRMANN, R. P. **Coagulant** and anticoagulant actions of Australian snake venoms. **Thrombosis and Haemostasis**., 50: p.707, 1983.
- MEBS, D.; OWNBY, C. L. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. **Pharm. Ther.**, v.48, p.223-236, 1990.

- MURAKAMI, M.; KUDO, I. Secretory phospholipase A₂, **Biol. Pharm. Bull.** 27 (2004), pp. 1158 a 1164.
- NEVALAINEN, T. J.; QUINN, R. J.; HOOPER, J. N. Phospholipase A₂ in porifera, **Comparative Biochemistry and Physiology B**, 137 (2004), pp. 413 a 420.
- NIKAI, T.; MORI, N.; KISHIDA, M.; SUGIHARA, H.; TU, A. T. Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin from the venom of *Crotalus atrox*. **Arch. Biochem. Biophys.**, 321: p.309, 1984.
- OLIVEIRA, F.; RODRIGUES, V. M.; BORGES, M. H.; SOARES, A. M.; HAMAGUCHI, A. GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. Purification and parcial characterization of a new proteolytic enzyme from the venom of *Bothrops moojeni* (Caiçaca). **Biochemistry and Molecular Biology International**, v.47, n.06, p.1069-1077, 1999.
- OLIVEIRA, F. **Novas proteases da peçonha de Bothrops moojeni (Caiçaca): Purificação de quatro isoformas de fibrinogenases (Bthαs) e caracterização bioquímica da BthTl.** Tese de Doutorado, Universidade de Brasília, 2001.
- PINHO, F. M. O.; OLIVEIRA, E. S. F. Acidente ofídico no estado de Goiás. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, 2004, vol.50, no.1, p.93-96.
- ROCHA, M. M. T. da; FURTADO, M. de F. D. Caracterização individual do veneno de *Bothrops alternatus* Duméril, Bibron & Duméril em função da distribuição geográfica no Brasil (Serpentes, Viperidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, jun. 2005, vol.22, no.2, p.383-393.

- RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; MANCIN, A. C.; FONTES, M. R. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R. Geographic variations in the composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venoms: biochemical characterization and biological activity. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, Volume 121, Issue 3, 1 November 1998, Pages 215-222.
- ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: **Venomous and their venoms 2**, p. 345 (BUCHERL, W and BUCKLEY, E.E, eds). New York: Academic Press. 1971.
- SCHIMIDT, M. E.; ABDELKBAKI, Y. Z.; TU, A. T. Nephrotoxic action of rattlesnake and sea snake venoms: an electron-microscopic study. **J. Path.**, v.118, p.49-53, 1976.
- SINITOX- Animais peçonhentos. Disponível em: <http://www.saude.rj.gov.br/animaispeconhentos/serpents.html>. Acesso em: 05/05/2005.
- SIX, D.A.; E.A. DENNIS, E.A. The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Acta 1488 (2000), pp. 1a19.
- SMOLKA, M. B.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; NOVELLO, J. C. purification and partial characterization of a trombin-like enzyme, balterobin, from the venom of *Bothrops alternatus*. **Toxicon**, v. 36, n. 07, p. 1059-1063, 1998.
- SOARES, A.M. **Caracterização bioquímica parcial das miotoxinas básicas do veneno de Bothrops moojeni: seqüência aminoterminal, cristalografia e estudo da transição dos estados nativo e desenovelado**. Dissertação de mestrado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 1997.

SOARES, A.M.; MARCUSSI, S.; STÁBELI, R. G.; FRANÇA, S. C.; GIGLIO, J. R.;
WARD, R. J.; ARANTES, E. C. Structural and functional analysis of BmjMIP, a
phospholipase A₂ myotoxin inhibitor protein from *Bothrops moojeni* snake plasma.
Biochemical and Biophysical Research Communications, Volume 302, Issue 2, 7 March
2003, Pages 193-200.

STÁBELI, R. G.; F. AMUL, S. F.; SANT'ANA, C. D.; PIRES, M. G.; NOMIZO, A.;
MONTEIRO, M. C.; ROMÃO, P. R. T.; GUERRA-SÁ, R.; VIEIRA, C. A.; GIGLIO, J. R.
Bothrops moojeni myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A₂ homologue: An example of
function versatility of snake venom proteins. **Comparative Biochemistry and Physiology**
Part C: Toxicology & Pharmacology, Volume 142, Issues 3-4, March-April 2006, Pages
371-381.

STOCKER, K. F.: Snake venom proteins affecting haemostasis and fibrinolysis. In: K.F.
Stocker, Editor, **Medical Use of Snake Venom Proteins**, CRC Press Inc, Boca Raton, FL,
p.97-160, 1990.

STORER, T. I.; USINGER, R. L.; STEBBINS, R. C.; NYBAKKEN, J. W. **Zoologia Geral**.
6ª edição. São Paulo, Editora Nacional. (Biblioteca Universitária, Série 3, Ciências Puras; v.
8), 1995.

XIUXIA, L.; JIASHU, C.; YINGNA, Z.; PENGXIN, Q.; GUANGMEI, Y. Purification and
biochemical characterization of F II(a), a fibrinolytic enzyme from *Agkistrodon acutus*
venom. **Toxicon**. v. 39, n. 8, p. 1133-1139, 2001.

ZAGANELLI, G. L.; ZAGANELLI, M. G. M.; DINIZ, C. R.; LIMA, M. E. Purification and
characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from the venom jararacuçu (*Bothrops*
jararacussu). **Toxicon**, v. 34, p. 807-819, 1996.

