

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Purificação e Caracterização Bioquímica Parcial de uma
Fosfolipase A₂ Ácida Presente na Peçonha da Serpente
Caiçaca (*Bothrops moojeni*)**

Norival Alves Santos Filho

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
Fevereiro - 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Purificação e Caracterização Bioquímica Parcial de uma
Fosfolipase A₂ Ácida Presente na Peçonha da Serpente
Caiçaca (*Bothrops moojeni*)**

Norival Alves Santos Filho

Prof. 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.

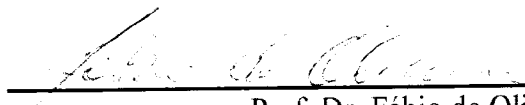
Uberlândia - MG
Fevereiro - 2007

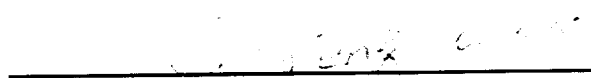
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

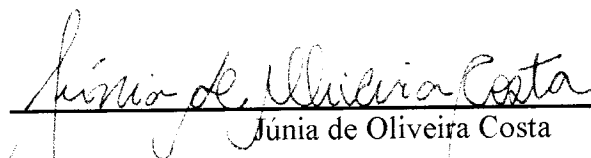
**Purificação e Caracterização Bioquímica Parcial de uma
Fosfolipase A₂ Ácida Presente na Peçonha da Serpente
Caiçaca (*Bothrops moojeni*)**

Norival Alves Santos Filho

Aprovado pela Banca Examinadora em: 16/02/07 Nota: 1000


Prof. Dr. Fábio de Oliveira


Clayton Zambeli Oliveira


Júnia de Oliveira Costa

Uberlândia, 16 de fevereiro de 2007.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Purificação e Caracterização Bioquímica Parcial de uma
Fosfolipase A₂ Ácida Presente na Peçonha da Serpente
Caíçaca (*Bothrops moojeni*)**

Norival Alves Santos Filho

Prof. Dr. Fábio de Oliveira
Instituto de Ciências Biológicas

Homologado pela coordenação do Curso
de Ciências Biológicas em __/__/__

Prof^a Dr^a Vera Lúcia Brites

Uberlândia - MG
Mês - Ano

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Local de hidrólise de diferentes fosfolipases (Kini, 1997).....	03
Figura 02: Determinação cinética da Creatino Quinase (Sant'Ana, 2005).....	15
Figura 03: Fracionamento da peçonha bruta de <i>Bothrops moojeni</i> em coluna de DEAE Sephacel.....	17
Figura 04: SDS-PAGE 14% da peçonha bruta de <i>Bothrops moojeni</i> e das frações obtidas no fracionamento com a resina DEAE Sephacel.....	19
Figura 05: Cromatografia da fração D3 em coluna de Sephadex G-75.....	20
Figura 06: SDS-PAGE 14% da peçonha bruta de <i>Bothrops moojeni</i> e das sufrações obtidas no fracionamento com a resina Sephadex G-75.....	21
Figura 07: Cromatografia da fração D3G2 em coluna Phenyl Sepharose.....	23
Figura 08: SDS-PAGE 14% da peçonha bruta e da enzima BmooPLA ₂	24
Figura 09: Atividade hemolítica indireta dose-dependente.....	26
Figura 10: Efeitos de íons catiônicos sobre a atividade hemolítica Indireta.....	27
Figura 11: Atividade hemolítica indireta pH-dependente.....	28
Figura 12: Atividade hemolítica indireta temperatura dependente.....	29
Figura 13: Atividade hemolítica indireta na presença do EDTA.....	30
Figura 14: Atividade Edematogênica.....	31
Figura 15: Atividade Miotóxica.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Soluções utilizadas para confecção de SDS-PAGE.....	11
Tabela II: Recuperação protéica por absorbância à 280nm das frações obtidas do fracionamento da peçonha bruta de <i>Bothrops moojeni</i> em DEAE Sephacel.....	18
Tabela III: Recuperação protéica por absorbância à 280nm das subfrações obtidas do fracionamento da fração D3 em coluna Sephasex G-75.....	21
Tabela IV: Atividade Fosfolipásica.....	25

LISTA DE QUADROS

Quadro I: Classificação das PLA ₂ s segundo Six e Dennis (2000).....	05
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida

SDS – Dodecil sulfato de sódio

PAGE-SDS – Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS

TEMED – N,N,N',N'tetrametiletilenodiamino

Bis-acrilamida – N,N' metileno-bis-acrilamida

Tris – Tris (hidroximetil) aminometano

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético, sal dissódico

PBS – Tampão fosfato, em salina

UV – Luz ultravioleta

Rpm – Rotações por minuto

CK – Creatina quinase

AMBIC – Tampão bicarbonato de amônio

PLA₂ – Fosfolipase A₂

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

nm – Nanômetros

Mr – Massa molecular relativa

AGRADECIMENTOS

À Deus por ser o alicerce da minha vida.

Aos meus pais Norival Alves Santos e Dalila Moraes Santos, pela dedicação e apoio que me foram dados.

Aos meus irmãos Tiago e Thatty, pelo companheirismo e paciência que tiveram comigo.

À minha namorada Claudia, seu apoio e compreensão foram muito importantes para mim, graças a você posso falar que hoje sou uma pessoa mais organizada.

Ao meu orientador Fábio de Oliveira por ser um exemplo de ser humano, sua dedicação e paciência foram de grande valia para mim. Obrigado pela orientação, pelos ensinamentos e pela oportunidade.

À professora Veridiana por me emprestar a resina Phenil Sepharose e me ceder o espaço do laboratório e à Renata, por me auxiliar na utilização da resina.

Ao professor Andreimar e ao Clayton, por me receberem tão bem em Ribeirão Preto, espero que esta amizade perdure por muito tempo.

Aos meus colegas de laboratório (não citarei nomes para não cometer uma injustiça com alguém), pela amizade e todos momentos que passamos juntos.

À Júnia e à Fernanda, devo a vocês muito do que eu sei hoje.

Ao Helinho e à Bety, pela ajuda durante minha iniciação científica.

À FAPEMIG, pela bolsa de iniciação científica.

Aos meus amigos do curso de Ciência Biológicas, pelo agradável convívio diário.

Aos professores do Curso de Ciências Biológicas, podem ter certeza, que de alguma forma vocês ajudaram na minha formação.

RESUMO	1
1. INTRODUÇÃO	2
2. OBJETIVOS.....	8
3. MATERIAL E MÉTODO.....	9
3.1 Obtenção da peçonha.....	9
3.2. Fracionamento da peçonha bruta de <i>Bothrops moojeni</i>	9
3.3.Cromatografia de exclusão molecular da fração D3 em gel Sephadex G-75.....	9
3.4. Cromatografia de interação hidrofóbica em resina Phenyl Sepharose.....	10
3.5. Determinação quantitativa de proteínas.....	10
3.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes e determinação do peso molecular aparente.	10
3.7. Atividade fosfolipásica.....	12
3.8. Atividade hemolítica indireta (fosfolipásica em gel).....	12
3.9. Determinação da dose hemolítica indireta mínima (DheM).....	13
3.10. Efeito de íons catiônicos sobre a atividade fosfolipásica.....	13
3.11. Atividade Fosfolipásica pH dependente.	13
3.12. Atividade fosfolipásica temperatura dependente.	14
3.13. Efeito do EDTA sobre a atividade fosfolipásica	14
3.14. Animais.	14
3.15. Atividade Edematogênica.....	14
3.16. Atividade miotóxica.	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
4.1. Cromatografia da peçonha bruta de <i>Bothrops moojeni</i> em gel de DEAE Sephacel.	17
4.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% em condições desnaturantes.....	18
4.3. Cromatografia em coluna de exclusão molecular da fração D3 em resina Sephadex G-75.....	19
4.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% em condições desnaturantes das subfrações obtidas a partir da coluna Sephadex G-75.	21
4.5. Cromatografia de interação hidrofóbica em resina Phenyl Sepharose.....	22
4.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% em condições desnaturantes da peçonha bruta de <i>Bothrops moojeni</i> e da enzima BmooPLA ₂	23
4.7. Atividade fosfolipásica.....	24
4.8. Atividade Hemolítica Indireta.	25
4.9. Efeito de íons catiônicos sobre a atividade fosfolipásica.....	26
4.10. Atividade fosfolipásica pH dependente.	27
4.11. Atividade fosfolipásica temperatura dependente.	28
4.12. Efeito do EDTA sobre a atividade enzimática da PLA ₂	29
4.13. Atividade Edematogênica.....	30
4.14. Atividade Miotóxica.....	31
5. CONCLUSÃO	33
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

RESUMO

Fosfolipases A₂ (PLA₂ EC 3.1.1.4) são enzimas que catalisam especificamente a hidrólise de fosfolipídios na ligação éster do carbono 2, liberando lisofosfolipídios e ácidos graxos, em uma reação dependente de cálcio. Nesse trabalho, uma fosfolipase A₂ ácida, denominada BmooPLA₂, foi purificada a partir da peçonha da serpente *Bothrops moojeni* com uma combinação de cromatografia em gel de troca iônica (DEAE Sephacel), gel filtração (Sephadex-G75) e gel de interação hidrofóbica (Phenyl Sepharose CL-4B). A eletroforese em gel de poliacrilamida, sob condições redutoras (SDS-PAGE), corada com coomassie brilhante blue, revelou uma única banda protéica com peso molecular aparente de 15.500. A atividade PLA₂ foi determinada pela titulação potenciométrica em emulsão de gema de ovo em presença de disoxicolato de sódio 0,03M e 0,1mL de CaCl₂. A atividade fosfolipásica específica da BmooPLA₂ foi de 1316 µEq/min/mg, cerca de 10 vezes maior que a da peçonha bruta. A atividade hemolítica indireta foi realizada em gel de agarose, utilizando gema de ovo e eritrócitos humanos como substrato. BmooPLA₂ apresentou uma atividade hemolítica indireta mínima a uma concentração de 1µg. A fosfolipase BmooPLA₂ demonstrou ser estável em diferentes temperaturas (-20 a 100°C) e pHs (entre 2,5 e 10), não demonstrou dependência a nenhum íon catiônico (Mg²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Na⁺, Mn²⁺ e Fe²⁺) e foi inibida totalmente com EDTA a partir de uma concentração de 30mM. A enzima BmooPLA₂ também apresentou uma elevada atividade edematogênica, quando injetada em patas de ratos e uma moderada miotoxicidade, quando ensaiada com o kit de creatina quinase. Neste trabalho, foi purificada e caracterizada parcialmente uma fosfolipase A₂ ácida (BmooPLA₂) da peçonha da serpente *Bothrops moojeni*.

Palavras Chave: *Bothrops moojeni*, phospholipase A₂, BmooPLA₂.

1. INTRODUÇÃO

Os acidentes causados por serpentes peçonhentas representam significativo problema de Saúde Pública, especialmente em países tropicais, pela frequência com que ocorrem e pela mortalidade que ocasionam (Pinho e Pereira, 2001).

No Brasil, dentre as famílias existentes são cinco os gêneros de serpentes, os quais somam aproximadamente 30 espécies e, incluindo as subespécies o número chega a 36. Os principais gêneros são *Bothrops*, representado pelas jararacas, *Crotalus*, representado pelas cascavéis, *Lachesis*, cujas serpentes são conhecidas como surucucus e *micrurus*, que correspondem às corais (Sant' Ana, 2005).

O gênero *Bothrops* é o mais importantes do ponto de vista médico já que é responsável por 90% dos 20.000 acidentes ofídicos anuais ocorridos no Brasil. As serpentes deste gênero habitam preferencialmente ambientes úmidos como matas, áreas cultivadas e locais de proliferação de roedores, em zonas rurais. Possuem hábitos noturnos e são consideradas serpentes muito agressivas (França e Málaque, 2003).

As peçonhas de serpentes são, provavelmente, as mais complexas de todas as peçonhas animais conhecidas, contendo 20 ou mais componentes diferentes, sendo que mais de 90% do peso seco é constituído por proteínas, com uma grande variedade de enzimas, e uma parte não protéica composta por carboidratos, lipídeos, metais, aminoácidos livres, nucleotídeos, etc. (Varanda e Gianinni, 1999).

Segundo França e Málaque (2003), alterações na homeostasia são freqüentemente observadas em acidentes ofídicos e deve-se, sobretudo, a três principais enzimas, que estão presentes também, na peçonha botrópica, são elas: enzimas coagulantes, fatores hemorrágicos e fosfolipases.

Enzimas coagulantes são proteínas presentes nas peçonhas botrópicas, que ativam, de modo isolado ou simultâneo, o fator X da cascata de coagulação e a protrombina. Essas proteínas possuem ação semelhante à trombina, convertendo o fibrinogênio em fibrina. Essas ações produzem distúrbios da coagulação, que se caracterizam pelo consumo de seus fatores, geração de produtos de degradação de fibrina e fibrinogênio, o que pode causar incoagulabilidade sangüínea (Gans, 1978).

Fatores hemorrágicos, também chamados de hemorraginas, são enzimas encontradas nas peçonhas de serpentes que provocam lesões na membrana basal dos

capilares, associadas à plaquetopenia (diminuição das plaquetas) e alterações na coagulação sangüínea (Gans, 1978).

Fosfolipases são uma súper família de enzimas que na membrana celular realizam a clivagem de fosfolipídios em ácidos graxos. Existem diferentes tipos de fosfolipases, dependendo do sítio de sua hidrólise (Figura 1). As fosfolipases A_2 (PLA_2) foram as primeiras fosfolipases a serem conhecidas, sua descoberta foi baseada na observação da ação do suco pancreático de mamíferos e da peçonha de serpentes na hidrólise de fosfatidilcolina (Wittcoff, 1951). As fosfolipases A_2 são enzimas amplamente espalhadas na natureza, podendo ser encontradas tanto no exterior quanto no interior da célula (Bosch, 1980). As PLA_2 intracelulares são encontradas associadas à membrana e estão envolvidas no metabolismo de fosfolipídios, transdução de sinal e várias outras funções celulares essenciais. As PLA_2 extracelulares são abundantes em tecidos de mamíferos, peçonhas de artrópodes e peçonhas de répteis (Soares e Gíglío, 2003).

Fosfolipases A_2 (EC 3.1.1.4) são enzimas que catalisam especificamente a hidrólise de fosfolipídeos na ligação éster do carbono 2, liberando lisofosfolipídeos e ácidos graxos, em uma reação dependente de cálcio (Kudo e Murakami, 2002). Muitas vezes um destes ácidos graxos é o ácido araquidônico, que é um precursor de lipídeos bioativos tais como prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos, sendo que há evidências de que estas enzimas poderiam também atuar em respostas imunológicas, inflamação, proliferação celular e vasoconstrição (Chang *et al.*, 1977; Mukherjee *et al.*, 1994).

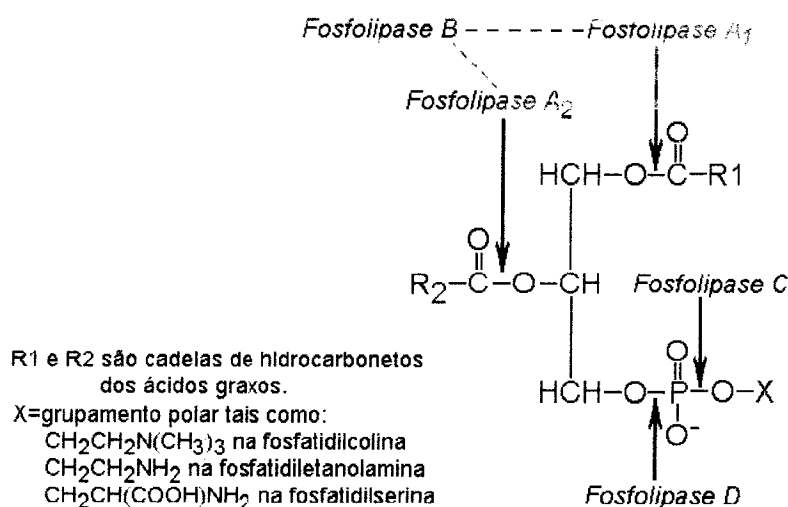


Figura 01. Local de hidrólise de diferentes fosfolipases (Kini, 1997).

Atualmente, as fosfolipases A_2 são classificadas segundo Six e Dennis (2000) (Quadro 1), sendo que as PLA_2 s de peçonha de serpentes estão classificadas no grupo I e II com base nas suas estruturas primárias e pontes dissulfeto (Rodrigues *et al.*, 2004). PLA_2 isoladas a partir de peçonhas de serpentes que pertencem ao grupo IIA, foram subdivididas em 2 grupos: (i) Asp49 que são usualmente consideradas com alta atividade catalíticas, e (ii) Lys49, com baixa ou nenhuma atividade enzimática sobre substratos artificiais (Gutiérrez e Lomonte, 1995; Ownby *et al.*, 1999).

As PLA_2 s aspartato-49 (Asp49), enzimaticamente ativas, requerem cálcio para estabilização de uma conformação catalítica, possuindo um sítio de ligação de cálcio, que é formado pelo grupo β -carboxílico da Tyr28, Gly30 e Gly32. Duas moléculas de água estruturalmente conservadas completam a esfera de coordenação do cálcio formando uma bipirâmide pentagonal (Scott *et al.*, 1990). Esse resíduo de aspartato na posição 49 é essencial para a ligação do cálcio com a proteína, pois, a substituição conservativa Asp49 por Glu49 leva a uma redução de doze vezes na afinidade pelo cálcio com uma concomitante perda da atividade catalítica (Li *et al.*, 1994).

Nas PLA_2 s Lisina-49 (Lys49) o resíduo da posição 49, normalmente Asp é substituído por Lys. Essa substituição reduz dramaticamente a associação ao Ca^{2+} , um cofator essencial a estabilidade da PLA_2 durante a catálise (Scott *et al.*, 1990). Esta subclasse, denominada Lys49, é particularmente interessante, com a ausência do ácido aspártico as enzimas conservam baixa atividade catalítica. Assim, a atividade desta subclasse Lys49- PLA_2 se faz através de um mecanismo independente de cálcio. Além disso, esta subclasse de PLA_2 demonstra atividades farmacológicas, miotóxica e citolítica cujas bases estruturais são pobremente compreendidas (Polgar *et al.*, 1996).

Quadro I: Classificação das PLA₂s segundo Six e Dennis (2000).

Grupo	Origem	Localização	Tamanho (Kda)*	Número de pontes dissulfeto*
I				
A	Elapídico e Hidrofilídico	Secretada	13-15	7
B	Pâncreas suíno e humano	Secretada	13-15	7
II				
A	Crotálica, líquido sinovial humano e plaquetas.	Secretada	13-15	7
B	Víbora de gaboão	Secretada	13-15	6
C	Testículo de rato	Secretada	15	8
III	Abelhas e lagartos	Secretada	16-18	5
IV	Rim de ratos novos	Citosólica	85	
V	Coração de camundongos	Secretada	14	6
VI	Macrófagos da linhagem celular P338D1	Citosólica	80-85	ND**
VII	Plasma humano	Secretada	45	ND**
VIII	Cérebro bovino	Citosólica	29	ND**
IX	Caracol marinho	Secretada	14	6

*Número aproximado

**ND-Não Determinado

No caso da peçonha botrópica, como de outras espécies de serpentes, tem-se mostrado a presença de isoformas de fosfolipases A₂, que aparecem em um mesmo indivíduo ou em diferentes indivíduos da mesma espécie. Conhece-se que as serpentes possuem vários genes que codificam várias isoformas, no entanto a expressão e síntese dessas diferentes isoformas não são bem conhecidas ainda e segundo Toyama (2000), a separação dessas isoformas só tem sido possível a partir da utilização de sistemas de HPLC de fase reversa.

As fosfolipases A₂ presentes nas peçonhas de serpentes são as responsáveis pelo surgimento de alguns efeitos tóxicos nos envenenamentos, juntamente com enzimas de outras classes que possuem atividades semelhantes, podendo ou não contribuir para o agravamento do acidente ofídico. As PLA₂s encontradas na peçonha de *Bothrops moojeni*, pertencem a uma das principais classe de enzimas responsáveis pelo surgimento de edema, miotoxicidade, cardiotoxicidade, neurotoxicidade, hemorragias e hemólise, o que podem levar à perda tecidual abundante, tornando o indivíduo, ofendido por este tipo de serpente, incapacitado, ou até mesmo resultando na perda de parte ou de todo o membro atingido pela picada (Soares *et al.*, 2004).

Pesquisas em busca de novos fármacos cresceram substancialmente nos últimos anos, principalmente em busca de substâncias bioativas extraídas de plantas e animais. Estima-se que 60% das drogas antitumorais e anti-infecciosas que se encontram no mercado, ou estão em estudos na fase clínica, são de origem natural (Sant'Ana, 2005).

As toxinas animais também ganharam seu espaço no mercado farmacêutico, assim como toxinas vegetais, as quais, possuem diversas ações, como, antiofídica, proteolítica, hemorrágica, dentre outras (Soares *et al.*, 2004).

Com a evolução da ciência, o homem foi percebendo que um medicamento e um veneno podem possuir diferença apenas dependendo da administração da dose correta. Portanto, os estudos químicos, bioquímicos, farmacológicos, fisiológicos e toxicológicos de determinados compostos como, proteínas e peptídeos estão sendo realizados de forma cada vez mais específica, a fim de se encontrar, nas próprias toxinas animais, substâncias que possam ser usados de forma benéfica para a ciência (Sant'Ana, 2005). Um exemplo de medicamento que hoje já é comercializado, que surgiu a partir de substâncias isoladas de toxinas animais (*Bothrops jararaca*), é o captopril (Rocha e Silva *et al.*, 1949), utilizado no tratamento da hipertensão arterial, insuficiência cardíaca congestiva e da doença arterial coronária (Ferreira, 2000).

Durante os últimos 15-20 anos, tem crescido o interesse no estudo sobre componentes de peçonhas capazes de causar danos teciduais, resultando no isolamento e na caracterização funcional e estrutural de várias enzimas PLA₂s homólogas provenientes de serpentes botrópicas (Soares *et al.*, 2004).

O estudo das peçonhas ofídicas é de grande importância sob vários aspectos. Deve-se ressaltar que a elucidação da fisiopatologia dos envenenamentos é fundamental para o avanço na terapia dos acidentes ofídicos. O estudo dessas peçonhas vem contribuindo para o conhecimento de diversos processos fisiológicos e fisiopatológicos, destacando-se a estrutura e a função dos receptores nicotínicos, a cascata de coagulação sanguínea, a fibrinólise, o processo inflamatório e a vasoconstrição (França e Málaque, 2003).

O presente trabalho traz novas contribuições para a elucidação e determinação da composição bioquímica dos venenos animais. O estudo desses venenos e de suas toxinas isoladas nos permite entender melhor o mecanismo de ação dessas toxinas em envenenamentos. Estudos futuros de elaboração de fármacos podem resultar na utilização direta destas proteínas, ou de parte delas para a elaboração de modelos sintéticos. Assim, entender seus mecanismos de ação em induzir efeitos tóxicos e farmacológicos, e caracterizá-las bioquímica e estruturalmente torna-se de suma importância, podendo futuramente obter esta proteína não por isolamento, mas por expressão gênica utilizando técnicas de Biologia Molecular.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral:

- ✓ Purificar uma PLA₂ ácida a partir da peçonha bruta da serpente *Bothrops moojeni*.

2.2. Objetivos Específicos:

- ✓ Isolar essa PLA₂ através de cromatografias e determinar a Massa Molecular relativa (Mr) por SDS-PAGE.
- ✓ Caracterizar enzimática e farmacologicamente a PLA₂, realizando atividades: fosfolipásica, hemolítica indireta, determinação da dose hemolítica indireta mínima, efeito de diferentes temperaturas, pHs, de íons catiônicos e do EDTA sobre a atividade desta fosfolipase A₂, além das atividades edematogênica e miotóxica.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Obtenção da peçonha.

A peçonha da serpente *Bothrops moojeni* foi adquirida do Serpentário Bioagents, em Batatais-SP, sob responsabilidade da bióloga Alexandra Jardim Sandrin.

Após a coleta, a peçonha foi imediatamente dessecada a vácuo em temperatura ambiente e conservada a -20 °C até o momento do uso.

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

O fracionamento inicial da peçonha bruta de *B. moojeni* foi realizado conforme técnicas descritas por Oliveira (2001). Cerca de 200mg da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* foram dissolvidos em 2,0mL de tampão bicarbonato de amônio 0,05M pH 7,8, centrifugados a 10.000xg por 10min em temperatura ambiente e o sobrenadante aplicado a uma coluna de DEAE Sephacel (1,5 X 15cm). As amostras foram eluídas com um gradiente convexo de concentração de bicarbonato de amônio (0,05 - 0,3M) pH 7,8, utilizando uma câmara de mistura com um volume de 150mL. As frações, contendo 3,0mL cada, foram coletadas em um fluxo de 20mL/hora, por um coletor de frações Bio Rad. As absorbâncias de cada fração foram acompanhadas em comprimento de onda 280nm, 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.

3.3.Cromatografia de exclusão molecular da fração D3 em gel Sephadex G-75.

A terceira fração da cromatografia anterior, denominada D3 foi ressuspensa em tampão bicarbonato de amônio 0,05M pH 7,8 e aplicada a uma coluna de Sephadex G-75 (1,0 X 100cm). As frações, contendo 3,0mL cada, foram coletadas num fluxo de 20mL/hora. A absorbância de cada fração foi acompanhada em 280nm.

3.4. Cromatografia de interação hidrofóbica em resina Phenyl Sepharose

A segunda fração resultante da cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G-75), denominada D3G2, foi ressuspensa em tampão Tris-HCl 0,01M, pH 8,5 e NaCl 4M e aplicada em coluna (10 x 0,6cm) contendo Phenyl-Sepharose CL-4B, previamente preparada e equilibrada à temperatura ambiente com o mesmo tampão. Desta cromatografia foram coletados 2,0 mL/tubo, num fluxo de 20mL/h, com gradiente decrescente, gradativo e descontínuo de NaCl (4-0M) em tampão Tris-HCl 0,01M, pH 8,5 e H₂O destilada. A absorbância de cada fração foi acompanhada à 280nm. As frações resultantes foram delimitadas e avaliadas quanto ao grau de pureza e caracterização funcional.

3.5. Determinação quantitativa de proteínas.

Para quantificar as proteínas presentes da peçonha utilizada, soluções contendo de 0,1 a 2,0mg de proteínas foram submetidas à dosagem pelo método do microbiureto, conforme descrito por Itzhaki e Gill (1964). A curva padrão foi construída utilizando-se soroalbumina bovina, que apresenta um coeficiente de extinção $\epsilon^{1,0 \text{ mg/mL}}$ em 278nm de 0,666 (Doty, 1953).

3.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes e determinação do peso molecular aparente.

A eletroforese em gel de poliacrilamida a 14%, foi realizada conforme a técnica descrita por Laemmli (1970), utilizando-se SDS (dodecil sulfato de sódio) como agente desnaturante. Na preparação dos géis a 5% (empilhamento) e 14% (separação) foram utilizadas as seguintes soluções:

Tabela I: Soluções utilizadas para confecção de SDS-PAGE.

SOLUÇÕES ESTOQUES	VOLUME (µL)	
	Gel de Separação (14%)	Gel de empilhamento (5%)
Tris-HCl 2M pH 8,8	1.170	-
Tris-HCl 2M pH 6,8	-	167
EDTA 200mM	63	27
Acrilamida:bis (30: 0,8)	2.920	435
Água desionizada	2015	1.990
TEMED	7,5	2,5
Persulfato de amônio (10%)	37,5	18

A solução tris base 0,1 M, EDTA 7,8 mM, glicina 0,77 M e SDS 0,3% (m/v) pH 8,3 foi utilizada como tampão para o cátodo e a mesma solução, porém sem glicina, para o ânodo.

As amostras foram dissolvidas em água desionizada. Em seguida foi adicionado 50% de tampão da amostra (Tris-HCl 187 mM pH 6,8, SDS 6%, EDTA 6 mM, azul de bromofenol 1% e glicerol 27%) e 10% de β-mercaptoetanol. Posteriormente, as amostras foram aquecidas por 3 minutos à 100°C e aplicadas ao gel de poliacrilamida. β-mercaptoetanol é um agente redutor, que quando aplicado nas amostras cliva as pontes dissulfeto presentes na proteína, mostrando no gel a presença ou não de polímeros na proteína.

Foram utilizados os seguintes padrões para determinação dos pesos Moleculares: 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).

PBS (30mL) e as células lavadas 3 vezes com centrifugações de 400xg por 10 minutos, para volumes aproximados de 10mL de sangue. Após as centrifugações, o plasma foi desprezado e as células foram utilizadas na composição do gel.

3.9. Determinação da dose hemolítica indireta mínima (DheM).

A quantidade de enzima (μg) que foi considerada como a DheM foi a concentração responsável pela formação de um halo de aproximadamente 15mm de diâmetro na atividade hemolítica Indireta. Após a determinação da dose hemolítica indireta mínima, foram realizados ensaios de caracterização enzimática diversificando variáveis como pH e temperatura, além da interação com íons catiônicos e inibidores.

3.10. Efeito de íons catiônicos sobre a atividade fosfolipásica.

A BmoopLA₂ foi previamente incubada por 1 hora a 37°C, em tampão PBS pH 7,2, com os íons catiônicos Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Na⁺, Mn²⁺ e Fe²⁺ (1mM). Para a incubação, foi utilizada a concentração de proteína referente a dose hemolítica indireta mínima. O controle foi realizado nas mesmas condições, estando ausentes os íons, e os volumes foram completados com o mesmo tampão. A atividade foi realizada conforme descrito no item 3.8.

3.11. Atividade Fosfolipásica pH dependente.

A fosfolipase A₂ foi previamente incubada por 1 hora a 37°C com soluções que apresentavam pHs entre 2,5 e 10. A atividade foi realizada conforme descrito no item 3.8.

3.12. Atividade fosfolipásica temperatura dependente.

A BmooPLA₂ foi previamente incubada por 1 hora em tampão PBS às temperaturas de -20, 4, 25, 37, 50 60, 80 e 100°C. Para a incubação, foi utilizada a concentração de proteína equivalente a Dhem. O controle foi realizado nas mesmas condições, à temperatura ambiente. Após a incubação, as amostras foram utilizadas para realização do ensaio de atividade hemolítica indireta, conforme descrito.

3.13. Efeito do EDTA sobre a atividade fosfolipásica.

A fosfolipase A₂, em concentração de proteína equivalente a Dhem, foi previamente incubada por 1 hora a 37°C com EDTA 3, 15, 30 e 60mM. O controle foi realizado nas mesmas condições, sem a presença do inibidor. Após a incubação, as amostras foram utilizadas para realização do ensaio de atividade hemolítica indireta, conforme descrito.

3.14. Animais.

Os camundongos *Swiss* machos, com peso de 18-22g e os ratos *Wistar* machos, com pesos de 350-430g foram gentilmente doados pela Valée e Uniube, respectivamente, e mantidos no biotério do laboratório de Biofísica até o momento dos experimentos.

3.15. Atividade Edematogênica.

Em grupos de 03 ratos *Wistar* machos (350-430g) foram injetados via intradérmica (i.d) na região intraplantar da pata direita posterior, soluções contendo 50µL de diferentes quantidades de PLA₂s e peçonha bruta, dissolvidos em PBS. A mensuração da espessura das patas foi realizada previamente com um paquímetro de baixa pressão 0,01mm (Mytutoyo, Japão), antes da inoculação das amostras (tempo 0 h). Os controles foram realizados com injeções de 50µL de PBS por animal.

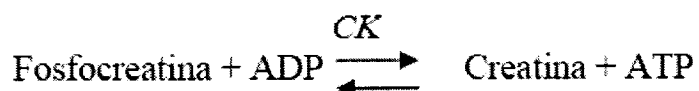
Em seguida, foi realizada a mensuração das patas em diferentes intervalos de tempo (1h, 2 h, 3h, 4h, 5h e 24hs) após as administrações. O aumento do volume na pata dos ratos foi medido e expresso em percentagem direta de edema induzido (Soares *et al.*, 2000).

3.16. Atividade miotóxica.

Em grupos de 04 camundongos machos *Swiss* (18-22g) foram injetados no músculo gastrocnêmio direito diferentes doses (μg) de peçonha bruta e proteína isolada, dissolvidos em 50 μL de PBS. Os controles receberam somente PBS e, três horas depois, o sangue dos camundongos foi coletado, por corte na extremidade da cauda, em capilares heparinizados e imediatamente centrifugados a 3.000xg por 10 minutos.

A atividade da enzima creatino quiinase foi determinada utilizando-se 4 μL de plasma com 1,0mL de reativo pelo CK-UV K010 (Bioclin) cinético, por 3 minutos a 37°C e realizando-se leituras a 340nm após 3 minutos.

A atividade creatina cinase foi expressa em unidades/litro, sendo que uma unidade consiste no resultado da fosforilação de um nanomol (nmol) de creatina por minuto (Soares *et al.*, 2000). A determinação cinética da Creatino Quinase se baseia segundo as seguintes reações:



Onde: CK $\rightarrow$ Creatino Quinase.

HK $\rightarrow$ Hexoquinase.

G-6-PDH $\rightarrow$ Glicose-6-Fosfato Desidrogenase.

Figura 02: Determinação cinética da Creatino Quinase (Sant'Ana, 2005).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

4.1. Cromatografia da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* em gel de DEAE Sephacel.

Para o processo de purificação da , inicialmente, cerca de 200mg de peçonha bruta foram aplicados a uma coluna DEAE Sephacel, eluída num gradiente convexo de concentração em tampão bicarbonato de amônio 0,05 a 0,3M pH 7,8. O gradiente de concentração foi estabelecido a partir do início da cromatografia. Desse fracionamento foram obtidas cinco frações principais denominadas D1 a D5 (figura 03).

As frações obtidas foram quantificadas pelo método de microbiureto, liofilizadas e armazenadas a -20°C até o momento do uso.

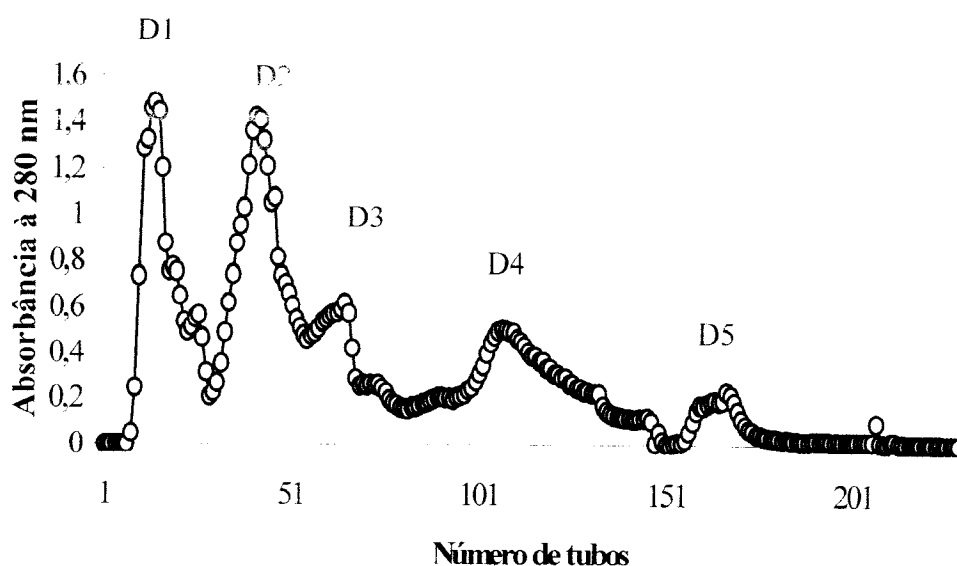


Figura 03: Fracionamento de 200mg da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* em coluna de DEAE Sephacel (1,5 x 15,0cm), equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,05M, pH7,8. As amostras foram eluídas num gradiente convexo de concentração (0,05-0,3M) do mesmo tampão, num fluxo de 20mL/h à temperatura ambiente. Frações de 3mL foram coletadas. O gradiente foi estabelecido a partir do início da cromatografia.

A recuperação de proteínas por absorvância em 280nm das frações obtidas no fracionamento da peçonha bruta da serpente *Bothrops moojeni* está representada na tabela II.

Observa-se que houve uma recuperação total em torno de 80%, em relação à peçonha bruta, sendo que, a fração de interesse para esse estudo (D3) representa aproximadamente 15% da peçonha.

Tabela II: Recuperação protéica por absorvância à 280nm das frações obtidas do fracionamento da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* em DEAE Sephacel.

Amostras	Unidades totais de A _{280nm}	Recuperação Protéica (%)
PB*	242,4	100
D1	56,59	23,34
D2	53,69	22,14
D3	36,03	14,86
D4	33,0	13,6
D5	13,19	5,44
Total	192,5	79,38

*PB – Peçonha bruta de *Bothrops moojeni*

4.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% em condições desnaturantes.

Após a cromatografia em resina de troca iônica (DEAE-Sephacel), as frações obtidas foram ressuspensas em solução salina (NaCl 0,9%) e submetidas a uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% em condições desnaturantes (SDS-PAGE) para visualização de seus componentes protéicos. O perfil eletroforético é mostrado pela figura 04. Neta figura, pode-se observar que a fração D3 é constituída por três bandas protéicas fortemente coradas, com pesos moleculares aparentes de 15.500, 25.000 e 40.000, além da presença de alguns contaminantes.

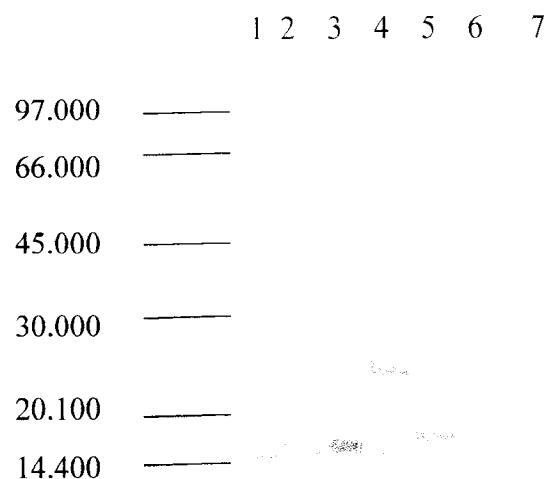


Figura 04: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* e das frações obtidas no fracionamento com a resina DEAE Sephacel. **1-** Padrão de peso molecular LMW (Low Molecular Weight): fosforilase b (97.000), albumina bovina (66.000), ovoalbumina (45.000), anidrase carbônica (30.000), inibidor de tripsina (20.100) e α -lactoalbumina (14.400); **2-** Peçonha bruta de *Bothrops moojeni*; **3-D1**; **4-D2**; **5-D3**; **6-D4**; **7-D5**.

Ao julgar pela análise eletroforética, a fração D1 provavelmente possui as proteínas básicas provenientes da peçonha de *Bothrops moojeni*, com base nisso, podemos falar que essa fração provavelmente contém as duas miotoxinas (I e II) isoladas por Lomonte *et al.* (1990), possivelmente também estão presentes nesta fração duas outras proteínas descritas por Soares (1997).

4.3. Cromatografia em coluna de exclusão molecular da fração D3 em resina Sephadex G-75.

A fração D3 (obtida do fracionamento anterior) foi submetida a um novo passo cromatográfico em gel de exclusão molecular (Sephadex G-75) em tampão bicarbonato de amônio 0,05M, pH 7,8. O perfil cromatográfico está mostrado na figura 05. A fração D3 foi resolvida em três subfrações denominadas de D3G1, D3G2, D3G3.

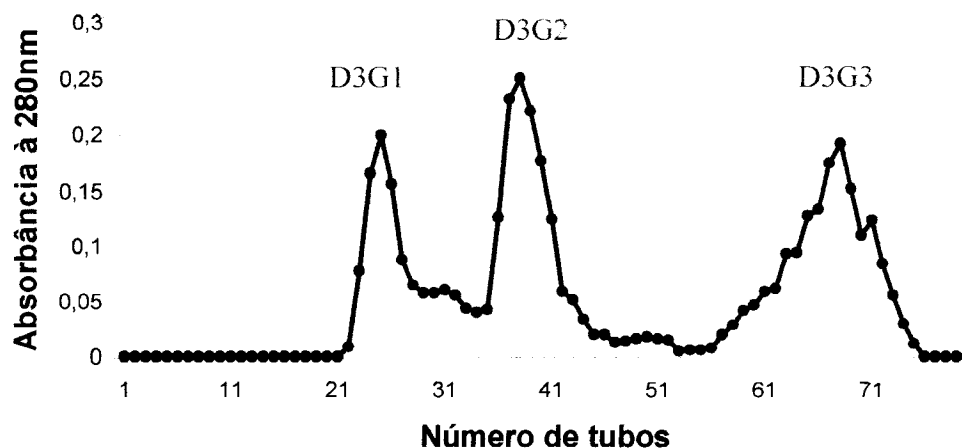


Figura 05: Cromatografia da fração D3 em coluna de Sephadex G-75 (1,0 x 100cm), equilibrada com o tampão bicarbonato de amônio 0,05M, pH7,8. As amostras foram eluídas num fluxo de 20mL/h à temperatura ambiente. Frações de 3mL foram coletadas.

A recuperação de proteínas por absorbância em 280nm das subfrações obtidas no fracionamento da fração D3 está representada na tabela III. Observa-se que houve uma recuperação total em torno de 90%, aproximadamente 10% maior que a recuperação da cromatografia anterior, o que pode ser explicado pelo fato de que resinas de exclusão molecular geralmente possuem uma recuperação protéica maior que resinas de troca iônica (Sant'Ana, 2005).

Em todos os fracionamentos realizados até então, foi utilizado o tampão bicarbonato de amônio; a utilização desse sal facilita as etapas de purificação, pois o bicarbonato de amônio é volátil e desaparece das amostras durante a liofilização, minimizando assim a perda de amostra durante a diálise (Bonaldi, 2005).

Tabela III: Recuperação protéica por absorvância à 280nm das subfrações obtidas do fracionamento da fração D3 em coluna Sephasex G-75

Amostras	Unidades totais de A_{280nm}	Recuperação Protéica (%)
D3	33,50	100
D3G1	8,93	26,66
D3G2	10,07	30,08
D3G3	10,84	32,3
Total	29,84	89,12

4.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% em condições desnaturantes das subfrações obtidas a partir da coluna Sephadex G-75.

Após a cromatografia em Sephadex G-75 as subfrações obtidas foram submetidas à uma SDS-PAGE 14%. O perfil eletroforético é mostrado pela figura 06.

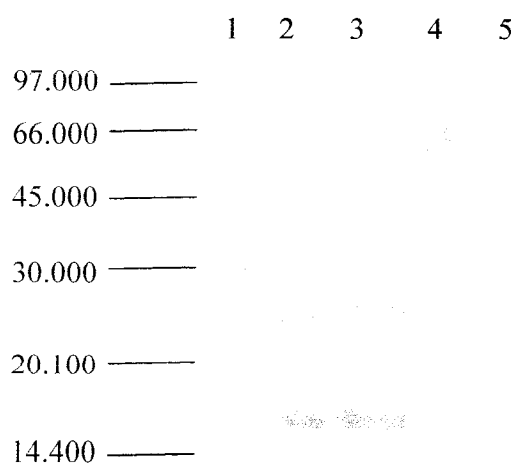


Figura 06: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* e das subfrações obtidas no fracionamento com a resina Sephadex G-75. 1- Padrão de peso molecular LMW, 2- Peçonha bruta de *Bothrops moojeni*; 3-D3; 4-D3G1; 5-D3G2.

A análise do perfil eletroforético das subfrações mostra que a subfração D3G1 é formada por várias proteínas com peso molecular aparente de 60.000 e uma outra proteína com peso molecular próximo de 45.000. Os resultados também mostraram que a subfração D3G2 apresenta uma banda fortemente corada com peso molecular aparente de 15.500 e um contaminante de 25.000. A fração D3G3 não aparece no gel, o que nos leva a crer que seja formada por peptídeos, já que a SDS-PAGE a 14% em poliacrilamida não é adequado para os mesmos, devido a grande espessura dos poros da malha do gel, permitindo a passagem rápida dos peptídeos e conseqüentemente sua saída do gel.

É interessante observar que a fração D3, quando analisada em SDS-PAGE (figura 05 – linha 3) apresentou um perfil protéico formado por mais bandas do que aquele mostrado na figura 04 (linha 5). Isto pode ser explicado pelo fato de que a fração D3 foi liofilizada e, portanto, concentrada antes de ser aplicada no gel mostrado pela figura 06.

4.5. Cromatografia de interação hidrofóbica em resina Phenyl Sepharose.

A fração D3G2, obtida a partir da cromatografia de exclusão molecular, foi submetida a um novo passo cromatográfico em gel de interação hidrofóbica (Phenyl Sepharose) com um gradiente decrescente de concentração em tampão tris HCl 0,01M pH 8,5 com NaCl 4M, 3M, 2M, 1M e 0,5M respectivamente, Tris HCl 0,01M e água destilada. O perfil cromatográfico está mostrado na figura 07. A PLA₂ saiu apenas no tubo de número 91.

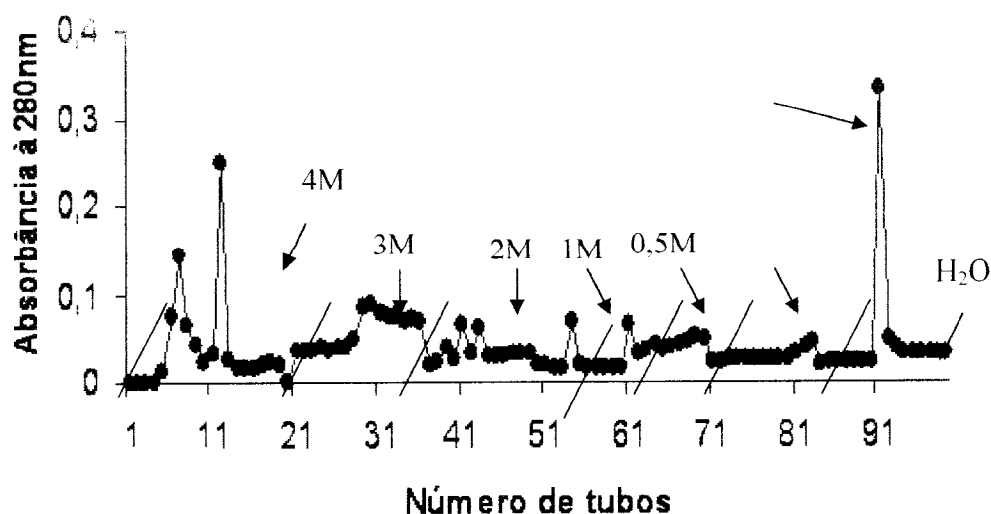


Figura 07: Cromatografia da fração D3G2 em coluna Phenyl Sepharose. As amostras foram eluídas em um fluxo de 20mL/h, com gradiente decrescente de NaCl (4-0M) em tris HCl 0,01M, Tris e água destilada, à temperatura ambiente. Frações de 3mL foram coletadas.

O mecanismo da interação hidrofóbica ocorre por meio de ligações entre grupos hidrofóbicos da proteína e grupos localizados na matriz de separação, características estas, que contribuíram para a aplicação e padronização da metodologia utilizada para o isolamento da enzima. A PLA_2 , denominada Bmoo PLA_2 , foi isolada em sistema cromatográfico contendo NaCl (4M), o qual promoveu a exposição dos grupos hidrofóbicos presentes na molécula. Assim, a alta afinidade da enzima pela matriz foi observada após a aplicação de um gradiente decrescente de NaCl, Tris HCl 0,01M e água destilada, onde a proteína foi eluída em água destilada.

4.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% em condições desnaturantes da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* e da enzima Bmoo PLA_2 .

Após a cromatografia em resina Phenyl Sepharose, a enzima Bmoo PLA_2 e a peçonha bruta de *Bothrops moojeni* foram submetidas a uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% em condições desnaturantes. O perfil eletroforético é mostrado pela figura 08.

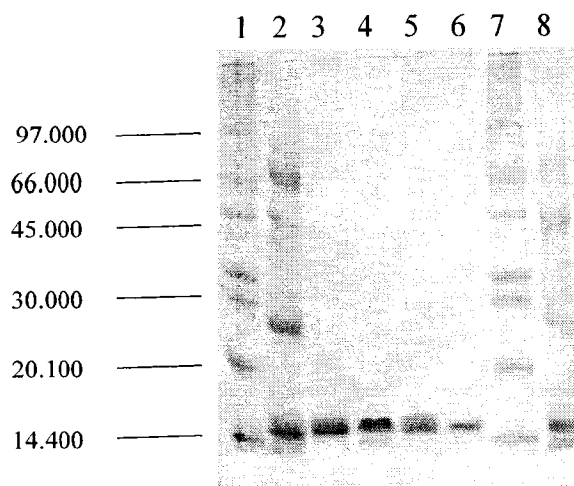


Figura 08: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% da peçonha bruta e da enzima BmooPLA₂. 1- Padrão de peso molecular LMW; 2- Peçonha bruta de *Bothrops moojeni* reduzida; 3- BmooPLA₂ reduzida (15μg); 4- BmooPLA₂ não reduzida (15μg); 5- BmooPLA₂ reduzida (10μg); 6- BmooPLA₂ não reduzida (10μg); 7- Padrão de peso molecular LMW; 8- Peçonha bruta de *Bothrops moojeni* não reduzida.

A análise do perfil eletroforético mostra que a enzima BmooPLA₂ é formada por uma única unidade com peso molecular aparente de 15.500 e que apresenta um alto grau de pureza.

4.7. Atividade fosfolipásica.

A enzima BmooPLA₂ apresentou uma potente atividade fosfolipásica, assim como a peçonha bruta de *Bothrops moojeni*. A BmooPLA₂ apresentou uma atividade específica de 1316 μEq/mg/min., cerca de 10 vezes a atividade da peçonha bruta de *Bothrops moojeni*, que apresentou uma atividade específica de 122 μEq/mg/min. (tabela IV).

Várias PLA₂ têm sido purificadas a partir de peçonhas de serpentes. Cogo *et al.* (2006), purificaram e caracterizaram duas fosfolipases A₂ ácidas atóxicas da peçonha da serpente *Bothrops insularis* (Jararaca Ilhoa), já Higuchi *et al.* (2006), também purificaram, recentemente, duas fosfolipases A₂ da peçonha da serpente *Bothrops leucurus*, Silveira *et al.*, (2004) publicaram recentemente um trabalho no qual purificaram duas PLA₂s ácidas

atóxicas da peçonha da serpente *Bothrops moojeni*, Reichl *et al.*, (1989), também descreveram o isolamento de uma PLA₂ ácida da peçonha de *Bothrops moojeni*, também atóxica. As duas enzimas PLA₂s purificadas a partir da peçonha de *Bothrops moojeni* se diferenciam da BmooPLA₂ por não apresentarem atividade miotóxica, enquanto a enzima BmooPLA₂ possui uma moderada atividade miotóxica, como veremos mais adiante.

*Amostra (5µg)	Atividade Fosfolipásica (µEq/mg/min)
Peçonha bruta (<i>B.moojeni</i>)	122,0
PLA ₂	1316

*Dosagem pelo método do microbureto.

Tabela IV: Atividade Fosfolipásica. Nesta atividade foi utilizado como substrato uma suspensão aquosa de gema de ovo. Os ácidos graxos liberados enzimaticamente foram titulados com NaOH 0,1248N em pH 8,0 à temperatura ambiente. A atividade foi expressa por microequivalentes de base consumida, por miligramas de proteína por minuto.

4.8. Atividade Hemolítica Indireta.

A atividade fosfolipásica foi medida em gel de ágar suplementado com eritrócitos humanos e gema de ovo. A avaliação da atividade foi realizada pela medição do diâmetro do halo que se formou. Quando a amostra aplicada apresenta atividade fosfolipásica, ela age quebrando os fosfolipídeos presentes na gema do ovo e com isso, libera ácidos graxos que fazem com que o meio ao redor torne-se ácido, o que resulta em lise de eritrócitos do sangue que foi adicionado ao gel, formando desta maneira um halo em torno da amostra, o qual é o indício da atividade.

A enzima BmooPLA₂ apresentou atividade a partir de 0,1µg e esta se estabilizou com 1,5µg. O controle negativo foi realizado com PBS e o positivo com a peçonha bruta de *Bothrops moojeni* (10µg), o PBS não apresentou atividade e a peçonha bruta apresentou um halo com aproximadamente 15mm (figura 09). A dose hemolítica indireta mínima da

BmooPLA₂ foi determinada como 1µg, pois houve a formação de um halo com diâmetro de 16mm.

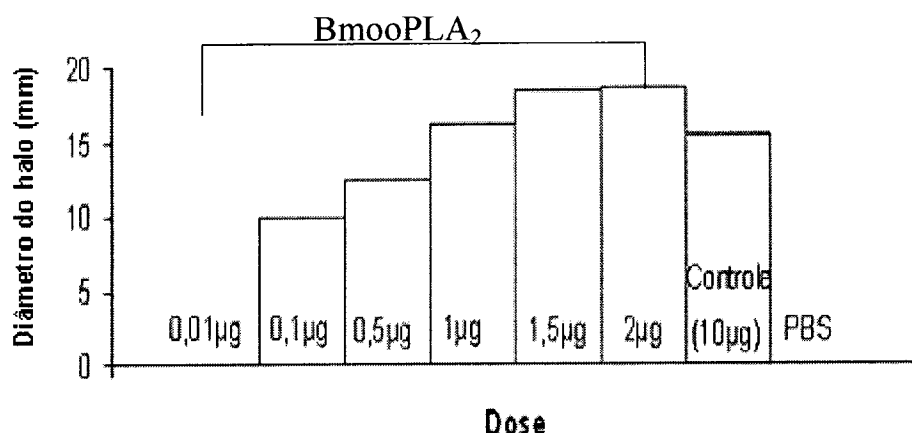


Figura 09: Atividade hemolítica indireta dose-dependente. O controle positivo foi feito com a peçonha bruta de *bothrops moojeni*, e o controle negativo com PBS.

4.9. Efeito de íons catiônicos sobre a atividade fosfolipásica.

Sabe-se que as PLA₂s procedentes de peçonhas de serpentes são cálcio dependentes, uma vez que íon cálcio na concentração de 1 mM apenas, é um importante cofator para que ocorra a catálise (Ponce-Soto, *et al.*, 2002). No entanto, determinadas PLA₂s são também ativas cataliticamente por ação de outros íons divalentes como descrito por Breithaupt (1976). Além do cálcio, outros íons foram testados como, por exemplo, Mg²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Na⁺, Mn²⁺ e Fe²⁺ (1mM), com o intuito de verificar a existência de alguma outra dependência para uma atividade ótima. É importante ressaltar que já existe cálcio na gema de ovo, por isso não houve um aumento na atividade quando o íon testado foi Ca²⁺.

Os íons testados, provavelmente, não contribuíram para a atividade catalítica, pois se houvesse alguma dependência de alguns desses íons a atividade deveria ser potencializada. Já no caso do Zn²⁺, a atividade fosfolipásica foi reduzida para a concentração de íon utilizada (Figura 10), o controle utilizado foi a enzima BmooPLA₂ na concentração observada como a dose hemolítica indireta mínima (1µg).

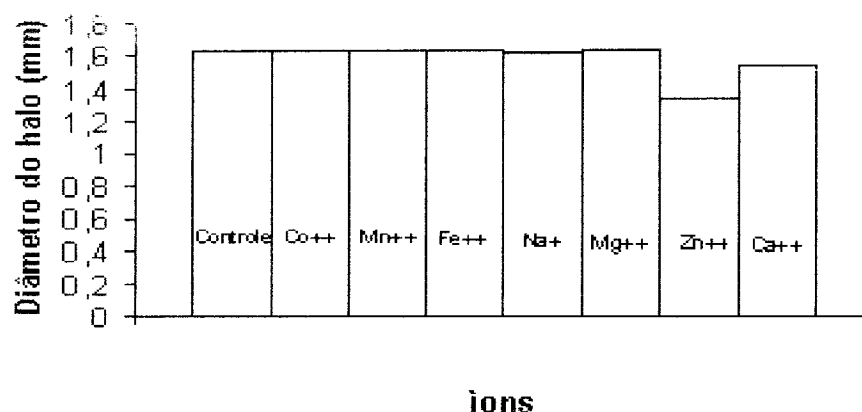


Figura 10: Efeitos de íons catiônicos sobre a atividade hemolítica Indireta. O controle foi feito com a BmooPLA₂ em PBS, pH 7,2.

4.10. Atividade fosfolipásica pH dependente.

A atividade fosfolipásica da enzima BmooPLA₂ foi realizada em soluções de pHs entre 2,5 e 10. A enzima apresentou atividade em todos os pHs, mostrando-se bastante estável (Figura 11). Nos pHs 3,5 e 4,5 houve um decréscimo na atividade da enzima, o que pode ser explicado uma vez que o pI dessa fosfolipase deve ser semelhante a esses pHs, ocorrendo dessa forma a precipitação da proteína, o que já foi observado também em outras PLA₂ (Bonfim, 2004). O controle utilizado foi a enzima BmooPLA₂ na concentração de 1 µg.

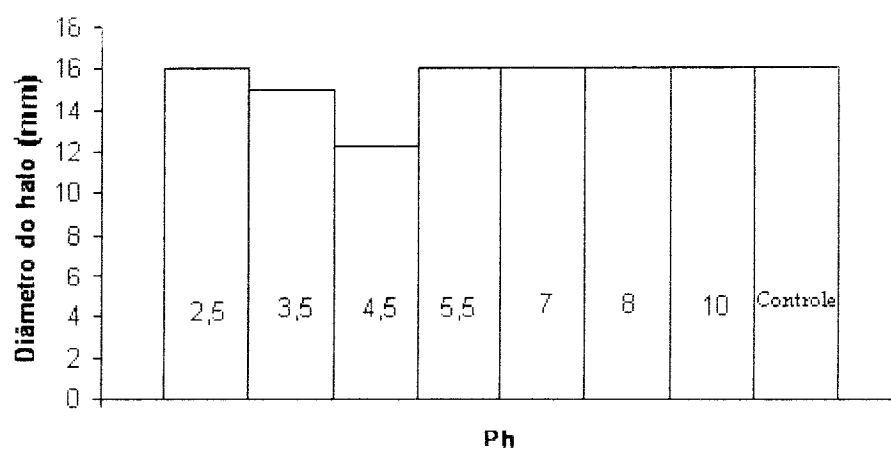


Figura 11: Atividade hemolítica indireta pH-dependente. A atividade foi realizada com a PLA₂ na concentração estipulada como a dose hemolítica indireta mínima. O controle foi feito com a PLA₂ em tampão PBS, pH 7,2.

4.11. Atividade fosfolipásica temperatura dependente.

A enzima BmooPLA₂ foi incubada em diferentes temperaturas (-20°C à 100° C) por 1 hora, e a atividade fosfolipásica foi ensaiada. A BmooPLA₂ apresentou atividade em todas as temperaturas em menor ou maior grau, sendo que nenhuma variação significativa ocorreu (figura 12). Esse resultado é coerente com a literatura, que mostra que as PLA₂s de peçonhas de serpentes são termoestáveis (Bonfim *et al*, 2001; Ponce-Soto, *et al.*, 2002). O controle utilizado foi a BmooPLA₂ na concentração de 1µg.

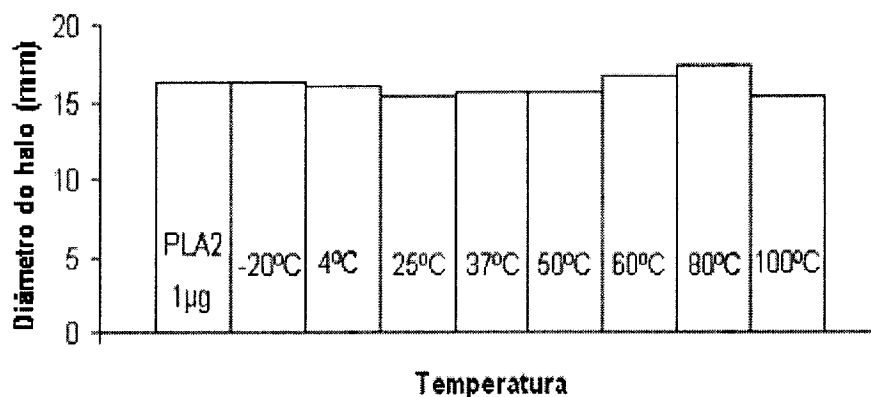


Figura 12: Atividade hemolítica indireta temperatura dependente. A atividade foi realizada com a PLA₂ na concentração estipulada como a dose hemolítica indireta mínima. O controle foi feito com a BmooPLA₂ (1µg) à temperatura ambiente.

4.12. Efeito do EDTA sobre a atividade enzimática da PLA₂.

A BmooPLA₂ foi incubada com diferentes concentrações de EDTA (3, 15, 30 60mM) por 1 hora e sua atividade ensaiada. A atividade da enzima foi parcialmente inibida com EDTA nas concentrações de 3 e 15mM e totalmente inibida nas concentrações de 30 e 60 mM (Figura 13). O EDTA é um agente quelante que se liga a íons presentes no sítio catalítico da enzima (Riffel, 2006). A inibição da atividade enzimática, na presença de EDTA, demonstra a dependência de íons para o efeito dessa enzima, provavelmente o íon cálcio, como já dito anteriormente. O controle utilizado foi a BmooPLA₂ na concentração observada como a dose hemolítica indireta mínima (1µg) em temperatura ambiente.

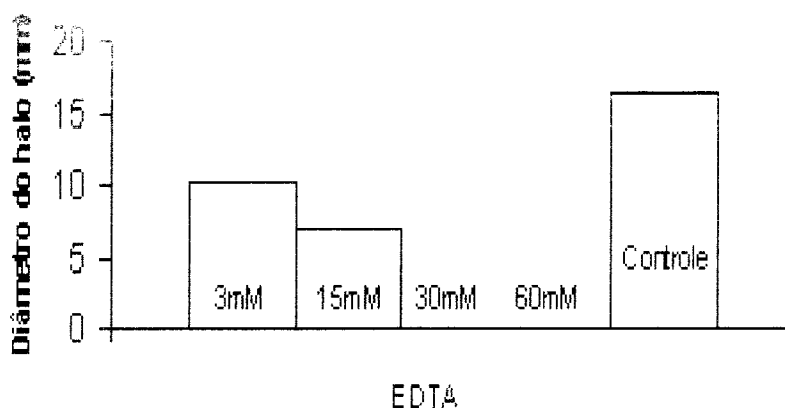


Figura 13: Atividade hemolítica indireta na presença do EDTA. A atividade foi realizada com a BmooPLA₂ na concentração estipulada como a dose hemolítica indireta mínima. O controle foi feito com a BmooPLA₂ na concentração de 1µg em tampão PBS, pH 7,2 à temperatura ambiente.

4.13. Atividade Edematogênica.

Os resultados obtidos na atividade de formação de edema estão representados na figura 14. A atividade foi realizada utilizando a enzima BmooPLA₂ nas concentrações de 5µg, 10µg e 15µg e a peçonha bruta de *Bothrops moojeni* na concentração de 15µg. A formação de edema foi aferida nos tempos 1, 2, 3, 4, 5 e 24hs onde as maiores atividades foram observadas com a BmooPLA₂ nas concentrações de 10µg e 15µg, sendo que na concentração de 10µg o edema foi menor 3hs após a aplicação em relação à 15µg e também em relação à peçonha bruta.

A peçonha bruta na concentração de 15µg apresentou atividade menor que nas concentrações de 10µg e 15µg de BmooPLA₂, sendo que em todas as amostras pôde-se observar uma diminuição da atividade em decorrer do tempo. Todas as concentrações tiveram seu pico máximo de edema com 1h e em nenhuma das concentrações foi visualizado edema após 24hs de aplicação.

Os resultados desta atividade foram compatíveis com o estudo bibliográfico realizado, o qual descreve uma grande ação local por parte dos venenos botrópicos, principalmente devido à atividade de fosfolipases A₂ (Bonfim, 2004).

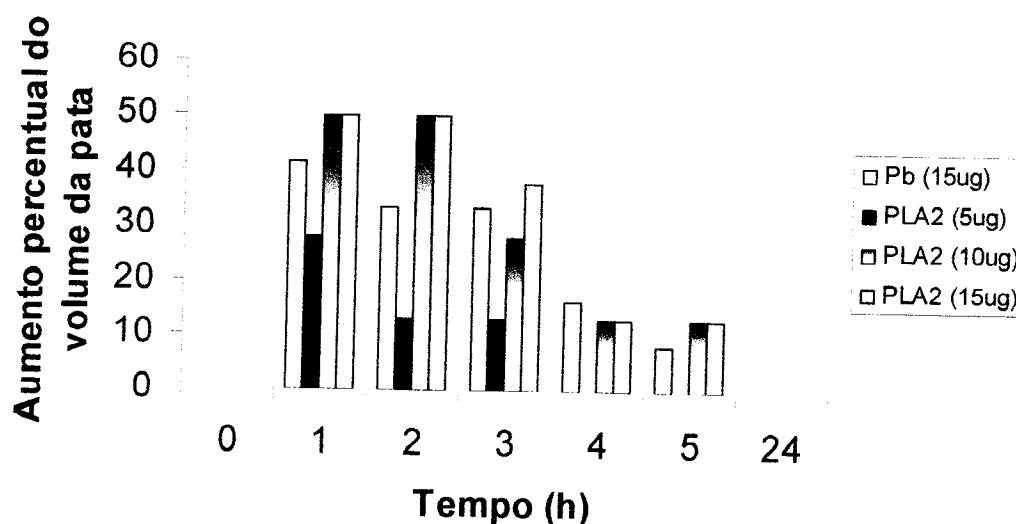


Figura 14: Atividade Edematogênica realizada por injeção subplantar na pata de camundongos.

4.14. Atividade Miotóxica.

A enzima BmooPLA₂ apresentou uma baixa atividade miotóxica. O controle negativo foi realizado com a injeção de 50μL de PBS, no qual foi verificada uma quantidade basal de 258U/L de CK no plasma. Quando foram injetados 25μg de peçonha de *B. moojeni*, os níveis de CK foram alterados, subindo para 2.738U/L. Ao injetar BmooPLA₂ para verificação da sua capacidade de induzir atividade miotóxica foi considerado que a enzima não apresentou atividade na concentração de 25μg, sendo quantificado 405U/L de CK no plasma do camundongo, concentração muito próxima da obtida no controle contendo apenas PBS. Já quando foram utilizados 50μg de BmooPLA₂, os níveis de CK no plasma foram alterados para 1020U/L (Figura 15).

Em regra geral, PLA₂s ácidas demonstram uma menor atividade miotóxica (quando possuem esta atividade) em relação as PLA₂ básicas, apesar de possuírem normalmente uma maior atividade enzimática (Rosemberg, 1986).

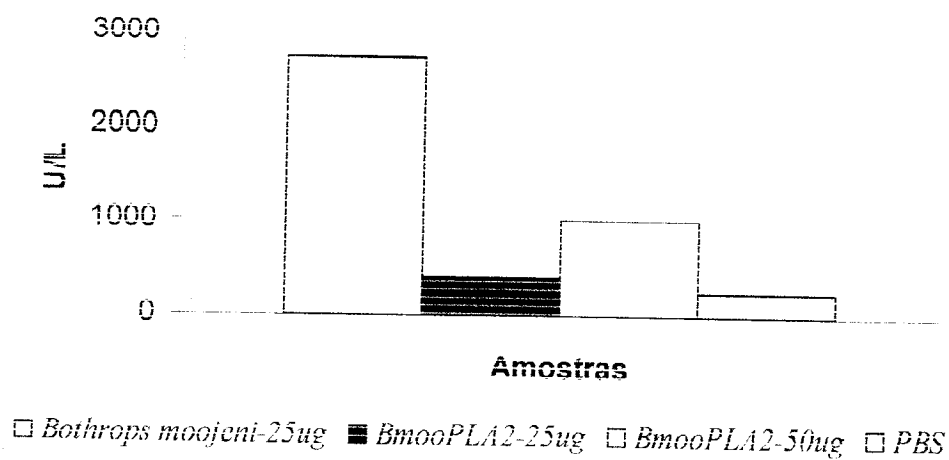


Figura 15: Atividade Miotóxica realizada pela determinação da creatina quinase. A atividade foi expressa em unidades/litro. A atividade miotóxica foi mensurada pela fosforilação de um nanomol (nmol) de creatina por minuto.

5. CONCLUSÃO

O trabalho descreve a purificação de uma fosfolipase A₂ ácida (BmooPLA₂) de peso molecular de aproximadamente 15000, a partir da peçonha bruta de *Bothrops moojeni*.

Esta enzima apresentou uma alta atividade fosfolipásica, tanto em titulação potenciométrica em emulsão de gema de ovo, quanto em gel de agar (hemólise indireta). Demonstrou também, ser uma enzima estável em diferentes temperaturas, pHs e na presença de íons, além de perder sua atividade catalítica na presença de EDTA, comprovando a dependência do cofator cálcio.

Além disso, esta PLA₂ foi capaz de induzir formação de edema na pata de ratos, além de ser uma miotóxica quando testadas em camundongos.

Estes resultados podem auxiliar no entendimento do mecanismo de ação de fosfolipases A₂ e seus processos toxicológicos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bonaldo, S.M. Efeito de *sccharomyces cerevisae* na síntese de fotoalexinas em sorgo, na germinação e formação de apressórios por fungos fitopatogênicos e na proteção de pepino A *colletotrichum lanegarium* e sorgo A *colletotrichum sublineolum*. **Tese de Doutorado**, Universidade de São Paulo, 2005.
- Bonfim, V.L.; Toyama, M.H.; Novello, J.C.; Hyslop, S.; Oliveira, C.R.; Rodrigues-Simioni, L.; Marangoni, S. Isolation and enzymatic characterization of a basic phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* snake venom. **J Protein Chem.** v.20, p.239-245, 2001.
- Bonfim, V.L. Caracterização bioquímica e biológica de duas isoformas de BthTX-II: Bj-IV e Bj-V (PLA2) isoladas do veneno de *Bothrops jararacussu*. **Dissertação de mestrado**, Unicamp, 2004.
- Bosh, H. Van den. Intracellular phospholipase A. **Biochim. Biophys. Acta**, v.604, p. 191-246, 1980.
- Breithaupt, H. Neurotoxic and myotoxic effects of crotalus phospholipase A and its complex with crotapotin. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.** v.292, p.271-278, 1976.
- Chang, C. C.; Dong Lee, J. The presynaptic neuromuscular blocking action of taipoxin: A comparison with B-bungarotoxin and crotoxin. **Toxicon**, v.15, p. 571, 1977.
- Cogo, J.C.; Lilla, S.; Souza, G.H.M.F.; Hyslop, S.; de Nucci G. Purification, sequencing and structural analysis of two acidic phospholipases A₂ from the venom of *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa). **Biochimie**, v. 88, p. 1947-1959, 2006.
- De Hass, G.H.; Postema, N.M.; Nieuwenhuizen, W. Purification and properties of phospholipase A from porcine pâncreas. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 24, p. 103- 117, 1968.

- Doty, P.; Geiduschec, E.P. In: **The proteins**. I-A. (Neurath, H.; Bailey, K. Eds), 1953.
- Ferreira, S.H. Angiotensin Converting Enzyme: History and Relevance. **Sem. Perinatology**. v. 24 (1), p. 7-10, 2000.
- França, F.O.S.; Málaque, C.M.S. Acidente Botrópico. In: **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos acidentes**. p. 72-86, 2003.
- Gans, C. **Physiology of the Reptília**. Londres: Academy Press, 1978. v. 12.
- Gutiérrez, J.M.; Avila, C.; Rojas, E.; Cerdas, L. An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. **Toxicon**. v. 26, p. 411-413, 1988.
- Gutiérrez, J. M.; Lomonte, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v.33, p.1405-1424, 1995.
- Higuchi, D.A.; Barbosa, C.M.V.; Bincoletto, C.; Chagas, J.R.; Magalhaes, A.; Richardson, M.; Sanchez, E.F.; Pesquero, J.B.; Araujo, R.C.; Pesquero J.L. Purification and partial characterization of two phospholipases A₂ from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) snake venom. **Biochimie**. P. 1-10, 2006.
- Itzhaki, R.F.; Gill, D.M.A. A microbiuret method for estimating proteins. **Analytical Biochemistry**, v. 9, p.401-410, 1964.
- Kini, R. M. Phospholipase A₂: a complex multifuncional protein puzzle. in: R. M. Kini (Ed), **Venom Phospholipase A₂ enzymes: Structure, Function and Mechanism**, Wiley, Chichester, p. 1-28, 1997.
- Kudo, I.; Murakami, M. Phospholipase A₂ enzymes. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**. v. 68, p. 3-58, 2002

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 277, p. 680-689, 1970.

Li, Y.; Yu, B. Z.; Zhu, H.; Jain, M.K.; Tsai, M.O. Phospholipase A₂ Engineering. **Biochem.** v. 33, p. 14714-14722, 1994.

Lomonte, B.; Gutiérrez, J.M.; Furtado, M.F.; Otero, R.; Rosso, J.P.; Vargas, O.; Carmono, E.; Rovira, M.E. Isolation of basic miotoxins from *Bothrops moojeni* and *Bothrops atrox* snake venoms. **Toxicon**, v.28, p. 1137-1146, 1990.

Mukherjee, A.B., Miele, L.; Pattabiraman, N. Phospholipase A₂ enzymes: regulation and physiological role. **Biochem. Pharmac.**, v. 48, p. 1-10, 1994.

Oliveira, F. Novas proteases da peçonha de *Bothrops moojeni* (Caiçaca): Purificação de quatro isoformas de fibrinogenases (Bth α s) e caracterização bioquímica da BthT1. **Tese de Doutorado**, Universidade de Brasília, 2001.

Ownby, C.L., Selistre-de-Araujo, H.S., White, S.P., Fletcher, J.E. Lysine 49 Phospholipase A₂ Proteins. **Toxicon** v.37, p. 411-445, 1999.

Pinho, F.M.O.; Pereira, I.D. Ofidismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.47, p. 24-29, 2001.

Polgar, J.; Magnenat, E.M.; Peitsch, M.C.; Wells, T.N.; Clemetson, K.J. Asp-49 is not an absolute prerequisite for the enzymic activity of low-Mw phospholipase A₂: purification, characterization and computer modelling of an enzymically active Ser-49 phospholipase A₂, ecarpholin S, from the venom of *Echi carinatus sochureki* (saw-scaled viper). **Biochem. J.**, v.319, p.961-968, 1996.

- Ponce-Soto, L.A.; Toyama, M.H.; Hyslop, S.; Novello, J.C.; Marangoni, S. Isolation and preliminary enzymatic characterization of a novel PLA₂ from *Crotalus durissus collilineatus* venom. **J Protein Chem.** v.21, p.131-136, 2002.
- Reichl, A.P.; Serrano, S.M.T.; Assakura, M.T. Isolation and properties of a phospholipase A₂ from the venom of the *Bothrops moojeni*. **Mem. Inst. Butantan**, v.51, p.225-237, 1989.
- Riffel, A. Avaliação de proteases extracelulares da linhagem *Chryseobacterium* sp. Kr6 e purificação e caracterização de uma metaloprotease queratinolítica. **Tese de Doutorado**, Universidade de São Paulo, 2006.
- Rocha e Silva, M.; Beraldo, W.T.; Rosenfeld, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. **Am. J. Physiol.** v. 156, p. 261-273, 1949.
- Rodrigues, V.M.; Marcussi, S.; Cambraia, R.S.; Araujo, A.L.; Malta-Neto, N.R.; Hamaguchi, A.; Ferro, E.A.V.; Homsí-Brandeburgo, M.I.; Giglio, J.R.; Soares, A.M. Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 44, p. 305-314, 2004.
- Rosemberg, D. The relationship between enzymatic activity and pharmacological properties of phospholipases in natural poisons, in: J.B. Harris (Ed.), Natural Toxins Animal, Plant and Microbial, **Oxford Science Publications**, Oxford, pp. 129-174, 1986.
- Sant'Ana, C.D. Caracterização funcional e estrutural de uma nova serinoprotease do veneno de *Bothrops jararacussu*. **Dissertação de mestrado**, Universidade de São paulo, 2005.
- Scott, D.L.; White, S.P.; Otwinowski, W.; Yuan, M.H. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A₂. **Science**, v.250, p.1541-1546, 1990.
- Silveira, L.B.; Fernandes, V.C.; Coppede, J.S.; Sant'Ana, C.D.; Marcussi, S.; Silva, E.G.; Araújo, A.L.; França, S.C.; Giglio, J.R.; Soares, A. M. Enzymatic and Pharmacological

Characterization of two Acidic Atoxic Phospholipase A₂ Isolated from *Bothrops moojeni* Snake Venom. **Anais SBTX**, 2004.

Six, D.A.; Dennis E.A. The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. **Biochim Biophys Acta**. P. 1-19, 2000.

Soares, A.M. Caracterização bioquímica parcial das miotoxinas básicas do veneno de *Bothrops moojeni*: seqüência aminoterminal, cristalografia e estudo da transição dos estado nativo e desenovelado. **Dissertação de mestrado**, Universidade de São Paulo, 1997.

Soares, A.M.; Andriao-Escarso, S.H.; Angulo, Y.; Lomonte, B.; Gutierrez, J.M.; Marangoni, S.; Toyama, M.H.; Arni, R.K.; Giglio, J.R. Structural and functional characterization of a myotoxin I from *Bothrops moojeni* (caissaca) snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.** V. 373, p. 7-15, 2000.

Soares, A.M.; Gíglío J.R.; Chemical modifications of phospholipases A₂ from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties. **Toxicon**, v. 42, p. 855-868, 2003.

Soares, A.M.; Januário, A.H.; Lourenço, M.V.; Pereira, P.S. Neutralizing effects of Brazilian plants againts snake venoms. Review. **Drugs Future**. v. 29, p. 1105-1117. 2004.

Toyama, M.H.; Soares, A.M.; Novello, J.C.; Oliveira, B.; Giglio, J.R.; Marani, S. Amino Acid Sequence of piratoxin-II, a myotoxic Lys 49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops pirajai* venom. **Biochemica Biophysica Acta**, 2000.

Varanda, E.A.; Giannini, M.J.S. Bioquímica de venenos de serpentes. In: **Venenos**. Aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos. BARRAVIERA, B., p.205-223, 1999.

Wittcoff, H. **The phosphatides**. Ed. Reinhold Publising Corporation (New York), p.99- 115, 1951.