

## **PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA PARCIAL DE PROTEASES EXISTENTES NO LÁTEX DA PLANTA *Euphorbia millii* Des Moulins**

ARTHUR DE FREITAS FERREIRA<sup>1</sup>; KELLY CORTES FONSECA<sup>2</sup>; HUDSON  
ARMANDO NUNES CANABRAVA<sup>3</sup>; FÁBIO DE OLIVEIRA<sup>4</sup>.

### **RESUMO**

Foram caracterizadas, em camundongos, as frações proteolíticas do látex de *Euphorbia millii* quanto ao perfil eletroforético e avaliadas as respostas hiperalgésica e edematogênica induzidas pelas proteases purificadas, além da ação destas em fibras musculares. O látex da planta *Euphorbia millii* Des Moulins foi inicialmente fracionado em uma coluna de Troca Iônica (DEAE-Sephacel). Foram obtidas dez frações denominadas Ep1 a Ep10. A fração Ep6, que apresentou atividade proteolítica sobre o fibrinogênio bovino, foi liofilizada e submetida a um outro passo de purificação em resina de Exclusão Molecular (Sephadex G-75). Esse procedimento resultou em 4 frações que foram denominadas de Ep6M1 a Ep6M4. A fração Ep6M3 apresentou atividade fibrinogenolítica e foi denominada de Millinase. A Millinase, quando injetada no músculo Gastrocnemius de camundongo, conduziu a uma série de eventos degenerativos drásticos, como a degeneração da hialina, degeneração gordurosa muscular, mionecrose e reação inflamatória que eram evidentes ao microscópio. Foram selecionados grupos de 03 Ratos Wistar adultos machos e injetados via intradérmica (i.d) na região subplantar da pata direita posterior, soluções contendo 50µL de diferentes concentrações (1, 5 e 25ug) de Millinase. Os experimentos controles foram realizados com injeções de 50µL de

---

<sup>1</sup>Acadêmico de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG. E-mail: [arthurfreitasferreira@yahoo.com.br](mailto:arthurfreitasferreira@yahoo.com.br)

<sup>2</sup>Acadêmica de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG.

<sup>3</sup>Prof. Dr. do Laboratório de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Av. Pará, 1720-Bloco 2A, Umuarama, 38400-000, Uberlândia-MG. E-mail: [canabrava@ufu.br](mailto:canabrava@ufu.br)

<sup>4</sup>Prof. Dr. do Laboratório de Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Av. Pará, 1720-Bloco 2A, Umuarama, 38400-000, Uberlândia-MG.

salina por animal. Quando a Millinase foi injetada na região intraplantar de ratos Wistar, foi capaz de induzir a formação de edema. Os resultados mostraram que a resposta máxima para todas as doses (1, 5 e 25ug) foi observada 1 hora após o tratamento com a Millinase, decaindo gradualmente a seguir e desaparecendo por completo em 24 horas. Quanto a hiperalgesia, apesar da enzima ter induzido a um aumento, não houve diferença significativa.

Palavras-chave: *Euphorbia millii* Des Moulins; látex.

## **ABSTRACT**

The proteolytic fractions of the latex of *Euphorbia millii* had been characterized by the eletroforetic profile and the induced hyperalgesic and endematogenic response by purified proteases evaluated in rats, besides the action of these purified proteases in muscular fibres. The latex of the *Euphorbia millii* Des Moulins initially was fractionazed in a column of Ionic Exchange (DEAE-Sephacel). Ten fractions had been gotten and called Ep 1 to Ep10. The Ep6 fraction, that presented proteolytic activity on the bovine fibrinogen, was liofilized and submitted to one another step of purification in resin of Molecular Exclusion (Sephadex G-75). This procedure resulted in 4 fractions that were called of Ep6M1 to Ep6M4. The Ep6M3 fraction presented fibrinogenolitic activity and was called of Millinase. The Millinase, when injected in the rat's Gastrocnemius muscle, lead to a serie of drastic degenerative events, as the degeneration of the hialina, muscular greasy degeneration, myonecrosis and inflammatory reaction that were clear on the microscope. Groups of 03 adult male Wistar mice had been selected and intradermic (i.d.) injected solutions containing 50µL of different concentrations (1, 5 and 25ug) of Millinase in the subplantar region behind the right leg. The control experiments had been carried through with injections of 50µL salin in each animal. When Millinase was injected in the intraplantar region of Wistar mice, it was capable to induce the formation of edema. The results had shown that the maximum response for all the doses (1, 5 and 25ug) was observed 1 hour after the treatment with the Millinase, having decayed gradually and disappearing completely in 24 hours. Although the enzyme had induced an increase on hyperalgesia, this hyperalgesic response did not have significant difference.

Keywords: *Euphorbia millii* Des Moulins; latex.

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo Van Die (1955) há aproximadamente 12.500 espécies de plantas que produzem látex. Elas compreendem desde pequenas plantas herbáceas anuais como *Euphorbia*, até grandes árvores como *Hevea* e *Arctocarpus* e as trepadeiras tropicais como *Cryptostegia* e *Landolphia*.

A turvação ou aspecto leitoso do látex não depende diretamente da sua composição, mas sim de resultados das diferenças entre os índices de refração das partículas e do meio de dispersão (ESAU, 1965). O látex fresco após sangria, pode ser dividido por centrifugação em três frações principais: uma camada superior branca, um soro aquoso e o precipitado. A camada superior contém partículas de borracha, o soro contém a maior parte das substâncias solúveis, incluindo, aminoácidos, proteínas (*Ficus callosa*), carboidratos, ácidos orgânicos, sais inorgânicos, materiais nucleotídeos e algumas Papaveraceas contem alcalóides importantes (por exemplo, *Papaver*

*somniferum*) (BUTTERY,1985). Também podem existir em grande quantidade cristais de oxalatos e malatos. A fração do fundo consiste principalmente de lutóides e quantidades variáveis de borracha e outros componentes de densidade maior que a do soro (BUTTERY,1985). O látex contém aproximadamente 44% de borracha, 46% de soro de látex, 9% de soro lutóide e 1% de sólidos diversos por volume (BUTTERY et al, 1985). Os terpenos que aparecem em diferentes quantidades dependendo do tipo da planta, por sua vez, podem estar completamente ausentes.

Vários estudos vêm sendo realizados com enzimas proteolíticas oriundas do látex de várias plantas (MURRAY et al., 2000) tais como: *Caricaceae*, *Moraceae*, *Asclepiadaceae*, *Apocynaceae*, e (BOLLER, 1986). A função destas proteases, ainda, não é bem definida. Uma possível função é a degradação das proteínas durante o desenvolvimento laticífero. Um exemplo é o látex de *Carica papaya*, que contem uma mistura de endopeptidases do tipo cisteína (DUBOIS, 1988), como a papaína (MITCHEL, 1970), as quimopapaínas A e B, a endopeptidase III da papaia, a endopeptidase IV da papaia (BARRET, 1985 e RITONJA, 1989) e a endopeptidase V (caricainase) (DUBOIS, 1988). A

maioria das proteases encontrada é pertencente à classe das cisteínoprotease e serinoproteases (principalmente em plantas das famílias Euphorbiaceae, Moraceae e Asteraceae), que estão envolvidas em processos intra e extracelulares, tais como amadurecimento de frutos, reserva nutricional, quebra de dormência de sementes, ativação e degradação de proteínas defeituosas (DUBEY, 2002).

Com as centenas de genes que codificam proteases, as plantas são equipadas com uma grande maquinaria proteolítica que regula a irreversibilidade da ação das proteínas. Esta maquinaria foi vista geralmente com papel das tarefas domésticas, servindo para remover as proteínas não funcionais e liberação dos aminoácidos para reciclagem. Entretanto, as proteases parecem também ter papéis-chaves na regulação de processos biológicos nas plantas, tais como o reconhecimento de patógenos e de pestes e a indução de respostas eficazes para defesa. As associações entre a indução de genes das proteases e a defesa foram encontradas também para os genes que codificam as proteases metallo, aspartica e as cisteína (GIDROL, 1994).

A partir destas correlações, há outras razões para esperar que as proteases poderiam estar envolvidas na defesa da planta. Determinadas caspases possuem papel-chave no processo de apoptose de

células animais, um procedimento de morte programada das células (PCD). As apoptoses têm muitas características comuns com as respostas de hipersensibilidade das plantas, um mecanismo de defesa que envolva PCD (MITCHEL, 1970). Embora os genes das caspases das plantas não foram identificados ainda, sua existência é indicada por muitos estudos em que os inibidores de caspases obstruíram outras respostas da defesa. Uma evidência mais adicional que as proteases de plantas estão envolvidas na defesa emergiu com a identificação de RCR3, uma cisteínoprotease secretada, que é requerida para a função do gene Cf-2 da resistência (para o fulvum resistance-2) do *Cladosporideo*, e CDR1, uma aspartoprotease secretada que regula respostas de defesa (BARRET, 1985). Outro exemplo importante é a papaína, uma protease isolada do látex de *Carica papaya* que é responsável por “executar um ataque” ao organismo invasor. Outras proteases participam de uma cascata de sinalização, como indicado por estudos com inibidores de proteases (VAN DER HOORN et al, 2004).

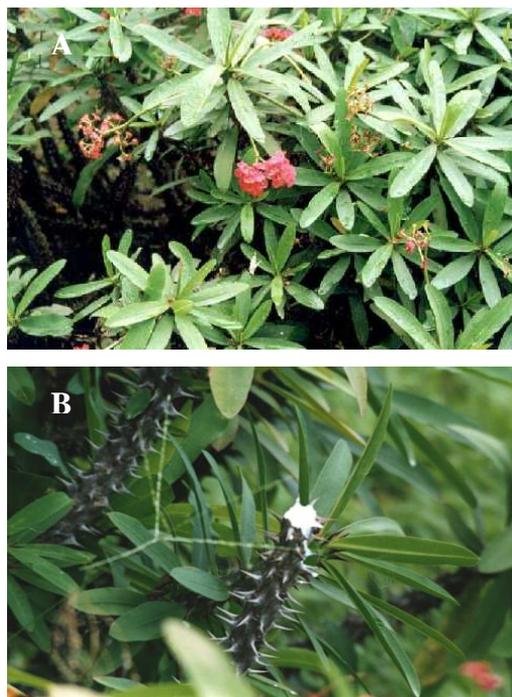
A presença de atividade proteolítica tem sido relatada em diferentes locais da célula, tais como, vacúolos, cloroplastos, parede celular, microsomas, mitocôndrias, citossol e aparelho de Golgi (PALMA et

al., 2002 e DISTEFANO, 1997). As ações dessas enzimas são controladas por mecanismos que envolvem controle gênico, produção de zimogênios, ativação e inibição enzimática (GARCÍACARREÑO e DEL TORO, 1998).

Muitas espécies do gênero *Euphorbia* são causadoras de intoxicações, principalmente *E. pulcherrima* Willd (bico-de-papagaio), *E. lactea*, *E. tirucalli* L. (árvore-de-são-sebastião) e a própria *E. millii* Des Moulins (coroa-de-cisto). Estas contêm em seus látices compostos que são irritantes para a pele e para as mucosas (FREITAS et al.,1991). Além da ação dos ésteres de forbol, a presença de proteases e o baixo pH do látex (4,5 a 5,5) podem agravar a irritação. Os casos mais frequentes estão associados ao contato do látex com a pele e com as mucosas. A exposição aguda da pele ao látex causa uma condição inflamatória direta sobre a epiderme, que é caracterizada por vermelhidão, inchaço, dor e necrose dos tecidos. Quando partes da planta são ingeridas, desenvolve-se uma sensação de queimação nos lábios, na língua e na mucosa bucal. Subseqüentemente surgem dores intestinais, vômitos e diarréia. O contato com os olhos pode levar ao desenvolvimento de conjuntivites, queratites e uveites, juntamente com inchaço das pálpebras e fechamento dos

olhos devido ao edema. Todos os sintomas ocorrem imediatamente e podem durar várias horas ou dias após a exposição (EVANS e EDWARDS, 1987).

Aplicações medicinais importantes foram relatadas para a *Euphorbia millii*, uma planta laticífera, pertencente à família Euphorbiaceae (SAUZA et al.,1997). Originária de Madagascar, a espécie *Euphorbia millii* Des Moulins (Figura 1) é muito difundida no Brasil, onde é cultivada como ornamental nos jardins e, sobretudo em cima de muros e janelas. Esta planta é caracterizada por ser um arbusto perene, latescente, caule com 1,5m de altura, muito ramificado, com ramos compridos e contorcidos, armados de numerosos espinhos. Folhas alternas, simples, inteiras, obovadas ou espatuladas, glabras, membranosas, curto pecioladas. Flores unissexuais, reunidas em inflorescências tipo ciátio, longo-pedunculadas com brácteas vermelhas e involúcro campanulado com cinco glândulas apicais (CORRÊA, 1984). O látex desta planta contém um aglomerado de materiais de baixa densidade, comuns aos látices, e várias enzimas (conhecidas como forbaínas), bem como terpenos, alcalóides, vitaminas, carboidratos, lipídeos e aminoácidos livres (LYNN e CLEVETTE-RADFORD, 1987).



**Figura 1-** Planta *Euphorbia millii* popularmente conhecida como Coroa-de-Cristo (A) e um corte feito na planta para coleta do látex (B). Disponível no site: <http://br.geocities.com/plantastoxicass/principal.html>.

Há uma extensa literatura relatando o potencial efeito moluscicida do látex de várias espécies do gênero *Euphorbia* (PILE et al.,1999). Teoricamente, estas plantas representam uma solução de baixo custo e ecologicamente correta no controle de vetores da esquistossomose. Porém, as propriedades tóxicas apresentadas pelo látex diminuem a viabilidade do uso das mesmas. Vários estudos com ratos e com coelhos estão sendo realizados por muitos autores na tentativa de encontrar diluições apropriadas do látex, para que este seja

aplicado em lagoas sem prejuízos para seres humanos e outros animais. Foram também realizados alguns testes toxicológicos para outros animais que habitam os criadouros e seres humanos; bem como testes em criadouros naturais comprovando a efetividade em campo; identificadas três das oito frações ativas (ingenóis) componentes do látex como não sendo carcinogênicas, sendo uma das frações 100 vezes mais ativa do que o produto sintético usado como moluscicida atualmente (niclosamida) (RIBAS,2002). Subhash C., et al (2006), purificaram a partir do látex de *Euphorbia millii*, uma protease que fora chamada de “Milin”. Esta apresenta peso molecular de 51 kDa e tem atividade ótima em pH 8,0 e 60°C, principalmente sobre os substratos caseína e azoalbumina. Outra característica importante desta protease, é o fato de suas atividades serem inibidas por PMSF (phenylmethanesulphonylfluoride), o que levou os pesquisadores a concluir que a “Milin” se trata de uma serinoprotease.

As enzimas proteolíticas de fonte vegetal receberam uma atenção especial na indústria e na biotecnologia farmacêutica devido a sua propriedade de ser ativa em larga escala quando em alta temperatura e pH. Elas possuem uma importante aplicação comercial, estando entre os três maiores grupos de enzimas industriais, sendo responsáveis por 60% da venda

internacional de enzimas. Várias etapas proteolíticas importantes ocorrem no mecanismo evasivo de tumores, assim como no ciclo de infecção de um grande número de vírus e microrganismos patogênicos. Estes fatos tornam as proteases um alvo quimioterápico valioso para o desenvolvimento de novos compostos farmacêuticos. As enzimas proteolíticas também participam no catabolismo de proteínas, tanto nas vias catabólicas como nas anabólicas e na liberação de hormônios peptídeos farmacologicamente ativos a partir de proteínas precursoras. As proteases têm também uma variedade de aplicações principalmente na indústria de detergentes e de alimentos. Tendo em vista os recentes acordos mundiais para uso de tecnologias não poluentes, as proteases começaram a ser usadas em larga escala no tratamento do couro, em substituição aos compostos tóxicos e poluentes até então usados. Na indústria farmacêutica, as proteases são usadas em pomadas cicatrizantes e têm um uso potencial para outros medicamentos.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### **Materiais**

#### **Cromatografia e Eletroforese**

DEAE-Sephacel, Acrilamida, bis-acrilamida, N,N,N',N'- tetrametiletileno-diamino (TEMED), dodecil sulfato de sódio (SDS), Comassie Brilliant Blue R-250, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), azul de bromofenol, Tris-HCl, βmercaptoetanol, persulfato de amônio (Sigma Chem.Co.). Sephadex G-75 (Amersham Biosciences)

#### **Padrões para determinação do peso molecular**

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 (20.000) e □lactoalbumina (14.400) (Amersham Bioscience).

#### **Determinação das atividades enzimáticas e Biológicas**

- Fibrinogênio bovino (Sigma Chem.Co).
- Caseína pura (Sigma Chem.Co).
- Animais experimentais (Ratos e camundongos albinos das raças Wistar e Swiss, respectivamente) foram gentilmente doados pelo

Biotério da área de Ciências Fisiológicas do Instituto de Ciências Biomédicas – UFU.

- Analgesímetro (Insight).
- Paquímetro (Mitutoyo).

Os demais reagentes utilizados eram de grau analítico

## Métodos

### Eletróforese em gel de poliacrilamida

#### Preparação dos géis

Dois espaçadores em forma de fita foram utilizados para formar entre duas placas de vidro (10,0cm X 10,5 cm) um espaço retangular de aproximadamente 0,75mm de espessura. Com o auxílio de um suporte de montagem, as placas foram imobilizadas verticalmente, formando assim, uma câmara que foi preenchida com a solução do gel.

Terminada a polimerização do gel, a placa foi colocada em uma cuba de acrílico e conectada aos eletrodos. A eletróforese foi conduzida por uma corrente constante de 25mA por aproximadamente 90 minutos.

Após a corrida, os géis foram retirados da placa e mergulhados em uma solução corante contendo Comassie Brilliant Blue R-250 0,2% (m/v) em água-metanol-ácido acético (4:5: 1 v/v) por

10 minutos. Em seguida, os géis foram descorados por uma solução de água e ácido acético 7% (v/v).

### Preparação dos géis de poliacrilamida em condições desnaturantes.

Na preparação dos géis 5% e 14% foram utilizadas as soluções contidas na tabela abaixo:

Tabela 1: Reagentes utilizados na preparação dos géis de poliacrilamida

Soluções estoque	Volume (µL)	
	Gel de Empilhamento (5%)	Gel de Separação (14%)
Tris-HCl 2M pH 8,8	-----	1170
Tris-HCl 2M pH 6,8	250	-----
Acrilamida: bis (30:0, 8)	650	2920
Água destilada	2960	1950
TEMED	5,0	7,5
Persulfato de Amônio (10%)	35	37,5
<i>SDS 1%</i>	40	62,5

A solução tris base 0,1M, glicina, 0,77M e SDS 0,3% pH 8,3 foi utilizada como tampão para o cátodo e a mesma solução, porém sem glicina, para o ânodo.

### **Ensaio enzimáticos:**

#### **Teste de degradação do fibrinogênio bovino**

A atividade fibrinogenolítica foi realizada segundo EDGAR e PRENTICE (1973). Cerca de 5 µg da amostra foram adicionados em 50 µL de uma solução de fibrinogênio bovino (1,5 mg/mL de salina) e incubada por até 120 min a 37 °C. A reação foi parada com a adição de 25 µL do tampão de amostra e 5 µL de β-mercaptoetanol. As amostras foram aquecidas a 100 °C por 3 min. e analisadas em eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com SDS como agente desnaturante.

#### **Efeito de agentes inibidores sobre a atividade fibrinogenolítica**

A influência de agentes inibidores de proteases foi testada quando a amostra foi pré-incubada por 10 minutos com EDTA 8 mM, βMercaptoetanol 0,55 mM e Benzamidina 4 mM. Em seguida a atividade fibrinogenolítica foi determinada conforme descrito anteriormente.

#### **Efeito da temperatura sobre a atividade fibrinogenolítica**

Cerca de 5 µg da enzima foi pré-incubada por 15 minutos em diferentes temperaturas (30°C a 80°C), e em seguida a atividade fibrinogenolítica foi determinada conforme descrito anteriormente.

#### **Atividade proteolítica sobre a caseína**

Cerca de 5 µg da enzima foram adicionadas a 500 µL de uma solução de caseína 1% tamponadas em diferentes pHs (Tampão acetato de sódio 0,02M, pHs 3,0; 4,0 e 5,0; fosfato de sódio 0,02M, pH 6,0; Tris-HCl 0,02M, pHs 7,0;8,0 e 9,0; borato de sódio, pHs 10,0 e 11,0) e incubados por 60 minutos a 37°C. A reação foi parada com adição de 100 µL de ácido tricloroacético (TCA). A amostra foi deixada em repouso por 20 minutos. Após esse período foi centrifugada a 10.000 g por 10 minutos e o sobrenadante foi retirado e monitorado no espectrofotômetro a 280nm. Uma unidade de atividade caseinolítica corresponde a um acréscimo de 0,001 unidades na absorbância.

#### **Atividade miotóxica**

A atividade miotóxica foi determinada com base nas alterações

morfológicas induzidas por injeções de 50 µg da amostra no músculo gastrocnemius de camundongos Swiss. 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.

#### **Atividade edematogênica**

Em grupos de 03 Ratos Wistar adultos machos (220-250g) foram injetados via intradérmica (i.d) na região subplantar da pata direita posterior, soluções contendo 50µL de diferentes concentrações (1, 5 e 25ug) de Millinase. A mensuração da espessura das patas foi realizada previamente com um paquímetro (0,01 mm) de baixa pressão (Mytutoyo, Japão). Os experimentos controles foram realizados com injeções de 50µL de salina 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).

#### **Atividade de Hiperalgometria**

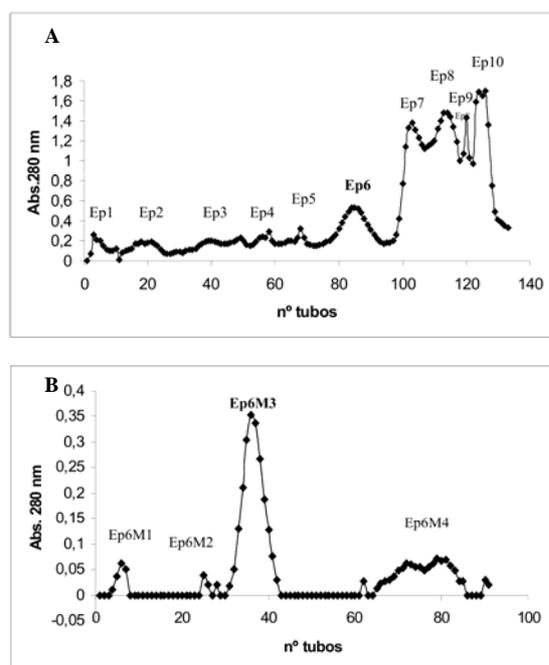
Esta atividade seguiu o mesmo protocolo da atividade edematogênica, porém a dor foi medida com o auxílio de um analgesímetro (Analgesy- Meter Insight, Brasil). Neste teste, uma força em gramas (g), de magnitude crescente (16g/s), foi continuamente aplicada sobre o dorso de uma das patas posteriores do rato e foi interrompida quando o animal apresentou a reação de “retirada” do membro. Neste modelo, o limiar de dor é representado como a força (em g) necessária para indução desta reação.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **Purificação do látex da planta *Euphorbia millii* Des Moulins.**

O látex da planta *Euphorbia millii* Des Moulins foi inicialmente fracionado em uma coluna de Troca Iônica (DEAE-Sephacel). Foram obtidas dez frações

denominadas Ep1 a Ep10 (figura 2A). A fração Ep6, que apresentou atividade proteolítica sobre o fibrinogênio bovino, foi liofilizada e submetida a um outro passo de purificação em resina de Exclusão Molecular (Sephadex G-75). Esse procedimento resultou em 4 frações que foram denominadas de Ep6M1 a Ep6M4 (figura 2B). A fração Ep6M3 apresentou atividade fibrinogenolítica e foi denominada de Millinase.



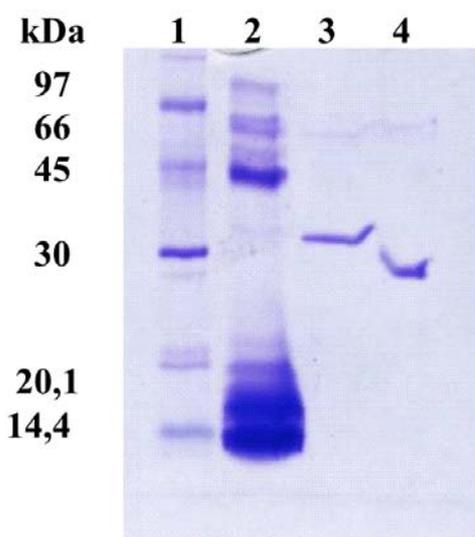
**Figura 2** – Fracionamento do látex da planta de *Euphorbia millii* Des Moulins (A) Separação em DEAE-Sephacel: o látex bruto, depois de dialisado, foi aplicado à coluna (1,5 X 15 cm) e a eluição foi conduzida a um fluxo de 20ml/h com gradiente convexo de concentração (50mM a 1,0M) em tampão bicarbonato de amônio, pH 7,8. (B) Separação em Sephadex G-75: a fração fibrinogenolítica

(Ep6) foi aplicada a uma coluna (1,0 X 100 cm), eluída com tampão bicarbonato de amônio 50mM, pH 7,8 com um fluxo de 20 ml/h.

A análise por eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes (SDS-PAGE) da fração Ep6M3 mostrou que os tubos (32 a 42) eram constituídos por banda única (resultado não mostrado). Esse material denominado de Millinase foi reunido, liofilizado e armazenado a -20°C.

### Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes e determinação da massa molecular.

Quando analisada em SDS-PAGE a 14%, a Millinase apresentou banda única e cadeia simples com massa molecular aparente de aproximadamente 33 kDa, na presença e 30 kDa na ausência do agente redutor  $\beta$ mercaptoetano (figura 3). De acordo com esses resultados sugerimos que a Millinase possui pontes de dissulfetos. Por esse motivo, quando reduzida, a enzima se encontra mais desenovelada e, portanto, com um volume maior e conseqüentemente migra menos no gel de eletroforese. Por outro lado, as possíveis pontes de dissulfetos podem favorecer uma maior compactação da enzima, o que poderia reduzir o volume e aumentar a migração da enzima no gel.



**Figura 3** – Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes para a determinação da massa molecular da Millinase. Linha 1- padrão de peso molecular: fosforilase b (97.000), albumina bovina (66.000), ovoalbumina (45.000), anidrase carbônica (30.000), inibidor de tripsina (20.000) e  $\alpha$  lactoalbumina (14.400); 2- látex bruto reduzido; 3- Millinase reduzida; 4- Millinase não reduzida.

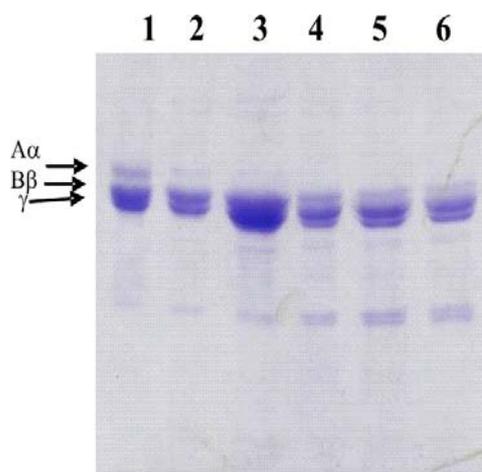
### **Teste de degradação do fibrinogênio bovino**

Os testes de degradação do fibrinogênio bovino mostraram que a Millinase degrada a cadeia A- $\alpha$  do fibrinogênio mais rapidamente que a cadeia B- $\beta$ , enquanto que a cadeia  $\gamma$  continua inalterada mesmo após 120

minutos. A cadeia A- $\alpha$  do fibrinogênio é degradada totalmente com 5 minutos de incubação, já a cadeia B- $\beta$  tem sua degradação iniciada com 60 minutos (figura 4). A atividade fibrinogenolítica é caracterizada pelo desaparecimento das cadeias do fibrinogênio ou, então, pelo aparecimento de produtos de degradação na parte inferior do gel de eletroforese.

Nossos resultados mostraram que a atividade fibrinogenolítica da Millinase é semelhante a muitas outras proteases, purificadas e caracterizadas de peçonhas de serpentes botrópicas (OLIVEIRA, 2001;). Essas proteases hidrolisam preferencialmente a cadeia A- $\alpha$  do fibrinogênio e por isso são classificadas como  $\alpha$  fibrinogenases. Muitas fibrinogenases de peçonhas de serpentes são capazes de degradar o fibrinogênio “in vivo” e por isso são objetos de interesses médicos, pois essas enzimas apresentam uma ação anticoagulante e trombolítica muito eficiente e não apresentam efeitos colaterais severos (OLIVEIRA, 2001). Quando injetada intraperitonealmente em camundongos, a Millinase não foi capaz de degradar o fibrinogênio bovino, provavelmente pela presença de inibidores endógenos presentes na circulação dos animais e que impediram a enzima de expressar sua atividade sobre o fibrinogênio.

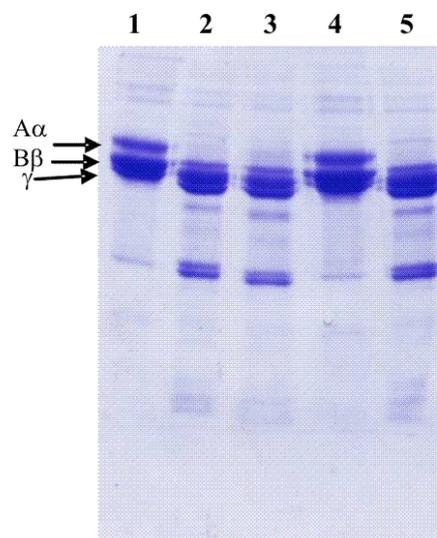
Diversos estudos estão sendo feitos com proteases presentes no látex de plantas de diferentes famílias sobre o fibrinogênio. Podemos citar como exemplo a LGP uma protease isolada do látex da planta *Calotropis gigantea* que é responsável pela degradação completa das cadeias A- $\alpha$  e B- $\beta$  e degradação parcial da cadeia  $\gamma$  do fibrinogênio humano. A cadeia A- $\alpha$  é degradada totalmente quando incubada por 5 minutos, a cadeia B- $\beta$  por 60 minutos e a cadeia  $\gamma$  por 240 minutos (RAJESH et al., 2006)



**Figura 4** – Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% em condições desnaturantes dos produtos de hidrólise do fibrinogênio bovino, resultantes da ação da Millinase. **1-** fibrinogênio bovino controle, **2 a 6-** fibrinogênio incubado com a enzima a 37 °C por 5, 30, 60, 90 e 120 minutos, respectivamente.

### Efeito de agentes inibidores sobre a atividade fibrinogenolítica

Dos agentes testados para a inibição da atividade proteolítica da Millinase somente o  $\beta$ -mercaptoetanol conseguiu inibir por completo a hidrólise do fibrinogênio bovino (figura 5). Os demais inibidores (EDTA e benzamidina) não apresentaram efeito sobre esta atividade. Esse resultado sugere que a Millinase possui pontes dissulfeto que são importantes pra manutenção da sua conformação nativa. O agente  $\beta$ mercaptoetanol teria sido responsável pelo rompimento das pontes dissulfeto, com isso, a proteína teria sua forma nativa alterada perdendo, portanto, sua atividade proteolítica.

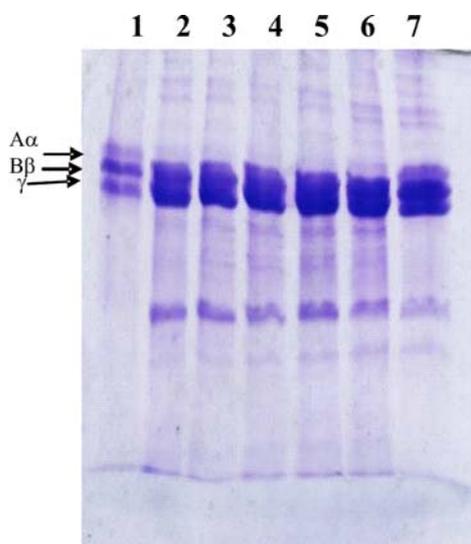


**Figura 5** – Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% em condições desnaturantes dos produtos de hidrólise do fibrinogênio bovino pela ação da Millinase

pré-incubadas com os inibidores.  
**1-** fibrinogênio bovino controle,  
**2-** fibrinogênio bovino incubado com a Millinase por 120 minutos a 37°C,  
**3 a 5-** fibrinogênio incubado com a enzima pré incubada com EDTA 8 mM,  $\beta$  Mercaptoetanol 0,55 mM e Benzamidina 4 mM, respectivamente.

### Efeito da temperatura sobre a atividade fibrinogenolítica

Estudos de estabilidade enzimática mostraram que a Millinase é uma proteína termoestável, visto que, mantém sua atividade proteolítica até uma temperatura de 70°C (figura 6).



**Figura 6** – Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% em condições desnaturantes dos produtos de hidrólise do fibrinogênio bovino pela ação da Millinase pré-incubadas a diferentes temperaturas;

**1-** fibrinogênio bovino controle;  
**2 a 5-** fibrinogênio incubado com a Millinase aquecida por 30, 40, 50, 60, 70 e 80°C durante 15 minutos, respectivamente.

As enzimas termoestáveis já têm sido usadas como ferramenta para a Biologia Molecular (Taq polimerase), como aditivo de detergentes e sabões (proteases e celulasas), no processamento industrial do amido ( $\alpha$ -amilase, glucose isomerase) e na indústria de polpa e papel (xilanase) e surgem como alternativas de interesse em outros bioprocessos, como o de síntese orgânica (lipases, proteases, oxidoredutases), no setor de diagnóstico, no tratamento de resíduos e na produção de ração animal (HAKI e COLOMBATTO, 2003,2004).

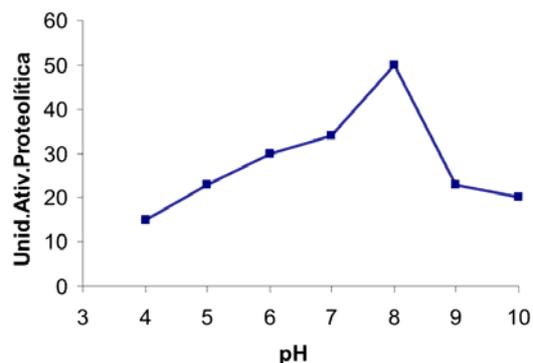
A proteína nativa é mantida por um delicado balanço de forças não covalentes, como pontes de hidrogênio, pareamento de íons, interações hidrofóbicas e força de van der Waals. Com o aumento da temperatura, essas interações são rompidas e a proteína se desdobra (ANFINSEN, 1973). Algumas proteínas recuperam sua conformação ativa após o resfriamento, porém, para a maioria, a desnaturação é irreversível (JAENICKE, 1999).

A  $\beta$ -eliminação de pontes dissulfeto também é fator de desnaturação de proteínas, sendo mais susceptíveis aquelas com alto teor de aminoácidos sulfurados. A

reação de  $\beta$ -eliminação consiste na destruição das pontes S-S em condições alcalinas, produzindo diidroalanina e tiocisteína. A  $\beta$ -eliminação produz tióis livres que podem catalisar permutas de pontes de S-S e desnaturar a proteína (VIEILLE, et al., 2001). Sugerimos que a estabilidade da Millinase se dá pela presença de pontes dissulfeto, importantes para manutenção da sua conformação nativa. Os resultados da inibição da enzima pelo agente redutor  $\beta$ -mercaptoetanol (figura 5) colaboram com essa hipótese. O sequenciamento da enzima mostraria a quantidade de pontes de dissulfeto e se estas estariam localizadas inter ou intracadeias.

#### **Atividade proteolítica sobre a caseína**

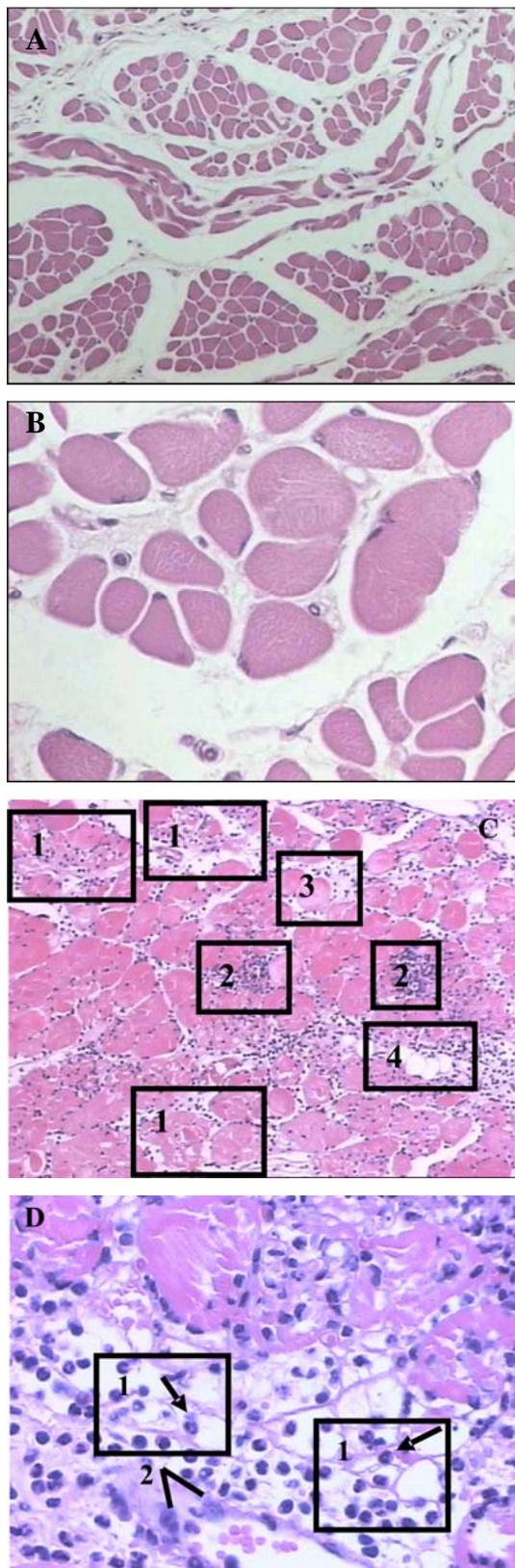
Estudos de estabilidade enzimática mostraram que a Millinase apresenta atividade proteolítica sobre a caseína numa larga faixa de pH (4 a 10). Assim como a Milin, enzima isolada do látex da planta *Euphorbia millii* Des Moulins (SUBHASH et al., 2006), a Millinase também apresentou um pH-ótimo em torno de 8,0. (figura 7).



**Figura 7** – Atividade proteolítica sobre a caseína em diferentes pHs. Uma unidade de atividade caseinolítica corresponde a um acréscimo de 0,001 unidades de absorvância, quando monitorado em 280nm.

#### **Atividade miotóxica**

A Millinase, quando injetada no músculo Gastrocnemius de camundongo, conduziu a uma série de eventos degenerativos drásticos, como a degeneração da hialina, degeneração gordurosa muscular, mionecrose e reação inflamatória que eram evidentes ao microscópio. A alta presença de macrófagos, leucócitos e polimorfosnucleados sugerem que já havia iniciado a fagocitose das células musculares (figura 8).



**Figura 8** – Degeneração das fibras musculares causada pela Millinase após 24 horas de aplicação da enzima. (A) Fibras do músculo esquelético normal ( aumento

de 10x), (B) Fibras do músculo esquelético normal (aumento de 40x), (C) Evidências da ação miotóxica: 1- fibras esqueléticas danificadas, 2- infiltração leucocitária, 3- degeneração hialina, 4- provável efeito provocado por degeneração gordurosa, (D) Reação inflamatória (aumento de 40x)- Mecanismo de defesa e fagocitose de restos celulares: 1- infiltrado leucocitário – polimorfos nucleados (neutrófilo característico com núcleo trilobulado e citoplasma róseo), 2- macrófagos.

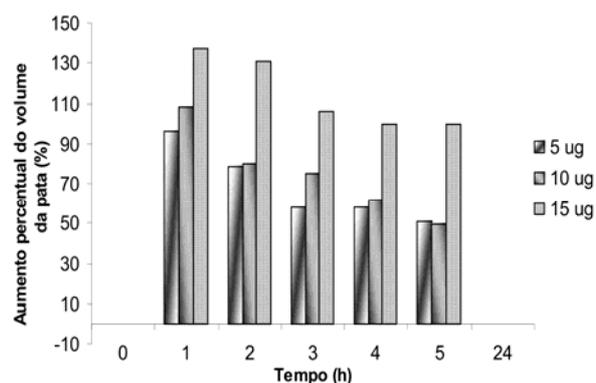
As miotoxinas são componentes quantitativamente importantes dos venenos de *Bothrops*, com massa molecular de aproximadamente 13,5 kDa (CINTRA et.al.1993, MANCUSO et al, 1995). A injeção intramuscular dessas toxinas induzem rapidamente uma série de eventos degenerativos drásticos, iniciados ao nível da membrana plasmática, que culminam na necrose seletiva de músculo esquelético (GUTIERREZ e LOMONTE,1995). As miotoxinas isoladas de várias serpentes do gênero *Bothrops* revelaram que estas interagem com a membrana plasmática por meio de uma região molecular distinta de seu sítio catalítico já conhecido. A região ativa parece ser formada por uma combinação de resíduos de aminoácidos básicos e hidrofóbicos próximo à região C-terminal da proteína, que permite interação eletrostática e penetração da bicamada. Esses eventos parecem levar a uma

desestabilização da membrana e perda da permeabilidade seletiva para íons como o cálcio, mediadores importantes no processo de necrose muscular (GUTIÉRREZ e LOMONTE,1995). Há evidências consideráveis que as toxinas do veneno de serpente danificam as fibras musculares de modo diferente, afetando mais alguns tipos que outros. Estudos recentes de mionecrose sistêmica devido ao envenenamento por *Crotalus durissus terrificus* em humanos mostrou que as fibras musculares tipo I são preferencialmente injuriadas, isto é, alterações degenerativas/necróticas e sinais de regeneração foram mais proeminentes em fibras do tipo I do que do tipo II (AZEVEDO-MARQUES et al., 1996). A ação necrosante da Millinase se mostrou semelhante aquelas de veneno de serpente. Todavia, a literatura não descreve ação miotóxica de proteases isoladas de látex, portanto, não sabemos qual a função dessas miotoxinas na planta e nem o seu mecanismo de ação no tecido muscular. Estudos adicionais são necessários para que possamos elucidar o modo da ação miotóxica da Millinase.

### Atividade edematogênica

A Millinase, quando injetada na região intraplantar de ratos Wistar, foi capaz de induzir a formação de edema.

Nossos resultados mostraram que a resposta máxima para todas as doses (1, 5 e 25ug) foi observada 1 hora após o tratamento com a Millinase, decaindo gradualmente a seguir e desaparecendo por completo em 24 horas (figura 9).

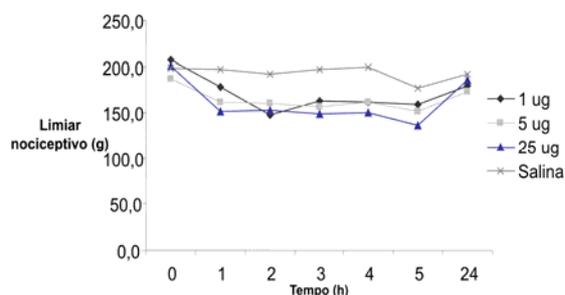


**Figura 9** – Edema causado pela Millinase quando injetada na região intraplantar da pata de ratos Wistar e mensurados com o auxílio de um paquímetro entre 0 e 24 horas.

O edema refere-se a um acúmulo anormal de líquido no espaço intersticial. É constituído de uma solução aquosa de sais e proteínas do plasma e sua composição varia conforme a causa do edema. Não sabemos a causa exata da formação do edema, porém sugerimos que este pode ter sido formado por ação de um mecanismo inflamatório.

### Atividade de Hiperalgometria

A Millinase, quando injetada na região intraplantar de ratos Wistar, foi capaz de aumentar a sensibilidade à dor. Nossos resultados mostraram que a enzima induziu esse aumento em todas as doses testadas (1, 5 e 25ug). No entanto, não houve diferença significativa na hiperalgometria induzida pelas doses da proteína, sendo o efeito hiperalgésico máximo observado na 5<sup>o</sup> hora após a injeção (25ug). Nossos resultados mostraram que, mesmo depois de 24<sup>a</sup> hora da administração, a enzima diminuiu significativamente o limiar nociceptivo (figura 10).



**Figura 10** - Hiperalgometria causada pela Millinase quando injetada na região intraplantar da pata de ratos Wistar e analisados com o auxílio de um analgesímetro entre 0 e 24 horas.

Dor transitória é normalmente observada quando fibras nervosas primárias aferentes do tipo C e A  $\delta$  são

ativadas por estímulos breves de alta intensidade que produzem pouco ou nenhum dano tecidual. Durante o desenvolvimento de uma resposta inflamatória, as fibras nervosas, particularmente as do tipo C, são ativadas por estímulos de baixa intensidade, acarretando dor mais persistente. Neste caso, a sensibilização dos receptores da dor (nociceptores), causando hiperalgometria, é o denominador comum de todos os tipos de dor inflamatória. O fenômeno de hiperalgometria envolve tanto a sensibilização das terminações nervosas nociceptivas periféricas, pela ação de mediadores químicos, quanto à facilitação central (corno dorsal da medula espinhal e tálamo) da transmissão nervosa (LEVINE et al., 1993; DRAY, 1994).

O mecanismo pelo qual diferentes estímulos evocam a atividade das terminações nervosas nociceptivas, é compreendido apenas vagamente. Em muitas condições patológicas, a lesão tecidual representa a causa imediata da dor. Esta lesão resulta na liberação local de diversos mediadores químicos que irão agir sobre as terminações nervosas, ativando-as diretamente, ou exacerbando sua sensibilidade para outras formas de estímulo (hiperalgometria). É importante salientar que, além dos receptores polimodais C, um grupo adicional de

nociceptores, denominados receptores “silencioso” ou “adormecidos” (silent nociceptors/ sleeping nociceptors), são ativados durante processos inflamatórios, contribuindo para a hiperalgesia. Estas fibras aferentes são encontradas na pele, articulações e em órgãos viscerais (SCHAIBLE e SCHMIDT, 1988; SCHEMELZ et al., 1994). Não existem relatos na literatura de trabalhos com proteases de plantas correlacionando-as com o aparecimento de dor. Por esse motivo, serão necessários estudos mais detalhados para que possamos compreender melhor o mecanismo de ação da dor provocada por essa enzima.

#### 4. CONCLUSÃO

Este trabalho foi responsável pelo isolamento de uma proteína proveniente do látex da planta *Euphorbia millii* Des Moulins denominada Millinase. Esta é uma protease de cadeia simples com massa molecular aparente de 30.000 em condições não redutoras. Além disso, é uma protease ativa sobre o fibrinogênio bovino e caseína apresentando uma atividade máxima em torno de pH 8,0 e temperaturas até 70°C. Quando injetada em camundongos causa degeneração das fibras musculares, além de aumentar a sensibilidade à dor e causar edema.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANFINSEN, C. B. **Scienc**, v.223, p.181, 1973.

AZEVEDO-MARQUES, M.M.; CUPO, P.; HERING, S.E. Systemic myonecrosis due to poisoning by *Crotalus durissus terrificus* in humans. **Toxicon** (abstract), v.34, p.12, 1996.

BARRET, A.J.; BUTTLE, D.J. Names and numbers of papaya proteinases. **Biochem**, v. 228, p. 527, 1985.

BOLLER, T. Roles of proteolytic enzymes in interaction of plant and other organisms. **Plant Proteolytic Enzymes**, v.1, p. 67–96, 1986.

BUTTERY, B. R.; BOATMAN, S. G. **Déficits Hídricos e Fluxo de Látex**. Campinas: Fundação Cargill, p. 223, 1985.

CINTRA, A.C.O.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J.R. Bothropstoxin-1: amino acid sequence and function. **J. Prot. Chem**, v.12, p.57-64, 1993.

COLOMBATTO, D.; MOULD, F. L.; BHAT, M. K.; PHIPPS, R. H.; OWEN, E.

**Anim. Feed Sci. Technol**, v.129, p.11, 2004.

CORRÊA, M.P. **Dicionário de Plantas úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Rio de Janeiro. Instituto Brasileiro de desenvolvimento Florestal, v. 6, 1984.

DISTEFANO, S.; PALMA, J. M.; GOMEZ, M.; del RIO, L. A. Characterization of endoproteases from plant peroxisomes. **BIOCHEM. J**, v. 327, p. 399-405, 1997.

DOTY, P.; GEIDUSCHEC, E.P. In: **The proteins**. I-A. (NEURATH, H.; BAILEY, K. Eds), 1953.

DRAY, A. Tating the inflammatory soup: role of peripheral neurones. **Pain Rev**, v. 1, p.153-171, 1994.

DUBEY, V.K. et al. Procerain, a stable cysteine protease from the latex of *Calotropis*. **Phytochemistry**, v. 62, p.1057-1071, 2002.

DUBOIS, T.; JACQUET, A.; SCHNEK, A.G.; LOOZE Y. The thiol proteinases from the latex of carica papaya. **Biol. Chem. Hoppe Seyler**, v. 369, p. 733-740, 1988.

EDGAR, W.; PRENTICE, C.R.M. The proteolytic action of ancrod on human

fibrinogen and its polypeptide chains. **Thrombosis Research**, v.2, p.85, 1973.

ESAU, K. **Plant Anatomy**, 2d ed. John Wiley, New York, p.525, 1965.

EVANS, F. J.; EDWARDS, M. C. Activity correlations in the phorbol ester series. **The Euphorbiales chemistry, taxonomy & economic botany**. Linnean Society, Academic Press, London, 1987.

FREITAS, J. C. B. R.; PRESGRAVE, O. A. F.; FINGOLA, F. F.; MENEZEX, M. A. C.; VASCONCELLOS, M. C.; SCHALL, V. T. & PAUMGARTTEN, F. J. R. Toxicological study of molluscidal látex of *Euphorbia splendens*: irritant action on skin and eye. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 87-88, 1991.

GARCIACARRENO, F. L.; Del TORO, A. N. Characterization of fish acid proteases by substrate-gel electrophoresis. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v.121, p.369-377, 1998.

GIDROL, X.; CHRESTIN, H.L. et al. A lectin-like protein from *Hebea brasiliensis* (rubber-tree) is involved in the coagulation

of latex, **J. Biol. Chem**, v. 269, p. 9278–9283, 1994.

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms.

**Toxicon**, v.33, p.1405-1424, 1995.

HAKI, G. D.; RAKSHIT, S. K. **Bioresour. Technol**, v.17, p.89, 2003.

ITZHAKI, R.F.; GILL, D.M. A microbiuret method for estimating proteins. **Analitical Biochemistry**, v.9, p.401-410, 1964.

JAENICKE, R. **Prog. Biophys. Mol. Biol**, v.155, p.71, 1999.

LEVINE, J.D.; FIELD, H.L.; BASBAUM, A.I. Peptides and the primary afferent nociceptor. **J.Neurosci**, v.13, p.2273-2286, 1993.

LYNN, K.R.; CLEVETTE-RADFORD, N.A. Proteases of euphorbiaceae. **Phytochemistry**, v. 27, p.45–50, 1987.

MANCUSO, L.C.; CORREA, M.M.; VIEIRA, C.A.; CUNHA, O.A.B.; LACHAT, J.J.; SELISTRE DE ARAÚJO, H.S.; OWNBY, C.L.; GIGLIO, J.R. Fractionation of *Bothrops pirajai* snake venom: isolation and characterization of piranotoxin-I, a new myotoxic protein. **Toxicon**, v.33, n.5, p. 615-626, 1995.

MITCHEL, R.E.J.; CHAIKEN, I.M.; SMITH, E.L. The complete amino acid sequence of papain. **J. Biol. Chem**, v. 245, p. 3485-3492, 1970.

MURRAY, R.K.; GRANNER, D.K.; MAYES, P.A. **Harper's Biochemistry**, 25 ed, Prentice-Hall Internacional, London, 2000.

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

PALMA, J. M.; et al. Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. **Plant Physiol. Bioche**, v. 40, p. 521-530, 2002.

PILE, E.; SANTOS, J.A.A.; SÃO LUIZ, J.B.; VASCONCELLOS, M.C. Fasciiose bovina: controle com látex da "coroa-de-Cristo" (*Euphorbia splendens* var. *hislopii*). Departamento de Biologia IOC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 1996.

RAJESHA,R.;NATARAJUA,A.;GOWDA A,C.D.R.;FREYB,B.M.;FREYB,F.J.;VISH WANATHA,B.S. Purification and characterization of a 34-kDa, heat stable

glycoprotein from *Synadenium grantii* latex: action on human fibrinogen and fibrin clot. **Biochimie**, v. 88, p.1313–1322, 2006.

RIBAS, J.L.C.; VENDRAMIN, G.; NAVARRO, D. Caracterização de extrato bruto de *Euphorbia milli* (coroa-de-cristo). **Nature**, v. 3256, p. 125-139, 2002.

RITONJA, A.; BUTLER, D.J.; RAWLINGS, N. D.; TURK, V.; BARRET, A. J. Papaya proteinase IV amino acid sequence. **Fesb Letters**, v. 258, p.109-112, 1989.

SAUZA, C.A.; De-CARVALHO, R.R.; KURIYAMA, S.N.; ARAUJO, I.B.; RODRIGUES, R.P.; VOLLMER, R.S.; ALVES, E.N.; PAUMGARTTEN, F.J. Study of the embryofeto-toxicity of crown of thorns (*Euphorbia milii*) latex, a natural molluscicide. **Braz. J. Med. Biol. Res**, v. 30, p.1325–1332, 1997.

SCHAIBLE, H.G.; SCHMIDT, R.F. Excitation and sensitization of fine articular afferents from cat's knee joint by prostaglandins E2. **J.Physiology**, v. 403, p.91-104, 1988.

SCHEMELZ, M.; SCHMIDT, R.; RINGKAMP, M.; HANDWERKER, H.O.; TOREBJORK, H.E. Sensitization of

intensive branches of C nociceptors in human skin. **J.Physiology**, v. 480, p.389-394, 1994.

SOARES, A.M.; ANDRILAO-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.

SUBHASH, C.; YADAV, M. P.; JAGANNADHAM, M.V. Highly Stable Glycosylated Serine Protease From The Medicinal Plant *Euphorbia milii*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 1414–1426, 2006.

VAN DER HOORN, R.A.; JONES, J.DG. The plant proteolytic machinery and its role in defence. **Plant Biology**, v. 7, p.400-407, 2004.

VAN DIE, J. A. Comparative study of the particle fractions from Apocynaceae latices. **Annales Bogorienses**, v. 2, p.1-124, 1955.

VIEILLE, C.; ZEIKUS, G. J. **Microb. Mol. Biol. Rev**, v. 1, p.65, 2001.

