

CAPÍTULO 3

Purificação e caracterização de um factor de citotoxicidade

Como já acima foi referido, da análise dos resultados, constatou-se que a produção dos factores de citotoxicidade é dependente dos meios de cultura utilizados. A cinética de produção temporal e a sua estabilidade, são diferentes quando se comparam as culturas em MTH, TSB e LB. Relembra-se, a propósito que em XnMTH, a cinética de produção da actividade citolítica/citotóxica revelou-se inteiramente sobreponível com a actividade hemolítica contra hemácias de carneiro. Por esses motivos, consideraram-se as culturas bacterianas somente nos dois primeiros meios e, particularmente, as executadas em XnTSB foram conduzidas de modo a que se pudessem recuperar as actividades características existentes nos filtrados dos sobrenadantes C1.

Perante os resultados, que têm vindo a ser expostos, a decisão científica e estratégica foi tomada no sentido de se pesquisarem as melhores condições que permitissem a purificação e caracterização da molécula responsável pelas actividades citolítica/citotóxica contra hemócitos e hemolítica contra hemácias de carneiro, ou seja, a actividade C1.

Desde sempre que se tomaram todas as precauções possíveis no desenvolvimento de testemunhas que pudessem controlar com eficácia os diferentes ensaios em curso no presente trabalho. As diferentes testemunhas nas condições em que foram utilizadas nos diversos ensaios enzimáticos, citolíticos/citotóxicos e hemolíticos revelaram-se perfeitamente ajustadas aos fins para que foram concebidas. Com efeito, os meios MTH, TSB e LB, isentos de cultura bacteriana, revelaram não possuírem actividades hemolítica, citotóxica,

proteásica, lipásica ou lecitinásica, contudo, foi possível detectar níveis positivos de endotoxinas em todos os meios. Estes níveis aumentam ligeiramente ao longo do tempo de incubação do complexo simbiote e da bactéria.

O uso de soluções tampão com a molaridade e/ou osmolaridade controlada permitiu obter testemunhas negativas em todos os bioensaios. Com efeito, não se observaram anomalias relacionadas com a mortalidade hemocitária ou hemólise quando se fizeram os ensaios com soluções isotónicas com osmolaridade compreendida entre 290 e 320 mOsmol*Kg⁻¹ H₂O. Constatou-se que os tampões salinos com molaridade compreendida entre 100-mM e 200 mM apresentavam a tonicidade requerida, comportando-se como soluções fisiológicas. Deste modo, todas as soluções com baixa concentração molar (<100 mM) foram extemporaneamente ajustadas para o patamar médio de 150 mM com adição de NaCl em solução aquosa a 10 M ou PBS a 10 M.

O teste para a detecção de endotoxinas permitiu verificar também que, embora com níveis bastante baixos, existem sempre vestígios de LPS em todas as soluções tampão testadas, apesar dos cuidados colocados na preparação das mesmas. Tal facto, porém, não é sinónimo da existência de actividades biológicas e ou enzimáticas.

Os ensaios foram sempre controlados por várias testemunhas e, em particular, nos ensaios de citotoxicidade sobre hemócitos de insectos, nunca foram tolerados mais do que 2,0% de mortalidade inicial nas testemunhas. Na esmagadora maioria dos casos esta mortalidade é nula ou vestigial. De igual modo, as testemunhas produziram sempre zero unidades de actividade hemolítica atestando a qualidade da manipulação das suspensões de hemácias e de todas as soluções usadas.

No entanto, em algumas circunstâncias, obtiveram-se níveis superiores de mortalidade hemocitária inicial mas estes acontecimentos foram analisados de imediato. Em alguns casos constatou-se que tinham existido pequenos erros de manipulação na recolha das células noutros verificou-se que tinham existido problemas com o estado sanitário e fisiológico no lote de lagartas. Em

consequência, os resultados considerados anómalos, foram sistematicamente descartados e, de seguida, corrigidos pela imediata repetição dos bioensaios com as devidas alterações metodológicas.

Como regra geral, os ensaios de citotoxicidade e de descolamento de hemócitos, são feitos com células provenientes das três espécies de insectos. No que concerne à actividade hemolítica, todas as soluções que apresentam os efeitos anteriores são, pelo menos, testadas sobre hemácias de carneiro e de coelho.

3.1. Análise cromatográfica dos filtrados dos sobrenadantes dos meios de cultura de *X. nematophila*

As Fig. 20 mostra os fluxogramas da separação cromatográfica preliminar dos factores biológicos C1 e enzimáticos (protease) detectados nos sobrenadantes de cultura de *X. nematophila* (XnMTH e XnTSB) e os Cromatogramas 5 e 6 com os respectivos perfis das cromatografias de troca aniónica (Mono Q 5/5).

De acordo com a metodologia seguida, as actividades biológicas e enzimáticas, são pesquisadas em todas as fracções das cromatografias. As fracções com actividade hemolítica contra hemácias de carneiro são, no mínimo, também testadas quanto à actividade citotóxica sobre hemócitos de insectos e hemolítica contra hemácias de coelho. Nestes ensaios existe um resultado constante que é a ocorrência de actividades positivas do tipo citolítica/citotóxica contra hemócitos e hemolítica contra hemácias de carneiro e negativa contra hemácias de coelho, ou seja, actividades veiculadas pelos filtrados dos sobrenadantes do tipo C1. A Tabela XIX mostra a sensibilidade de diferentes tipos de hemácias aos factores citotóxicos encontrados nas fracções cromatográficas do sobrenadante de cultura XnTSB.

Apesar de, nos filtrados dos sobrenadantes de cultura da bactéria, terem sido detectadas as actividades lipásica, lecitínica e, principalmente, proteásica

a análise elaborada sobre as fracções com a actividade citotóxica do tipo C1, revelaram que estas fracções não possuíam quaisquer outras actividades enzimáticas. De resto, a partir do primeiro nível de purificação cromatográfica obteve-se uma separação nítida dos factores citotóxicos/hemolíticos do restante universo de actividades enzimáticas. Com efeito, a análise dos Cromatogramas 3 e 4 revelou que a actividade citotóxica do tipo C1 elui no gradiente a 140-180 mM de NaCl encontrando-se bem separada, por exemplo, da actividade proteásica.

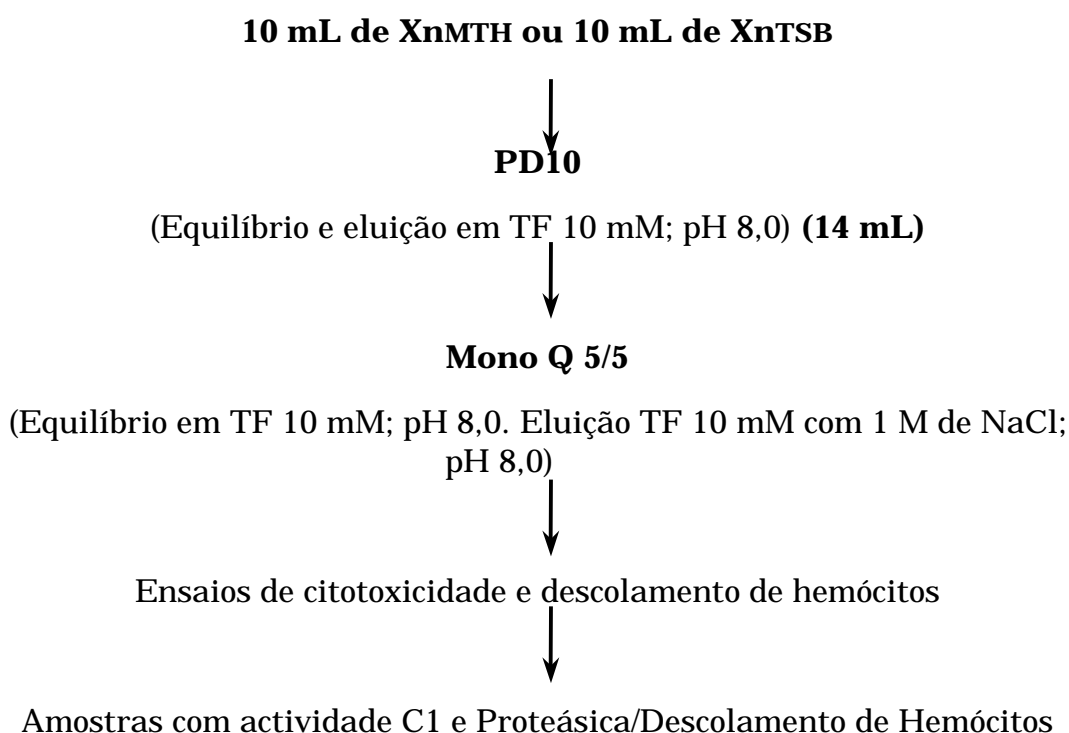
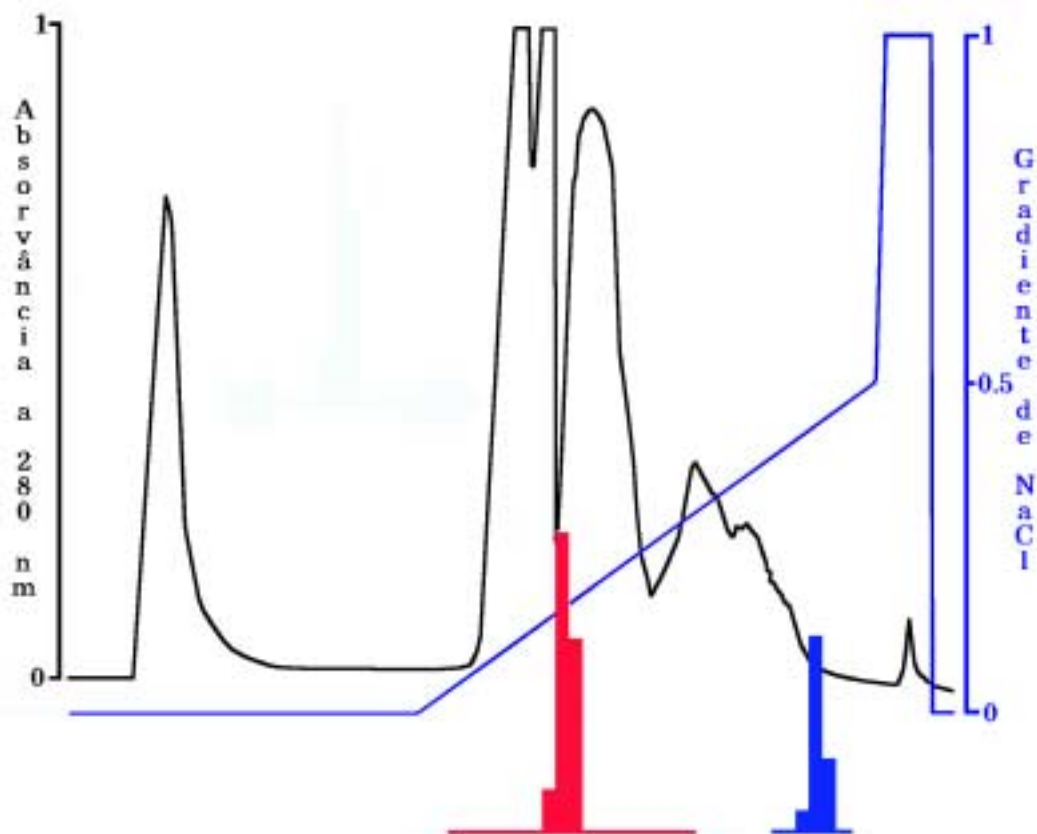


Fig. 20 – Fluxograma da separação cromatográfica das actividades do tipo C1 e da proteásica existentes nos sobrenadantes de cultura de *X. nematophila* (XnMTH e XnTSB). As fracções com actividades biológicas e enzimáticas, depois de cromatograficamente separadas uma da outra, são individualmente congeladas em azoto líquido e liofilizadas.

De facto, as cromatografias de troca aniónica dos sobrenadantes de cultura XnMTH e XnTSB (Cromatogramas 3 e 4) também originaram fracções com actividade proteásica e de descolamento de hemócitos de insectos. Estas fracções obtiveram-se na eluição do gradiente salino a 440-460 mM de NaCl, possuem uma actividade proteásica na ordem de 150 ± 25 U (unidades equivalentes da

actividade proteásica da tripsina) e apresentam um efeito de descolamento de plasmatócitos na ordem de 2-15%. As observações revelam alguns granulócitos ligeiramente arredondados mas, a generalidade, apresenta-se com a sua estrutura normal. No entanto, uma parte dos plasmatócitos ($\pm 20\%$) encontram-se arredondados e com os pseudópodes retraídos. Aquelas amostras não são citotóxicas porque as células não coram pelo azul Trypan e os ensaios de detecção da actividade hemolítica, para o conjunto de fracções proteásicas, revelaram-se sistematicamente negativos.

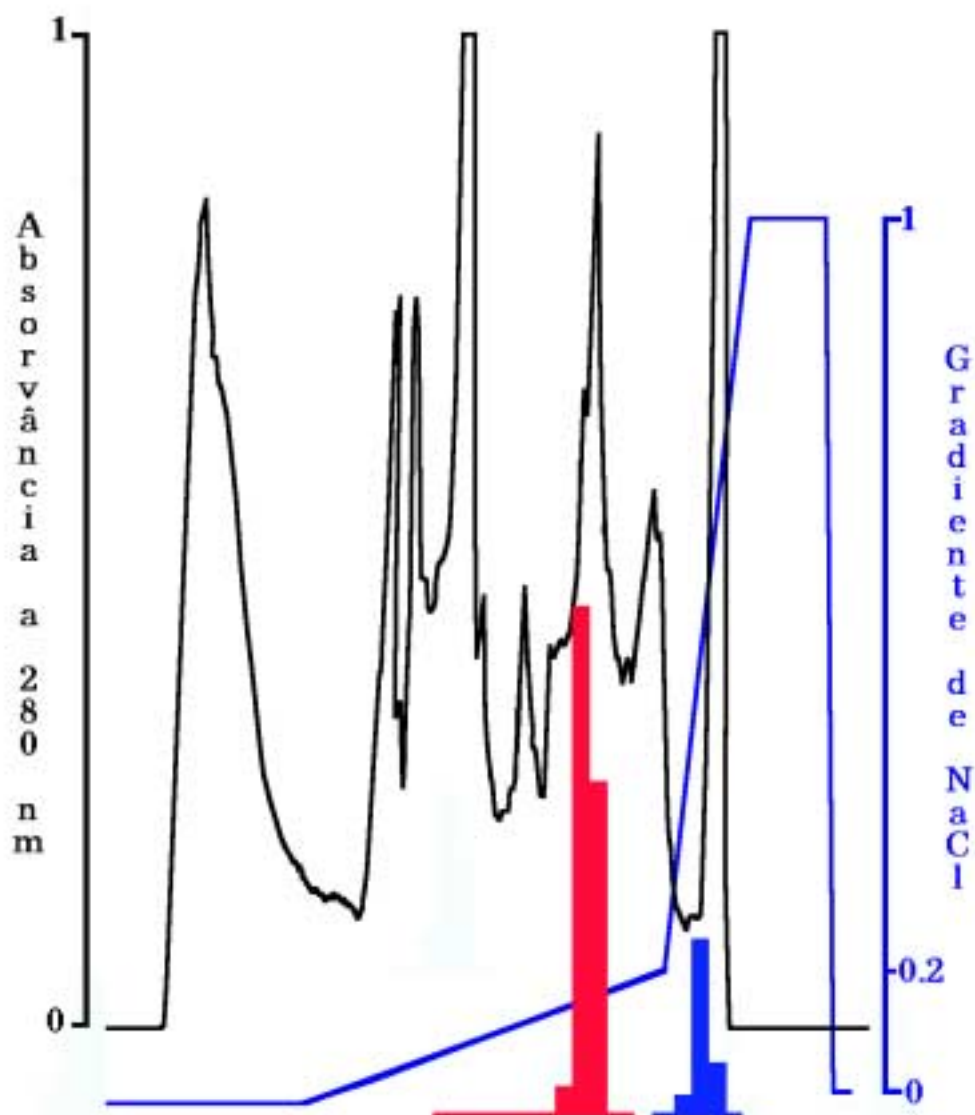


Cromatograma 3 – Perfil da cromatografia de troca aniónica Mono Q 5/5 de 10 mL de meio XnMTH. As barras a vermelho e a azul representam, respectivamente, a actividade citotóxica do tipo C1 e a actividade proteásica e de descolamento de hemócitos. A actividade C1 representa 100% de mortalidade hemocitária e a de descolamento 15%.

A Tabela XX apresenta os resultados dos ensaios de mortalidade diferencial de hemócitos em função da diluição das fracções cromatográficas. A sua análise torna evidente que foram os granulócitos as células mais sensíveis à actividade do tipo C1. De facto, verificou-se que a diluição 1/16 induziu uma percentagem de mortalidade dos granulócitos na ordem de 4%, enquanto que a dos plasmatócitos foi nula.

Quaisquer que sejam os insectos estudados, as fracções com actividade do tipo C1 induzem mortalidade diferencial de hemócitos em que as células mais sensíveis são os granulócitos.

Contudo, verificou-se experimentalmente não ser possível a purificação do factor de citotoxicidade a partir de sobrenadantes de cultura bacteriana de 10 mL de volume. Na verdade, as várias tentativas de continuar um processo de purificação revelaram-se infrutíferas por perda da actividade do tipo C1. Além disto, apesar dos elevados níveis de actividade inicial presentes, o XnMTH revelou-se impróprio para os fins em vista por várias ordens de razão prática: i) é um meio dispendioso em tempo de preparação dada a quantidade de hemolinfa que é necessário recolher e, por conseguinte, limitante ao nível do volume do meio de cultura; ii) é um meio muito heterogéneo e rico em proteínas e, finalmente, iii) foram encontrados alguns problemas com a eficácia das colunas de troca aniónica dado que colmatam com facilidade em presença deste meio.



Cromatograma 4 – Perfil da cromatografia de troca aniônica Mono Q 5/5 de 10 mL de meio XnMTH. As barras a vermelho e a azul representam, respectivamente, a actividade citotóxica do tipo C1 e a actividade proteásica e de descolamento de hemócitos. A actividade C1 representa 100% de mortalidade hemocitária e a de descolamento 10%.

Tabela XIX

Actividade hemolítica, sobre vários tipos de hemácias, das fracções das cromatografias Mono Q 5/5 dos sobrenadantes da cultura XnTSB. As fracções testadas possuem actividade citolítica/citotóxica contra hemócitos de insectos

Hemácias						
	Homem²	Coelho	Porco	Vaca	Cabra	Carneiro
Hemólise (UAH)¹	0	0	2,0	1,0	1,0	1,0

1 Unidades de actividade hemolítica (UAH)

2 Testados todos os grupos sanguíneos humanos

Tabela XX

Sensibilidade de dois tipos diferentes de hemócitos de *M. unipuncta* e *G. mellonella* às fracções com actividade do tipo C1 das cromatografias Mono Q 5/5 de XnMTH

Diluições em PBS¹	% de Mortalidade diferencial de hemócitos²	
	Granulócitos	Plasmatócitos
1/2	100^a / 100^b	100 / 100
1/4	60,4±6,2 / 66,2±3,1	13,4±4,5 / 12,0±5,1
1/8	27,0±4,8 / 26,2±3,3	2,5±1,0 / 1,8±1,1
1/16	4,0±1,3 / 5,2±2,1	<2
1/32	<2	<2

1 Diluições em PBS das fracções cromatográficas com actividade do tipo C1. Cromatografias Mono Q 5/5 dos sobrenadantes de cultura de XnMTH

2 Citotoxicidade expressa em percentagem de mortalidade diferencial de hemócitos de a) *M. unipuncta* e b) *G. mellonella*. (Média±desvio padrão; n=10)

Em conclusão, a alternativa lógica encontrada consistiu na escolha de um único meio de cultura bacteriana que passou a ser o TSB. Os filtrados dos sobrenadantes de XnTSB sempre mostraram possuir uma apreciável actividade

do tipo C1 sem os inconvenientes descritos e, para obviar aos problemas do eventual baixo rendimento da purificação cromatográfica, o volume de partida foi aumentado em conformidade com os resultados.

3.2. Purificação do factor responsável pela actividade do tipo C1

Efectuaram-se numerosas tentativas de purificação do factor C1 para as quais se seguiram outros tantos protocolos de purificação. De facto, utilizaram-se todas as metodologias clássicas de separação e purificação de proteínas nas mais variadas combinações sequenciais. Com efeito, foram testadas as cromatografias de troca iónica, filtração em gel, interacção hidrófoba e fase reversa e foram utilizadas as mais diversas colunas e suportes para cromatografia existentes no mercado.

A metodologia que melhores resultados demonstrou e que permitiu a purificação do factor C1 foi a representada no fluxograma da Fig. 21, e, em resumo, constou de um volume de partida de seis litros de meio TSB onde as bactérias incubaram até se atingirem os níveis de citotoxicidade com as características dos sobrenadantes do tipo C1. Seguidamente, os sobrenadantes foram sujeitos a uma precipitação de proteínas no patamar de 50%-70% com sulfato de amónio. As etapas seguintes constaram de uma sequência de duas cromatografias de troca aniónica (Mono Q 10/10 e Mono Q 5/5) e de uma cromatografia de filtração em gel (TSK G3000). A análise das fracções activas e a avaliação do seu grau de pureza foi efectuada por intermédio de uma cromatografia de fase reversa (NovaPak® C18), e, finalmente, efectuou-se em MALDI-TOF a análise directa da molécula ou após a sua digestão tripsínica.

Decorrente de análises preliminares, a Tabela XXI mostra os resultados da precipitação seriada em sulfato de amónio e a recuperação da actividade do tipo C1 nos precipitados e sobrenadantes após este tratamento. É evidente que o precipitado de a 50% não possui esta actividade ou ela era inferior a 5% de

mortalidade hemocitária enquanto que o sobrenadante respectivo contém citotoxicidade e hemólise total. Por seu lado, a precipitação a 70% de AmoSO_4 mostra que o precipitado contém a totalidade das actividades pesquisadas. Em consequência, o protocolo de purificação, resumido no fluxograma da Fig. 21, revela que a primeira acção bioquímica, sobre os sobrenadantes de cultura, é a da precipitação a 50% de AmoSO_4 , reprecipitação do sobrenadante a 70% com a recuperação do precipitado final. Este procedimento descarta uma quantidade apreciável de proteínas constituindo em si mesma uma etapa de purificação.

Tabela XXI

Recuperação e quantificação da actividade C1 em função da percentagem de sulfato de amónio usada na precipitação de proteínas dos sobrenadantes da cultura XnTSB

% de Sulfato de amónio		% de Mortalidade total de hemócitos²	Hemólise (UAH)³
30	Precipitado	<2	0
	Sobrenadante	100	4
40	Precipitado	<2	0
	Sobrenadante	100	8
50	Precipitado	<5	0
	Sobrenadante	100	8
60	Precipitado	100	4
	Sobrenadante	100	3
70	Precipitado	100	8
	Sobrenadante	<5	0
80	Precipitado	100	8
	Sobrenadante	<2	0
Testemunha⁴	Precipitado	<2	0
	Sobrenadante	<2	0

1 Percentagem de sulfato de amónio directamente dissolvido nos sobrenadantes das culturas XnTSB (p/v)

2 Citotoxicidade expressa em percentagem de mortalidade total de hemócitos de *G. mellonella* e *S. littoralis* (n=3)

3 Unidades de actividade hemolítica contra hemácias de carneiro

4 Meio TSB isento de incubação bacteriana e precipitado a 80% de AmoSO_4 (p/v)

O precipitado, redissolvido e dialisado em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 8,0, foi cromatografado em coluna preparativa de troca aniónica Mono Q 10/10. O Cromatograma 5 representa o perfil deste tipo de cromatografias e é evidente a obtenção de fracções com duas actividades citotóxicas contra hemócitos de insectos que estão sobrepostas com duas actividades hemolíticas contra hemácias de carneiro mas que são negativas contra hemácias de coelho. As fracções que contêm estas actividades foram reunidas em dois volumes distintos, (MQ_{10/10} C1 I e MQ_{10/10} C1 II), congeladas em azoto líquido e liofilizadas.

As fracções com actividade proteásica e descolamento de hemócitos (MQ_{10/10} Prot./Desc.) estavam bem separadas daquelas duas últimas e foram, também, reunidas num só volume, congeladas e liofilizadas. No entanto, no presente trabalho, não serão objecto de mais nenhuma manipulação ou análise.

As fracções com a primeira e a segunda actividade citotóxica/hemolítica, respectivamente, C1 I MQ_{10/10} e C1 II MQ_{10/10}, foram cromatografadas separadamente em coluna de troca aniónica Mono Q 5/5. Da avaliação e quantificação das actividades pesquisadas resultou a obtenção de dois novos conjuntos de fracções positivas (C1 I MQ_{5/5} e C1 II MQ_{5/5}). O Cromatograma 6 representa o perfil da cromatografia Mono Q 5/5 da primeira amostra (=C1 I MQ_{10/10}). De referir a total ausência de fracções com actividade proteásica e descolamento de hemócitos no conjunto das fracções neste tipo de cromatografias.

Por razões de tempo e de estratégia resolvemos não prosseguir a análise do segundo pico activo da cromatografia Mono Q 10/10. Com efeito ainda se efectuou a cromatografia Mono Q 5/5 destas amostras conseguindo-se recuperar uma actividade apreciável. No entanto, as fracções positivas foram adicionadas, liofilizadas e encontram-se em azoto líquido a aguardar oportunidade para se continuar a sua análise.

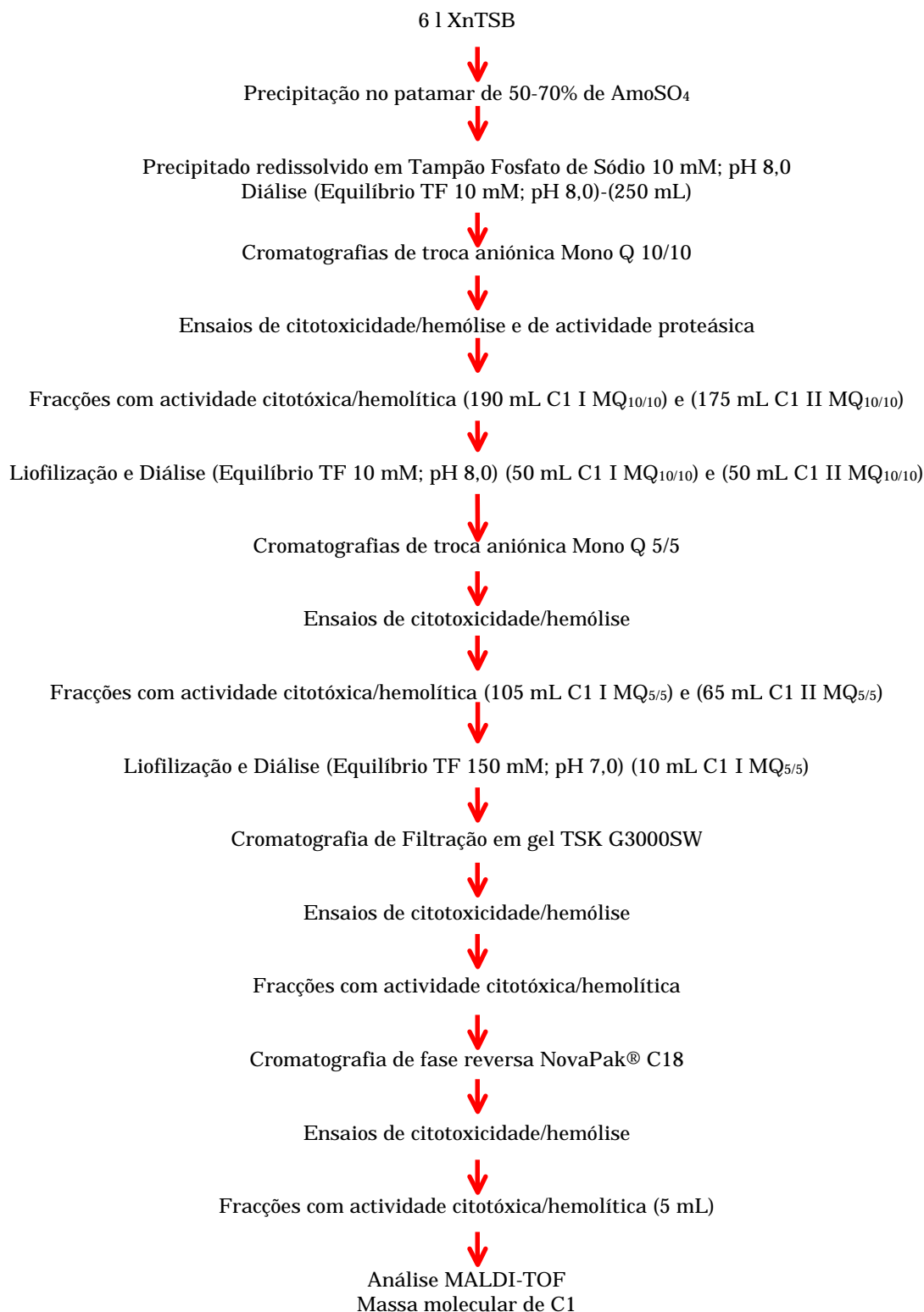
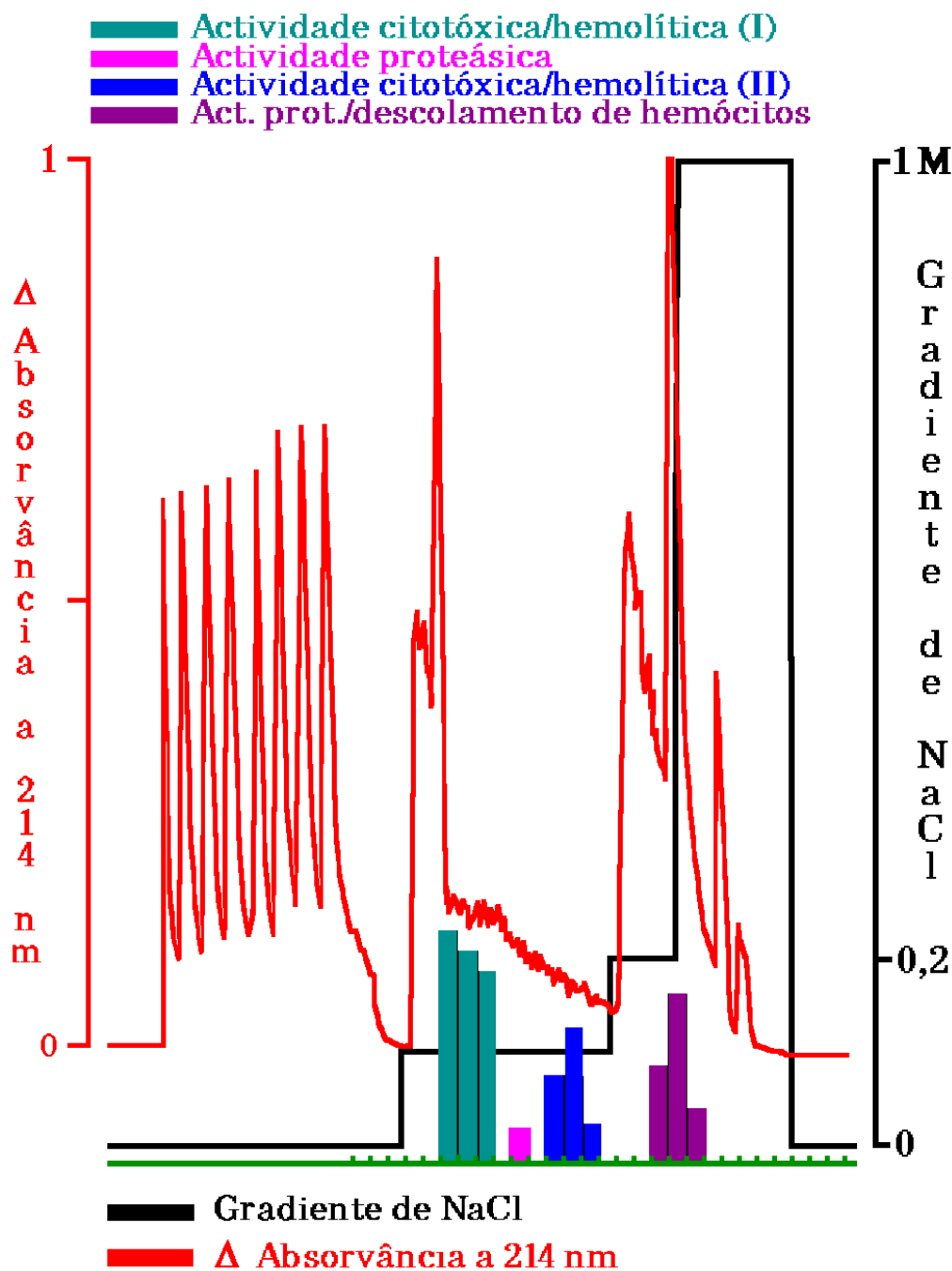
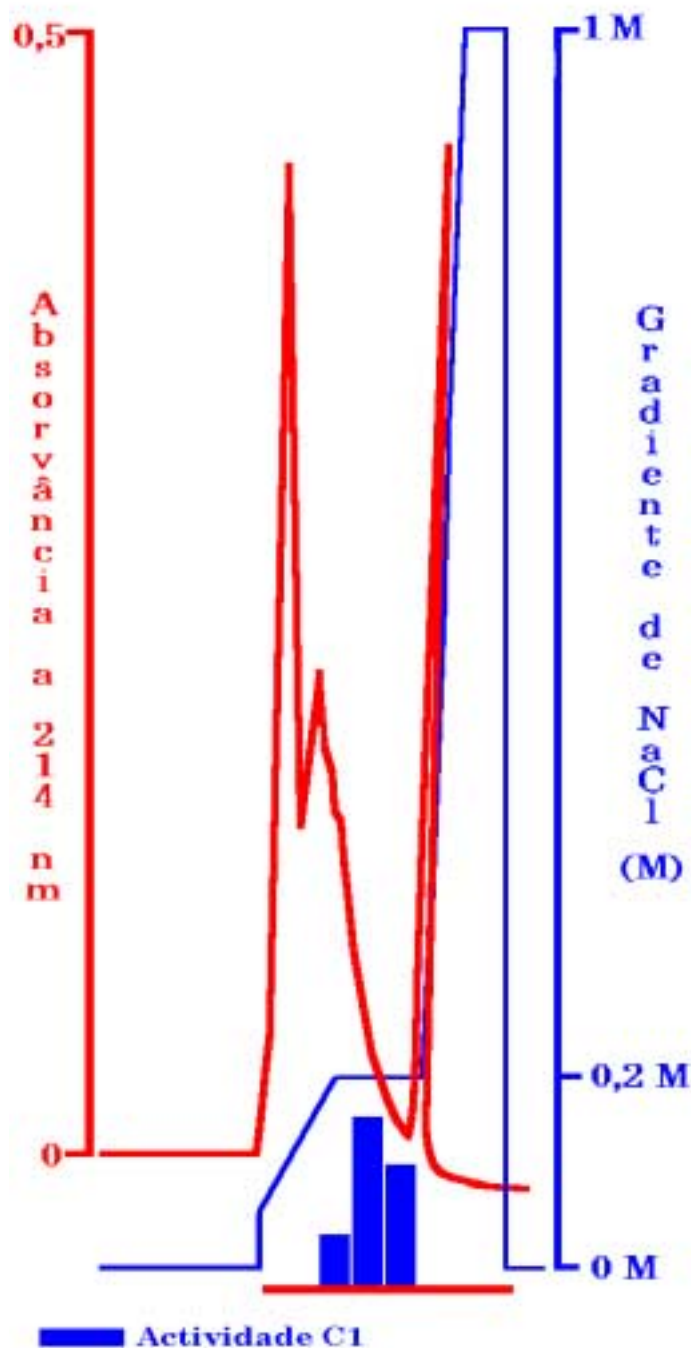


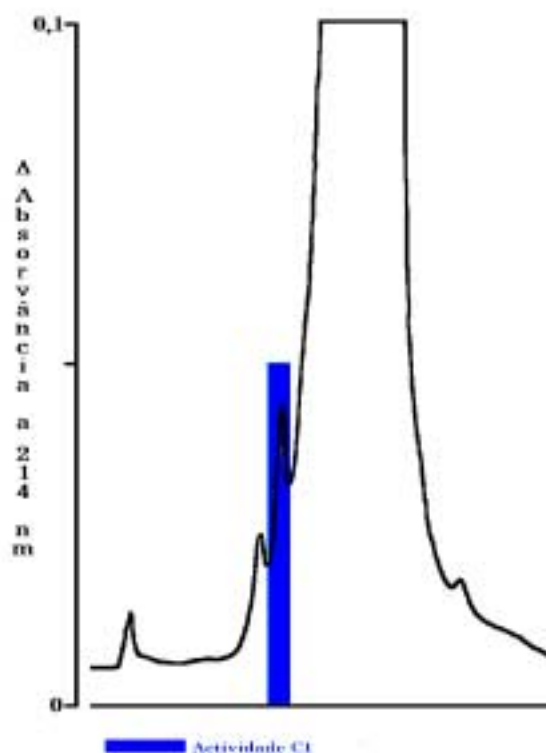
Fig. 21 – Fluxograma da purificação do factor C1 a partir de filtrados dos sobrenadantes de cultura de XnTSB.



Cromatografia 5 – Perfil da cromatografia de troca aniônica Mono Q 10/10 de 40 mL do meio XnTSB precipitado a 50-70% de AmoSO_4 . De notar, a obtenção de fracções com duas actividades citotóxicas contra hemócitos de insectos que estão sobrepostas com duas actividades hemolíticas contra hemácias de carneiro mas que são negativas contra hemácias de coelho, (**MQ_{10/10} C1 I** e **MQ_{10/10} C1 II**). Apesar de ter sido detectada a actividade proteásica em dois conjuntos de fracções só num é que se observou a actividade de descolamento de hemócitos (**MQ_{10/10} Prot./Desc.**).



Cromatograma 6 – Perfil da cromatografia Mono Q 5/5 de 10 mL do conjunto das fracções com actividade C1 obtidas na cromatografia Mono Q 10/10 com a designação C1 I MQ_{10/10}. As fracções com actividade C1, foram denominadas C1 I Mono Q 5/5. O conjunto destas fracções depois de concentrado (liofilizado, dialisado e ressuspensão) foi submetido a análise por cromatografia de separação por filtração em gel.



Cromatograma 7 – Perfil da cromatografia de filtração em gel de 100 μ L da fracção C1 I MQ_{5/5} executada com coluna TSK G3000.

A continuação da análise cromatográfica prosseguiu com o primeiro conjunto de fracções, ou seja, C1 I MQ_{5/5}, que foi injectado numa coluna de filtração em gel TSK G3000 e a eluição da fracção activa deu-se zona correspondente ao peso molecular de \pm 8-10 kDa (Cromatograma 7). A análise subsequente consistiu numa cromatografia de fase reversa NovaPak® C18 tendo a fracção activa eluído num único pico a 61% do gradiente de ACN, (Cromatograma 8 e 10). Este facto, indicia a característica altamente hidrófoba da molécula responsável pela actividade biológica.

Finalmente, a molécula responsável pela actividade citotóxica provocada pelo factor C1 será, a partir deste momento, denominada com o nome de alfa-Xenorhabdolisina (α -Xlis) e o rendimento e actividade específica do seu processo de purificação está expresso na Tabela XXII.

Tabela XXIITabela de rendimento e de actividade específica da purificação da α -Xlis

	Volume (mL)	Actividade 100 μ L	Actividade Total	Rendiment o
XnTSB	6000 mL	4,6	276000	-
AmoSO4	250 mL	109	272500	98,7%
Mono Q 10/10	190 mL	96	182400	66,0%
Mono Q 5/5	105 mL	90	94500	34,2%
TSK 3000	10 mL	88	88000	3,1%
C18	5 mL	78	3900	1,4%

3.3. Características bioquímicas e fisiológicas da α -Xenorhabdolisina

As fracções correspondentes aos picos com actividade α -Xlis das cromatografias de filtração em gel foram cromatografadas em fase reversa em coluna C-18 (Cromatogramas 8 e 9). O varrimento espectral do único pico encontrado com a actividade biológica (Fig. 22) apresentou absorção nos comprimentos de onda de 280 nm e 214-220 nm, característicos das proteínas. Com efeito, a análise do citado pico mostra que a absorção é mais importante a 214-220 nm do que a 280 nm podendo significar a existência de uma molécula proteica com poucos amino ácidos aromáticos prevalecendo a detecção molecular no comprimento de onda característico da ligação peptídica.

Seguidamente, efectuou-se a análise da molécula em MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight) do pico α -Xlis obtido na cromatografia C18. Esta análise da molécula foi directa ou após digestão tripsínica. Do ensaio da análise directa resultou a detecção de uma proteína com o peso molecular igual a 10789,14 Da, (Fig. 23).

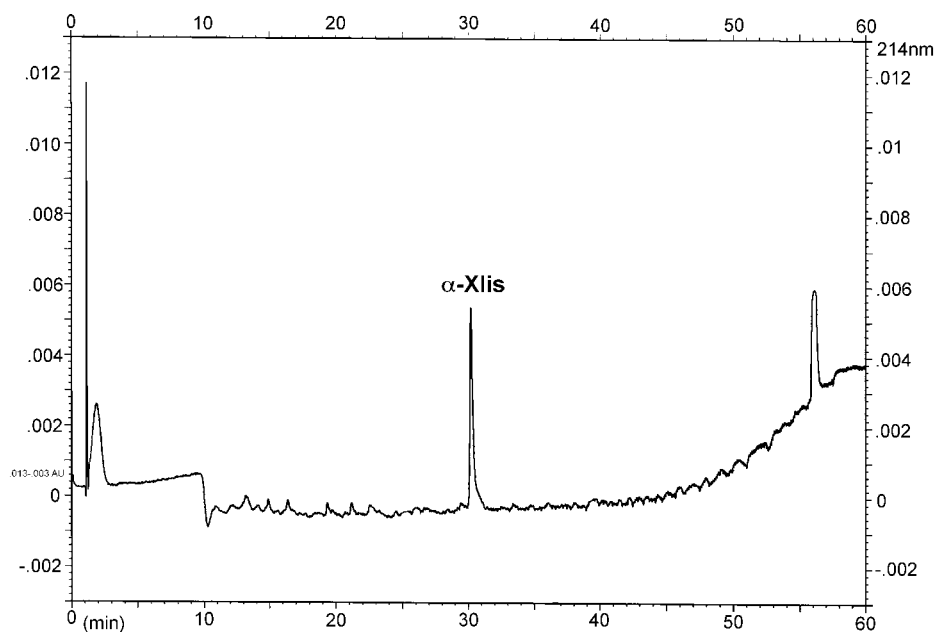
Após digestão tripsínica e análise subsequente o resultado originou 19 fragmentos (Fig. 24) com a respectiva massa peptídica conhecida. Seguidamente, o perfil peptídico foi comparado com os disponíveis nos bancos de dados. O resultado obtido não correspondeu a nenhuma proteína actualmente conhecida e

descrita nos diferentes bancos consultados. É quase certo que esta molécula é uma toxina bacteriana inteiramente nova.

Com efeito, a interrogação informática dos bancos de dados das massas peptídicas disponíveis, permitiu constatar que a α -Xlis apresenta um perfil peptídico hipotético que não corresponde a nenhuma outra proteína actualmente disponível e conhecida. No entanto, os estudos sobre esta molécula estão a ser desenvolvidos presentemente e a sua sequência aminoacídica será conhecida em breve.

A análise MALDI-TOF, sua interpretação e a interrogação dos bancos peptídicos foram efectuados no Laboratório UPR9023-Mécanismes Moléculaires de Communications Cellulaires CCIPE, Montpellier, por E. Demay.

Finalmente, um estudo das características dos efeitos da α -Xlis sobre os hemócitos e sobre as hemácias de carneiro foi elaborado e os resultados, entretanto obtidos, permitiram concluir que se encontram exactamente as mesmas características que evidenciámos aquando do estudo do factor responsável pela actividade C1 no meio de cultura de *X. nematophila*, (Tabela XXIII).



Cromatograma 8 – Cromatografia de fase reversa – C18 da fracção com actividade α -Xlis oriunda da cromatografia de filtração em gel (TSK 3000). Tempo de retenção 30.4 min e gradiente de acetonitrilo a 61%.

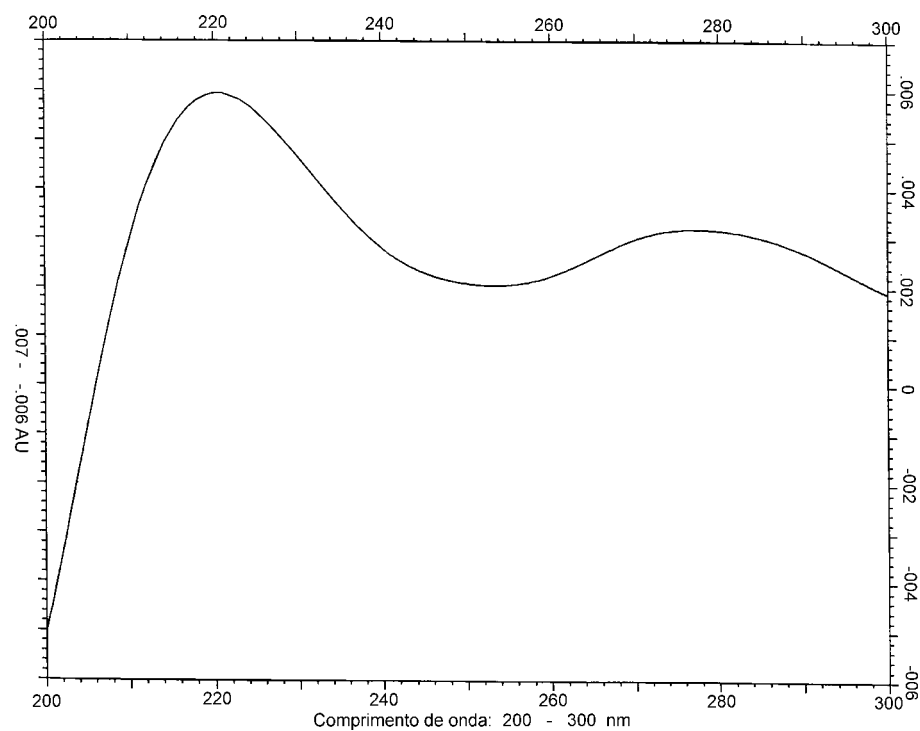


Fig. 22 - Varrimento espectral do pico da cromatografia de fase reversa C-18, tempo de retenção=30.4 min, o qual apresentava actividade biológica do tipo α -Xlis. De notar, que a absorção a 214-220 nm é mais importante do que a 280 nm. Este facto, poderá significar a existência de uma molécula proteica com poucos amino ácidos aromáticos prevalecendo a detecção molecular no comprimento de onda característico da ligação peptídica.

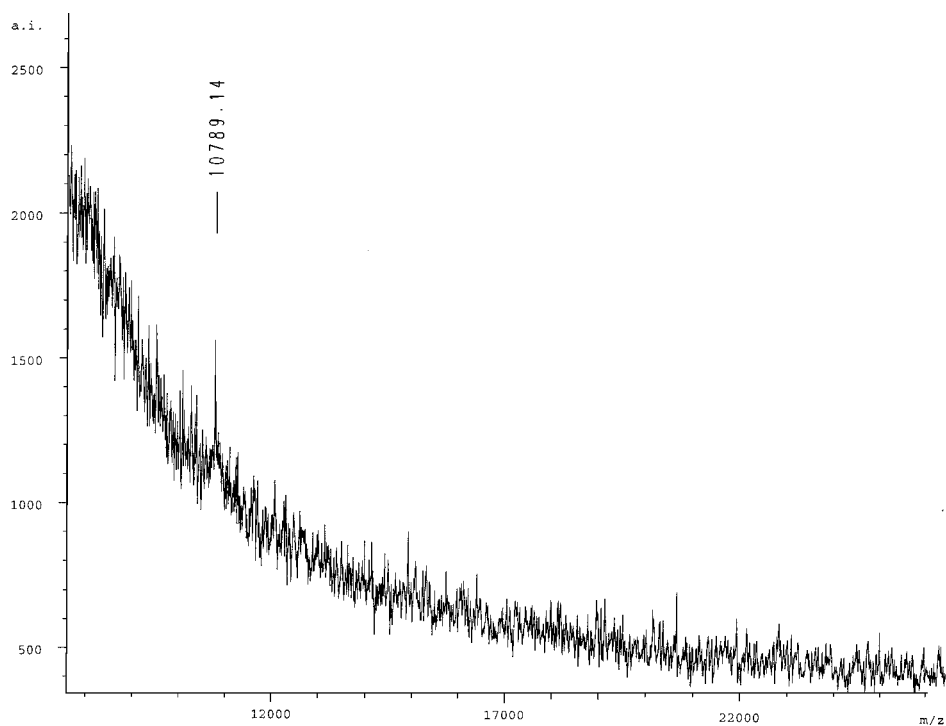


Fig. 23 – Perfil da análise directa MALDI-TOF do pico com actividade α -Xlis obtido na cromatografia C18. O resultado foi a detecção de uma proteína com peso molecular igual a 10789,14 Da.

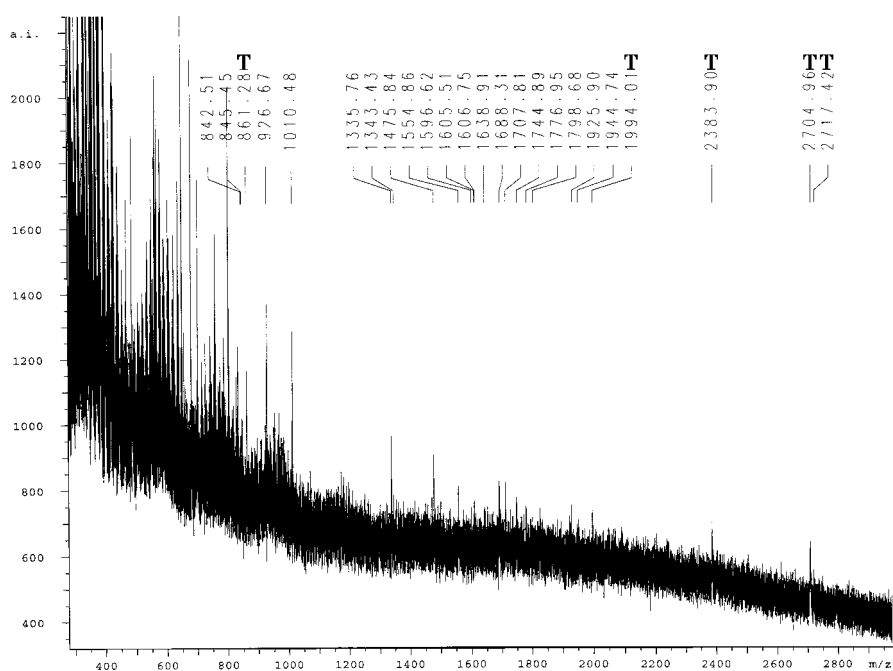


Fig. 24 – Perfil da análise MALDI-TOF após digestão tripsínica do pico com actividade α -Xlis obtido na cromatografia C18. O resultado foi a detecção de 19 fragmentos com pesos moleculares indicados no topo da figura. Os fragmentos anotados com T correspondem aos fragmentos proteicos oriundos da autodigestão da tripsina utilizada na digestão da α -Xlis.

Tabela XXIII

Resumo das características dos efeitos da α -Xlis sobre os hemócitos de *S. littoralis* e sobre as hemácias de carneiro

	Hemócitos de <i>S. littoralis</i> (% Mortalidade)	Hemácias de Carneiro (Hemólise - UAH)
Testemunha		
(PBS c/ Ca⁺ e Mg⁺)	1,5±0,5	0,03±0,01
α-Xlis		
(PBS c/ Ca⁺ e Mg⁺)	76,2±4,9	0,676±0,062
α-Xlis		
(PBS s/ Ca⁺ e Mg⁺)	77,6±5,1	0,614±0,05
α-Xlis		
(60°C - 30 min)	1,5±0,2	0,05±0,007
α-Xlis		
(Tripsina 30U - 1 h)	1,4±0,7	0,035±0,009
α-Xlis		
(Memb. Hemácias carneiro)	1,3±0,7	0,056±0,007

3.4. Conclusão

O factor responsável pela actividade que denominado por C1, encontrada nos sobrenadantes das culturas de *X. nematophila*, é essencialmente da responsabilidade de uma proteína com cerca de ± 11 kDa. Esta molécula foi purificada e o seu estudo está em curso. Os primeiros resultados mostram que a α -Xlis é uma molécula que parece não corresponder a nenhuma proteína actualmente conhecida. Deve certamente tratar-se de uma nova toxina de origem bacteriana.

A partir das fracções purificadas é possível, por conseguinte, efectuar a análise precisa dos efeitos desta molécula sobre as células alvo, (os hemócitos e as hemácias) de maneira a caracterizar o seu modo de acção. Estes estudos farão o objecto do último capítulo da presente tese.

Apesar de tudo, o rendimento do processo de purificação é bastante baixo. No entanto, é necessário ter em conta que a molécula responsável pela actividade pesquisada pode, por razões de auto-agregação ou polimerização, ir perdendo a actividade ou constituir agregados activos que possuem um comportamento cromatográfico diferente. Relembre-se, a propósito, que as cromatografias Mono Q 10/10 apresentavam duas zonas de eluição da actividade C1 e que, por este motivo se pode ter perdido uma quantidade significativa de material activo.