

PURIFICAÇÃO DE UMA METALOPROTEASE P-I ISOLADA DO VENENO DE BOTHROPS MOOJENI

Anna R. P. Valerio¹, Guilherme H. M. Salvador¹ e Marcos R. M. Fontes¹

¹Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu - SP, Brasil.

Introdução: No Brasil, a serpente *Bothrops moojeni* (Caiçaca) é uma representante das jararacas e é a principal espécie de *Bothrops* do cerrado. Proteínas encontradas no veneno de serpentes do gênero *Bothrops* possuem grande interesse científico e médico. Cerca de 90% do peso seco destes venenos são compostos por proteínas, que podem possuir diversas propriedades farmacológicas, como o estabelecimento de mionecrose local em vítimas acometidas por acidentes ofídicos. Entre as proteínas que são consideradas miotóxicas, estão as PLA₂s e metaloproteases. Esta primeira e suas variantes, atacam diretamente as células musculares, enquanto proteases lesam o músculo por meio de hemorragia e isquemia. É de grande interesse médico e científico o estudo aprofundado de forma estrutural de proteínas que participam da ação miotóxica em acidentes ofídicos, sendo que o mesmo não é neutralizado eficientemente pela soroterapia convencional.

Métodos: Para se obter amostras de metaloproteases de classe P-I são utilizados os métodos de purificação em sistemas fechados em HPLC. O veneno bruto é diluído em solução tamponada e submetido em colunas de cromatografia líquida CM-FF 5mL (GE Healthcare). As frações correspondentes as proteases são coletadas, concentradas e submetidas a cromatografia de fase reversa, em coluna Shim-Pack CLC-ODS (Shimadzu). Para se observar o grau de pureza das amostras, foram preparados géis de SDS-PAGE a 13%.

Resultados e Discussões: A fração correspondente à metaloprotease P-I foi obtida à partir do veneno bruto de *B. moojeni* utilizando duas etapas de purificação. Seu grau de pureza foi observado por meio de um gel de eletroforese em SDS-PAGE a 13%, onde a fração correspondente é a de número 6, com ~22 kDa de massa molecular (Figura 1).

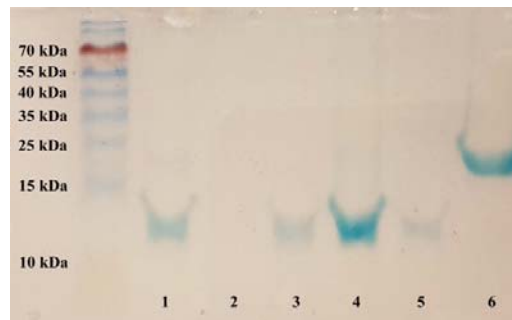


Figura 1 – Gel de SDS PAGE a 13% mostrando as frações obtidas à partir da purificação do veneno de *B. moojeni*. A fração de número 6 corresponde à metaloprotease P-I.

Após a obtenção da metaloprotease P-I em maior quantidade, serão realizados experimentos de sequenciamento, funcionais e de cristalografia, visando obter e analisar a estrutura cristalográfica tridimensional.

Conclusões: Os resultados preliminares apresentados aqui são promissores para o entendimento do funcionamento desta classe de proteínas. A obtenção de uma metaloprotease de classe P-I e análises feitas futuramente, em conjunto com análises de outras proteínas presentes em venenos desta serpente, podem auxiliar no entendimento do mecanismo completo da mionecrose local. Entendendo o mecanismo miotóxico, é possível buscar compostos que possam inibir essa atividade e complementar a soroterapia convencional.