

PURIFICAÇÃO E ESTUDOS CRISTALOGRÁFICOS DE UMA FOSFOLIPASE A₂ ISOLADA DO VENENO DE BOTHROPS MOOJENI

Cíntia F. Alves¹, Guilherme H. M. Salvador¹ e Marcos R. M. Fontes¹

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

Introdução: A *Bothrops moojeni* (Caiçaca) possui grande importância científica e médica no Brasil, pois ela consegue se adaptar a vários ambientes e é a principal espécie de *Bothrops* do cerrado. Venenos de serpentes são compostos por uma mistura de diferentes moléculas que apresentam diferentes propriedades biológicas, sendo aproximadamente 90% de seu peso seco constituído por diferentes proteínas, como proteases, PLA₂s e L-aminoácido oxidases, por exemplo. Fosfolipases A₂ (PLA₂s, E.C. 3.1.1.4) são enzimas cálcio dependentes que podem participar de diversos processos fisiológicos, como o remodelamento de membranas, mediação de processos inflamatórios e digestão de fosfolipídios. Estas enzimas podem ser encontradas de forma abundante em venenos de artrópodes e répteis. Devido à sua importância na participação no estabelecimento da mionecrose, estudos estruturais envolvendo PLA₂s catalíticas presentes em venenos de serpentes, pode auxiliar na busca de melhor compreender este mecanismo e auxiliar na busca de compostos que visam complementar a soroterapia convencional utilizada.

Métodos: Os procedimentos de purificação das PLA₂s catalíticas são conduzidos à temperatura ambiente, onde o veneno bruto é diluído em solução tamponada e submetido em colunas de cromatografia líquida DEAE (GE Healthcare). As frações correspondentes as PLA₂s 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. Após se obter amostras puras, estas foram submetidas à experimentos de cristalização de forma automatizada utilizando o kit comercial JCSG + Suite (QIAGEN) e o robô Oryx4 (Douglas Instruments), com a técnica de difusão de vapor no sistema *hanging drop* em placas com 40 µL de reservatório e gotas de 0,3 µL de amostra de proteína + 0,3 µL de solução do reservatório.

Resultados e Discussões: Foram obtidas amostras da PLA₂ do veneno de *B. moojeni* com um grau de pureza conveniente para posterior experimento de cristalização. Os cristais obtidos à partir do processo de cristalização de forma automatizada foram observados na solução de número 37, que contém 15% de glicerol e 24% de PEG1500 (Figura.1).

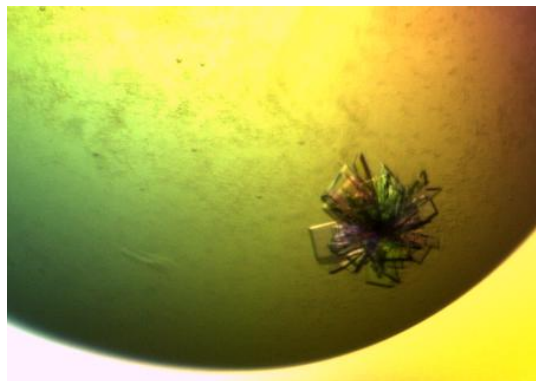


Figura 1 – Cristais obtidos da amostra de PLA₂ purificada do veneno de *B. moojeni*.

No momento, os cristais obtidos não são convenientes para experimentos de difração de raios X, sendo necessário novos experimentos de cristalização para posterior resolução da estrutura cristalográfica.

Conclusões: Apesar do trabalho possuir apenas resultados preliminares, estes mostraram ser promissores. Até o momento, alguns policristais da fração isolada de uma PLA₂ catalítica foram obtidos, porém não são convenientes para experimentos de difração de raios X. Futuramente, serão feitos novos experimentos para se obter maior quantidade de amostra e novas tentativas de cristalização, à fim de se obter monocristais para a resolução da estrutura tridimensional.