

CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DE DUAS SERINA PROTEASES DO VENENO DA SERPENTE *Crotalus simus*



INSTITUTO DE QUÍMICA – UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

R. V. dos Santos¹; F. G. Villalta-Romero²; L. Tasic³

¹roney_quim09@yahoo.com.br; ²fabian.romero@iqm.unicamp.com; ³ljubica@iqm.unicamp.br

CNPq

Palavras-chave: Venenos de serpentes - Serina proteases - Análises biofísicas.



INTRODUÇÃO

Mais de 2,5 milhões de pessoas por ano são envenenadas em todo o mundo como consequência dos acidentes ofídicos. Deste número, cerca de 12,5 mil resultaram em morte.

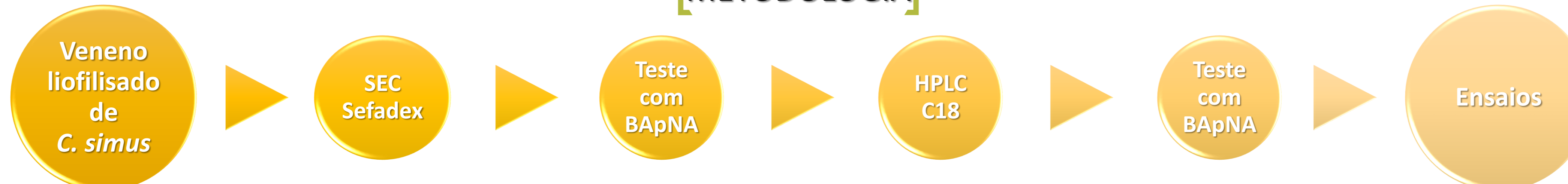
Acidentes por ofidismo, representam um problema de saúde pública muito relevante, afetando principalmente as pessoas pobres que vivem em áreas rurais da Ásia, África e América Latina.

O tratamento baseia-se na administração de antídotos derivados de animais que são altamente eficazes na neutralização de efeitos sistêmicos induzidos por venenos de cobra.

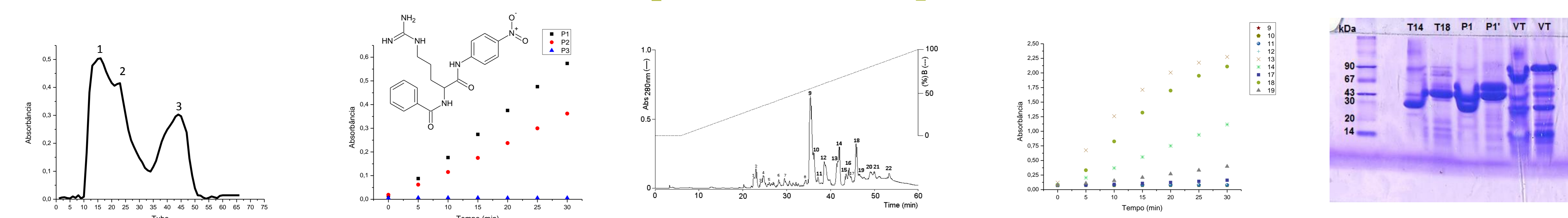
Apesar do alto grau de identidade entre suas sequências, estas proteínas são bastante específicas quanto ao substrato macromolecular utilizado.

As serina proteases pertencem à família da tripsina S1 clã SA, a maior família de peptidases. Elas catalisam a hidrólise de ligações peptídicas e desempenham papéis importantes em diversos processos biológicos, desde a digestão, regulação da coagulação do sangue, no sistema imunológico e processos inflamatórios.

METODOLOGIA



RESULTADOS E DISCUSSÃO



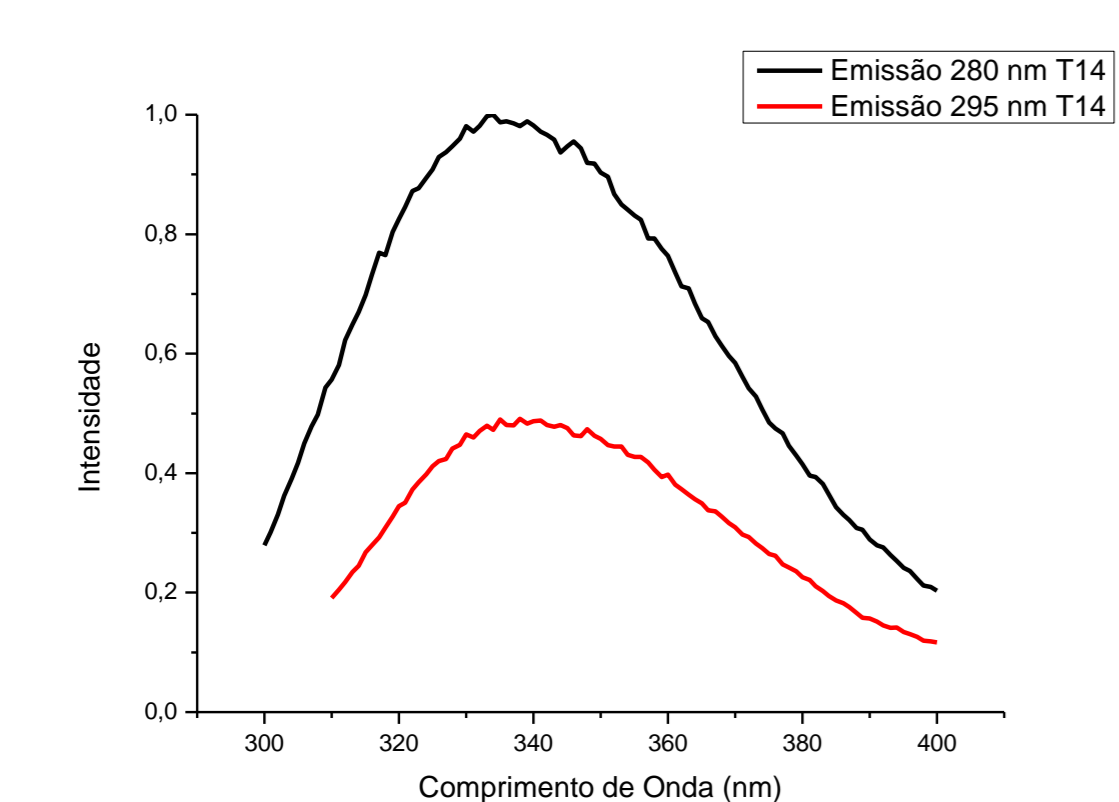
Curva de absorvância em função dos tubos de coleta. Leitura feita em 280 nm. As amostras foram separadas em três tubos, referentes aos picos apresentados no gráfico acima, e liofilizados. Foi realizado teste com BAPNA (molécula do gráfico ao lado).

BAPNA é substrato cromogênico para enzimas proteolíticas da família das serino proteases. Ocorre uma clivagem, com auxílio do resíduo de arginina, no BAPNA liberando *p*-nitroanilina, sendo ele o cromóforo responsável pela coloração amarela que pode ser lido em um comprimento de onda de 410 nm.

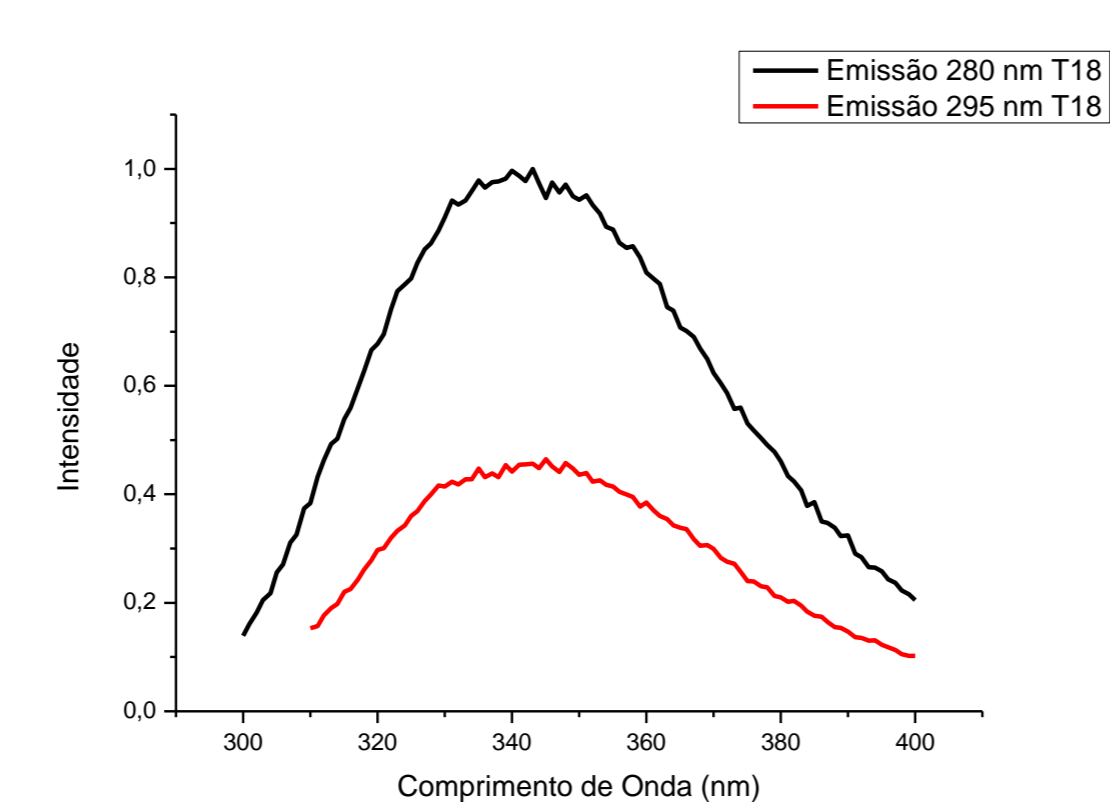
Com o resultado positivo para o Pico 1 com o BAPNA, foi feita uma separação por HPLC C18.

Teste de BAPNA para todos os tubos coletados. Os Tubos 13, 14 e 18, apresentaram resultados positivos. Somente com as amostras dos Tubos 14 e 18 foram feitas SDS-PAGE, fluorescência e dicroísmo circular.

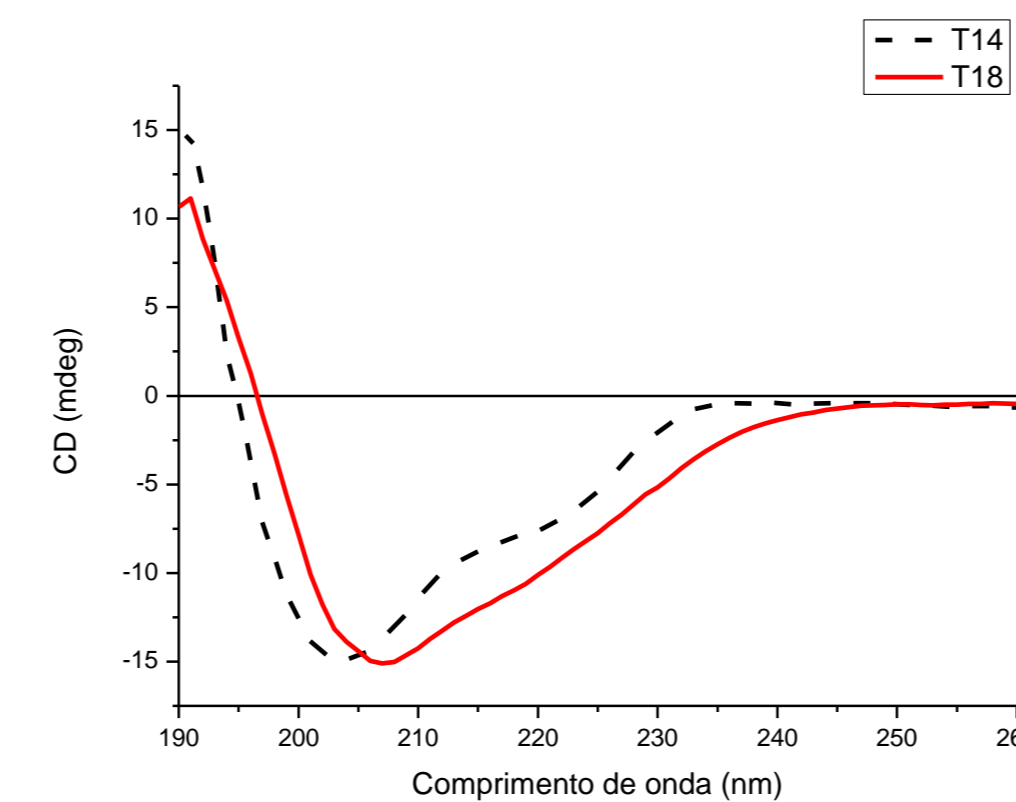
SDS-PAGE (12,5%) das amostras T14 e T18. Podemos notar uma banda mais intensa em cada amostra de peso molecular igual a 24,8 kDa.



Curva de intensidade em função do comprimento de onda. Pela intensidade pode-se notar que a intensidade de emissão é devido aos resíduos de Tyr do que os resíduos de Thp.



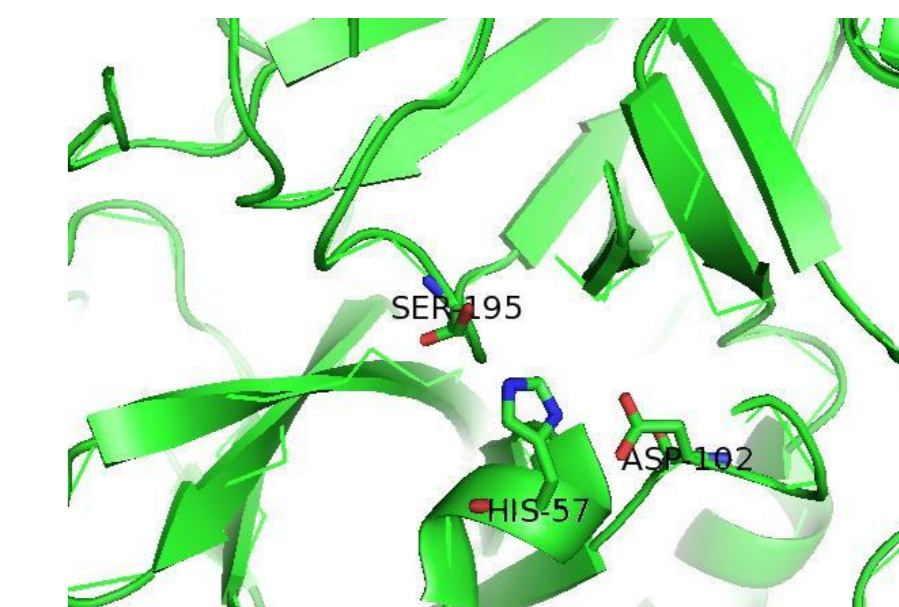
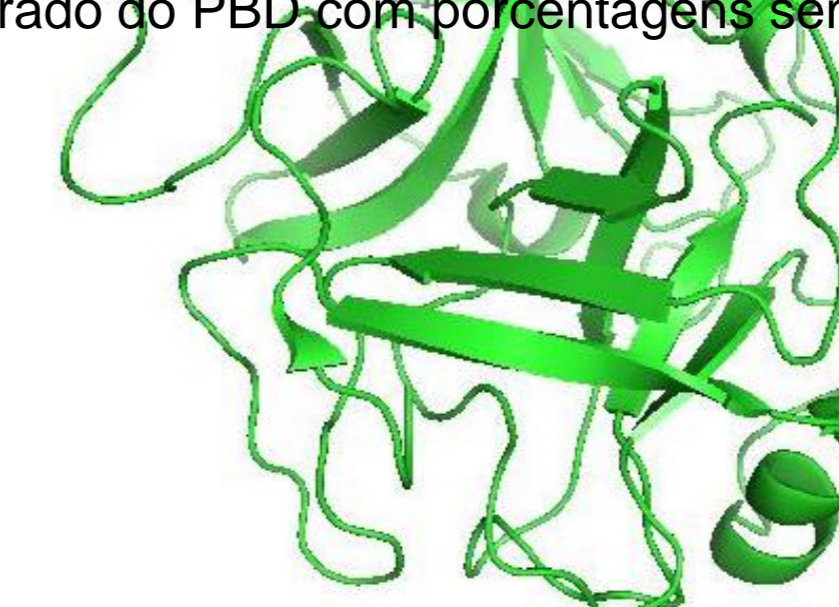
Curva de intensidade em função do comprimento de onda. Pela intensidade pode-se notar que a intensidade de emissão é devido aos resíduos de Tyr do que os resíduos de Thp.



Dicroísmo circular das amostras T14 e T18. Para T14 tem dois mínimos, um em 238 nm e outro em 204 nm, e uma máxima em 191 nm. T18 possui dois mínimos, um em 223 nm e outro em 207 nm, e um máximo em 191 nm.

	T14 (190-260 nm)	T18 (190-260 nm)
α -hélice	13%	12%
β -folha antiparalela	31%	31%
β -folha paralela	9%	10%

Porcentagem de α -hélices, folhas β -anti e paralelas nas serina proteases do veneno de *C. simus*. Imagem tridimensional e do sítio catalítico de uma outra serino preatense (10P2) retirado do PBD com porcentagens semelhantes.



REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Villalta-Romero, F. G., *Nuevos recursos terapéuticos para el envenenamiento ofídico: utilización de química combinatoria para optimización de inhibidores específicos de la metaloproteína BAP1 aislada del veneno de la serpiente Bothrops asper (Terciopelo)*. Tesis de Maestría. Universidad de Costa Rica. 2011.

AGRADECIMENTOS

