Análise da relação estrutura e função da Crotoxina e suas subunidades com inclusão de ligantes.

Ana Júlia Loureiro Levada, Fábio Florença Cardoso, Marcos Roberto de Mattos Fontes, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências – Campus de Botucatu, Bacharel em Física Médica, ana.levada@unesp.br, PIBIC.

Palavras Chave: *Crotalus*, Fosfolipases A₂, Cristalografia.

Introdução

O envenenamento pelos acidentes ofídicos foi reconhecido como uma doença tropical negligenciada pela Organização Mundial de Saúde¹. No Brasil, as serpentes das espécies do gênero *Crotalus* (cascavéis) promovem a maior taxa de mortalidade entre as vítimas². A Crotoxina (CTX), fração majoritária do veneno de cascavéis, é um complexo proteico heterodimérico com potente efeito neurotóxico pré-sináptico³. A CTX é formada por uma subunidade ácida, não-tóxica e não-enzimática (Crotoxina A, CA ou Crotapotina) ligada não-covalentemente a uma componente básica, uma fosfolipase A₂ (PLA₂) enzimática e tóxica (Crotoxina B ou CB)⁴. Esse complexo atua pela sinergia entre suas subunidades. Sugere-se que a CA pode diminuir a atividade catalítica da CB, pois pode bloquear parcialmente o acesso ao substrato. Como a mesma não possui ação local, a CA atua como carreadora da CB a seu sítio específico, localizado na membrana pré-sináptica da junção neuromuscular. Após a interação do complexo com o alvo, as subunidades dissociam-se, permitindo que a CB exerça seu papel neurotóxico³.

Apesar da soroterapia geralmente neutralizar os efeitos sistêmicos do envenenamento ofídico, pode ocorrer reações adversas graves⁵. Além disso, o mecanismo de ação desta toxina não está completamente elucidado, justificando o aprofundamento dos estudos nesta área. Vale ressaltar ainda, que a CTX e suas subunidades vem sendo estudada pelo seu potencial como fármaco para diversas patologias⁶.

Objetivo

Aprofundar o conhecimento estrutural e funcional da CTX e suas subunidades isoladas, utilizando como modelo o veneno da subespécie *Crotalus durissus terrificus*, cascavel de maior dispersão em território brasileiro.

Material e Métodos

O isolamento da CTX e suas subunidades foi realizada a partir do fracionamento do veneno bruto de *C. d. terrificus* por cromatografia líquida de exclusão molecular (CTX), em fase reversa (CA e CB) e de troca iônica (isoformas de CA)^{7,8}. As subunidades de CA foram avaliadas por

espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF⁹. As frações de cada etapa cromatográfica foram analisadas por eletroforese em gel de poliácridamida (SDS-PAGE)¹⁰. Para realizar estudos estruturais, a CTX e suas subunidades foram submetidas a ensaio de cristalização e co-cristalização¹¹ com inibidores de PLA₂ descritos na literatura. Os cristais serão submetidos a experimentos de difração de raios X para a obtenção das estruturas quaternárias dessas toxinas na forma nativa e em interação com ligantes. Para realizar os estudos funcionais será realizada a verificação de atividade enzimática¹² da CTX e da CB, na presença dos potenciais inibidores encontrados nas estruturas cristalográficas.

Resultados e Discussão

As análises cromatográficas e por SDS-PAGE corroboram o perfil do veneno crotálico⁷, com fração minoritária de Crotamina. A alta homologia sequencial entre as frações coletadas não permitiu a diferenciação das isoformas de CA. Os testes de cristalização das toxinas nativas e complexadas estão em andamento.

Conclusões

As regiões estruturais de interesse farmacológico serão analisadas após a obtenção dos cristais. Adicionalmente serão realizados ensaios estruturais em solução, como análises por difração circular, espectrometria de fluorescência e espalhamento dinâmico de luz, disponíveis nas dependências do laboratório.

¹Chippaux, JP. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2017, 23, 38.

²Oliveira, A.T.A.L.; Sousa, A.F.P.B.; Alcantra, I.C.L. *et al.Revinter*. 2018, 11, 119.

³Faure, G. *et al.JMol Biol*. 2011, 412, 176.

⁴Marchi-Salvador, D.P. *et al.Proteins*. 2008, 72, 883.

⁵León, G. *et al.Toxicon*. 2013, 76, 63.

⁶Sampaio, S.C.; Hyslop, S.; Fontes, M.R.M. *et al.Toxicon*. 2010, 55, 1045.

⁷Hendon, R.A. e Fraenkel-Conrat, H. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971, 68, 1560.

⁸Faure, G. e Bon, C. *Biochemistry*. 1988, 27, 730.

⁹Jurinke, C. *et al.Mol Biotechnol*. 2004, 26, 147.

¹⁰Laemmli, U.K. *Nature*. 1970, 227, 680.

¹¹McPherson, A. *Introduction to macromolecular crystallography*. 2009.

¹²Araújo, A.L. e Radvanyi, F. *Toxicon*. 1987, 25, 1181.