

PLA₂-homóloga Lys49, BnuTX-I, do veneno da serpente *Bothrops neuwiedi*: Isolamento, caracterização química e antiparasitária

Edailson de A. Corrêa^{1,3,4}; Jorge J. Alfonso^{1,2}; Rafaela D. Sousa^{1,2}; Anderson M. Kayano¹; Carolina B. G. Teles⁶, Ana Paula de A. dos Santos^{2,5}; Andreimar M. Soares^{1,3,5}; Leonardo de A. Calderon^{1,2,3,5}

¹Centro de Estudos de Biomoléculas Aplicadas à Saúde, CEBio, Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz Rondônia, Porto Velho-RO, Brasil; ²Univ. Federal de Rondônia, UNIR, Porto Velho-RO, Brasil

³Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia, Rede BIONORTE, Brasil

⁴Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia – IFRO, Porto Velho – RO, Brasil. ⁵Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz-RO. e-mails: correa_bio@yahoo.com.br;

jorwish@gmail.com; raf.dinizs@gmail.com; akayano@gmail.com; carbioni2004@gmail.com; paulaazevedo.2011@gmail.com; andreimar@fiocruz.br; calderon@fiocruz.br

As fosfolipases A₂, variantes, PLA₂-Lys49, apresentam na posição 49 um resíduo de aminoácido Lisina (Lys), o que resulta na pouca ou nenhuma atividade enzimática sob substratos artificiais ou naturais. Entretanto, estas proteínas podem interagir com membranas biológicas provocando efeitos tóxicos nas células, por mecanismos não totalmente esclarecidos. Os objetivos deste estudo foram isolar e caracterizar bioquímica e antiparasitária uma PLA₂-Lys49, BnuTX-I, do veneno de *B.n.urutu*. A purificação de BnuTX-I foi realizada por dois passos cromatográficos: 1) Troca aniônica, utilizando coluna-DEAE-Sepharose (10x30 cm), e 2) Fase reversa, em coluna Discovery C18 (25 cm x 4.6 mm). O fracionamento em coluna aniônica produziu nove frações (F1 a F9), onde após atividade fosfolipásica sobre o substrato 4-nitro-3-octanoiloxi-benzoico (4N3OBA) e SDS-PAGE 1D, observou-se a presença de BnuTX-I na fração F1, que foi recromatografada em coluna de fase reversa, obtendo-se sete frações (F1 a F7), sendo a fração F4 contendo a proteína de interesse. A massa molecular relativa (*Mr*) e a pureza, avaliadas por eletroforese, mostraram uma banda única de ~14 kDa. A determinação da massa molecular absoluta/real foi obtida por espectrometria de massa (MALDI-TOF) com um *m/z* de 13.733 Da e a averiguação da atividade fosfolipásica sobre 4N3OBA mostrou que a toxina é inativa. Os ensaios de citotoxicidade com macrófagos peritoneais e os ensaios leishmanicidas com *Leishmania (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH) *in vitro* foram determinados por MTT, enquanto os ensaios tripanocidas com *T. cruzi* (cepa CL clone B5) foram revelados por resazurina. A Toxina BnuTX-I apresentou apenas atividade sobre cepas de *L. amazonensis* com IC₅₀ de 52 µg; CC₅₀ de 22,91 µg/mL e com índice de seletividade (IS) de 0,44. Os resultados, embora similares a toxinas Lys49 de peçonhas de ofídios do mesmo gênero, demonstraram potenciais biotecnológicos para atividades antiparasitárias.

Palavras-chave: Fosfolipase A₂-homólogas Lys49, Antiparasitária, Biotecnologia.

Apoio: Rede Bionorte, IFRO, CAPES, CNPq, FIOCRUZ e INCT/INPeTAm.