

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

**Análises Proteômicas, Anti-venômicas e
Isolamento de Novas Proteínas com Atividade
Citotóxicas de Venenos Elapídicos**

Orientador: Dr. Adriano Monteiro de Castro Pimenta

Paula Henriques Cruz Ciscotto

Agosto/2011



PAULA HENRIQUES CRUZ CISCOTTO

**Análises Proteômicas, Anti-venômicas e
Isolamento de Novas Proteínas com Atividade
Citotóxicas de Venenos Elapídicos**

Tese submetida ao Curso de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Bioquímica.

**Belo Horizonte
Minas Gerais/Brasil**

2011



Apaixone-se por um sonho, acredite que tudo dará certo, pois somente a sua fé trará seu sonho para perto de você.... No final, poderá contemplar a magia de tudo aquilo que teve fé.....Tudo que aconteceu é merecimento, por seus sinceros desejos....

(Fabiana Thais Oliveira)

Agradecimentos:

Aos meus pais por sempre estarem ao meu lado, incentivando meu crescimento pessoal e profissional e apoiando minhas decisões. Apoiando as mudanças de vida.

Ao Prof. Adriano M. C. Pimenta por dar continuidade à minha trajetória científica pelo caminho da especialização profissional e por depositar em mim sua confiança para realização deste trabalho. Pelas conversas e desabafos.

Ao Dr. Michael Richardson pela ajuda na determinação da seqüência de aminoácidos, das proteínas purificadas.

Ao Msc. Breno Rates pela ajuda no sequenciamento *de novo*.

Ao Dr. Carlos Bloch pela colaboração feita entre os laboratórios.

Ao Dr. Luciano pela paciência, pelos ensinamentos e colaboração na determinação das seqüências das proteínas.

Ao Dr. Eduardo Ferraz Coelho e ao Msc. Diogo Valadares pela colaboração nos experimentos de atividade anti-*Leishmania* e citotoxicidade em macrófago.

À Élide Monteiro Andrade pela colaboração e ensinamentos nos ensaios de 2D-*immunoblotting*.

Ao Dr. Eládio Sanchez pela doação do veneno peruano da espécie *M. spixii*.

À Wany Slena Maria pela colaboração, ao ceder os soros anti-Elapídicos específicos.

Ao Dr. Prof. Carlos Chavez pelas palavras de incentivo, desta forma, deu continuidade à orientação do mestrado. Como diz o ditado: O bom filho a casa torna.

À Dra. Profa. Maria Elena pelo carinho demonstrado em todos os dias de convivência. Aos conselhos no final desse caminho e a indicação para início de um próximo.

À todos colegas e ex-colegas de laboratório que durante estes anos ou parte dele, fizeram parte do meu dia-dia, contribuindo com suas experiências e incentivos. Agradeço a todos vocês pelos dias de alegria e também de dificuldade que passamos

juntos, o que sempre nos leva a um crescimento pessoal. Na vida, além do conhecimento adquirido, o mais interessante é a relação interpessoal, no qual conhecemos pessoas que permanecerão em nosso coração ou em nossa lembrança. Vocês sempre estarão comigo. Em especial, vai um agradecimento para Alexandre Dutra, Vitor Minelli, Juliana Cassoli, Ricardo Andrez, Cristina Monerat, Breno Rates, Rodrigo Novaz, Melissa Assef, Micheline Donato, Daniele Nascimento, Thiago Braga, Marcela Nunes, Beatriz Adaime, Rosângela Romeo, Karla Ferraz, Daniel Santos, pela amizade e amadurecimento de vida.

Aos grandes amigos que de alguma forma sempre me deram força: Thais Ciscotto, Fabiano Straposkovisk, Lele, Xande, André Roberto, Bruninho, Luiz, Marcelo Bulhões, Cris e Cadinho. Amigos são os que sorriem na sua alegria, e não simplesmente, os que lhe aconselham na tristeza.

Ao, Pedro, que apesar de surgir no final dessa etapa de vida, foi quem me deu força e coragem para continuar, para acabar e para iniciar uma nova etapa... Pessoas aparecem na nossa vida e sempre tem um por quê, um pra que. Quando menos esperamos, parece que algo está reservado. São situações que parecem coincidências. Situações que remetem ao destino. Espero que você continue fazendo parte da minha vida. Esp.F12!

Deus... uma força maior que não fazia tanto parte dos meus pensamentos. Hoje, uma fé interior e um sentimento superior, que me dá brilho, força, coragem, atitude pra ir atrás de metas, objetivos e sonhos. Que me tira o medo do novo. Me tira o medo de viver a vida. Que me dá uma sensação plena de que tudo vai dar certo. Pois agora é a hora, porque esse é o momento reservado para a minha felicidade. Me dá um claro sentimento de que agora é a hora de uma grande realização profissional, de vida e de emoção.

Agradeço a todos citados acima. Nessa vida não viemos só, não vamos só. Sempre levarei todos no meu coração e na minha mente. Amadurecimento, é vivência, é aprendizado, e foi com vocês que hoje me tornei esse ser lindo, seja profissional ou pessoalmente falando.

ÍNDICE

Páginas

LISTA DE AMINOÁCIDOS.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE TABELAS.....	XIII
RESUMO.....	XVI
ABSTRACT.....	XVIII
1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Aspectos gerais e dados epidemiológicos do ofidismo.....	2
1.2 As serpentes.....	7
1.2.1 Características morfológicas gerais e seus venenos.....	7
1.2.2 Venenos Elapídicos.....	10
1.3 Principais famílias de toxinas dos venenos elapídicos: 3FTxs e PLA ₂	13
1.3.1 <i>Three-fingers</i> –3FTxs (α -neurotoxinas e cardiotoxinas-citotoxinas).....	13
1.3.2 Fosfolipases (PLA ₂).....	18
1.4 Gênero <i>Micrurus</i>	23
1.4.1 Características das serpentes.....	23
1.4.2 O veneno de <i>Micrurus</i> e suas toxinas.....	29
1.4.2.1 Atividade neurotóxica.....	30
1.4.2.2 Atividade miotóxica.....	31
1.4.2.3 Atividades proteolítica, hemolítica, hemorrágica e cardiovascular.....	32
1.4.2.4 Toxinas dos venenos de <i>Micrurus</i>	33
1.5 Proteômica e os venenos ofídicos.....	37
1.6 Sorologia e estudos anti-venômicos.....	41
1.7 Venenos de serpentes e sua atividade antiparasitária.....	46
2.OBJETIVOS.....	50
2.1 Objetivos Geral.....	51
2.2 Objetivos Específicos.....	51
3.METODOLOGIA.....	53
3.1 Obtenção dos venenos.....	54
3.2 Obtenção dos antivenenos.....	54
3.3 Dosagem de proteína.....	55
3.4 Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LC/MS).....	55
3.5 Cromatografia Líquida Bidimensional (2D-LC).....	56
3.6 Análises por Espectrometria de Massa.....	57
3.7 Determinação da sequência N-terminal de proteínas isoladas.....	57
3.8 Pesquisa de Similaridade.....	58
3.9 Eletroforese bidimensional (Gel-2D).....	58
3.10 Digestão trípica (<i>in gel</i>).....	59
	VI

3.11 Imunoensaio – reação cruzada.....	60
3.12 Fracionamento do veneno de <i>M. lemniscatus</i>	60
3.13 Análises estruturais das proteínas purificadas do veneno de <i>M. lemniscatus</i>	62
3.14 Atividade anti- <i>Leishmania</i>	62
3.14.1 Cultivo dos parasitas.....	62
3.14.2 Ensaio de citotoxicidade em <i>L.(L). amazonensis</i>	63
3.15 Ensaio de citotoxicidade em macrófago.....	65
4.RESULTADOS	65
4.1 Análises Proteômicas dos venenos de <i>Micrurus</i>	66
4.1.1 Análise comparativa primária dos venenos por LC/MS.....	66
4.1.2 Fracionamento dos venenos de <i>Micrurus</i> através de cromatografia bidimensional (2D-LC).....	69
4.1.3 Análise das massas moleculares dos venenos das serpentes.....	73
4.1.4 Distribuição das proteínas em relação à concentração de NaCl na CIEX.....	80
4.1.5 Análise da composição dos venenos por eletroforese bidimensional.....	85
4.1.6 Identificação de famílias de proteínas dos venenos de <i>Micrurus</i>	88
4.2 Análises anti-venômicas: Reação cruzada entre diferentes venenos de <i>Micrurus</i> e anti- <i>Micrurus</i>	93
4.3 Purificação de proteínas da família 3FTx com atividade biológica....	96
4.3.1 Purificação das proteínas.....	96
4.3.2 Identificação das proteínas purificadas por sequenciamento N-terminal.....	102
4.3.3 Ensaio de atividade anti- <i>Leishmania</i> e citotoxicidade em macrófago.....	108
5. DISCUSSÃO	112
5.1 Análises Proteômicas dos venenos de <i>Micrurus</i>	113
5.1.1 Análises por 1D-LC, 2D-LC e espectrometria de massas.....	113
5.1.2 Análise da composição dos venenos através 2D-gel.....	120
5.1.3 Identificação das famílias de proteínas nos venenos de <i>Micruru</i> ..	122
5.2 Análises anti-venômicas.....	127
5.3 Ensaio de atividade anti- <i>Leishmania</i> e citotoxicidade em macrófago.	132
6 CONCLUSÕES	139
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	142

Lista de aminoácidos

Nome	Símbolo	Abreviação
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutâmico	Glu	E
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Cisteína	Cis	C
Fenilalanina	Fen	F
Glicina	Gli	G
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lis	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tir	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V

Lista de abreviaturas

2D-LC	cromatografia bidimensional
3FTxs	Três dígitos, do inglês <i>three-fingers</i>
ACh	acetilcolina
ACN	acetonitrila
BSA	soro albumina bovina
cDNAs	ácido desorribonucléico complementar
CHAPS	ácido 3-[(3- cholamidopropil)dimethylammonio]propanesulfônico
CID-MS/MS	<i>Collision-induced dissociation mass spectrometry</i>
CIEX	cromatografia de troca catiônica
CRISPs	proteína secretória rica em cisteína, do inglês <i>Cysteine-rich secretory proteins</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidina
DL50	dose letal média
DO	densidade óptica
DTT	1,4-dithio-DL-threitol
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent</i>
ESI-Q-TOF	<i>electrospray ionization quadrupole time-of-flight</i>
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
Gel-2D	eletroforese bi-dimensional
LAO	L-aminoácido oxidase
LC	cromatografia líquida

LC/MS	cromatografia líquida e espectrometria de massas
LT	leishmaniose tegumentar
LV	leishmaniose visceral
MALDI-TOF-MS	<i>matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight</i>
MED	dose ematogênica mínima
MHD	dose hemolítica mínima
MS	espectrometria de massas
MTT	brometo de 3-[4,5- dimethylthiazol-2-y1]-2,5diphenil-tetrazolio
nAChR	receptores de acetilcolina nicotínicos
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	tampão fosfato
pI	ponto isoelétrico
PLA ₂	fosfolipases
RPC	fase reversa
SDS	dodecilsulfato de sódio
TFA	ácido trifluoroacetico
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol

Lista de Figuras

Figura 1: Distribuição dos acidentes ofídicos no Brasil, segundo o gênero.....	3
Figura 2: Serpentes da família Viperidae e Elapidae.....	8
Figura 3: Estruturas terciárias das 3FTx.....	14
Figura 4: Estrutura de receptores nAChR muscular e o sítio de ligação das α -neurotoxinas.....	15
Figura 5: Catálise bioquímica da PLA ₂	20
Figura 6: Estruturas de β - neurotoxinas isoladas de venenos elapídicos.....	23
Figura 7: Dentição proteróglifa: <i>Micrurus</i>	25
Figura 8: Espécies de serpentes do gênero <i>Micrurus</i>	27
Figura 9: Estrutura das imunoglobulinas presentes nos anti-venenos.....	43
Figura 10: Distribuição das proteínas dos venenos de <i>Micrurus</i> em função da massa molecular e porcentagem de ACN.....	68
Figura 11: Cromatografia Bidimensional: Primeira dimensão - Troca catiônica (CIEX).....	71
Figura 12: Cromatografia Bidimensional: Segunda dimensão - Fase reversa (RPC) das frações da CIEX.....	72
Figura 13: Distribuição de massas moleculares em função da frequência de ocorrência nos venenos das serpentes.....	78
Figura 14: Espectro representativo das análises do MALDI-TOF-TOF das frações do veneno de <i>M. frontalis</i>	79
Figura 15: Distribuição das proteínas em função da massa molecular e concentração de NaCl.....	82
Figura 16: Distribuição das proteínas em função da massa molecular e concentração de ACN.....	84
Figura 17: Perfis eletroforéticos de venenos de <i>Micrurus</i> por eletroforese bidimensional.....	87
Figura 18: Reação cruzada entre diferentes venenos de <i>Micrurus</i> e anti- <i>Micrurus</i>	95

Figura 19: Cromatografia de Troca Catiônica (CIEX) do veneno bruto de <i>M. lemniscatus</i>	98
Figura 20: Cromatografia de Fase Reversa das frações provenientes da CIEX.....	99
Figura 21: Recromatografia em Fase Reversa da fração MI 4.2.....	100
Figura 22: Espectros de massa (MALDI-TOF) das proteínas purificadas do veneno de <i>M. lemniscatus</i>	101
Figura 23: Alinhamento da sequência de aminoácidos da MI 6435 do veneno de <i>M. lemniscatus</i> com sequências de proteínas da família das 3FTx.....	105
Figura 24: Alinhamento da sequência de aminoácidos da MI 6504 do veneno de <i>M. lemniscatus</i> com sequências de proteínas da família das 3FTx.....	107
Figura 25: Alinhamento entre as sequências N-terminais das proteínas MI 6435 e MI 6504, isoladas do veneno de <i>M. lemniscatus</i>	108
Figura 26: Ensaio de atividade anti-Leishmania.....	110
Figura 27: Ensaio de atividade citotóxica em macrófago.....	111

Lista de Tabelas

Tabela 1: Lista de massas moleculares das frações da RPC do veneno de <i>M. frotalis</i> ...	75
Tabela 2: Lista de massas moleculares das frações do RPC do veneno de <i>M. ibiboboca</i>	76
Tabela 3: Lista de massas moleculares das frações do RPC do veneno de <i>M. lemniscatus</i>	77
Tabela 4: Sequencia primária N-terminal e identificação de proteínas dos venenos de <i>M. frontalis</i> , <i>M. ibiboboca</i> e <i>M. lemniscatus</i> por degradação de Edman e pesquisa de similaridade.....	91
Tabela 5: Identificação de peptídeos trípticos extraídos da eletroforese bidimensional (digestão <i>in gel</i>), por sequenciamento <i>de novo</i> via MALDI-TOF-TOF S/MS.....	92
Tabela 6: Proteínas similares à proteína MI 6435 do veneno de <i>M. lemniscatus</i>	104
Tabela 7: Proteínas similares a proteína MI 6504,6 do veneno de <i>M. lemniscatus</i>	106
Tabela 8: Porcentagem de morte dos parasitas promastigotas de <i>Leishmania</i>	110
Tabela 9: Porcentagem de morte dos macrófagos.....	111



Partes dos resultados deste trabalho foram apresentados nos seguintes congressos:

- XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica
- IX Congresso da Sociedade Brasileira de Toxinologia.
- Reunião Anual da FESBE – Federação de Sociedades de Biologia Experimental
- XVI World Congress of the International Society on Toxinology and X Congresso da Sociedade Brasileira de Toxinologia

Ciscotto, P.H.C.; Nascimento, D.G.; Richardson, M.; Agostini, G.C.; Rodrigues, R.J.; Santoro, M.M.; Lima, M.E.; Pimenta, A.M.C. Venome Comparative Analysis And Identification Of Novel Proteins From South-American Coral Snake. **IX Congresso da Sociedade Brasileira de Toxinologia**. 28 de novembro a 02 de dezembro de 2006, Fortaleza, CE.

Ciscotto, P.H.C.; Nascimento, D.G.; Richardson, M.; Agostini, G.C.; Rodrigues, R.J.; Santoro, M.M.; Lima, M.E.; Pimenta, A.M.C. Venome Comparative Analysis And Identification Of Novel Proteins From South-American Coral Snake. **XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica**. 1 a 4 de julho de 2006, Águas de Lindóia – SP.

Donato, M.F.; Ciscotto, P.H.C; Gonçalves, J.C.R.; Alves, A.M.H.; Pereira Filho, G.A.; Pimenta, A.M.C.; Araújo, D.A.M. Avaliação eletrofisiológica de uma proteína do veneno de *Micrurus ibiboboca* (coral verdadeira) no sistema periférico de rato. **XXII Reunião Anual da FESBE – Federação de Sociedades de Biologia Experimental**. 22 a 25 de agosto de 2007, Águas de Lindóia – SP.

Ciscotto, P.H.C.; Richardson, M.; Ferraz, K; Donato, M.F.; Agostini, G.C.; Rodrigues, R.J; Santoro, M.M.; Lima, M.E.; Pimenta, A.M.C. **Proteomic characterization and identification of novel proteins from *Micrurus* venoms: *M. frontalis*, *M. ibiboboca* and *M. lemniscatus***. In: XVI World Congress of the ISTx Congresso da SBTx, 2009, Cabo de Santo Agostinho.



Donato, M. ; Ciscotto, P. H. C. ; Pereira-Filho, G.A ; Golçalves, J. C.r. ; Aron, M. A. ; Alves, AM.H. ; Medeiros, M.A.A ; Pimenta, A.M.C ; Araújo, D.A.M. . The electrophysiological changes in peripheral nerve of the *Micrurus ibiboboca* (merrem,1820) snake are caused mainly by the mic6c7ntx toxin. In: XVI World Congress of the ISTx Congresso da SBTx, 2009, Cabo de Santo Agostinho.

Os resultados obtidos geraram uma premiação e o seguinte artigo (aceito):

The Best Poster Prize from International Society on Toxinology, XVI World Congress of the International Society on Toxinology and X Congresso da Sociedade Brasileira. In: XVI World Congress of the ISTx Congresso da SBTx, 2009, Cabo de Santo Agostinho

Ciscotto, P.H; Rates, B.; Silva, D.A.; Richardson, M.; Silva, L.P.; Andrade, H.; Donato, M.F.; Rodrigues, R.J.; Sanchez, E.F.; De Lima, M.E.; Pimenta, A. Venomic analysis and evaluation of antivenom cross-reactivity of South American *Micrurus* species. Journal of Proteomics, 2011. (*In press*).

Resumo

Com o desenvolvimento tecnológico, áreas da pesquisa como a proteômica, análises anti-venômicas e prospecção de novas proteínas com atividade biológica em venenos de serpentes vem crescendo nos últimos anos. Estudos de venenos raros e de difícil obtenção, como os venenos de serpentes do gênero *Micrurus* começaram a ser realizados com maior frequência. O gênero *Micrurus* (cobra coral) é o principal representante da família Elapidae nas Américas e compreende 61 espécies distribuídas do Sul dos Estados Unidos ao sul da América do Sul. No envenenamento por espécies deste gênero são observados sintomas neurotóxicos devidos a um progressivo bloqueio da transmissão neuromuscular, o que pode levar a vítima à morte por paralisia muscular e parada respiratória. Apesar da sua alta toxicidade poucas informações existem acerca da caracterização bioquímica e farmacológica desse veneno. No presente trabalho, em um primeiro momento, análises proteômicas foram realizadas objetivando o melhor entendimento da composição dos venenos das espécies *M. frontalis*, *M. ibiboboca* e *M. lemniscatus*. Nos três venenos investigados, proteínas com massa moleculares entre 6 e 8 kDa e 12 e 14 kDa mostraram-se mais abundantes. Por meio de sequenciamento N-terminal de proteínas purificadas, sequenciamento por espectrometria de massa (MS/MS) de peptídeos tripticos de eletroforese bidimensional e pesquisa de similaridade em bancos de dados, foi verificado que os venenos são compostos de proteínas similares à: neurotoxinas de cadeia curta e de cadeia longa, weak neurotoxinas, venom protein E2, frontoxina III, precursores de lectina tipo C, PLA₂, LAO, metaloproteases e β-bungarotoxina. Ainda, foram relatados pela primeira vez, a sequência N-terminal de sete proteínas purificadas do veneno de *M. lemniscatus*, similares à 3FTx, PLA₂ e inibidores de proteases do tipo-kunitz já descritas em venenos de outras *Micrurus* e Elapídeos. Em um segundo momento, a atividade anti-venômica foi investigada por meio da reação cruzada entre diferentes venenos de *Micrurus* e antivenenos mono e polivalente, por meio de eletroforese bidimensional e immunoblotting. O antiveneno polivalente anti-Elapídico apresentou maior grau de reatividade cruzada com os venenos de *M. frontalis*, *M. ibiboboca*, *M. lemniscatus* e de espécimes peruanos de *M. spixii*, sendo este último usado como um ponto externo, exemplificando um veneno que não é comumente encontrado no Brasil. Ainda, o anti-

M. corallinus reagiu fracamente com as proteínas dos venenos testados, tendo o anti-*M. ibiboboca* mostrado melhor reação quando comparado ao anti-*M. corallinus*. As proteínas mais imunogênicas dos venenos pertencem são similares a 3FTx, PLA₂, β -bungarotoxin, venom protein E2, frontoxina III, LAO e proteínas tipo lectina tipo C. As implicações destes resultados para a produção de antivenenos contra *Micrurus* são discutidas. Ainda, como terceiro passo de investigação, duas proteínas da família das 3FTx, com massas moleculares de 6435,4 Da e 6504,6 Da foram purificadas à partir do veneno de *M. lemniscatus* e tiveram sua toxicidade ensaiada contra células de parasitas e de mamíferos. Ambas as proteínas foram tóxicas para formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, apresentando uma porcentagem de morte de 49% e 39% dos protozoários, respectivamente, na concentração de 50 μ g/mL. Entretanto, as mesmas proteínas mostraram-se tóxicas para macrófagos isolados de camundongos.

Abstract

Coral snakes from *Micrurus* genus are the main representatives of the Elapidae family in South America. However, biochemical and pharmacological features of the constituents of their venoms remain poorly investigated. In this study, venom analyses were carried out aiming a deeper understanding of the composition of the venoms of *M. frontalis*, *M. ibiboboca*, and *M. lemniscatus*. To achieve this goal, two-dimensional chromatography and mass spectrometry analyses, together with N-terminal sequencing were employed. In these three observed venoms, proteins with masses ranging from 6 to 8 kDa and 12 to 14 kDa, related to 3FTx and PLA₂ protein families, respectively, were found to be the most abundant. We also report, for the first time, the N-terminal sequence of four new proteins purified from the *M. lemniscatus* venom that are similar to 3FTx, PLA₂ and Kunitz-type protease inhibitor from other *Micrurus* and elapid venoms. Moreover, cross-reactivity among different *Micrurus* venoms and antivenoms (anti-*M. corallinus*, anti-*M. frontalis*, anti-*M. ibiboboca* and anti-Elapidic) was carried out by means of 2D-electrophoresis and immunoblotting assays. The generic anti-Elapid venom displayed the highest degree of cross-reactivity. Conversely, anti-*M. corallinus* reacted weakly against *M. frontalis*, *M. lemniscatus*, *M. ibiboboca* and *M. spixii* venoms. In gel digestions, followed by mass spectrometry analyses and databank similarity searching, revealed the most immunogenic protein families as similar to short and long neurotoxins, weak neurotoxins, PLA₂, β -bungarotoxin, venom protein E2, frontoxin III, L-amino acid oxidase and C-type lectin. The implications of our results for the production of *Micrurus* antivenoms are discussed. Additionally, two proteins from 3FTx family, with molecular masses of 6435,4 Da and 6504,6 Da, were purified from the venom of *M. Lemniscatus*. Their toxicity against *Leishmania* and mammals cells was tested. Both proteins were toxic to promastigotic forms of the *L. (L). amazonensis*, leading to 49% and 39%, respectively, of death on the protozoan population in the 50 μ g/mL concentration. However, both proteins were also toxic to mice macrophages.



1. *INTRODUÇÃO*

1 Introdução

1.1 Aspectos gerais e dados epidemiológicos do ofidismo

Em vários países, principalmente países tropicais e subtropicais em desenvolvimento, o envenenamento por picadas de serpentes vem sendo considerado um problema de saúde pública negligenciado (Chippaux, 1998; Theakston, Warrell *et al.*, 2003). As regiões mais afetadas são a Ásia, África, Oceania e América Latina, onde se observa um maior índice de morbidade e mortalidade, devido ao falho sistema de saúde pública, à escassez de antivenenos e à dificuldade de acesso aos mesmos (Theakston e Warrell, 2000; Theakston, Warrell *et al.*, 2003). A estimativa anual é que ocorram, em todo o mundo, entre 421 mil e 1.841 milhões de envenenamentos, com um índice de letalidade entre 20 e 94 mil casos (Kasturiratne, Wickremasinghe *et al.*, 2008).

Mais recentemente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) (2009) reconheceu os acidentes ofídicos como doenças tropicais negligenciadas, o que irá certamente contribuir para um aumento no aporte financeiro e de interesse público para combater este problema (Who, 2010).

Na América do Sul, pela sua grande extensão e diversidade de habitats, o Brasil é o país que apresenta o maior número de acidentes ofídicos, embora países como Peru, Venezuela, Colômbia, Equador e Argentina, também, apresentem grande importância epidemiológica (Warrell, 2004). No Brasil, de 1990 a 1993, 20 mil casos de acidentes foram notificados, com 90 mortes por ano (Saúde, 2001). Porém, esse índice de envenenamento vem aumentando ao longo dos anos. Em 2003 foram notificados, 25.478 casos de envenenamento em todo o país (Brasil e Saúde, 2005).

No território brasileiro observa-se um maior número de casos de ofidismo, nas regiões norte, nordeste e sudeste, sendo as regiões sul e centro-oeste as menos afetadas. Tais acidentes acometem, principalmente, indivíduos do sexo masculino, trabalhadores rurais, na faixa etária de 15 a 49 anos, atingindo normalmente os membros inferiores (Brasil e Saúde, 2005).

Os acidentes ofídicos apresentam considerável importância médica em virtude da sua grande frequência e gravidade, sendo considerado um problema de saúde pública no

Brasil (Saúde, 2001). Casos de envenenamento se não levam o indivíduo a óbito, podem deixar sequelas fisiológicas irreversíveis, causando um grave transtorno sócio-econômico para o país.

A maior incidência de ataques, no Brasil, ocorre com serpentes do gênero *Bothrops* (87,5%), seguida do gênero *Crotalus* (9,2%) e *Lachesis* (2,7%). Em contrapartida, um menor número de envenenamento (0,6%) é atribuído aos acidentes elapídicos, causado pelas serpentes pertencentes ao gênero *Micrurus* (Fig.1) (Brasil e Saúde, 2005). Entretanto, no que se trata de letalidade, é observado um maior índice de morte em acidentes provocados por serpentes do gênero *Crotalus* (Araújo, Santalúcia *et al.*, 2003).

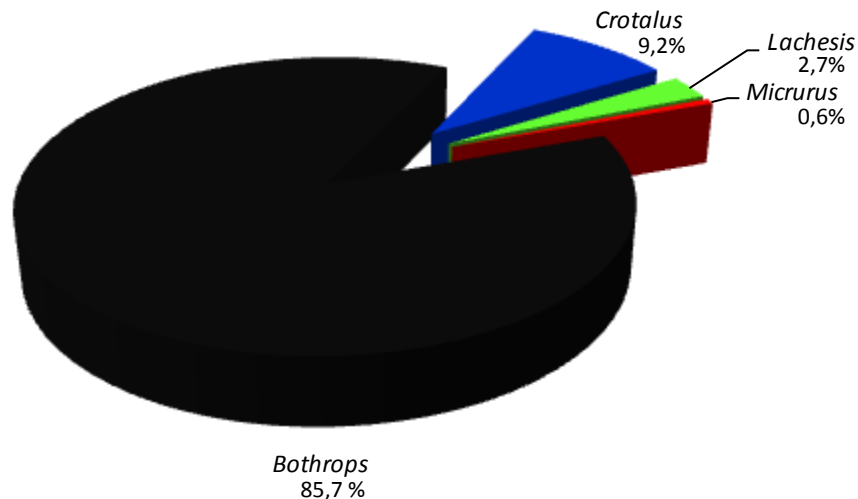


Figura 1: Distribuição dos acidentes ofídicos no Brasil, segundo o gênero (Brasil e Saúde, 2005)

Existem alguns estudos mais recentes publicados, com dados epidemiológicos por regiões brasileiras, que não apresentam grandes diferenças dos dados publicados pelo Ministério da Saúde. No estado de São Paulo, por exemplo, 506 casos de ofidismo foram notificados entre 1999 e 2004, sendo o maior número de registros atribuídos a serpentes do gênero *Bothrops*. Um baixo índice de letalidade é observado por acidentes com serpentes do gênero *Micrurus*, apesar desde apresentar um veneno altamente neurotóxico (Rojas, Almeida Santos *et al.*, 2007).

Em 2004, um estudo epidemiológico no estado de Goiás mostrou que dos 2.350 casos de envenenamento relatados, 78,6% foram causados por serpentes do gênero *Bothrops*, 28,8% por *Crotalus* e 6% por *Micrurus*, sendo a letalidade geral de 0,46% (Pinho, Oliveira *et al.*, 2004). O maior índice de notificação correspondeu aos acidentes crotales. Já na região nordeste do país, no período de 1999-2003, foram notificados 15.345 casos e 57 óbitos registrados, com letalidade geral de 0,37%, sendo o Rio Grande do Norte o estado onde observou-se o maior número de óbitos (Lira-Da-Silva, Mise *et al.*, 2009). Na Amazônia, região norte do país, 2.680 casos de ofidismo foram registrados entre os anos de 1991 e 1999, com a maior letalidade (0,8%) entre as cinco regiões do país (Araújo, Santalúcia *et al.*, 2003). No estado de Minas Gerais, região sudeste do país, no período de 2001 a 2005, os acidentes ofídicos ocorreram com maior frequência nas Macrorregiões Leste do Sul, Nordeste, Leste do estado e região do Jequitinhonha. A maior parte destes acidentes foi provocada por serpentes do gênero *Bothrops* (81%) e *Crotalus* (18%), no período de maio a outubro, acometendo indivíduos com idade entre 20 e 59 anos, quando estavam em suas atividades de trabalho (Secretaria do Estado de Minas Gerais, 2006).

Os dados epidemiológicos muitas vezes não correspondem à realidade. Acredita-se muito na subnotificação dos acidentes, por parte da população, uma vez que em muitas regiões do país ainda é deficiente o sistema de informação e notificação. Porém de forma geral, observa-se uma diminuição no número de óbitos, onde na década de 80 girava em torno de 250 por ano e atualmente em torno de 110 por ano (Cardoso e Wen, 2003). Tal fato pode ser explicado pelo desenvolvimento biotecnológico na produção de soro e na maior eficiência e capacitação da sua distribuição. Em 1987, o Programa Nacional de Controle de Acidentes por Animais Peçonhentos implementou uma política de coordenação de produção, distribuição de antivenenos, capacitação de recursos humanos e vigilância epidemiológica em todas as regiões brasileiras, visando uma melhor eficiência no controle e tratamento dos acidentes (Araújo, Santalúcia *et al.*, 2003).

O envenenamento por serpentes peçonhentas ocorre através da inoculação do veneno na vítima, através das presas. O veneno contém uma variedade de proteínas, com diversas atividades farmacológicas, capazes de promover diferentes manifestações

clínicas. Como mencionado acima, os quatro gêneros de serpentes com importância médica no Brasil são *Bothrops*, popularmente conhecida como jararaca, *Crotalus* (cascavel), *Lachesis* (surucucu) e *Micrurus* (cobra-coral).

Comparando os estudos realizados com esses quatro tipos de venenos, pode-se observar uma grande discrepância de informações e conhecimentos gerados. Os venenos de *Bothrops* e *Crotalus* encontram-se mais explorados no âmbito da pesquisa bioquímica e farmacológica, quando comparados aos venenos das serpentes pertencentes ao gênero *Micrurus*. Como base de comparação, uma rápida pesquisa no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (2011 - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/>), em julho de 2011, forneceu 1336 artigos relacionados ao veneno das serpentes botrópicas, 1279 ao gênero crotálico e apenas 21 relatos de estudos relacionados aos venenos de serpentes do gênero *Micrurus*.

Tal fato não se explica apenas pelo alto índice de acidentes botrópicos e crotálicos e ao baixo índice de acidentes elapídicos no Brasil, o que poderia se tornar um incentivo maior para os pesquisadores explorar os primeiros venenos e negligenciar estes últimos. Mas também, pela grande dificuldade que se tem de obter venenos elapídicos.

As serpentes do gênero *Micrurus* são mais difíceis de se encontrar na natureza, são animais de pequeno porte, fossoriais e, quando capturadas, apresentam grande dificuldade de manutenção em cativeiro. Morfologicamente, possuem glândulas veneníferas pequenas, o que acarreta em uma baixa quantidade de veneno adquirida na extração do mesmo. A pequena aquisição de veneno implica em um aproveitamento, quase que exclusivo deste, para a produção sorológica. O baixo índice de acidentes, não torna as serpentes do gênero *Micrurus* menos importantes, uma vez que estas apresentam um veneno rico em toxinas que podem levar o indivíduo a óbito, por parada cardíaco-respiratória.

Nos últimos anos, a pouca quantidade de veneno tem deixado de ser um empecilho nos estudos bioquímicos de venenos, sendo assim, vários estudos e descobertas de novas proteínas tem sido realizados. Tal fato se deve à evolução das técnicas proteômicas como espectrometria de massas (MS), cromatografia líquida (LC) e eletroforese bidimensional (Gel-2D). Técnicas proteômicas tem auxiliado na

caracterização e na diferenciação de venenos de diferentes espécies de serpentes como *Bothriechis lateralis*, *Bothriechis schlegelii*, *Alsophis portoricensis*, *Bothrops atrox*, *Crotalus durissus terrificus*, *Bothrops cotiara*, *Bothrops fonsecai*, *Bothrops jararacussu*, incluindo espécies de elapídeos como *M. nigrocinctus*, *M. altirostris* e *M. corallinus* (Lomonte, Escolano *et al.*, 2008; Tashima, Sanz *et al.*, 2008; Correa-Netto, Teixeira-Araujo *et al.*, 2010; Georgieva, O Hler *et al.*, 2010; Weldon e Mackessy, 2010; Calvete, Sanz *et al.*, 2011; Corrêa-Netto, Junqueira-De-Azevedo *et al.*, 2011; Fernandez, Alape-Giron *et al.*, 2011).

O único e efetivo tratamento para o envenenamento ofídico é a administração intravenosa de antivenenos específicos. Entretanto, sabe-se que infelizmente, alguns antivenenos podem não proteger satisfatoriamente os pacientes. Tal fato pode ser explicado pelos antivenenos produzidos não possuírem todos os anticorpos capazes de reconhecer e neutralizar proteínas específicas do veneno (Espino-Solis, Riaño-Umbarila *et al.*, 2009). Para a fabricação de um antiveneno com melhor poder de neutralização, um passo crucial é a escolha do veneno a ser utilizado nas etapas de imunização (Gutiérrez, Le N *et al.*, 2011). Com isso torna-se necessário um estreito conhecimento bioquímico sobre os venenos.

A proteômica, assim como, os estudos venômicos e anti-venômicos abriram espaço não só para a descoberta de novas proteínas nos venenos destes animais peçonhentos, mas, também, vem auxiliando na melhoria na produção de soro, possibilitando a descoberta de proteínas mais imunogênicas e o estudo de reações cruzadas entre os venenos e antivenenos. Estes estudos podem contribuir para a fabricação de antivenenos mais específicos e com maior capacidade de neutralização. Podem, também, ajudar na prospecção de novas moléculas com potencial farmacológico e biotecnológico.

Estando de acordo com a necessidade de melhorar a produção sorológica e a descoberta de novas proteínas com potencial biotecnológico, o presente trabalho teve como finalidade o estudo venômico e anti-venômico dos venenos de serpentes do gênero *Micrurus*. Ainda, a utilização de técnicas de separação cromatográfica e caracterização bioquímica permitiram o isolamento e caracterização parcial de duas toxinas citotóxicas de uma das espécies estudadas.

1.2 As serpentes

1.2.1 Características morfológicas gerais e seus venenos

As serpentes são animais pertencentes ao filo Chordata, sub filo Vertebrata, classe Reptilia, sub-ordem Serpentes (Pough, Jamis *et al.*, 2003). Encontram-se distribuídas por quase todos os ambientes do mundo, com exceção das calotas polares, onde o clima frio impossibilita a vida de vertebrados ectotérmicos. Habitam principalmente regiões temperadas e tropicais. Em relação à alimentação, praticamente todas as serpentes são carnívoras, tendo como presas moluscos, artrópodes, peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos, inclusive algumas serpentes são ofiófagas, ou seja, alimentam-se de outras serpentes (Cadle, 1987).

Para capturar e digerir a presa, as serpentes contam com um aparato de produção e inoculação de veneno, no qual se destacam as glândulas produtoras de veneno e as presas capazes de inocular o mesmo (Pough, Jamis *et al.*, 2003). As glândulas de venenos de Viperidae são longas e triangulares, podendo ser divididas em vários compartimentos, com um lúmen grande capaz de estocar uma grande quantidade de veneno. Já as glândulas de veneno dos Elapídeos normalmente apresentam um lúmen menor, com uma menor capacidade de estocagem de veneno (Kardong, 2002).

Em relação às presas, as serpentes podem ser classificadas em áglifas, opistóglifas, proteróglifa e solenóglifa (Kardong, 1982). As serpentes peçonhentas são as que possuem, portanto, a capacidade de inocular seu veneno, possuindo dentição proteróglifa ou solenóglifa. As primeiras apresentam presas anteriores localizadas no maxilar, com canal não completamente fechado e conectado com as glândulas de venenos. Já as com dentição solenóglifa possuem presas grandes que permanecem paralelas ao crânio quando em repouso, formando um ângulo de 90° com o mesmo, no momento do ataque. As serpentes áglifas e opistóglifas são ditas não peçonhentas (Kardong, 1982).

Existem atualmente cerca de 2.900 espécies de serpentes no mundo, distribuídas em 465 gêneros e 20 famílias (Tamiya e Fujimi, 2006). A pesquisa taxonômica no NCBI classifica as espécies de serpentes em cinco famílias dentro da superfamília

Colubroidea: Atractaspididae, Colubridae, Elapidae, Hydrophiidae e Viperidae. A Colubridae é a maior e mais diversificada família de serpentes (> 1700 espécies), com membros encontrados em vários hábitat em todo o mundo (Campbell e Campbell, 2001).

No Brasil, as serpentes se encontram distribuídas em 9 famílias, 75 gêneros e 321 espécies. As serpentes peçonhentas são representadas pela família Viperidae e Elapidae. As serpentes da família Viperidae são identificadas pela cabeça triangular, recoberta de escamas e pela dentição do tipo solenóglifa. A presença de fosseta loreal é característica de toda a subfamília Crotalinae, onde encontramos os gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis* (Fig. 2A-C) (Franco, 2003). A família Viperidae, possui cerca de 250 espécies e apresentam-se como o mais importante grupo de serpentes em nível de saúde pública. Na família Elapidae os indivíduos são classificados como proteróglifos, possuem cabeça arredondada e sem fosseta loreal. São serpentes mais encontradas na Ásia, África e Austrália, onde se destacam as serpentes do gênero *Naja*, *Bungarus* e *Oxyuranus*. Nas Américas, esta família está, principalmente, representada pelas cobras-coraais pertencentes ao gênero *Micrurus* (Fig. 2D), porém podem ser encontrados ainda os gêneros *Leptomicrurus* e *Micruroides* (Melgarejo, 2003)

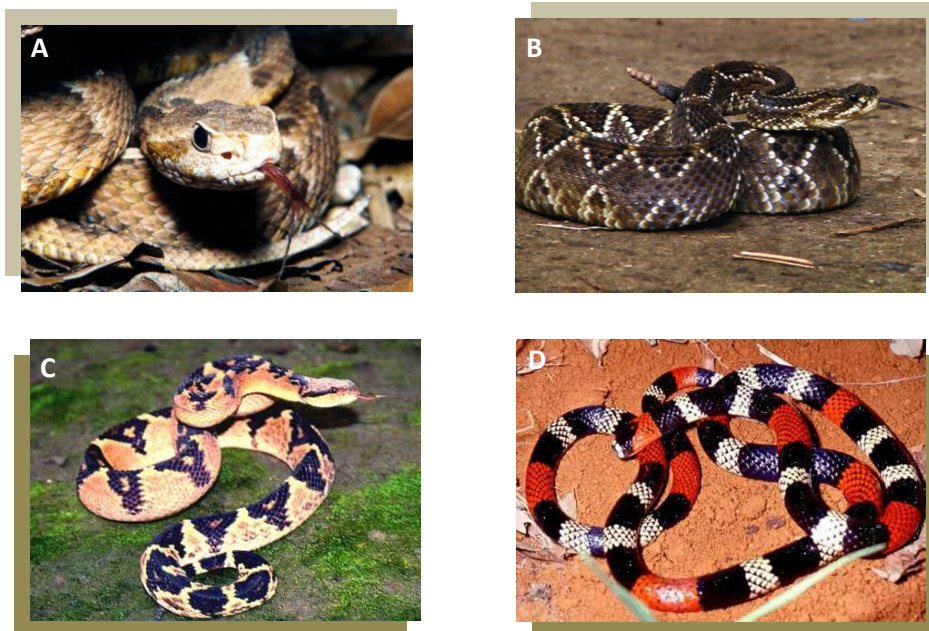


Figura 2: Serpentes da família Viperidae e Elapidae. (A) *Bothrops*, (B) *Crotalus*, (C) *Lachesis* e (D) *Micrurus*.

(Fonte: Melgarejo, 2003, www.itsseguros.com.br/Fotos/2006/crotalus.jpg,
http://portaldoprofessor.mec.gov.br/storage/recursos/9721/bothrops_neuwiedi.jpg)

O envenenamento é provocado pela inoculação do veneno após a picada da serpente. Tais venenos são compostos por uma mistura complexa de proteínas, peptídeos, carboidratos, lipídeos, íons metálicos e compostos orgânicos, sendo que as proteínas e peptídeos apresentam 90% do peso seco (Jorge Da Silva, 2001). Entretanto, é importante ressaltar que a composição, propriedades bioquímica e farmacológica do veneno podem variar entre as espécies ou entre indivíduos de uma mesma espécie, devido a fatores como, dieta, sazonalidade, habitat, idade e dimorfismo sexual (Meier, 1986; Gutiérrez, Avila *et al.*, 1990; Chippaux, Williams *et al.*, 1991; Monteiro, Yamanouye *et al.*, 1998; Andrade e Abe, 1999; Saravia, Rojas *et al.*, 2002; Saldarriaga, Otero *et al.*, 2003; Pimenta, Prezoto *et al.*, 2007; Zelanis, Travaglia-Cardoso *et al.*, 2008).

As manifestações clínicas em humanos, após os ataques das serpentes, são dependentes de dois fatores: da composição e toxicidade intrínseca de cada veneno e da quantidade de veneno injetado. Dependendo da espécie as manifestações observadas podem ser presença de paralisia flácida, miólise sistêmica, hemorragia e distúrbio no sistema de coagulação sangüínea, falência ou algum dano renal, cardiotoxicidade e dano tecidual no local da ferida (Koh, Armugam *et al.*, 2006).

Alguns estudos mostram que as toxinas dos venenos podem ser agrupadas em superfamílias com atividade enzimática e não enzimática. Algumas dessas famílias são: família das toxinas em estrutura de três dígitos (*three-fingers* – 3FTxs), família de inibidores de proteases, família das lectina, família das PLA₂, família das serina proteases e família das metaloproteases. Dentro de uma mesma família pode-se observar uma grande similaridade em termos estruturais (estrutura primária e terciária), podendo haver, entretanto, divergências nos aspectos farmacológicos (Kini e Doley, 2010).

Venenos produzidos por serpentes da família Viperidae contêm proteínas que interferem na cascata de coagulação, no sistema homeostático normal e no reparo tecidual. Processos hemorrágicos e necrose no local da picada são bem característicos (Markland, 1998; Watanabe, Shannon *et al.*, 2003; Fox e Serrano, 2005; Gutiérrez,

Rucavado *et al.*, 2005). O envenenamento pode causar hemorragia que é provocada, principalmente, por metaloproteases dependentes de Zn^{+} (Bjarnason e Fox, 1994). Tais venenos contêm mais que 100 componentes proteicos (Serrano, Shannon *et al.*, 2005), pertencentes a poucas famílias proteicas, incluindo enzimas como serino proteases, metaloproteases, L-aminoácido oxidase (LAO), fosfolipases (PLA₂) e proteínas sem atividade enzimática como as desintegrinas, lectinas tipo-C, peptídeos natriuréticos, miotoxinas, toxinas tipo CRISP, fator de crescimento endotélio vascular, inibidores de proteases do tipo kunitz (Markland, 1998; Fry e Wüster, 2004; Calvete, Marcinkiewicz *et al.*, 2005; Serrano, Shannon *et al.*, 2005). O gênero *Bothrops* e *Crotalus* merecem destaque devido ao seu alto índice de acidentes no Brasil.

O veneno botrópico induz várias reações locais devido à combinada ação de proteases, fatores hemorrágicos, PLA₂, e liberação de mediadores endógenos (Lomonte e Gutierrez, 1989). Apresentam atividade arginina éster hidrolase, moderada ou alta atividade fosfodiesterase, porém sem atividade acetilcolinesterase (Tan e Ponnudurai, 1991). Uma das toxinas mais estudadas deste veneno é a Jararagina, isolada da espécie *B. jararaca*. Esta toxina é um metaloprotease hemorrágica que promove inflamação e inibe a agregação plaquetária (Kamiguti, Hay *et al.*, 1996; Clissa, Laing *et al.*, 2001).

Explorando o veneno de serpentes do gênero *Crotalus* pode-se dar destaque a Crotamina, uma toxina composta de 42 resíduos de aminoácidos e três ligações dissulfetos. Esta toxina induz despolarização de membrana em células musculares esqueléticas e influxo de Na^{+} , por meio da interação com canais de sódio nas células musculares (Chang, Hong *et al.*, 1983). Porém, o maior componente tóxico do veneno de *Crotalus* é a Crotoxina, uma PLA₂ com atividade neurotóxica que age na junção neuromuscular bloqueando a transmissão de sinais nervosos (Habermann e Breithaupt, 1978).

1.2.2 Venenos Elapídicos

Dentre todos os venenos, os mais temidos são os produzidos pelas serpentes da família Elapidae por apresentarem toxinas neurotóxicas que agem no sistema nervoso central, promovendo morte por parada cardíaco-respiratória. Nessa família encontram-se as famosas cobras asiáticas, africanas e australianas. Os sintomas observados no

paciente acometido por esse tipo de envenenamento, aparecem em torno de 30 minutos a 1 hora após o acidente e estão relacionados à paralisia dos nervos cranianos. Os resultados desta paralisia são ptose palpebral, oftalmoplegia (paralisia da musculatura ocular), visão turva, dificuldade na fala e na deglutição, salivação e fraquesa nos músculos faciais (Karalliedde, 1995; Phui Yee, Nanling *et al.*, 2004).

De maneira geral, os venenos elapídicos podem apresentar atividade miotóxica, neurotóxica, hipotensiva, hemolítica e podem promover coagulação sanguínea (Weis e Mcisaac, 1971; Alape Girón, Persson *et al.*, 1999). Entretanto, vale ressaltar que a composição do veneno varia, consideravelmente, entre estas espécies de serpentes.

O veneno da *Naja*, por exemplo, contém componentes biologicamente ativos como, PLA₂, cardiotoxinas, neurotoxinas, miotoxinas e fatores de veneno de cobra (Eggertsen, Lind *et al.*, 1981; Harvey, Barfaraz *et al.*, 1994; Chang, Lin *et al.*, 2000). Como já relatado com outras espécies, os venenos de *Naja naja*, de três regiões distintas da Índia apresentam variações intra-específica na sua composição, nas suas propriedades bioquímicas e farmacológicas (Shashidharamurthy, Jagadeesha *et al.*, 2002). Venenos de *N. naja* que habitam as regiões mais a leste apresentam um veneno com atividade neurotóxica e procoagulante, enquanto que as serpentes das regiões do oeste da Índia possuem uma atividade mais miotóxica e anticoagulante.

Do veneno de *N. kaouthia* foram identificados 12 grupos de proteínas de acordo com suas diferenças na atividade biológica. Tais proteínas foram similares a cardiotoxinas (citotoxinas), fatores de veneno de cobra, toxinas ricas em cisteínas, proteínas tipo toxinas muscarínicas, α -neurotoxinas, oxiglutarato desidrogenase, PLA₂, soro albumina e *weak* neurotoxinas (Kulkeaw, Chaicumpa *et al.*, 2007). No veneno de *N. naja atra*, foi observado um maior conteúdo de cardiotoxinas, em relação a PLA₂ e α -neurotoxinas, sendo ainda detectados hemotoxinas e ausência de metaloproteases (Li, Wang *et al.*, 2004).

Algumas proteínas da família CRISPs (*Cysteine-rich secretory proteins*) já foram detectadas em venenos elapídicos, como de *Pseudechis australis*, *N. kaouthia*, *Ophiophagus hannah*, *Bungarus candidus* e *N. atra* (Brown, Haley *et al.*, 1999; Osipov, Weise *et al.*, 2001; Jin, Lu *et al.*, 2003; Yamazaki e Morita, 2004). Estas são um grupo

de proteína básicas secretadas, de cadeia única, com massa molecular em torno de 20-30 kDa, com 8 pontes dissulfetos (Osipov, Levashov *et al.*, 2005). Latisemina, uma proteína CRISP (*Laticauda semifasciata*) age bloqueando canal de sódio, o que promove o bloqueio da despolarização em células musculares (Yamazaki, Koike *et al.*, 2002). Já, Pseudochetonina e Pseudecina duas proteínas expressas e caracterizadas do veneno de *Pseudechis australis* e *P. porphyriacus*, respectivamente, bloqueiam canais homotetraméricos retinal (CNGA2) e olfatório (CNGA1) (Brown, Haley *et al.*, 1999; Yamazaki, Koike *et al.*, 2002).

Vários peptídeos natriuréticos já foram isolados do veneno de elapídeos, como de venenos de serpentes do gênero *Acanthophis*, *Oxyuranus*, *Dendroapis* e *Micrurus* (Schweitz, Vigne *et al.*, 1992; Ho, Soares *et al.*, 1997; Fry, Wickramaratna *et al.*, 2002; Fry, Wickramaratana *et al.*, 2005). Os peptídeos apresentam importante ação no envenenamento da presa, promovendo a vasodilatação e o aumento da permeabilidade do capilar, o que pode facilitar a difusão rápida de toxinas até seu sítio de ação. As atividades hipotensiva e vasodilatadora, são caracterizadas pela ação dos peptídeos através da ligação a guanilil ciclases ligadas a membrana (Misono, 2002). Peptídeos natriuréticos foram clonados a partir do cDNAs da glândula de veneno de *M. corallinus*, um dos elapidicos mais importantes no Brasil (Ho, Soares *et al.*, 1997).

A Dendrotoxina, isolada do veneno da serpente *D. angusticeps*, tem a sua atividade provocada através do aumento da liberação de acetilcolina na junção neuromuscular (Harvey, 2001). Esta toxina é um homodímero constituído de 59 resíduos de aminoácidos, com três ligações dissulfetos. Apresentam alto grau de similaridade com as serino proteases do tipo-kunitz, apesar de apresentarem baixa ou nenhuma atividade de inibição de proteases (Harvey, Marshall *et al.*, 1992). A atividade neurotóxica da Dendrotoxina está relacionada com o bloqueio de canais de K⁺ neuronal (Harvey, 2001). Deste mesmo gênero, foi isolada a Fasciculina, uma neurotoxina que interfere com a neurotransmissão colinérgica, inibindo a atividade da acetilcolinesterase, presente na junção neuromuscular (Chiappinelli, 1992).

Apesar dos estudos mostrarem a presença de diferentes tipos de proteínas nos venenos das serpentes da família Elapidae, os principais componentes são neurotoxinas que irão interferir na neurotransmissão colinérgica. As neurotoxinas podem apresentar

diferentes mecanismos de ação podendo interagir com diferentes alvos. Elas podem atuar promovendo a inibição de receptores de acetilcolina nicotínicos (nAChR) (ex: α -bungarotoxina de *Bungarus multicinctus*) e muscarínicos (toxinas muscarínicas, MT de *Dendroaspis viridis*), podem agir bloqueando canais iônicos (dentrotoxina de *D. angusticeps*) e inibindo a ação da enzima acetilcolinesterase (Clarke, Schwartz *et al.*, 1985; Harvey, 2001; Harvey, Kornisiuk *et al.*, 2002) . Os sítios pré-sinápticos da junção neuromuscular de músculos esqueléticos, também, podem sofrer a ação de neurotoxinas pré-sinápticas (β -neurotoxinas). Estas são enzimas que possuem atividade fosfolipásica ou apresentam a PLA₂ como componente do complexo proteico. A atividade das β -neurotoxinas baseia-se na inibição da liberação da acetilcolina (ACh, tal neurotoxina pode ser representada pela β -bungarotoxina (Yang, 1994).

1.3 Principais famílias de toxinas dos venenos elapídicos: 3FTxs e PLA₂

1.3.1 *Three-fingers* – 3FTxs (α -neurotoxinas e cardiotoxinas - citotoxinas)

As 3FTxs já foram isoladas dos venenos de serpentes da família Elapidae, Columbridae e Hydrophilidae. Por meio de estudos de transcriptoma, também, se pode observar a presença dos genes que codificam estas proteínas em viperídeos e crotalídeos (Strizhkov, Blishchenko *et al.*, 1994; Pawlak, Mackessy *et al.*, 2006; Chen, Kao *et al.*, 2007; Pahari, Mackessy *et al.*, 2007; Pawlak, Mackessy *et al.*, 2009).

As 3FTxs formam uma família de proteínas compostas por 60 a 74 resíduos de aminoácidos, com a presença de 4 a 5 ligações dissulfetos, onde quatro dessas ligações mostram-se conservadas. Outra característica dessa família de proteínas é a ausência de atividade enzimática (Endo e Tamiya, 1991). Estas proteínas apresentam uma estrutura tridimensional formada por três alças adjacentes, que emergem de um pequeno núcleo hidrofóbico ligado pelas ligações dissulfetos. As alças se assemelham a três dedos e apresentam folhas β como estruturas secundárias (Fig. 3) (Endo e Tamiya, 1991; Ménez, 1998; Tsetlin, 1999; Kini, 2002).



Figura 3: Estruturas terciárias das 3FTx. (A) Neurotoxina II de *Naja oxiana* e (B) α -CTX, Cobratotoxina de *N. siamensis*. Os números romanos representam as três alças. Em azul estão as folhas- β e em amarelo as ligações dissulfetos. I a III representam as alças (FI, FII e FII) (Tsetlin, 1999).

Uma grande similaridade estrutural é observada nos membros dessa família, a saber: (I) a presença de oito resíduos de cisteínas conservados, formando o núcleo hidrofóbico, (II) resíduos aromáticos de triptofano (Tyr25) ou de fenilalanina (Phe27) que são encontrados na maioria das proteínas dessa família e são importantes para o seu enovelamento, (Aird, Womble *et al.*) a estrutura das fitas β antiparalelas, (IV) presença de resíduos de aminoácidos carregados, que também ajudam na estruturação das proteínas (Endo e Tamiya, 1991; Antil, Servent *et al.*, 1999; Torres, Kini *et al.*, 2001).

Apesar da similaridade estrutural, em termos de mecanismo de ação, pode-se observar uma ampla variedade de atividades farmacológicas como, neurotoxicidade, cardioxicidade, citotoxicidade, atividade hipotensiva e anticoagulante, atividade antimicrobiana e de agregação plaquetária (Ménez, 1998; Tsetlin, 1999; Kini, 2002; Rajagopalan, Pung *et al.*, 2007).

Dentro da grande família de 3FTXs estão as toxinas muscarínicas que se ligam a receptores de acetilcolina muscarínicos, as κ -bungarotoxina, que se ligam a receptores nicotínicos neuronais, as fasciculinas, que inibem a acetilcolinesterase e as calsiceptinas que bloqueiam canais de Ca^{+2} (Karlsson, Mbugua *et al.*, 1984;

Jerusalinsky e Harvey, 1994). Entretanto, as mais abundantes 3FTxs encontradas nos venenos são as α -neurotoxinas e as cardiotoxinas (citotoxinas).

As α -neurotoxinas agem na junção neuromuscular da musculatura esquelética, ligando-se de forma reversível e com alta afinidade à receptores nicotínicos pós-sináptico, promovendo o bloqueio da transmissão neuromuscular, por inibir a ligação da ACh (Servent, Winckler-Dietrich *et al.*, 1997; Tsetlin, 1999). Estas não interferem na abertura de canais iônicos na membrana (Endo e Tamiya, 1987).

Os nAChR foram melhor caracterizados após o isolamento da α -bungarotoxina (Chu, 2005) e estão distribuídos na membrana pós-sináptica da junção neuromuscular, mediando a comunicação intracelular entre a célula nervosa e a célula muscular esquelética (Nirthanan e Gwee, 2004). Estes receptores são formados por um complexo pentamérico de proteínas transmembrânicas, com massa molecular aproximada de 290 kDa, que se organizam na formação de um poro iônico, seletivo para o íon Na^+ (Karlin, 2002) . Os mais bem caracterizados nAChR musculares, são os formados pelas subunidades $(\alpha 1)_2\beta\gamma\delta$ em células embrionárias e $(\alpha 1)_2\beta\epsilon\delta$ em células adultas. O sítio de ligação das α -neurotoxinas, está na interface das subunidades α/γ e α/δ , que são os mesmos sítios de ligação à ACh (Fig. 4) (Kreienkamp, Utkin *et al.*, 1992; Corringer, Novère *et al.*, 2000).

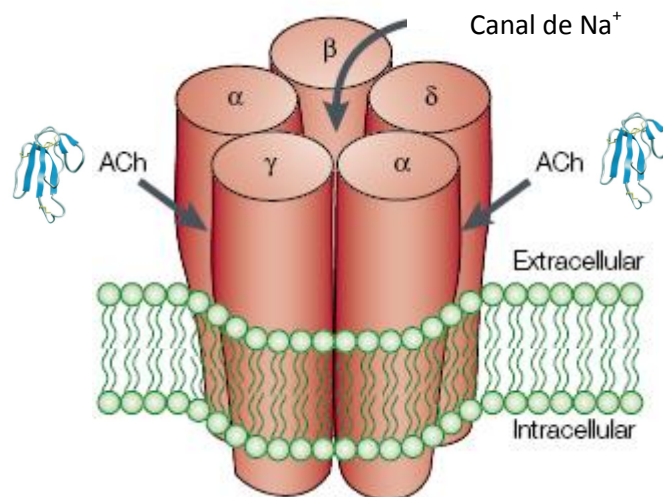


Figura 4: Estrutura de receptores nAChR muscular e o sítio de ligação das α -neurotoxinas (Tsetlin, 1999; Karlin, 2002) - adaptado.

As neurotoxinas pós-sinápticas podem ser classificadas em quatro grupos: neurotoxinas de cadeia curta, neurotoxinas de cadeia longa, κ -neurotoxinas (neurotoxinas de cadeia longa atípica) e neurotoxinas não convencionais (*weak* neurotoxinas) (Servent e Menez, 2001).

As neurotoxinas de cadeia curta são constituídas por uma única cadeia polipeptídica e apresentam de 60 a 62 resíduos de aminoácidos ligados por 4 ligações dissulfeto. As ligações dissulfeto podem ser encontradas entre resíduos específicos de cisteínas (Cis): Cis 3-24, Cis 17-45, Cis 49-60 e Cis 61-66 (Endo e Tamiya, 1991). Por outro lado, as α -neurotoxinas de cadeia longa possuem entre 66 e 75 resíduos de aminoácidos, com cinco ligações dissulfeto (Mordvintsev, Polyak *et al.*, 2005). A ligação dissulfeto adicional está localizada na alça II, entre os resíduos Cis 30 e 34. Esta diferença estrutural leva a uma diferença na cinética de interação com os nAChR musculares, para qual alguns estudos mostram que as α -neurotoxinas de cadeia curta possuem uma cinética de associação e dissociação mais rápida do que as α -neurotoxinas de cadeia longas. Ainda, as neurotoxinas de cadeia longa ligam-se com alta afinidade a nAChR musculares e a nAChR α -7 neuronal, enquanto as neurotoxinas de cadeia curta ligam-se com alta afinidade a nAChR muscular e baixa afinidade a nAChR α -7 neuronal (Antil-Delbeke *et al.*, 2000 e Servent *et al.*, 1997).

Cobrotoxina (neurotoxina de cadeia curta) e α -cobrotoxina (neurotoxina de cadeia longa), ambas isoladas de *N. atra*, mostraram atividade analgésica. Cobrotoxina é um ligante específico de nAChR α 1, ligação essa que promove forte ação analgésica, enquanto α -cobrotoxina mostra alta afinidade por nAChR α 7 promovendo ação anti-nociceptiva. Evidências adicionais sugerem que a cobrotoxina podem substituir a morfina (Chen, Zhang *et al.*, 2006). De forma similar, uma α -neurotoxina de *Ophiophagus Hannah*, também, mostrou atividade analgésica (Pu, Wong *et al.*, 1995).

As κ -neurotoxinas (neurotoxinas de cadeias longas atípicas) formam uma família de neurotoxinas de venenos de serpentes que estão diretamente relacionadas a α -neurotoxinas de cadeia longa. Baseado em sua similaridade estrutural com as α -neurotoxina de cadeia longa, foi caracterizada uma α -neurotoxina de cadeia longa atípica com 69 resíduos de aminoácidos e isolada a partir do veneno de *Laticauda semifasciata*. A diferença desta toxina para as α -neurotoxinas de cadeias longas típicas

está na perda da quinta ligação dissulfeto na alça II (Kim e Tamiya, 1982; Nirthanan e Gwee, 2004). As κ -neurotoxinas ligam-se com alta afinidade ao nAChR α -3 neuronal e com baixa afinidade ao nAChR α -4 neuronal (Chiappinelli, 1992). Ao contrário das α -neurotoxinas de cadeia curta, longa e das *weak* neurotoxinas, as κ -neurotoxinas podem ser encontradas formando, em solução, dímeros não covalentemente ligados. A interação entre os dímeros envolve a formação de ligação de hidrogênio e interação de Van der Waals (Dewan, Grant *et al.*, 1994).

As *weak* neurotoxinas pertencem a outro tipo de α -neurotoxinas. Estas são constituídas de 62 a 68 resíduos de aminoácidos e cinco ligações dissulfetos, sendo que, diferentemente das neurotoxinas de cadeia longa, a quinta ligação dissulfeto está localizada na alça I. Apresentam menor toxicidade, com dose letal média (DL₅₀) de aproximadamente 5-80mg/kg em camundongo, embora alguns estudos mostrem alguma variabilidade nesta toxicidade calculada (Nirthanan e Gwee, 2004). Um exemplo é a γ -bungatoxina, isolada do veneno de *Bungarus multicinctus*, que apresenta uma DL₅₀ de 0,15 mg/kg de camundongo (Aird, Womble *et al.*, 1999). Poucas sequências de aminoácidos de *weak* neurotoxinas tem sido identificadas, sendo que todas foram encontradas em serpentes pertencentes a família Elapidae, principalmente, dos gêneros *Naja* e *Bungarus*, mas também, em venenos de espécies como *Dendroapis jamesoni* e *M. corallinus* (Nirthanan, Charpantier *et al.*, 2003; Ogay, Rzhnevsky *et al.*, 2005). Estas toxinas são capazes de interagir com baixa afinidade a nAChR α -7 neuronal e nAChR muscular (Utkin, Kukhtina *et al.*, 2001).

As cardiotoxinas (ou citotoxinas) são encontradas exclusivamente em venenos de cobras são o segundo maior grupo de 3FTx dos venenos Elapídicos. Estruturalmente, mostram-se muito similares às neurotoxinas de cadeia curta, uma vez que possuem de 59 a 62 resíduos de aminoácidos, embora a função biológica seja divergente (Bilwes, Rees *et al.*, 1994). As cardiotoxinas não mostram nenhuma afinidade significativa a receptores (Dufton e Hider, 1988). Estudos bioquímicos demonstraram que as cardiotoxinas são proteínas de cadeia única, extremamente básicas e hidrofóbicas que podem provocar a despolarização e contração da musculatura esquelética ou lisa e despolarização de células nervosas. Devido à sua característica básica, com a presença de resíduos de aminoácidos com carga positiva, essas proteínas se ligam com alta

afinidade a lipídeos de membrana, que são negativamente carregados (Kumar, Pandian *et al.*, 1999).

Funcionalmente, as cardiotoxinas podem, também, promover a lise de eritrócitos (Kumar, Pandian *et al.*, 1999). A propriedade lítica das citotoxinas está associada à sua ligação à membrana celular, o que resulta em danos para a mesma. A atividade lítica foi vista em vários tipos de células como hemácias, células epiteliais, células de pulmão fetal e certos tipos de tumores (Dufton e Hider, 1988). A despolarização está associada com a abertura dos canais de Ca^{2+} e inibição dos canais de K^+ . Estas toxinas são formadoras de poros que levam a despolarização e degradação da membrana plasmática de células musculares esqueléticas. A sua cardiotoxicidade é atribuída a ligação específica de glicosaminoglicanos a motivos de carboidratos sulfatados presentes em células do tecido cardiovascular (Wang, Liu *et al.*, 2006).

Toxinas muscarínicas, que interagem com receptores de acetilcolina muscarínicos e Fasciculinas que bloqueiam acetilcolinesterases formam dois outros grupos de toxinas 3FTx (Karlsson, Jolkkonen *et al.*, 2000) Marcho, *et al.*, 1998). As neurotoxinas muscarínicas foram purificadas do veneno de mambas Africanas (*Dendroaspis angusticeps* e *D. polylepis*) e foram caracterizadas por sua capacidade de interação com vários subtipos de receptores muscarínicos (Bradley, 2000; Karlsson, Jolkkonen *et al.*, 2000).

Nos venenos de serpentes é notória a presença de várias proteínas glicosiladas, porém, até pouco tempo, nenhuma proteína 3FTx havia sido classificada como glicoproteína. Em 2004, foi isolado uma nova proteína do veneno de *N. kaouthia*, com uma sequência N-terminal similar a Citotoxina 3 isolada à partir do veneno da mesma espécie. As análises de composição de carboidrato mostraram a presença de manose, galactose, N-acetilglicosamina, fucose e ácido neuramínico na toxina (Osipov, Astapova *et al.*, 2004).

1.3.2 Fosfolipases (PLA₂)

As PLA₂ de forma geral formam uma superfamília de toxinas, que contém 17 grupos distintos ou izoenzimas encontradas em diversos organismo (invertebrados e

vertebrados), embora apenas toxinas pertencentes ao grupo IA e IIA, tem sido detectado em venenos de serpentes (Burke e Dennis, 2009). Os venenos Elapídicos apresentam PLA₂s do grupo I, com 115 a 120 resíduos de aminoácidos e sete ligações dissulfetos, enquanto os venenos Viperídeos apresentam PLA₂s do grupo II com 120 a 125 resíduos de aminoácidos e sete ligações dissulfeto (Kini e Evans, 1987). Nos venenos, as PLA₂ apresentam um importante papel no que se refere à digestão da presa, além de interferirem em vários outros processos fisiológicos, uma vez que podem apresentar diversificadas ações farmacológicas (Kini e Evans, 1987).

Como ação farmacológica as PLA₂ de venenos podem apresentar neurotoxicidade pré e pós-sináptica, miotoxicidade local e sistêmica, cardiotoxicidade, ação anticoagulante e hemolítica, promover inibição e ativação de agregação plaquetária. Desta forma são responsáveis por alterações fisiológicas como hemorragias internas, processos convulsionante, quadros de hipotensão, formação de edemas e danos teciduais (Kini, 2003). Alguns estudos ainda mostram que PLA₂ isoladas de venenos de serpentes apresentam atividades bactericida, anti-tumoral e anti-parasitária (Soares e Giglio, 2003). Fosfolipases miotóxicas são mais encontradas em viperídeos, enquanto as neurotóxicas (β -neurotoxinas) apesar de serem encontradas em viperídeos são, também, bem caracterizadas em venenos elapídicos.

Estruturalmente, as PLA₂ podem apresentar atividade como monômeros, não tendo a participação de nenhum outro componente protéico (notoxina). Entretanto algumas PLA₂ só mostram potência máxima quando formam complexos covalentemente (β -bungarotoxina) e não covalentemente (Textilotoxina) ligados a outras cadeias polipeptídicas (Kini, 1997). Essas subunidades auxiliares podem ser produtos de degradação de PLA₂, sem atividade fosfolipásica, assim como outros tipos de componentes similares aos inibidores de proteases. Nos casos citados acima, as subunidades sem atividade fosfolipásica agem como chaperonas, ajudando na ligação da PLA₂ ao seu sítio alvo, na célula pré-sináptica, afetando desta forma a neurotransmissão (Kini, 2003).

Muitas vezes, os venenos de serpentes possuem diferentes isoformas de PLA₂, sendo que cada isoforma mostra-se específica para alvos moleculares distintos, ocasionando a diversidade farmacológica. Estudos propõem que cada PLA₂ possui um

sítio farmacológico que pode ser diferente do sítio ativo (Kini, R. e Evans, H. J., 1989). O sítio farmacológico mostra-se específico para distintos sítios alvos na superfície de diferentes tipos celulares (glicoproteínas ou glicolípídeos de membrana). A interação entre toxina e sítio alvo se deve à complementariedade de carga e hidrofobicidade entre os mesmos. A afinidade de ligação da PLA₂ a um alvo proteico é de 4 a 6 vezes maior que a um alvo lipídico. Embora vários alvos extracelulares tenham sido identificados, alguns intracelulares são importantes vias de interação (Scott, 1997).

A atividade das PLA₂ pode ser dependente ou independente da sua atividade enzimática. Como pode ser observado na figura 5, a ação enzimática da PLA₂ é caracterizada pela hidrólise da ligação tipo éster (sn-2) em glicerofosfolípídeos, com a liberação de ácidos graxos e lisofosfolípídeos. Tais substratos fazem parte da estrutura da membrana de células de mamíferos, dentre outros tipos celulares (Burke e Dennis, 2009).

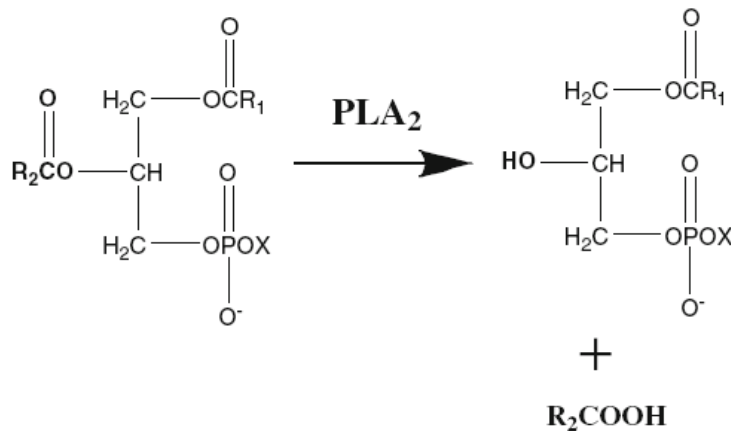


Figura 5: Catálise bioquímica da PLA₂ (Burke e Dennis, 2009)

Em contrapartida, as PLA₂ que não utilizam o poder catalítico para sua atividade, desempenham sua atividade farmacológica ligando-se ao seu sítio alvo como agonistas ou antagonistas, ou interferem na ligação do ligante natural do sítio alvo. Nestes casos ainda pode ocorrer a hidrólise de lipídeos na membrana, perto do sítio alvo, embora esse evento não seja essencial ao efeito farmacológico provocado (Kini, R. e Evans, H. J., 1989).

As PLA₂ são caracterizadas pela presença de histidina (His48) no seu sítio ativo, altamente conservado entre as diferentes isoformas. A alquilação desse resíduo induz a perda da atividade hidrolítica e a redução das ações tóxicas e farmacológicas (Melo e Ownby, 1999; Andrião-Escarso, Soares *et al.*, 2000). Tem sido notificado que íons Ca²⁺ são essenciais para a ação farmacológica baseada na atividade enzimática, porém tornam-se dispensáveis para PLA₂ que não agem de forma catalítica (Kini e Evans, 1988). As PLA₂ podem ser constituídas de uma única cadeia polipeptídica com aproximadamente 120 resíduos de aminoácidos, ou podem possuir de duas a cinco cadeias polipeptídicas (Koh, Armugam *et al.*, 2006). Podem ser compostas por seis ligações dissulfetos, ou apresentar o acréscimo de uma ou duas ligações (Schaloske e Dennis, 2006).

PLA₂ descritas com atividade anticoagulante foram isoladas dos venenos elapídicos como de *Naja nigricollis* (básica), *N. m. mossambica* (CM-III) e *Oxyuranus scutellatus* (Taipoxin) (Verheij, Boffa *et al.*, 1980). Existe certa controvérsia em relação a participação da atividade enzimática da proteína e seu poder anticoagulante. É sabido que os complexos de coagulação, como FX e protrobina, são formados em fosfolipídeos de superfícies, assim, a hidrólise de fosfolipídeos de membrana, pela PLA₂, promovem uma ação anticoagulante. Tal fato é sustentado por estudos com veneno de *N. nigricollis* e *N. atra*, nos quais a alquilação de His48, levam a perda completa de atividade enzimática e anticoagulante (Condrea, Fletcher *et al.*, 1981). A adição de EDTA, que promove a remoção de Ca⁺ do sítio ativo, também promove a perda da atividade enzimática e a diminuição da atividade anticoagulante (Kini e Evans, 1988). A modificação em resíduos de lisina (Lis) promove a perda da atividade anticoagulante, mas não a perda de atividade enzimática (Condrea, Rapuano *et al.*, 1983).

As PLA₂ conhecidas como β-neurotoxinas agem de forma pré-sináptica, afetando a liberação de Ach, sendo responsável pela alta toxicidade e paralisia respiratória. Algumas β-neurotoxinas tem sido isoladas de venenos elapídicos como β-bungarotoxin (*Bungarus multicinctus*), Taipoxin (*Oxyuranus scutellatus scutellatus*), Textilotoxina (*Pseudonaja textilis*) e Notexina (*Notechis scutatus scutatus*) (Su, Coulter

et al., 1983; Harris, Grubb *et al.*, 2000; Herkert, Shakhman *et al.*, 2001; Montecucco, Gutierrez *et al.*, 2008).

Alguns estudos propõem que as β -neurotoxinas apresentam ação extracelular, associando-se a membranas pré-sinápticas em regiões de liberação de vesículas sinápticas e iniciando a sua hidrólise, o que promove um acúmulo extracelular de ácidos graxos livres e lisofosfolípídeos. Tais produtos promovem a fusão das vesículas sinápticas com a membrana, promovendo o aumento da liberação de neurotransmissores (Rigoni, Paoli *et al.*, 2008). Ainda, além da ação extracelular, estas toxinas também apresentam uma ação intracelular. Várias toxinas, como β -bungarotoxina (*B. Multicinctus*), Taipoxina (*Oxyuranus scutellatus scutellatus*), Textilotoxina (*Pseudonaja textilis*) e Notexina (*Notechis scutatus scutatus*) foram capazes de acessar o meio intracelular e se ligar a membrana da mitocôndria, promovendo a alteração da forma organeolar, processo que auxilia na intoxicação do terminal nervoso (Rigoni, Paoli *et al.*, 2008).

De acordo com a sua estrutura quaternária, as β -neurotoxinas podem ser divididas em quatro classes (Kini, 1997). A classe I compreende toxinas de cadeia única, massa molecular variando entre 13-15 kDa, com sete ligações dissulfeto. Um exemplo, é a Notexina, isolada do veneno de *N. scutatus scutatus* (Fig. 6A). A classe II incluem PLA₂s neurotóxicas compostas de duas subunidades homólogas ligadas não covalentemente, sendo um exemplo é a Crotoxina, isolada de Viperídeos (*Crotalus*). A classe III inclui heterodímeros compostos de subunidades com funções diferentes, ligadas por ligação dissulfeto (Fig. 6B). Um exemplo é a β -bungarotoxina isolada da serpente elapídica *B. multicinctus*. E finalmente, a classe IV compreende oligômeros com subunidades homólogas ligadas não covalentemente. Um exemplo é a Textilotoxina de *Pseudonaja textilis* (Rossetto, Morbiato *et al.*, 2006). Os valores de toxicidade (DL₅₀) em camundongo variam entre as β -neurotoxinas podendo ser de 1 a 2 μ g/kg de Textilotoxina e Taipoxina e 1300 μ g/kg de Pseudexina A (*Pseudechis porphyriacus*) (Rossetto, Rigoni *et al.*, 2004).

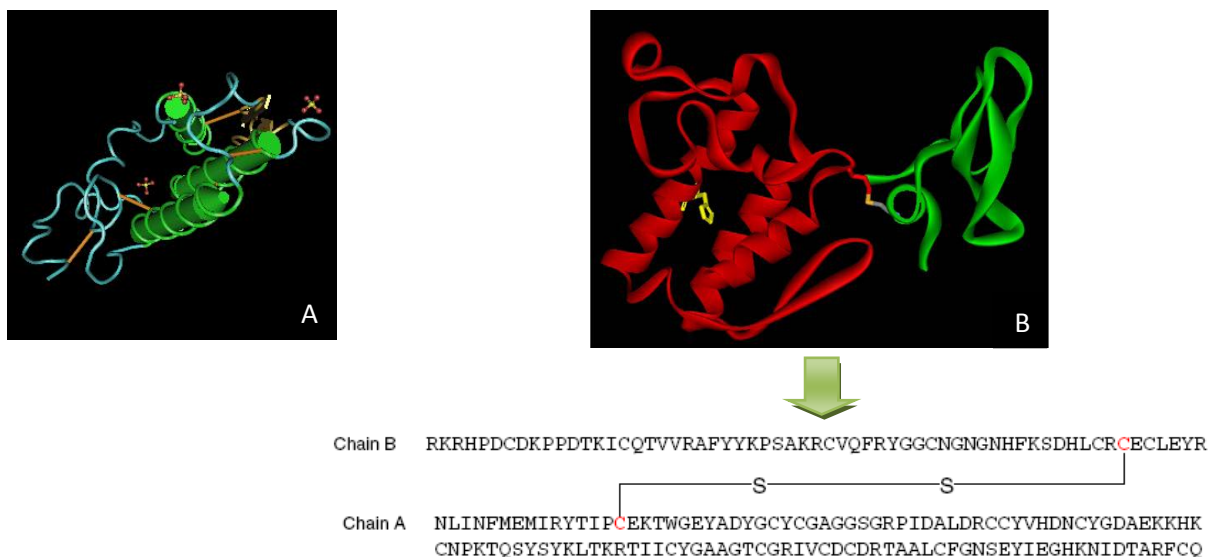


Figura 6: Estruturas de β - neurotoxinas isoladas de venenos elapídicos (A) Notexina isolada de *N. scutatus scutatus* (B) β -bungarotoxina de *B. multicinctus* (Westerlund, Nordlund *et al.*, 1992; Doley e Kini, 2009)

A β -bungarotoxina (Fig. 6B) é um dos mais bem estudados complexos de PLA₂. Trata-se de uma toxina heterodimérica, na qual a cadeia A é similar a PLA₂ do grupo I e a cadeia B é similar aos inibidor de protease do tipo-Kunitz e à dendrotoxina (Wu e Chang, 2000), embora a cadeia B não apresente atividade inibitória de proteases (Rowan, 2001). Estudos com modificações químicas mostram que a cadeia A é a subunidade ativa, responsável pela atividade fosfolipásica e efeitos neurotóxicos (Chang e Yang, 1988). Essa PLA₂ possui ação pré-sináptica, sendo desprovida de atividade pós-sináptica, miotóxica e efeito anticoagulante (Kini, 2003). Sua atividade pré-sináptica é atribuída à sua ligação a certos canais K⁺ dependentes que estão correlacionados à regulação da excitabilidade neuronal e transmissão sináptica (Schmidt e Betz, 1989).

1.4 Gênero *Micrurus*

1.4.1 Características das serpentes

A família Elapidae é representada na América por três gêneros de serpentes coral: *Micruroides*, *Leptomicrurus* e *Micrurus*, sendo o último gênero o mais representativo nesta região. O gênero *Micrurus*, serpente coral (Serpentes, Elapidae)

compreende 61 espécies distribuídas do Sul dos Estados Unidos ao sul da América do Sul (Roze, 1996). No Brasil estas serpentes são popularmente conhecidas como “cobras corais”. São serpentes de pequeno porte, muitas vezes menores que 700 mm, ou apresentam um porte maior, podendo chegar a 1,5 metro, sem entretanto apresentar comportamento agressivo (Harvey, Aparicio *et al.*, 2003).

Em relação à morfologia, estas serpentes apresentam a cabeça oval, recoberta por grandes placas simétricas, sem fosseta loreal, olhos pequenos e pretos com pupilas elípticas verticais e quase sempre localizadas em uma faixa preta na cabeça (Harvey, Aparicio *et al.*, 2003). O pescoço é curto, pouco pronunciado, adaptado para escavação e os ossos cranianos são fortes. Em relação à reprodução, são animais ovíparos, com as fêmeas colocando de 2 a 10 ovos em buracos no solo, em formigueiros ou no interior de troncos de árvores em decomposição (Cardoso e Wen, 2003).

A maioria das espécies de *Micrurus* possui padrão de coloração de algumas combinações de anéis vermelho (ou alaranjado), branco (ou amarelo) e pretos ao redor do corpo. O padrão de coloração mais comum na América do Sul é vermelho-preto-branco-preto-branco-preto-vermelho, conhecido como seqüência triadal, onde se tem três anéis pretos combinados com as outras cores (Roze, 1996). Outro grupo de coral apresenta um único anel preto combinado com anéis vermelhos e brancos (ou amarelos), vermelho-branco-preto-branco-vermelho (Campbell e Lamar, 1989).

São serpentes com dentição proteróglifa (Fig. 7), com presas pequenas caniculadas e imóveis, o que as difere das falsas corais. Essas últimas apresentam as presas na região posterior da maxila, sendo conhecidas como opistóglifas e apesar de apresentarem um padrão de coloração semelhante aos das corais verdadeiras (Silva Jr, Bucarechi *et al.*, 2003).

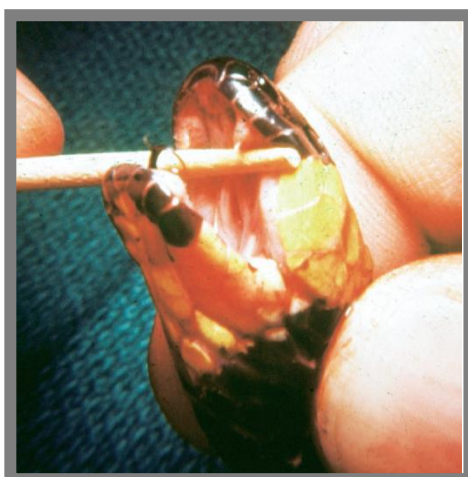


Figura 7: Dentição proteróglifa: *Micrurus* (Peterson, 2006)

São serpentes de hábito semi-fossorial, habitando principalmente a camada superficial do solo, ou sobre a serrapilheira que cobre o chão das matas. Eventualmente vão à superfície a procura de alimentos, para acasalar ou após as chuvas fortes. A maioria das espécies de *Micrurus* alimenta-se de outras serpentes e/ou de anfisbena (Jorge Jr e Aird, 2001). Em alguns casos há dietas específicas de algumas espécies como, por exemplo, *M. leminiscatus* alimentam-se de peixes tipo muçum (*Synbranchus marmoratus*) e *M. surinamensis* alimentam-se de peixes elétricos (*Gymnotus carapo*) (Cardoso e Wen, 2003). A dieta de *M. corallinus* em ambiente natural é especializada, compreendendo anfisbenídeos, gimnofionos, lagartos e colubrídeos (Roze, 1996; Marques, 2002).

As serpentes do gênero *Micrurus* são de abundância relativamente baixa, bastante sensíveis do ponto de vista fisiológico e, portanto, de difícil manutenção em cativeiro. Poucos animais sobrevivem a mais do que duas extrações de veneno (Tanasov, Salomão *et al.*, 2002).

Entre as espécies de *Micrurus* que deram entrada no Biotério do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantam, entre os anos de 1974 e 1997, a que apresentou um maior número de exemplares recebido foi a espécie *M. corallinus*. As que mostraram maior tempo de sobrevivência em cativeiro *M. frontalis* e *M. corallinus*, cujos exemplares ultrapassaram o período de mil dias (De Oliveira, Ribeiro *et al.*, 2005).

As espécies de *Micrurus* apresentam pequeno porte e, portanto, sua glândula de veneno é relativamente pequena, o que resulta em pouca quantidade *per capita* de veneno em cada processo de extração (Salomão, 1991). No geral, o que se observa, quanto à produção de veneno, é uma ampla variação entre as espécies. Valores brutos *per capita* oscilam entre 1,5 mg de *M. hemprichi* e 96,9 mg para *M. spixii* (De Oliveira, Ribeiro *et al.*, 2005). Em outro estudo foram registrados médias de produção de 10 a 12 mg de veneno seco para *M. corallinus* e *M. frontalis*, 8 a 10 mg para *M. altirostris* e *M. lemniscatus*, 8 mg para *M. pyrrhocryptus* e 41 mg para *M. spixii obscurus* (Roze, 1996).

As espécies de *Micrurus* da fauna brasileira são: *M. albicinctus*, *M. altirostris*, *M. averyi*, *M. brasiliensis*, *M. corallinus*, *M. decoratus*, *M. filiformes*, *M. frontalis*, *M. hemprichii*, *M. ibiboboca*, *M. lemniscatus*, *M. mipartitus*, *M. ornatissimus*, *M. paraensis*, *M. putumayensis*, *M. spixii*, *M. surinamensis*, *M. tricolor*, *M. waehnerorum* (Melgarejo, 2003).

Destacando as espécies que fizeram parte deste estudo observa-se uma distinta distribuição, em todo o território nacional. A espécie *M. lemniscatus* (Fig 8A), é encontrada em todas as regiões do Brasil, de norte a sul, podendo destacar a Amazônia ocidental, o litoral nordeste e sudeste, e o Brasil central incluindo o centro norte de São Paulo (Marques, 2002). Em contrapartida, *M. ibiboboca* (Fig. 8B) é uma espécie que habita o nordeste do Brasil, não sendo observada nas outras regiões. Já a espécie *M. spixii* (Fig. 8C) é encontrada principalmente na região norte do Brasil, incluindo o estado do Maranhão (Campbell e Lamar, 1989; Roze, 1996). *M. frontalis* (Fig. 8D) é encontrada nas regiões sudeste e centro-oeste, enquanto *M. corallinus* (Fig. 8E) é encontrada apenas nas regiões sul e sudeste do Brasil (Da Silva Júnior e Bucarechi, 2003).

Em várias regiões do mundo, do ponto de vista médico, as espécies mais importantes do gênero *Micrurus* são: *M. fulvius*, nos Estados Unidos, *M. diastema*, *M. distans* e *M. laticolaris* no México e Guatemala, *M. ningrocinctus* e *M. alleni* nos outros países da América Central, *M. mipartitus*, *M. corallinus*, *M. frontalis*, *M. spixii*, *M. dumerilli*, *M. carnicauda*, *M. surinamensis* e *M. isozonus* na América do Sul (Bolanos, Cerdas *et al.*, 1978). No Brasil, as mais importantes do ponto de vista de saúde pública

são: *M. corallinus*, *M. frontalis*, *M. ibiboboca*, *M. lemniscatus*, *M. spixii* e *M. surinamensis* (Melgarejo, 2003).



Figura 8: Espécies de serpentes do gênero *Micrurus*. (A) *M. lemniscatus*, (B) *M. ibiboboca*, (C) *M. spixii*, (D) *M. frontalis* (E) *M. corallinus*.

(Fontes: www.ivb.rj.gov.br/.../micrurus_4.html, Serafim *et al*, 2007, http://big-snake.narod.ru/enc/Reptilia/Serpentes/Elapidae/Micrurus/Micrurus_spixii_spixii01.jpg, <http://cienciahoje.uol.com.br/images/ch%20on-line/galeria/3334d.jpg>, Serapicos *et al*, 2005)

A espécie *M. lemniscatus* (Fig 8A) é uma serpente que apresenta um porte maior em relação às outras cobras corais, podendo chegar a 1,5 metro de comprimento. O focinho é rombudo e preto, com uma faixa internasal branca. No Brasil são registradas quatro subespécies: *M. l. lemniscatus*, *M. l. carvalhoi*, *M. l. diutius*, *M. l.*

helleri. Já, *M. ibibboboca* (Fig. 8B), uma espécie bem característica da caatinga do nordeste brasileiro, possui o focinho quase todo branco, com poucas manchas escuras. Dificilmente essa coral ultrapassa 60 cm de comprimento. A espécie *M. spixii* (Fig. 8C) é uma serpente Amazônica, sendo uma das cobras corais de maior porte, podendo ultrapassar 1 metro de comprimento. Apresenta anéis amarelos largos com praticamente a mesma largura dos vermelhos. Existem três subespécies representadas no Brasil: *M. s. spixii*, *M. s. martiusi*, *M. s. obscurus*. A espécie *M. frontalis* (Fig. 8D) possuem tríades pretas entre os anéis vermelhos, apresentam o focinho pintado irregularmente de preto e amarelo. O tamanho médio é de 60 a 80 cm, porém já foi encontrado um exemplar com 1,35 m de comprimento. A espécie *M. corallinus* (Fig. 8E) apresenta anéis pretos simples entre dois brancos, o que a difere da maioria das espécies de cobras corais, que apresentam anéis pretos entre vermelhos. Apresentam um comprimento médio de 50 cm para machos e 60 cm para fêmeas, sendo o maior exemplar visto com 98 cm (Melgarejo, 2003).

Como mencionado, anteriormente, em relação aos acidentes ofídicos, o envenenamento provocado por *Micrurus* possui índice relativamente baixo no Brasil (0,6%), com um coeficiente de letalidade de 0,36% (Brasil e Saúde, 2005). Porém, a gravidade do envenenamento por *Micrurus* pode variar dependendo de fatores como o volume de veneno injetado, o tamanho da serpente e a idade da vítima. Em geral os acidentes provocados pelas *Micrurus* são graves e em sua maioria ocorrem pela manipulação das serpentes sem as devidas precauções e técnicas adequadas (Campbell e Lamar, 1989). Quando o acidente é severo, o indivíduo acidentado pode ir a óbito por asfixia que pode ocorrer em um período de de 5 a 6 horas após o envenenamento, devido as ações neurotóxicas do veneno (Vital-Brazil, 1980). Uma dose de aproximadamente 4 a 5mg de veneno seria letal para um humano (Peterson, 2006).

Observações clínicas em torno do envenenamento por *Micrurus* mostram, principalmente, sintomas neurotóxicos. Ocorre um progressivo bloqueio da transmissão neuromuscular, o que pode levar a vítima à morte por paralisia muscular e parada respiratória, caso o antiveneno seja administrado após um longo período de tempo (Moussatché e Melendez, 1979). Durante o envenenamento, os seguintes sintomas são observados: ptose palpebral, oftalmoplegia (paralisia dos músculos do olho), paralisia

da musculatura da mandíbula, da laringe e da faringe, sialorreia (perda de saliva pela cavidade bucal), paralisia do pescoço, braços e pernas (Vital Brazil, 1987).

O tratamento do envenenamento dos acidentes por *Micrurus* é realizado através da administração de soro heterólogo. O soro anti-Elapídico comercial que é utilizado para o tratamento de vítimas humanas, é produzido através da imunização de cavalos com venenos brutos de *M. frontalis* e *M. corallinus* (Raw, 1991). O tratamento sorológico visa à neutralização total das proteínas dos venenos.

1.4.2 O veneno de *Micrurus* e suas toxinas

A característica mais marcante no veneno de *Micrurus* é sua ação neurotóxica. Em estudos experimentais, observou-se a ocorrência de mudanças neurofisiológicas similares às induzidas por α -neurotoxinas que possuem ação pós-sináptica, assim como ação pré-sináptica em junção neuromuscular, também, foram observadas (Vital Brazil, 1987). Entretanto, estes venenos mostram, também, atividades cardiotoxícas, miotóxicas e hemolíticas (Tan e Ponnudurai, 1991; Gutiérrez, Rojas *et al.*, 1992; Tan e Ponnudurai, 1992).

Um amplo espectro de atividades enzimáticas no veneno de *Micrurus* vem sendo detectadas, incluindo atividade fosfolipásica, hialuronidásica, fosfodiesterásica, leucina aminopeptidásica, L-aminoácido desidrogenásica, acetilcolinesterásica e L-aminoácido oxidásica (Aird e Da Silva, 1991; Tan e Ponnudurai, 1992). Ainda, algumas espécies de *Micrurus* possuem veneno com atividade anticoagulante (Tan e Ponnudurai, 1992).

A toxicidade dos venenos de *Micrurus* varia de acordo com a espécie. Através de injeção intraperitoneal em camundongo observam-se os seguintes valores de DL₅₀: *M. frontalis* (0,96 mg/kg), *M. corallinus* (0,35 mg/kg), *M. spixii* (0,33 mg/kg), *M. ibiboboca* (0,99 mg/kg) (Higashi, Guidolin *et al.*, 1995) e *M. pyrrhocryptus* (1,1 mg/kg) (Dokmetjian, Del Canto *et al.*, 2009).

Ensaio de toxicidade por administração intravenosa de venenos de espécies da Venezuela e dos Estados Unidos, em camundongos apresentam os seguintes valores de DL₅₀: *M. isozonus* (0,52 a 0,61 mg/kg), *M. tener tener* (0,78 mg/kg) e *M. fulvius* (0,32

mg/kg) (Salazar, Vivas *et al.*, 2011). O veneno bruto de *M. frontalis frontalis* apresenta uma DL₅₀ de 0,5 mg/kg de camundongo (injeção intraventricular) (Jorge Da Silva, 2001).

O veneno bruto de *M. fulvius microgalbineus* (52 µg) ao ser injetado em camundongos, por injeção intraperitoneal, promove a morte dos mesmos em 2 horas, ocasionando sintomas como paralisia progressiva, dispneia e parada respiratória (Possani, L., Alagon, A. *et al.*, 1979). A injeção de venenos de *M. fulvius* e *M. frontalis* em animais, provocam choque cardiovascular nos mesmos (Ramsey, Taylor *et al.*, 1972).

1.4.2.1 Atividade neurotóxica

A neurotoxicidade é a atividade predominante no veneno de *Micrurus*. Vital-Brazil, um dos pesquisadores pioneiros no segmento ofidismo, mostrou que o veneno de *M. corallinus* apresenta uma atividade neurotóxica com ação pré-sináptica e pós-sináptica, enquanto os venenos de *M. frontalis* e *M. lemniscatus* apresentam apenas atividade pós-sináptica (Vital Brazil, 1987).

A atividade pré-sináptica é caracterizada pela ação de PLA₂ (β-neurotoxinas) na junção axônica, impedindo a liberação de ACh na fenda sináptica da junção neuromuscular de nervos motores. Enquanto, a ação pós-sináptica é caracterizada pela ação das 3FTx que atuam através da ligação à receptores colinérgicos das membranas pós-sinápticas da junção neuromuscular de nervos motores, atuando como competidores de ACh (Silva Jr, Bucarechi *et al.*, 2003).

Até pouco tempo atrás, apesar das β-neurotoxinas terem sido isoladas de outros venenos da família Elapidae, dentre os venenos de *Micrurus* a ação pré-sináptica só havia sido visualizada em *M. corallinus*. Porém em 2005, foi isolada uma nova toxina com atividade pré-sináptica do veneno de *M. dumerilli carinicauda* (Dal Belo, Toyama *et al.*, 2005). Ainda, componentes do veneno de *M. altirostris* se ligam com alta afinidade aos receptores nicotínicos, promovendo um bloqueio neuromuscular irreversível, cuja ação independe de atividade enzimática (De Abreu, Leite *et al.*, 2008). Da mesma maneira, os venenos da serpente *M. lemniscatus*, *M. frontalis* e *M.*

corallinus tem ação direta na membrana de preparações neuromusculares (Vital Brazil e Fontana, 1983).

1.4.2.2 Atividade miotóxica

No envenenamento humano, apesar da possibilidade de um quadro de mialgia instalado, não foram descritas observações claras de ocorrência de mionecrose (Da Silva Júnior e Bucarechi, 2003). Entretanto dados experimentais de análises histológicas e detecção de níveis plasmáticos de creatina cinase, revelam que alguns venenos de *Micrurus* tem mostrado atividade miotóxica, após injeção intramuscular em camundongo. Venenos de espécies como *M. nigrocinctus nigrocinctus*, *M. n. mosquitenis*, *M. carinicauda*, *M. frontalis*, *M. alleni* e *M. surinamensis* podem promover mionecrose. Em contrapartida, o veneno de *M. mipartitus* não apresenta atividade miotóxica (Gutiérrez, Lomonte *et al.*, 1983; Gutiérrez, Rojas *et al.*, 1992).

O veneno de *M. spixii* induz uma maior liberação de creatina cinase quando comparado aos venenos de *M. averyii*, *M. hemprichii*, *M. lemniscatus*, *M. surinamensis*, indicando ter maior atividade miotóxica (Barros, Fernandes *et al.*, 1994). A atividade miotóxica do veneno de *M. pyrrhocryptus* possui um dos maiores valores já relatados para esse gênero, com a dosagem de 518 U/L de creatina cinase, quando 0,5 µg de veneno é injetado intramuscularmente.

No processo de mionecrose, o sarcolema é afetado ocasionando um aumento de íons Ca^{2+} no citossol. Desta forma é desencadeada uma hipercontração dos microfilamentos, danos mitocondriais e ativação de PLA_2 dependentes de Ca^{2+} (Gutiérrez, Rojas *et al.*, 1992). Do veneno de *M. nigrocinctus* foram isoladas a Nigrotoxina A e Nigrotoxina B que são duas PLA_2 com atividade miotóxica (Alape Girón, Persson *et al.*, 1999). O veneno de *M. altirostris*, uma espécie que promove alto índice de acidentes no Rio Grande do Sul, apresenta atividade miotóxica, edematogênica, hemolítica e letal para camundongos. A MED (dose ematogênica mínima) é de 0,27 µg/mL, com o edema iniciando imediatamente após a injeção subcutânea (Moraes, Sousa-E-Silva *et al.*, 2003).

1.4.2.3 Atividades proteolítica, hemolítica, hemorrágica e cardiovascular

A atividade proteolítica é variável entre os venenos do gênero *Micrurus* sendo que os venenos de algumas espécies mostram-se desprovidos dessa atividade. O veneno de *M. fulvius*, uma espécie endêmica dos Estados Unidos, possui baixa atividade proteolítica, o que promove pouco ou nenhum efeito no local do envenenamento (German, Hack *et al.*, 2005). Em *M. fulvius microgalbineus*, nenhuma atividade proteolítica é observada (Possani, L. D., Alagon, A. C. *et al.*, 1979).

Os venenos de *M. ibiboboca* e *M. spixii* apresentam atividade proinflamatória, e se mostraram capazes de promover a ativação do sistema complemento e capazes de promover a conversão de proteína C3 de soro humano em outros produtos. Ambos os venenos são, também, capazes de aumentar a permeabilidade vascular, provocar edema e apresentam atividade hemolítica em eritrócitos de carneiro (Tambourgi, Dos Santos *et al.*, 1994). O veneno de *M. spixii* apresenta uma baixa atividade *Trombin-like*, sendo capaz de converter fibrinogênio em fibrina, enquanto o veneno de *M. ibiboboca* é capaz de promover a clivagem da proteína C3 purificada, na ausência de outras proteínas do sistema complemento, o que pode ser atribuído a enzimas proteolíticas (Tambourgi, Dos Santos *et al.*, 1994).

O veneno de *M. pyrrhocryptus* não apresenta nenhuma atividade hemorrágica, anti-coagulante e necrótica (Dokmetjian, Del Canto *et al.*, 2009). O veneno de *M. averyii* apresenta atividade hemorrágica (Barros, Fernandes *et al.*, 1994). Os venenos de *M. nigrocinctus*, *M. alleni*, *M. frontalis*, *M. carinicauda* e *M. surinamensis* não apresentam capacidade de induzir hemorragia e edema (Gutiérrez, Lomonte *et al.*, 1983). Por outro lado, os venenos de *M. brasiliensis*, *M. lemniscatus*, *M. corallinus* e *M. frontalis* são capazes de promover hemorragia pulmonar, visceral e cardíaca em ratos, enquanto o veneno de *M. fulvis* promove hemorragia em camundongos (Tan e Ponnudrai, 1992; Francis, Da Silva Junior *et al.*, 1997; Jorge Da Silva, 2001; Da Silva Júnior e Bucarechi, 2003). A ação hemorrágica está caracterizada em ensaios experimentais, apesar de não ser um sintoma observado em acidentes humanos

A atividade hemolítica, em eritrócitos humanos, foi detectada no veneno de *M. pyrrhocryptus*, com valor de 0,309 µg/mL MHD (dose hemolítica mínima) (Barros, Fernandes *et al.*, 1994). Atividade citotóxica indireta é observada em leucócitos humanos, com ensaios com veneno de *M. altirostris* (Moraes, Sousa-E-Silva *et al.*, 2003).

Os venenos de *M. frontalis frontalis* e *M. nigrocinctus nigrocinctus* mostram maior atividade anticoagulante e fosfolipásica, sendo também os mais letais, quando comparados com os venenos de *M. lemniscatus carvalhoi* e *M. surinamensis surinamensis*. Dentre estes venenos, o de *M. nigrocinctus nigrocinctus* é o que provoca uma maior formação de edema (Cecchini, Marcussi *et al.*, 2005). A atividade edematogênica, também, é ocasionada pelos venenos de *M. frontalis*, *M. altirostris*, e *M. ibiboboca* em camundongos (Sanchez, Freitas *et al.*, 1992; Moraes, Sousa-E-Silva *et al.*, 2003). Sabe-se que as PLA₂ são toxinas responsáveis por agir direta e indiretamente na formação de edemas (Lomonte, Tarkowski *et al.*, 1993).

Ação cardiovascular foi observada através da atividade hipotensora do veneno de *M. fulvius* e *M. frontalis* (Francis, Williams *et al.*, 1993; Francis, Da Silva Junior *et al.*, 1997). O veneno de *M. fulvius* promoveu a diminuição da contração cardíaca e de músculos esqueléticos devido à ação direta do veneno na membrana muscular (Weis e Mcisaac, 1971). No veneno de *M. frontalis*, a ação hipotensora foi ocasionada por uma PLA₂, a qual, também, possui uma ação hemorrágica (Francis, Da Silva Junior *et al.*, 1997).

1.4.2.4 Toxinas dos venenos de *Micrurus*

Devido à baixa obtenção de venenos de espécies do gênero *Micrurus*, relativamente poucas toxinas tem sido isoladas e caracterizadas a partir desses venenos. Estudos proteômicos, venômicos e de transcriptoma tem promovido uma plataforma geral de identificação de proteínas, em tais venenos. Venenos de espécies como *M. corallinus*, *M. surinamensis*, *M. altirostris* e *M. nigroccintus* tiveram seu perfil protéico analisados recentemente (Olamendi-Portugal, Batista *et al.*, 2008; Leao, Ho *et al.*, 2009; Correa-Netto, Teixeira-Araujo *et al.*, 2010; Fernandez, Alape-Giron *et al.*, 2011).

Através do transcriptoma de *M. corallinus*, foi observado que as duas principais classes de toxinas deste venenos são as 3FTxs e as PLA₂, embora outras classes de proteínas, também, tenham sido indentificadas como, lectina tipo-C, peptídeos natriuréticos, metaloproteases, e LAO (Leao, Ho *et al.*, 2009). Ainda, por análises proteômicas, o veneno de *M. surinamensis*, também, mostrou um maior número de componentes proteicos com massa em torno de 6-14 kDa, que correspondem as 3FTx (neurotoxinas e cardiotoxinas) e às PLA₂, embora tenham sido identificados peptídeos trípticos similares a metaloproteases, LAO e inibidores de proteases (Olamendi-Portugal, Batista *et al.*, 2008).

Recentemente, um estudo combinado com análises proteômicas e de transcriptoma com os venenos de *M. altirostris* e *M. corallinus* mostraram a mesma importância das 3FTx e das PLA₂, em termos de porcentagem presencial, na composição do veneno. Além disso, proteínas como metaloproteases, LAO, proteínas tipo-CRISP, proteína tipo lectina tipo-C, lipases e serino proteases, também, foram identificadas (Corrêa-Netto, Junqueira-De-Azevedo *et al.*, 2011). Ainda, no veneno de *M. nigrocinctus* o estudo proteômico promoveu a identificação de oito famílias distintas de proteínas (PLA₂, 3FTx, LAO, proteína tipo lectina tipo-C, serino proteases, ohanina, nucleotidase) (Fernandez, Alape-Giron *et al.*, 2011).

Como mencionado acima, duas famílias de proteínas (PLA₂ e 3FTx) tem se mostrado mais representativa nos venenos de *Micrurus*. As PLA₂, uma das mais representativas proteínas do veneno de *Micrurus* apresentam uma grande variedade de ações farmacológicas, interferindo nos processos fisiológicos normais (Thwin, Gopalakrishnakone *et al.*, 2000). Há alguns anos atrás, Possani *et al.* através de métodos cromatográficos convencionais, purificaram uma PLA₂ do veneno de *M. fulvius microgalbineus*. Tal proteína apresentou uma massa molecular aproximada de 14,0 kDa sendo constituída de 119 resíduos de aminoácidos com 12 cisteínas (Possani, L. D., Alagon, A. C. *et al.*, 1979). Uma PLA₂ miotóxica também foi isolada do veneno de *M. nigrocinctus* (Arroyo, Rosso *et al.*, 1987). O veneno de *M. frontalis frontalis* contém PLA₂ básicas e ácidas, com massas moleculares que variam em torno de 21 a 23 kDa, tais proteínas apresentaram atividade hemorrágica (Francis, Da Silva Junior *et al.*, 1997). Do veneno de *M. nigrocinctus nigrocinctus*, *M. alleni yatesi*, *M. multifasciatus*

foram isoladas 11 frações com atividade fosfolipásica, utilizando sistema de cromatografia de fase reversa (Rosso, Vargas-Rosso *et al.*, 1996).

Nigroxina A e B, duas fosfolipases com atividade miotóxica foram isoladas do veneno de *M. nigrocinctus*, com massas moleculares de 14181,5 Da e 14210,0 Da (Alape Girón, Persson *et al.*, 1999). A sequência N-terminal de quatro PLA₂ do veneno de *M. pyrrhocryptus*, com massas moleculares aproximadas de 12,8 e 14,3 kDa, foram determinadas por degradação de Edman, e apresentaram similaridade com outras PLA₂s de serpentes elapídicas (Dokmetjian, Del Canto *et al.*, 2009). Mostrando certo pioneirismo, em relação ao veneno de *Micrurus*, Dal Belo *et al.*, isolaram e realizaram a caracterização farmacológica de uma nova fosfolipase com ação pré-sináptica (β -neurotoxina) do veneno de *M. dumerilli carinicaudata*, que promove o bloqueio da neurotransmissão em mamíferos e aves (Dal Belo, Toyama *et al.*, 2005).

A outra família de proteína importante no veneno de *Micrurus* é a 3FTx, da qual fazem parte as α -neurotoxinas. Algumas 3FTx têm sido isoladas e caracterizadas nos venenos de espécies como *M. nigrocinctus nigrocinctus*, *M. frontalis frontalis*, *M. pyrrhocryptus* e *M. frontalis* (Alape-Girón, Stiles *et al.*, 1996; Rosso, Vargas-Rosso *et al.*, 1996; Francis, Da Silva Junior *et al.*, 1997; Dokmetjian, Del Canto *et al.*, 2009; Moreira, Prates *et al.*, 2010).

A primeira sequência completa de uma α -neurotoxina isolada do veneno de *Micrurus* foi obtida em 1996, sendo isolada do veneno de *M. nigrocinctus nigrocinctus*. Esta neurotoxina, composta por 60 resíduos de aminoácidos, apresentou um alto grau de similaridade com outras toxinas de serpentes da família Elapidae, tendo 77% de homologia com α -neurotoxina I de *N. mossambica mossambica* (Rosso, Vargas-Rosso *et al.*, 1996). Em contrapartida, em um estudo mais recente, seis novas 3FTx denominadas de Frontoxinas I a VI, foram identificadas. Estas apresentaram similaridade com α -neurotoxinas de cadeia curta e α -neurotoxinas de cadeia longa. Ensaio *in vitro*, com junção neuromuscular de sapo, sugeriram que a frontoxina age bloqueando receptores de nAChR (Moreira, Prates *et al.*, 2010).

Anos atrás, também, foi demonstrado que o veneno de *M. nigrocinctus nigrocinctus* contém várias proteínas de ligação a nAChR, capazes de serem

reconhecidas por anticorpos contra α -Cobrotoxina e Neurotoxina II de *Naja naja oxiana*, sugerindo que sejam α -neurotoxinas de cadeia curta (Alape-Girón, Stiles *et al.*, 1996). O veneno de *M. frontalis frontalis* apresenta neurotoxina pós-sináptica o que foi observada pela determinação da sequência N-terminal e comparação de similaridade (Francis, Da Silva Junior *et al.*, 1997). Do veneno de *M. pyrrhocryptus* seis novas proteínas, cujas sequências N-terminais foram determinadas, apresentaram similaridade com α -neurotoxinas de outros venenos elapídicos. Dentre essas foi determinada a sequência completa de uma α -neurotoxina de cadeia curta. Segundo os autores, esta é a primeira sequência completa de uma α -neurotoxina do veneno de *M. pyrrhocryptus* (Dokmetjian, Del Canto *et al.*, 2009).

Em um estudo utilizando técnicas de biologia molecular, foi realizado a clonagem de cDNAs de três isoformas de α -neurotoxinas, extraídos da glândula de veneno da serpente *M. corallinus*. Todas as isoformas apresentam aproximadamente 70% de similaridade com outras α -neurotoxinas, apesar de não apresentarem alguns aminoácidos importantes que mediam a ligação da toxina aos receptores de acetilcolina (Oliveira, Harasawa *et al.*, 2008).

Além das α -neurotoxinas, a biologia molecular tem colaborado com os estudos dos peptídeos natriuréticos. Ho *et al.* realizaram a clonagem de cDNAs codificadores de peptídeos natriuréticos, também do veneno de *M. corallinus*. Tais peptídeos, ricos em prolina, possuem maior similaridade em relação aos peptídeos natriuréticos caracterizados de outra espécie de elapídeo, como a serpente *Dendroaspis angusticeps* que aos peptídeos isolados da serpente *B. jararaca* (Viperidae) (Ho, Soares *et al.*, 1997).

De acordo com uma busca realizada no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/>), indica que relativamente poucas proteínas do veneno de *Micrurus*, tiveram suas estruturas primárias parciais ou totais depositadas em bancos de dados. Analisando estas proteínas, pode-se notar que a proteínas sequenciadas tiveram origem de espécies *M. corallinus*, *M. nigrocinctus*, *M. altirostris*, *M. fulvius*, *M. pyrrhocryptus*, *M. frontalis* e *M. surinamensis*. Dentre as espécies proteicas sequenciadas estão: PLA2, α -neurotoxinas de cadeia curta e cadeia longa e

weak neurotoxinas, proteínas ligadoras a receptores de acetilcolina, proteínas tipo lectina tipo C e peptídeos natriuréticos.

Apesar do pouco número de proteínas com sequências depositadas em bancos de dados, observa-se um aumento recente nos estudos destes venenos. Isso fica evidenciado uma vez que uma mesma busca no mesmo banco de dados (NCBI) foi realizada no ano de 2007 e, naquela data, apenas a estrutura primária de 27 proteínas haviam sido depositadas. No ano de 2009, já pôde ser observado um aumento nesse número para 49 proteínas. Atualmente, pode-se verificar o depósito de 89 sequências primárias de proteínas. Esse aumento de dados obtidos a partir do veneno de espécies do gênero *Micrurus* está diretamente relacionado ao desenvolvimento de estudos transcriptômicos e proteômicos. As recentes proteínas cujas sequências foram depositadas, foram obtidas em estudos utilizando técnicas de biologia molecular (Leao, Ho *et al.*, 2009) e de estudos proteômicos (Olamendi-Portugal, Batista *et al.*, 2008; Dokmetjian, Del Canto *et al.*, 2009; Moreira, Prates *et al.*, 2010; Corrêa-Netto, Junqueira-De-Azevedo *et al.*, 2011; Fernandez, Alape-Giron *et al.*, 2011).

A pouca disponibilidade de dados e a pouca quantidade de estudos sobre os venenos de *Micrurus* se deve, principalmente, à dificuldade na manutenção desses animais em cativeiro, e à pouca produção de veneno pelos mesmos. Isso acarreta em um baixo rendimento de toxinas que, conseqüentemente, são quase exclusivamente disponibilizadas para a produção de soro. Ensaio biológicos de atividades e as técnicas convencionais de caracterização bioquímica das proteínas demandam uma quantidade maior de matéria prima, o que inviabiliza uma maior realização de estudos com esses venenos. O avanço no campo proteômico, com técnicas altamente sensíveis, veio colaborar com o estudo de proteínas ditas “escassas”, uma vez que necessitam de baixas quantidades de veneno para se realizar uma caracterização

1.5 Proteômica e os venenos ofídicos

A proteômica pode ser definida como uma análise sistemática de proteínas, na qual se visa identificar, quantificar e determinar a função de cada molécula, seguindo

um caminho diferente das pesquisas convencionais de proteínas, ou seja, primeiramente se determina a estrutura da proteína para depois estudar a função da mesma. Ao contrário dos genomas relativamente estáticos das células, o proteoma é bastante complexo e dinâmico, sendo definido como uma coleção de proteínas expressa em uma célula, tecido ou organismo em um determinado momento ou condição (Peng e Gygi, 2001).

As análises proteômicas comumente são realizadas pela combinação de várias técnicas analíticas das quais podem ser citados os processos cromatográficos, como a cromatografia bidimensional (2D-LC), a espectrometria de massa, principalmente usando as fontes do tipo *electrospray* (ESI) ou *matrix-assisted laser desorption ionization* (Grimaldi Jr, McMahon-Pratt *et al.*) e a eletroforese bidimensional (2D-Gel), interrelacionadas com a bioinformática. Uma das grandes inovações prometidas pelo conhecimento do proteoma, além do mapeamento de intrincados caminhos metabólicos celulares, é a possibilidade de identificação de moléculas que, em última análise, poderiam ser utilizadas como alvos de drogas específicas.

A possibilidade de utilização da espectrometria de massa - uma técnica altamente sensível e precisa - para análise de biomoléculas foi a maior responsável pelo grande impulso da proteômica. A listagem e o estudo sistemático das massas moleculares que correspondem aos componentes funcionais de um determinado extrato ou fluido biológico podem ser utilizados para a caracterização dos organismos produtores desse extrato ou para a classificação de seus estados de desenvolvimento e condições fisiológicas. Vários estudos têm sido realizados em busca de novas moléculas com potencial uso terapêutico escondidas em extratos naturais e secreções fisiológicas (Pimenta e De Lima, 2005).

As técnicas proteômicas têm sido utilizadas na caracterização bioquímica de venenos que são difíceis de serem obtidos, como é o caso de venenos de artrópodes (Pimenta e De Lima, 2005; Nascimento, Rates *et al.*, 2006; Rates, Bemquerer *et al.*, 2007) e de algumas serpentes. Essa nova ciência está sendo utilizada com o objetivo de esclarecer algumas informações contidas no fluxo gênico, respondendo perguntas em relação às atividades específicas destes venenos.

Como dito acima, a expressão protéica não é estática. As análises proteômicas tem demonstrado que a composição dos venenos pode ser influenciada por fatores como distribuição geográfica, variação ontogenética, gênero, variação inter e intra-específica, sazonalidade e fatores ambientais (Daltry, Wüster *et al.*, 1996).

Uma série de estudos comparativos entre venenos de serpentes vem se tornando um caminho a ser percorrido por vários pesquisadores que se aventuram nos estudos proteômicos. A influência da variação geográfica na composição dos venenos da serpente asiática *Trimeresurus stejnegeri* foi realizada utilizando MALDI-TOF-MS e focalização isoelétrica (Creer, Malhotra *et al.*, 2003). A variação ontogenética, dos venenos de *Bothrops atrox* de espécimes de diferentes idades foi realizada por eletroforese bidimensional, sugerindo que o proteoma do veneno altera de acordo com o desenvolvimento da serpente. Algumas classes de proteínas foram identificadas por *mass fingerprinting*, como metaloproteases, serina proteases, lectinas, PLA₂, LAO, fator de crescimento vascular e proteínas secretórias ricas em cisteínas (Guércio, Shevchenko *et al.*, 2006).

Análises comparativas entre diferentes gêneros de serpentes, e diferentes espécies do mesmo gênero, também, têm sido realizadas. A cromatografia líquida e espectrometria de massas (LC/MS) auxiliou no estudo da diversidade da composição dos venenos da serpente do gênero *Acanthophis*. Todos os venenos estudados apresentaram o mesmo padrão de eluição e uma significativa similaridade, e também, diferenças em relação a algumas moléculas individuais, como o número total, peso molecular e tempo de retenção (Fry, Wickramaratna *et al.*, 2002). O proteoma dos venenos das serpentes *Cerastes cerate*, *C. vipera* e *Macrovipera lebetina* mostrou que tais venenos são compostos por poucas famílias de proteínas, embora cada veneno tenha mostrado certa distinção na complexidade total. Em outro estudo, foi determinado a composição de proteínas de três sub-espécies de *Sistrurus catenatus* por RPC, sequenciamento N-terminal, *mass fingerprinting* e CID-MS/MS (*Collision-induced dissociation mass spectrometry*) (Sanz, Gibbs *et al.*, 2006).

Outra vertente seguida pelos estudos proteômicos é a caracterização individual de cada espécie. A identificação proteômica do veneno da serpente australiana *Pseudonaja textilis* foi realizado através de 2D-gel, MS e sequenciamento *de novo* de

peptídeos trípticos (Birrell, Earl *et al.*, 2006). A análise proteômica dos venenos das serpentes *N. naja atra* e *Agkistrodon halys* mostrou a diferença na composição do veneno de serpentes da família Viperidae e Elapidea. Os venenos elapídicos possuem uma alta abundância de cardiotoxinas e neurotoxinas, enquanto os venenos dos viperídeos contêm uma significativa quantidade de hemotoxinas e metaloproteinasas (Li, Wang *et al.*, 2004). A técnica de cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massa possibilitou a identificação de sessenta e uma proteínas no veneno de *N. kauthia*, nas quais podem ser destacadas cardiotoxinas, neurotoxinas e citotoxinas. A eletroforese bidimensional também foi utilizada na pesquisa da imunogenicidade do veneno, em ensaios de *Western blot* (Kulkeaw, Chaicumpa *et al.*, 2007).

O estudo proteômico do veneno de *Bothrops colombiensis* foi realizado através do fracionamento por RPC, seguida por análises das frações por 1D-gel, sequenciamento N-terminal, determinação de massas por MALDI-TOF/MS. Tal veneno é composto por oito tipos diferentes de famílias proteicas, destacando-se em abundância as metaloproteases dependentes de zinco, e as PLA₂ K49 que correspondem a 86% do total de proteínas do veneno (Calvete, Fasoli *et al.*, 2009). O estudo proteômico do veneno de *Daboia russelli siamensis*, foi realizado por 2D-Gel, seguido de sequenciamento *de novo* e análises enzimáticas. O resultado deste estudo mostrou que este veneno é composto por seis famílias de proteínas como, serino proteases, metaloproteases, PLA₂, fator de crescimento vascular, proteínas tipo lectina tipo-C (Risch, Georgieva *et al.*, 2009).

Um diferencial das técnicas proteômicas é a capacidade de prover a diferenciação de espécies protéicas em nível de modificações pós-traducionais, tornado importante no estudo dos venenos de serpentes uma vez que estes são ricos em isoformas. Através da junção da tecnologia proteômica com a especificidade enzimática foi analisada a diversidade molecular do veneno da *P. textilis*. Modificações pós-traducionais como fosforilação, γ -carboxilação, e glicosilação foram observadas neste veneno (Birrell, Earl *et al.*, 2006).

A vertente proteômica tem alcançado, também, caminhos no estudo de venenos de *Micrurus*. Hoje, já se tem uma elucidação acerca da composição do veneno de algumas espécies desse gênero graças a três estudos realizados, recentemente. Nestes

três estudos foram analisados os venenos de *M. nigrocinctus*, *M. corallinus*, *M. altirostris* e *M. frontalis*, sendo novas proteínas identificadas, possibilitando um melhor conhecimento dos venenos (Moreira, Prates *et al.*, 2010; Corrêa-Netto, Junqueira-De-Azevedo *et al.*, 2011; Fernandez, Alape-Giron *et al.*, 2011).

Realizando uma análise mais precisa dos venenos de serpentes, são gerados novos conhecimentos sobre suas toxinas, no que se trata de seu poder farmacológico, e seu poder imunogênico. Estes estudos colaboram para o desenvolvimento biotecnológico na produção de soros anti-ofídicos e possibilitam uma ótima prospecção para o desenvolvimento de novos fármacos.

1.6 Sorologia e estudos anti-venômicos

O tratamento contra o envenenamento por serpente é realizado pela administração intravenosa de soros anti-ofídicos. Porém o sucesso deste tratamento depende da boa qualidade do soro administrado, do tempo entre o acidente e sua administração e da identificação da serpente envolvida no acidente. Como mencionado ao longo deste trabalho, os acidentes ofídicos constituem um problema de saúde pública, muitas vezes negligenciado pelas autoridades locais.

Em 1984, foram realizados os primeiros experimentos que demonstraram que o soro de animais hiperimunizados, era capaz de neutralizar a ação tóxica dos venenos (Gutiérrez, Lomonte *et al.*, 2009). Tais pesquisadores demonstraram a efetiva ação de soros de animais hiperimunizados em neutralizar os efeitos tóxicos gerados pelos venenos. No primeiro estudo, os pesquisadores mostraram um diferente protocolo de imunização e foram capazes de produzir anti-soro que protegia contra o envenenamento de cobras. Os primeiros antivenenos produzidos consistiam de soro não purificados de animais hiperimunizados com os venenos. Hoje em dia, existem diferentes protocolos de imunização, que atendem a necessidade e os estudos de cada região e país (Espino-Solis, Riaño-Umbarila *et al.*, 2009).

Em um estudo recente, foi apresentado uma lista de antivenenos disponíveis em todo o mundo, mostrando o país, a instituição fabricante e o tipo de antiveneno produzido. Segundo este estudo, no Brasil, existem dois grandes centros produtores de

soro antiofídico, que são o Instituto Butantan, em São Paulo-SP e a Fundação Ezequiel Dias, em Belo Horizonte-MG (FUNED). No Instituto Butantan são produzidos soros anti-Elapidico, anti-Laquetico, anti-Botropico-crotalico, anti-Botropico-laquetico, anti-Crotalico e anti-Botropico. Em contrapartida, segundo o estudo, na FUNED são produzidos soros anti-Botropico, anti-Crotalico e anti-Botropico-crotalico (Espino-Solis, Riaño-Umbarila *et al.*, 2009).

Entretando, sabe-se que na FUNED, também, são produzidos os soros anti-Elapidico e anti-Botropico-laquetico, cujos dados foram negligenciados pelos autores (www.funed.mg.gov.br). Além, destes dois centros de pesquisa e produção de imunobiológicos, referenciados por Espino-Solis, Riaño-Umbarila *et al* (2009), o Instituto Vital Brasil, no Rio de Janeiro, também, é reconhecido pelo Ministério da Saúde, como um dos três fornecedores de soros hiperimunes distribuídos no Brasil. Neste intituto, os soros antiofídicos produzidos são: anti-Crotalico, anti-Botropico, anti-Botropico-crotalico e anti-Botropico-laquetico (<http://www.ivb.rj.gov.br/>).

A maioria dos antivenenos é produzida em cavalos devido ao seu grande volume de sangue, podendo ser utilizados também burros e carneiros (Gutiérrez, Lomonte *et al.*, 2009). Os antivenenos podem ser ditos monovalentes ou polivanlentes, ou seja, podem ser fabricados a partir da hiperimunização com o veneno de uma única espécie ou com o veneno de duas ou mais espécies, respectivamente. Pra se obter uma boa hiperimunização podem ser necessários de dez a quinze injeções de veneno em um período de 3 a 15 meses (Chippaux e Goyffon, 1998). Após esse período ocorre a coleta do sangue, o plasma é fracionado para extrair e purificar as imunoglobulinas ativas. Tal fracionamento é realizado com a utilização de sulfato de amônio ou sulfato de sódio (Gutiérrez, Lomonte *et al.*, 2009). Os antivenenos podem consistir principalmente de IgG, imunoglobulinas purificadas (Fig.9A) e de fragmentos produzidos a partir da digestão destas imunoglobulinas com papaina ou pepsina, formando fragmentos Fab (Fig. 9B) e F(ab')₂ (Fig. 9C), respectivamente, sendo que a maioria dos fabricantes utilizam fragmentos F(ab')₂ na sua produção.



Figura 9: Estrutura das imunoglobulinas presentes nos anti-venenos. (A) IgG, (B) Fab, e (C) $F(ab')_2$. VL e VH: regiões variáveis das cadeias leves e pesadas, CL e CH: regiões variáveis das cadeias leves e pesadas, FC: fragmento FC (Espino-Solis, Riaño-Umbarila *et al.*, 2009)

Tem sido muito discutidas as vantagens e desvantagens do antiveneno ser composto de IgG purificada, ou fragmentos Fab e $F(ab')_2$. De forma geral, os fragmentos Fab apresentam uma distribuição mais rápida nos tecidos, quando comparados a IgG e a $F(ab')_2$, embora o fragmento Fab seja eliminado da circulação de forma mais rápida (Gutiérrez, León *et al.*, 2003). As IgG promovem um maior poder no que se trata de causar reações adversas, como alergia. No momento, no caso de envenenamento de viperídeos tem sido preferido o uso de antivenenos constituídos de IgG total ou fragmentos $F(ab')_2$, por apresentarem uma meia vida maior, uma vez que estes venenos são constituídos na grande maioria das vezes de fosfolipases, metaloproteases, serinoproteases, que são moléculas de maior massa molecular, e consequentemente distribuição mais lenta no organismo (Bon, 1996). Já no envenenamento por elapídicos, onde os seus venenos apresentam uma maior quantidade de proteínas de baixa massa molecular, é indicado uma combinação de IgG e $F(ab')_2$, com fragmentos Fab, por este último ser mais rápido na distribuição no organismo (Espino-Solis, Riaño-Umbarila *et al.*, 2009).

A maioria dos antivenenos utilizados é polivalentes, uma vez que muitas vezes torna-se difícil a identificação da espécie de serpente responsável pelo acidente, para que possa ser administrado um antiveneno monovalente. Desta forma, a produção do soro se dá através da imunização através de uma mistura de venenos, de diferentes espécies. Essa mistura é específica para cada país ou região, devido a variação

intraespecífica e ao fato de diferentes espécies de serpentes serem responsáveis pela maioria de envenenamento em cada região. A escolha do veneno utilizado no protocolo de imunização é baseada, principalmente, levando-se em conta a espécie de serpente que apresenta maior distribuição geográfica na região, e que é, conseqüentemente, responsável pelo maior índice de envenenamento (Gutiérrez, Lomonte *et al.*, 2009).

Infelizmente, muitas vezes os antivenenos disponíveis podem não proteger satisfatoriamente o paciente. Isso se deve ao fato do antiveneno não possuir anticorpos contra determinados componentes tóxicos presentes em um veneno específico. Devido à ocorrência de uma variação ontogenética, geográfica, e variação intraespecífica ou individual torna-se necessário o uso de uma mistura de venenos representativos específicos para a fabricação de antiveneno. Na literatura existem alguns estudos que mostram a reação cruzada existente entre diferentes antivenenos e venenos.

Um antiveneno produzido a partir do veneno de *Crotalus atrox* é capaz de neutralizar tipos diferentes de venenos de cinco diferentes espécies cascavéis, mas não neutraliza o veneno de *C. terrificus durriificus*, que é caracterizado pela presença de *neurotoxina* e *crotoxina*, ausentes em *C. atrox* (Chippaux e Goyffon, 1998). O antiveneno anti-*B. jararaca* apresenta reação cruzada duas vezes maior com o veneno de *B. moojeni*, em comparação a relação inversa (Heneine e Catty, 1993).

Em um estudo proteômico e de imunogenicidade, demonstrou-se que o antiveneno polivalente produzido na Costa Rica, através da imunização de cavalo com os venenos de *B. asper*, *C. simus* e *L. stenophrys* foram capazes de imunodepletar aproximadamente 80% das proteínas de *B. carribauneus* e *B. lanceolatus*, e foi efetivo na neutralização das atividades letal, hemorrágica, fosfolipásica e proteolítica dos venenos (Gutierrez, Sanz *et al.*, 2008). Através de *immunoblotting* baseado em eletroforese bidimensional, foi verificado que o anti-*N. kaouthia* reagiu apenas com fatores de veneno de cobra e com fosfolipases, apesar desse veneno apresentar outras famílias de proteínas como, cardiotoxinas, toxinas ricas em cisteínas, citotoxinas, kaouthiagina, neurotoxinas, proteínas tipo toxinas muscarínicas e *weak* neurotoxinas (Kulkeaw, Chaicumpa *et al.*, 2007).

Em um outro estudo de *immunoblotting*, demonstrou-se que um antisoro contra a crotoxina de *C. d. cascavella* reconheceu a crotoxina de *C. d. terrificus* e a bothropstoxina-I de *B. jararacussu*. Tal reação cruzada, também, foi confirmada por ensaios de ELISA *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*. Neste mesmo estudo, os autores demonstraram que o antiveneno comercial contra *C. d. terrificus*, produzido em cavalo, foi capaz de neutralizar o bloqueio neuromuscular provocado pelo veneno de *B. jararacussu* (Beghini, Cruz-Höfling *et al.*, 2005).

Em 2001, através de eletroforese unidimensional e *Western blot*, foi demonstrado que antisoros contra *M. corallinus*, *M. frontalis*, *M. spixii* e o anti-elapidico apresentaram reação cruzada com os venenos de *M. corallinus*, *M. frontalis*, *M. ibiboboca* e *M. spixii*. Tais soros reagiram com pelo menos outros onze tipos diferentes de venenos de *Micrurus*, além de reagirem com o veneno de outras serpentes da mesma família (*N.n. scutatus*, *D. angusticeps*, e *B. multicinctus*) e com o veneno de *C. d. terrificus* (Prieto Da Silva, Yamagushi *et al.*, 2001). Anteriormente, através de ELISA, foi demonstrado que os venenos de 14 diferentes espécies de *Micrurus* foram capazes de reagir com antiveneno de *M. nigrocinctus*. Este mesmo antiveneno apresentou reação cruzada com o veneno de *Naja naja kaouthia* e foi capaz de reconhecer a proteína α -cobrotoxina isolada do veneno de *Naja* (Alape-Giron, Lomonte *et al.*, 1994).

O estudo de reação cruzada entre diferentes soros e venenos torna-se importante para uso terapêutico emergencial, como já ocorre nos Estados Unidos (EUA). Neste país, existem três espécies de *Micrurus*, sendo que duas delas são de importância médica (*M. tener tener* e *M. fulvius fulvius*), por apresentarem um maior índice de acidente. Entretanto, desde outubro de 2008, a distribuição de soro foi extinta pelos EUA. A alternativa para o tratamento é a utilização de antivenenos produzidos por outros países. A eficiência de um antiveneno comercializado no México, produzido a partir da imunização com *M. nigrocinctus nigrocinctus*, foi comparado com o antiveneno dos EUA, produzido com o veneno de *M. fulvius fulvius*, em neutralizar a ação tóxica dos venenos de *M. tener tener* e *M. fulvius fulvius*. Os resultados demonstraram que o antiveneno mexicano foi capaz de neutralizar tanto o veneno de *M. tener tener* quanto o veneno de *M. fulvius fulvius*, enquanto o antiveneno produzido nos

EUA só foi eficaz contra o veneno de *M. fulvius fulvius* (Sánchez, Lopez-Johnston *et al.*, 2008).

A variação intra e interespecífica na composição do veneno promove uma diferença sintomatológica, após o envenenamento. Tal fato reflete um cuidado maior na produção do antiveneno, procurando sempre a fabricação de um ativeneno que possa neutralizar ao máximo estes sintomas. Para isso a escolha dos venenos utilizados para a imunização é um passo primordial na fabricação dos mesmos. Os estudos proteômicos e imunonômicos dos venenos de serpentes, juntamente com as análises de reação cruzada vem para auxiliar no conhecimento das famílias de toxinas presentes nos venenos de diferentes espécies, e sua imunogenicidade, o que irá propiciar uma melhora no campo da sorologia.

Apesar dos venenos das serpentes auxiliarem na sorologia, uma outra vertente a ser explorada é o conhecimento dos mesmos visando uma prospecção biotecnológica, no que se trata da descoberta de possíveis proteínas com um potencial farmacológico. Alguns estudos tem tratado estes venenos explorando o seu caráter anti-parasitário.

1.7 Venenos de serpentes e sua atividade antiparasitária

Venenos de serpentes como *Cerastes cerastes*, *Vipera lebetina* e *Naja haje* foram capazes de inibir o crescimento de *T. cruzi* e *L. donovani infantum* (Fernandez-Gomez, Zerrouk *et al.*, 1994). Enquanto isso, o veneno de *B. jararaca* mostrou ação inibitória ação no crescimento de formas epimastigotas de *T. cruzi* e formas promastigotas de *L. donovani*. Neste estudo foram observadas alterações estruturais induzidos por este veneno, em formas epimastigotas, tripomastigotas, e amastigotas de *T. Cruzi*, assim como, em formas promastigotas de *L. major* (Goncalves, Soares *et al.*, 2002). Em um estudo comparativo com três venenos de *Crotalus*, mostrou-se que o veneno bruto de *C. durrisus terrificus* apresenta uma atividade anti-*Leishmania* superior quando comparado ao veneno de *C. durrisus cascavella*, por outro lado, o veneno bruto de *C. durrisus collilineatus* é capaz de aumentar em 50% o número de parasitas (Goncalves, Soares *et al.*, 2002).

As LAOs de alguns venenos foram isoladas e apresentaram atividade anti-*Leishmania*. O veneno bruto de *B. moojeni* apresentava atividade anti-*Leishmania*, sendo, uma LAO capaz de inibir o crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. panamensis* e *L. chagasi* (Tempone e Andrade, 2001). Em outro estudo, a LAO do veneno de *B. jararaca* que foi ativa contra formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (Ciscotto, Machado De Avila *et al.*, 2009). Como demonstrado em ambos os estudos, e em outros descritos na literatura, a atividade anti-*Leishmania* das LAOs ocorrem devido a atividade enzimática da mesma. Tais enzimas catalizam a desaminação oxidativa de L-aminoácidos, promovendo a formação de peróxido de hidrogênio, cuja ação é extinta pela adição de catalase ao meio de cultura. Uma LAO isolada do veneno de *B. pirajai* induziu morte dose-dependente de formas promastigotas de diferentes espécies de *Leishmania*, sendo *L. braziliensis* a mais susceptível dentre as estudadas (Izidoro, Ribeiro *et al.*, 2006). Uma LAO do veneno de *C. durrisus cascavella* exibiu alta atividade anti-*Leishmania* contra formas promastigotas de *L. amazonensis*, sendo sua atividade também, dependente de produção ed peróxido de hidrogênio, com uma concentração inibitória de 50% (IC₅₀) estimada em 2,39 µg/mL (Toyama, Toyama *et al.*, 2006).

A atividade anti-*Leishmania* de frações isoladas do veneno de *C. durrisus cascavella* foi demosntrada em outro estudo . A fração mais ativa contra *Leishmania* foi a giroxina, uma fração com atividade proteolítica que apresenta, também, proteínas como LAO, seguida de crotamina, um polipeptideo básico que possui ação analgésica, e posteriormente, crotoxina a fração considerada também mais tóxica do veneno (Passero, Tomokane *et al.*, 2007).

Recentemente, duas PLA₂s miotóxicas foram isoladas do veneno de *Bothrops brasiliis*, uma Asp49 enzimaticamente ativa, e outra Lis49 desprovida de atividade enzimática. Ambas as proteínas apresentaram atividade anti-*Leishmania*, sendo ativas contra *L. baraziliensis* e *L. amazonensis*. Além das toxinas nativas, os pesquisadores demonstraram, também, a mesma atividade para um peptídeo sintetizado a partir da região C-terminal dessas toxinas. Esse é um peptídeo catiônico e hidrofóbico que compreendem os aminoácidos 115 a 129 dessas toxinas (Passero, Tomokane *et al.*, 2007).

Mostrando um resultado diferente de inibição, outro estudo, demonstrou que formas amastigotas e promastigotas de *L. amazonensis* apresentaram aumento de crescimento quando tratadas com uma PLA₂ isolada do veneno de *C. durrius collilineatus*. Experimentos *in vivo* com formas promastigoda de *L. amazonensis* tratada com PLA₂ do veneno crotálico aumentaram o tamanho da lesão em camundongos BALB/c, onde análises histopatológicas demonstraram numerosas regiões necróticas. Observou-se, também, um aumento de PGE₂, um mediador inflamatório relacionado a progressão da leishmaniose, uma vez que diminui o nível de Interleucina-2 (IL-2) e aumenta o nível de IL-10, citocinas responsáveis pela cura e progressão da doença, respectivamente (Passero, Laurenti *et al.*, 2008).

Como descrito em toda esta introdução, fica claro perceber que a importância da compreensão dos venenos das serpentes, não é simplesmente pelo seu âmbito natural, ou seja, não só para entender qual a função de cada proteína para o organismo animal. A importância ultrapassa estes tópicos, e estapola no que diz respeito ao aproveitamento desse conhecimento para melhoria da vida e da saúde humana. O conhecimento dessas proteínas que fazem parte da composição dos venenos podem auxiliar em um melhor e mais efetivo tratamento sorológico, assim como, serem potenciais drogas utilizadas para várias doenças, como as doenças parasitárias.

Desta forma, o presente trabalho teve como finalidade o desenvolvimento e melhoria na produção de soros antiofídicos, assim como o desenvolvimento de formas alternativas para um possível tratamento de doenças parasitárias com base na utilização de venenos de serpentes do gênero *Micrurus*. Em uma primeira plataforma de estudos foram realizadas análises proteômicas visando traçar o perfil proteico dos venenos das espécies *M. frontalis*, *M. ibiboboca* e *M. lemniscatus*, assim como fazer a identificação de espécies proteicas nestes venenos.

Em um segundo momento foram realizadas análises anti-venômicas, traçando reações cruzadas entre os venenos de *M. frontalis*, *M. ibiboboca*, *M. lemniscatus* e *M. spixii*, frente a diferentes antivenenos (anti-*M. corallinus*, anti- *M. frontalis*, anti- *M. ibiboboca* e anti-Elapídico) elucidando as famílias de toxinas que são reconhecidas pelos anti-venenos, em cada veneno. Em última instância, com a finalidade de promover uma exploração maior de um dos venenos, uma investigação pioneira foi realizada com

o veneno de *M. lemniscatus*. Através de cromatografia bidimensional, duas novas proteínas com atividade citotóxica, foram isoladas e parcialmente caracterizadas bioquimicamente. Tais proteínas mostraram-se tóxicas para formas amastigotas de *Leishmania amazonensis*, embora tenham apresentado, também, certa toxicidade em macrófagos.



2. Objetivos

2 Objetivos

2.1 Objetivos Geral

Traçar o perfil protéico dos venenos de serpentes do gênero *Micrurus* (*Micrurus frontalis*, *M. lemniscatus* e *M. ibiboboca*), por meio de técnicas proteômicas, e o perfil anti-venômico dos venenos elapídicos, por meio da avaliação das reações cruzadas entre os venenos de algumas espécies de *Micrurus* contra antivenenos elapídicos mono e polivalentes. Ainda, por meio do cruzamento dos dados dos perfis proteômico e anti-venômico, identificar famílias estruturais para as quais o reconhecimento dos antivenenos está prioritariamente direcionado, relacionando essa identificação às famílias previamente descritas como farmacologicamente ativas nesses venenos. Eventualmente proteínas de interesse podem ser purificadas, identificadas estrutural e funcionalmente.

2.2 Objetivos Específicos

- Análisar a composição protéica dos venenos de *M. frontalis*, *M. lemniscatus* e *M. ibiboboca* por meio de técnicas de cromatografia líquida uni e bi dimensional acopladas a espectrometria de massa (ESI-Q-TOF e MALDI-TOF-TOF)
- Análisar a distribuição espacial das famílias estruturais moleculares em função do comportamento cromatográfico (carga líquida e hidrofobicidade) e massa molecular;
- Fracionar os venenos de *M. frontalis*, *M. lemniscatus* e *M. ibiboboca* através de cromatografia bidimensional (2D-LC – cromatografia de troca catiônica seguida de cromatografia de fase reversa), análisar os conteúdos proteicos fracionados por espectrometria de massa (ESI-Q-TOF e MALDI-TOF-TOF).
- Análisar a composição dos venenos de *M. frontalis*, *M. lemniscatus*, *M. ibiboboca* e *M. spixii*, por eletroforese bidimensional.
- Identificar as famílias de proteínas do veneno das espécies de *Micrurus* acima mencionadas por determinação parcial de estrutura primária das proteínas obtidas no

fracionamento bidimensional e da extração da eletroforese bidimensional, respectivamente, através de degradação de Edman e do sequenciamento de fragmentos trípticos por espectrometria de massa (MS/MS), buscando por similaridades de sequências proteínicas depositadas em banco de dados.

- Analisar a reação cruzada entre os venenos de *M. frontalis*, *M. lemniscatus*, *M. ibiboboca* e *M. spixii* contra os antivenenos mono e polivalentes (anti-*M. corallinus*, anti-*M. frontalis*, anti-*M. ibiboboca* e anti-Elapídico), por meio de imunoenaios (*immunoblot*).

- Determinar as famílias estruturais envolvidas nas respostas imunológicas;

- Purificar e caracterizar bioquímica e funcionalmente proteínas de interesse.



3. Metodologia

3 Metodologia

3.1 Obtenção dos venenos

Os venenos das serpentes das espécies *M. frontalis* e *M. lemniscatus* foram gentilmente cedidos pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED, Belo Horizonte, Brasil). As amostras de ambas consistiam de um *pool* de venenos coletados de machos e fêmeas adultos, originadas da região sudeste do Brasil. A identificação das serpentes e a extração dos venenos foram realizadas pelo Setor de Imunobiológicos, na Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Belo Horizonte, Minas Gerais. Ambos os venenos são regularmente usados na fabricação de antivenenos por essa fundação. O veneno da serpente da espécie *M. ibiboboca* consistia em um *pool* de oito espécimes adultos, de ambos os sexos, coletados em João Pessoa, PB e gentilmente cedidos pelo Msc. Gentil Alves Pereira Filho, do Departamento de Sistemática e Ecologia, da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Os espécimes de *M. ibiboboca* cujos venenos foram utilizados neste trabalho foram depositados na coleção herpetológica da UFPB. O veneno da serpente *M. spixii*, do Peru, foi gentilmente cedido pelo Dr. Eládio Sánchez (FUNED) e consistia de um *pool* de venenos de ambos os sexos. Após coleta, os venenos foram mantidos liofilizados em temperatura de -20°C .

3.2 Obtenção dos antivenenos

Os antivenenos monovalentes, anti-*M. frontalis*, anti-*M. ibiboboca* e anti-*M. corallinus* e o polivalente anti-Elapídico foram cedidos pela FUNED. O anti-Elapídico foi produzido por meio da hiperimunização de cavalos com um *pool* de venenos das serpentes *M. frontalis* e *M. ibiboboca*, em proporções iguais (1:1), seguindo o protocolo de imunização da FUNED. O soro é constituído de fragmentos F(ab')_2 purificados, gerados a partir de digestão com pepsina. O soro foi estocado a 4°C como recomendado pelo fabricante. Os antivenenos monovalentes (anti-*M. corallinus*, anti-*M. frontalis* e anti-*M. ibiboboca*) foram gentilmente cedidos pela Dra. Wany Selenia Maria, da Divisão de Produção de Imunobiológicos, FUNED. Estes antivenenos foram produzidos através da imunização de cavalos com um *pool* de venenos de cada espécie. Os antivenenos

monovalentes foram estocados a -20°C. Alíquotas foram feitas para evitar alteração estrutural das imunoglobulinas durante sucessivos processos de congelamento e descongelamento.

3.3 Dosagem de proteína

O conteúdo protéico das amostras foi estimado de acordo com Harris & Bashford (1987). As amostras foram medidas espectrofotometricamente por leitura de absorbância em comprimentos de onda de 215nm, 235nm e 280nm. As concentrações de proteína foram calculadas seguindo a fórmula $C=(E_{235} - E_{280})/2.51$, ou comparadas com soro albumina bovina (BSA) para a qual a absorbância (280nm) de 15 equivale a 1,0 mg/ml.

3.4 Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LC/MS)

As amostras dos venenos (*M. frontalis*, *M. lemniscatus* e *M. ibiboboca*) foram dissolvidas em 0.1% ácido trifluoroacético (TFA), na concentração de 1mg/mL. O fracionamento dos venenos foi realizado por cromatografia líquida em fase reversa, usando uma coluna XTerra MS C18 (300mm x 150mm NanoEase™, com tamanho da partícula: 3,5mm; e tamanho do poro: 125 Å). A coluna foi equilibrada com 0,1% TFA em um fluxo de 140 mL/min. Um divisor de fluxo foi usado para entrada da amostra no espectrômetro de massas. O conteúdo protéico foi eluído em gradiente linear (0 – 80%) de 0,1% TFA em acetonitrila (ACN), durante 120 minutos. A entrada do solvente e a formação do gradiente foram realizadas pelo sistema Shimadzu LC 10AD. Os espectros de massa foram adquiridos utilizando o ESI-Q-TOF/MS (Micromass, Manchester, UK). A voltagem do capilar foi de 2.5-3.0 kV e a voltagem do cone de 40-60v. As amostras (10 mL) foram injetadas manualmente no sistema LC/MS, e analisadas no modo positivo sobre uma m/z de 400 – 3400. O aparelho foi previamente calibrado com iodeto de sódio. Os dados foram analisados pelo software MassLynx 4.0.

3.5 Cromatografia Líquida Bidimensional (2D-LC)

Todas as análises de cromatografia líquida bidimensionais foram realizadas usando o sistema ÄKTA Explorer 10 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia), controlado pelo software UNICORN 4.11 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). A eluição foi monitorada pelas medidas de absorvância a 214 e 280 nm. As frações foram coletadas por coletor de frações automatizado Frac 920 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia) em placas de 96 poços (*deep well*). A cromatografia foi realizada como descrita previamente por (Rates, Bemquerer *et al.*, 2007), com modificações. Os venenos brutos de *M. frontalis*, *M. ibiboboca* e *M. lemniscatus* foram fracionados por cromatografia de troca catiônica (CIEX) (primeira dimensão) sendo as frações obtidas refracionadas por cromatografia de fase reversa (RPC) (segunda dimensão).

Na primeira dimensão, as amostras de venenos (2 mg) foram injetadas na coluna TSK-Gel CM-SW, 15cm x 4,6mm, (Tosoh Biosep, Montgomeryville, EUA) equilibrada com acetato de sódio 20 mM em pH 5,0 (solução A). A eluição das frações foi realizada com um gradiente linear de 0 a 1M de NaCl em acetato de sódio 20 mM (solução B), em 100 minutos. Com um fluxo de 0,75 mL/min em temperatura ambiente, sendo coletados 0,4 mL por tubo. A absorvância foi monitorada a 214 e 280 nm.

Na segunda dimensão, as frações eluídas no fracionamento por CIEX foram aplicadas na coluna de fase reversa Source 15 4.6/100 (GE Healthcare, Uppsala, Suécia), equilibrada com solução de TFA 0,1% (v/v) em água MiliQ (solução A). Os compostos foram eluídos por três passos de gradiente de TFA 0,1% (v/v) em ACN (solução B), por um fluxo de 1 mL/min. O primeiro passo foi realizado em 2,5 minutos em um gradiente linear de 0 – 10% de solução B; o segundo passo em 69,7 minutos em um gradiente linear de 10 – 80% de solução B e o terceiro foi realizado em 1,6 minuto em um gradiente linear de 80 – 100% de solução B. A eluição foi monitorada na absorvância de 214 e 280 nm. As frações foram coletadas em volume de 0,5 mL e posteriormente analisadas por espectrometria de massa do tipo ESI-Q-TOF/MS ou MALDI-TOF/TOF.

3.6 Análises por Espectrometria de Massa

As análises por espectrometria de massa foram realizadas através do espectrômetro do tipo *Electrospray ionization quadrupole time-of-flight* (ESI-Q-TOF) no Q-TOF Micro (Micromass, Manchester, UK) operado no modo positivo. A voltagem do capilar foi de 3000 – 4000 V as voltagens do *sample cone* foram de 40 – 60V. O espectrômetro de massa foi calibrado com iodeto de sódio. As amostras, diluídas em solução de TFA 0,1%, foram introduzidas utilizando-se uma bomba de seringa com um fluxo de 5 – 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Antes da interpretação dos dados, 20 *scans* (2,4 s duração) foram combinados em um único espectro. Os dados combinados dos espectros foram tratados (subtração da linha de base, suavização e centralização) e as informações foram manualmente deconvoluídas. Os dados obtidos foram analisados utilizando o programa MassLynx 4.0.

Como estratégia alternativa, as análises por espectrometria também foram realizadas por MALDI-TOF-TOF, usando o aparelho Autoflex III ou UltraFlex III (Bruker Daltonics, Billerica, USA) operado de modo positivo. O aparelho foi calibrado com padrões externos (*Protein Calibration Standard I*, Bruker Daltonics, Alemanha). As amostras foram dissolvidas em TFA 0,1 % (v/v) e misturado com solução matriz de ácido α -ciano-hidroxicinâmico (1:3, v/v, solução saturada em TFA 0,1%), sendo posteriormente 0,5 μL colocados sobre a placa de MALDI (AnchorChip-600; Bruker Daltonics, Billerica, USA) e secas a temperatura ambiente. As massas médias foram obtidas através do modo linear positivo e as massas monoisotópicas em refletido positivo.

3.7 Determinação da seqüência N-terminal de proteínas isoladas

A determinação da seqüência de aminoácidos de proteínas isoladas nas etapas de cromatografia líquida foi realizada pelo Dr. Michael Richardson, no Laboratório de Química de Proteínas, na Fundação Ezequiel Dias (FUNED). Amostras de proteínas purificadas (70 μg) foram desnaturadas em solução de guanidina 6 M, Tris-HCl 0,6 M, pH 8,6. Posteriormente as proteínas tiveram suas ligações dissulfeto reduzidas com 30

μL de 2-mercaptoetanol e os resíduos de cisteína foram alquilados com 30 μL vinylpiridina. O sequenciamento foi realizado segundo a metodologia desenvolvida por Edman, automatizada (Edman, 1950) . As amostras liofilizadas (50-200 pmol), após cromatografia de fase reversa, foram ressuspensas em 50 μL de TFA 0,1% (v/v) e aplicadas no seqüenciador automático PPSQ-21A Protein Sequencer (Shimadzu, Tokyo, Japan), acoplado ao fracionamento em fase reversa de aminoácidos PHT, em uma coluna WAKOSIL-PTH (4.6 x 250 mm) column (Wako, Osaka, 199 Japan).

3.8 Pesquisa de Similaridade

A pesquisa por similaridade de seqüências de aminoácidos foi realizada usando os programas FASTA3 e BLASTP 2.2.23+, nos bancos de dados Swiss-Prot e GeneBank, com filtro taxonômico para serpentes. Após a busca, as proteínas similares foram selecionadas de acordo com a proximidade taxonômica com o gênero *Micrurus* e/ou com a localização relevante (proteínas de origem de venenos em prol a proteínas sanguíneas, secretadas ou de membranas).

3.9 Eletroforese bidimensional (Gel-2D)

Os venenos brutos de quatro espécies de *Micrurus* (*M. frontalis*, *M. lemniscatus*, *M. ibiboboca* e *M. spixii*) foram separados por eletroforese bidimensional. O veneno de *M. spixii* (espécimes peruanos) foi utilizado como amostra externa, para a qual poderia se esperar uma baixa reação cruzada com antivenenos brasileiros. A separação na primeira dimensão foi realizada em *DryStrips* de 7cm, pH 3-11 não linear (GE Healthcare, Upsala, Suécia). As amostras (50 μg) foram rehidratadas durante 12 horas em uma solução de uréia 8M, tiuréia 2M, ácido 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]propanesulfônico (CHAPS) 4% (v/v), azul de bromofenol 0,5%, com 10mg/mL de 1,4-dithio-DL-threitol (DTT) e 1% (v/v) de anfólitos (Tampão de gradiente de pH imobilizado –IPG, pH 3-11 não linear – GE Healthcare, Uppsala, Suécia). A corrida foi realizada no sistema Ettan IPGhor (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). A isofocalização na primeira dimensão foi realizada de acordo com o seguinte protocolo: 300V a 5000V em seis horas, com uma voltagem final de 500 V por 30 minutos. Depois de desenvolvida a primeira dimensão, as *Strips* foram

estocadas a -80°C ou incubadas a temperatura ambiente no tampão de equilíbrio (2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol (Tris) pH 8,8 50mM, uréia 6M, glicerol 30% (v/v), dodecil sulfato de sódio (SDS) 2% (v/v), 0,001% (v/v) de solução de azul de bromofenol a 0,5%) com 10mg/mL de DTT e 25mg/mL de iodoacetamida. A eletroforese na segunda dimensão foi realizada em sistema vertical com gel de separação a 12,5% (v/v) à 25°C sendo submetido uma voltagem de 120V. Após a corrida os géis foram incubados a temperatura ambiente por 1h e 30min na solução de fixação A (ácido ortofosfórico 2% (v/v) e etanol 30% (v/v)), na solução de fixação B (ácido ortofosfórico 2% (v/v)) por 30 min. e na solução de fixação C (ácido ortofosfórico 2% (v/v), etanol 18%(v/v), e sulfato de amônio 12% (v/v)). As proteínas foram visualizadas utilizando Comassie Blue G-250 2% (v/v) ou foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, para a realização do *Western blotting*. Os *spots* dos géis, corados por Comassie Blue G-250, foram cortados e extraídos para posterior digestão com tripsina.

3.10 Digestão trípica (*in gel*)

Os *spots* de interesse foram extraídos do gel-2D e descorados com ACN 50% e bicarbonato de amônio 25mM, pH 8,0. Após lavagens sucessivas até o total desbotamento do gel, os *spots* foram desidratados com ACN 100% e secos a vácuo em *Speed-Vac*. Posteriormente, foi realizada a digestão com tripsina modificada (*Sequencing grade Trypsin*, Promega, Madison, USA), seguindo as instruções do fabricante. A mistura permaneceu reagindo por 20 horas a 37°C . Os peptídeos trípticos foram extraídos com uma solução de ácido fórmico a 5% (v/v) e ACN 50% (v/v), sendo posteriormente secos no concentrador a vacuo para redução do volume. Os digestos, foram espotados na placa de MALDI-TOF (AnchorChip 600 - Bruker Daltonics, Billerica, USA) após serem desalinizados por ZipTip C18 (Millipore, Billerica, USA). Utilizou-se ácido α -ciano-4-hidroxicinnâmico como matriz (1:3, v/v). Os espectros MALDI-TOF MS/MS foram obtidos utilizando o método LIFT nos aparelhos Autoflex III ou Ultraflex III (Bruker Daltonics, Billerica, USA), operados no modo positivo e refletido, para obtenção de massas monoisotópicas. O sequenciamento *de novo* foi

realizado manualmente usando os programas Biotoools (Bruker Daltonics, Billerica, USA) e Pepseq (Micromass, Manchester, Reino Unido).

3.11 Imunoensaio – reação cruzada

Nas análises de *Western blot*, as proteínas dos géis-2D com os venenos de *M. frontalis*, *M. ibiboboca*, *M. lemniscatus* e *M. spixii* foram realizados como descrito abaixo. As proteínas foram eletro-transferidas para membranas de nitrocelulose (Millipore), utilizando o sistema de transferência (Mini-Protean®II Cell/Bio-Rad), durante 12h, a uma voltagem de 24V e mais uma 1h a uma voltagem de 48V, ou durante 2h a uma voltagem de 100V. A transferência das proteínas para a membrana foi confirmada através da coloração da membrana com solução de Ponceau S. Posteriormente, as membranas foram imersas em uma solução de bloqueio (Monolaurato de Sorbitan Etoxilado 20 (Tween) 0,3% (v/v) e leite em pó 0,5% (p/v) em tampão fosfato salino (PBS), pH 7,4). Após incubação a 25°C por 1h a membrana foi lavada com solução de lavagem (Tween 0,05% (v/v) em PBS). As membranas bloqueadas foram incubadas com antivenenos (anti-*M. corallinus*, anti-*M. frontalis*, anti-*M. ibiboboca* e anti-Elapídico) em uma diluição de 1:1000 em Tween 0,3% (v/v) e leite em pó 0,5% (p/v), pH 7,4, durante 2 horas a 25°C. Após as lavagens (Tween 0,3% (v/v) em PBS), a membrana foi incubada com anti-IgG de cavalo conjugado a peroxidase (Sigma, USA) na diluição e 1:500. Após novas etapas de lavagem (Tween 0,3% (v/v) em PBS) foi realizada a adição de solução de substrato (10mg de 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) mais 5mg de cloronafitol em 28 mL de PBS contendo 8 µL de H₂O₂ a 30% (v/v) e 0,55 mL de metanol. A reação de coloração foi paralizada com a adição de água destilada à membrana.

3.12 Fracionamento do veneno de *M. lemniscatus*

O veneno bruto de *M. lemniscatus* foi fracionado por três etapas cromatográficas, para obtenção de duas proteínas puras. As duas primeiras etapas de purificação foram através de cromatografia de troca catiônica TSK-Gel CM-SW, 15 cm x 4,6mm, (Tosoh Biosep, Montgomeryville, EUA) e cromatografia de fase reversa Source 15 4.6/100 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia), realizadas nas condições já

descritas acima (item 3.5). O fracionamento foi realizado com um total de 70 mg de veneno bruto de *M. lemniscatus*, ocorrendo vários passos de fracionamentos, sendo que, em cada passo, foram aplicados 2 mg de veneno. As frações foram analisadas por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF/TOF, como descrito anteriormente. As frações que apresentaram conteúdos proteicos na faixa de massa molecular entre 6 a 8 kDa e com menor número de constituintes moleculares foram selecionadas para recromatografia. Na terceira etapa do fracionamento foi, também, realizada cromatografia de fase reversa. A fração da RPC (MI 4.2), em coluna Source 15 4.6/100, foi aplicada na coluna de fase reversa C2/C18 ST 4.6/100 (GE Healthcare), equilibrada com a solução de TFA 0,1%. Os compostos foram eluídos através de três passos de gradiente de TFA 0,1% (v/v) em ACN (solução B), em um fluxo de 1 mL/min. O primeiro passo foi realizado em 7 minutos em um gradiente linear de 0 – 10% de solução B, o segundo passo em 83 minutos em um gradiente linear de 10 – 80% de solução B e o terceiro foi realizado em 3 minutos em um gradiente linear de 80 – 100% de solução B. Foram coletados 0,5 mL por tubo, a um fluxo de 1 mL/min. A eluição foi monitorada por leitura da absorvância ($\lambda = 214\text{nm}$).

3.13 Análises estruturais das proteínas purificadas do veneno de *M. lemniscatus*

As proteínas purificadas dos venenos de *M. lemniscatus* tiveram sua massa molecular determinada por MALDI-TOF-TOF, usando o aparelho Autoflex III (Bruker Daltonics, Billerica, USA) operado de modo positivo linear, como descrito no item 3.6. A determinação da estrutura primária parcial foi realizada por Edman (1950), como descrito no item 3.7. Após a determinação da sequência N-terminal, foi realizada a identificação das proteínas por similaridade. A busca de similaridade foi realizada pelo programa BLASTP 2.2.23+, usando o Swiss-Prot e o GeneBank como banco de dados, com filtro taxonômico para serpentes. O alinhamento de aminoácidos das proteínas identificadas com proteínas selecionadas no banco de dados foi realizado através do programa ClustalX 2.0.11, no modo de alinhamento múltiplo (Thompson, Gibson *et al.*, 1997).

3.14 Atividade anti-*Leishmania*

Os ensaios de atividade anti-*Leishmania* e de citotoxicidade em macrófago foram realizados no Laboratório de Imunoquímica de Parasitas, no Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG, com a colaboração do Msc. Diogo Valadares e do Dr. Eduardo Ferraz Coelho.

3.14.1 Cultivo dos parasitas

Os parasitas foram cultivados em meio de cultura de Schneider completo, o qual foi constituído pelo meio Schneider (Sigma, Chemical Co, ST Louis, USA) acrescido com 20% (v/v) de soro fetal bovino (Sigma, USA) inativado, 20 mM de L-glutamina, 50 µg/mL de gentamicina, 200 u/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, em pH 7,4. Os parasitas permaneceram em cultivo a 24,5°C, sendo os repiques das culturas efetuados de três em três dias para *L. (L.) amazonensis* período no qual os parasitas encontravam-se em fase logarítmica de crescimento. Estoques de parasitas foram congelados em glicerol estéril, na concentração de 15% (v/v), diluídos em 1mL de meio Schneider completo e armazenados em nitrogênio líquido (-196°C).

3.14.2 Ensaio de citotoxicidade em *L.(L.) amazonensis*

A viabilidade dos parasitas foi ensaiada colorimetricamente pela oxidação de MTT (brometo de 3-[4,5- dimethylthiazol-2-y1]-2,5diphenil-tetrazolio) pelas mitocôndrias das células. Em placa de cultura celular de 96 poços Costar® foram incubadas formas promastigotas de *L.(L.) amazonensis* (4×10^5 células / poço), com as proteínas purificadas (25 µg/mL e 50µg/mL) ou anfotericina B (35 µg/mL e 50µg/mL) em meio RPMI-PR⁻ 1640, suplementado com 20% de soro fetal bovino, com penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (50 µg/mL), pH 7,4, em um volume final de 100 µL/poço, por uma hora à 25°C. O Controle negativo foi realizado apenas com meio RPMI. Posteriormente, O MTT (5mg/mL) foi dissolvido em meio de cultura RPMI⁻PR⁻ 1640, incompleto e esterilizado em filtros (0,22 µm). Após a incubação do experimento foi adicionado o MTT (50 µL/poço) e a placa foi incubada por 4 horas a 25°C. Depois 60

μL /poço de SDS-HCl (SDS 10% (v/v) em 0,01M de HCl) foi adicionado seguindo mais 18 horas de incubação a 25°C. A viabilidade celular foi medida através da densidade óptica (OD) medida a 570 nm. A porcentagem de parasitas mortos foi calculada segundo a equação abaixo (Tempone e Andrade, 2001).

$$\% \text{ de Morte} = \frac{(\text{DO}_{\text{controle}} - \text{DO}_{\text{amostra}})}{\text{DO}_{\text{controle}}}$$

3.15 Ensaio de citotoxicidade em macrófago

Camundongos BALB/c (6 a 8 semanas de vida) receberam injeção intraperitoneal de tioglicolato de sódio (3%), após 4 dias, os animais foram sacrificados e os macrófagos peritoneais foram retirados por lavagem peritoneal. Foram injetados 10 mL de PBS gelado na cavidade peritoneal, e os macrófagos foram coletados com uma agulha de 21 G. As células foram coletadas e lavadas três vezes, por centrifugação a 1200 rpm, por 20 min. As células precipitadas foram resuspendidas em meio RPMI-1640 completo e posteriormente contadas em câmara de Neubauer diluídas 1:50 em Azul de Tripán. As células foram espalhadas em placas de 96 poços, em uma concentração de 4×10^6 cel/mL, em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 20mM de L-glutamina, 50 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina, 200 u/mL de penicilina e 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina, em pH 7,4. Após a incubação a 37°C por 2 horas em meio humidificado com 5% de CO₂, as placas foram lavadas duas vezes com meio RPMI-1640 para remoção das células que não sofreram adesão. As células aderidas foram referidas como sendo os macrófagos. Posteriormente, o meio foi retirado e as células foram incubadas por 1 hora com as proteínas purificadas (50 $\mu\text{g/mL}$) e anfotericina B (50 $\mu\text{g/mL}$), em meio RPMI-1640 completo. Após isso, foi preparada solução de MTT (2 mg/mL) em meio RPMI-1640 incompleto e esterilizada por filtração (0,22 μm). Então, 50 μL /poço da solução de MTT foram adicionados e a placa foi incubada por 4 horas a 37 °C com 5% CO₂. Finalmente, 60 μL /poço de SDS 10% em

HCL 0,01 M (SDS – HCl) foram adicionados, seguido de 18 horas de incubação. A viabilidade celular foi medida através da densidade óptica (OD) medida a 570 nm. A porcentagem de parasitas mortos foi calculada segundo a equação citada acima (Tempone e Andrade, 2001).



4. Resultados

4 Resultados

4.1 Análises Proteômicas dos venenos de *Micrurus*

As análises proteômicas foram realizadas com a finalidade de promover um conhecimento mais apurado em torno dos venenos de *M. frontalis*, *M. ibiboboca*, *M. lemniscatus* e, em um segundo momento, do veneno da espécie *M. spixii*, este especialmente visando enriquecer os dados de reação cruzada entre os venenos e antivenenos elapídicos. Para uma caracterização físico-química das proteínas dos venenos e identificação de famílias protéicas, técnicas proteômicas como cromatografia uni e bidimensional, espectrometria de massa, eletroforese bidimensional, e determinação da estrutura primária parcial, assim como pesquisas de similaridades, foram utilizadas.

4.1.1 Análise comparativa primária dos venenos por LC/MS

Com o intuito de obter um conhecimento inicial acerca da composição protéica dos venenos de *M. frontalis*, *M. ibiboboca* e *M. lemniscatus*, e verificar o perfil de hidrofobicidade de suas proteínas, os mesmos foram submetidos a análise por LC/MS. Desta forma, os venenos foram fracionados em micro coluna de fase reversa e as massas moleculares foram analisadas *on line* no ESI-Q-TOF-MS.

Como pode ser observado na figura 10, os três venenos apresentaram, perfil de eluição bastante semelhante, sendo as amostras eluídas entre 10 e 70% de ACN. Significantes similaridades e diferenças na composição individual dos venenos foram evidentes no número total de frações, massas moleculares e tempos de retenção das proteínas. As moléculas mais representativas dos venenos são as que possuem massa molecular entre 6 e 8 kDa e as de massa de 12 a 14 kDa, aproximadamente. De maneira geral, os venenos parecem demonstrar uma baixa diversidade em relação às famílias estruturais embora, por outro lado, nos mostra um maior número de isoformas protéicas, uma vez que um alto número de proteínas com massas moleculares aproximadas eluídas em concentrações diferentes de ACN é observado.

O tempo de retenção, e conseqüentemente a característica hidrofóbica das moléculas de 6-8 kDa, mostraram diferentes entre os venenos analisados. Uma

tendência de grande parte destas moléculas em se agruparem em um espaço dimensionado entre os eixos x e y é observada no veneno de *M. frontalis*, o que indica que as isoformas analisadas apresentam pouca variação na sua composição de aminoácidos (Fig. 10A). Apesar de este veneno apresentar algumas poucas proteínas nessa faixa específica de massas moleculares, sendo eluídas com uma concentração maior de ACN, entre 50% e 60%. Em contrapartida, nos venenos de *M. ibiboboca* e *M. lemniscatus* esta tendência de agrupamento das proteínas de 6-8 kDa não é observada, sendo as isoformas eluídas em concentrações diferentes de ACN, o que pode ser observado à partir da dispersão horizontal no eixo x (Fig. 10B e C).

Já as isoformas das proteínas com massas moleculares entre 12 e 14 kDa, tendem a se agrupar no veneno de *M. lemniscatus*, sendo eluídas com aproximadamente 30% de ACN (Fig. 10C). Tal fato demonstra que este veneno apresenta uma menor variabilidade na composição dessas proteínas no que refere às estruturas primárias. Nos outros dois venenos analisados, este fenômeno não é observado, ou seja, as isoformas são eluídas em concentrações diferentes de ACN, mostrando que as mesmas apresentam uma maior variabilidade estrutural. Ainda por essa estratégia de separação e identificação das proteínas, foi possível verificar a presença de proteínas com massa molecular superior a 18 kDa nos venenos de *M. frontalis* e *M. lemniscatus*, fato este que não foi observado no veneno de *M. ibiboboca*.

A figura 10D representa a sobreposição do perfil de eluição dos três venenos analisados. Diferenças nas composições dos venenos se tornam, assim, mais evidentes. Uma única proteína de massa molecular de 23,0 kDa foi encontrada apenas no veneno de *M. lemniscatus*, sendo que o mesmo apresentou maior número de peptídeos com massas moleculares em torno de 1,0 kDa. Em contrapartida, proteínas com massas moleculares em torno de 10,0 kDa só foram encontradas nos venenos de *M. frontalis* e *M. ibiboboca*, estando ausentes no veneno de *M. lemniscatus*.

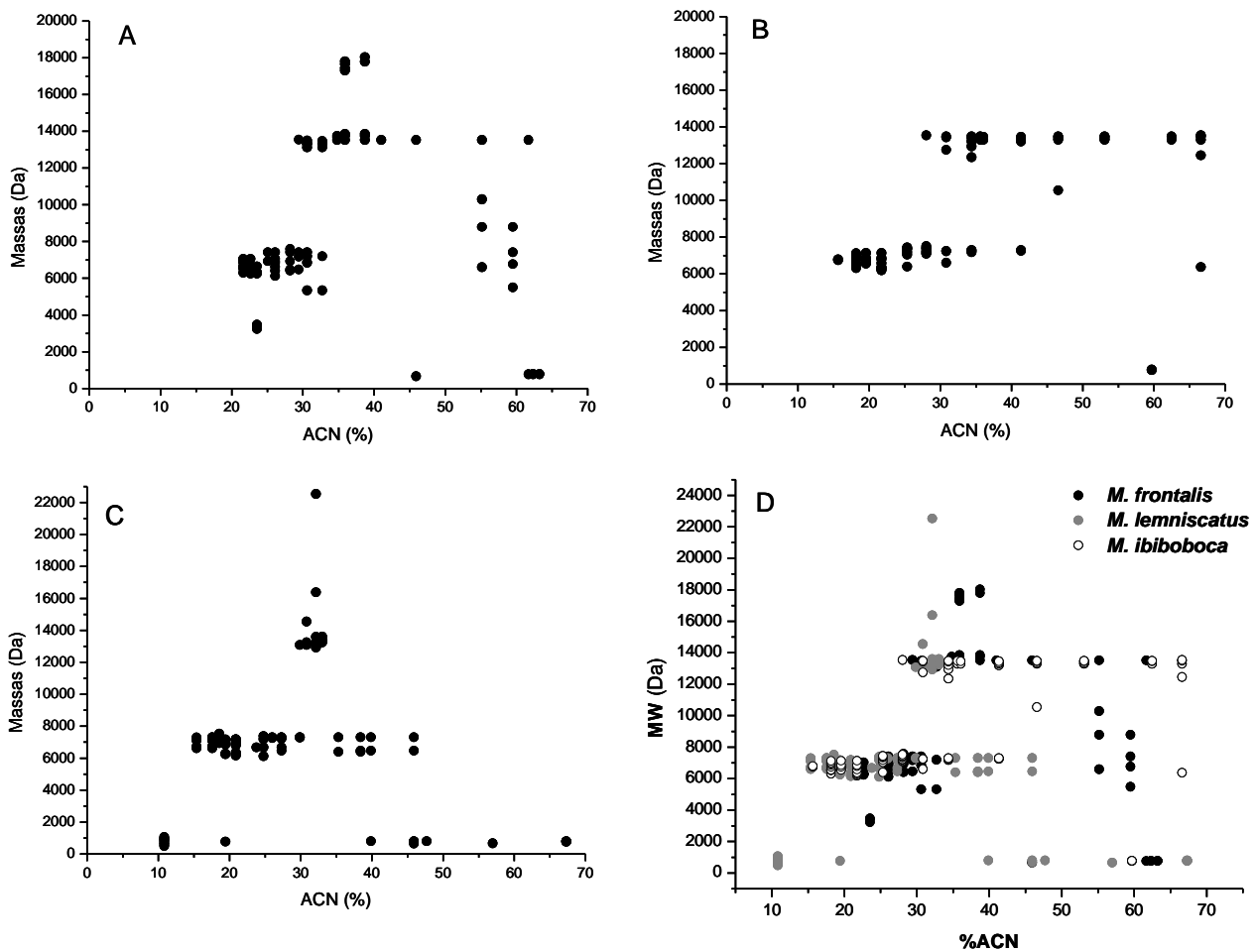


Figura 10: Distribuição das proteínas dos venenos de *Micrurus* em função da massa molecular e porcentagem de ACN. (A) *M. frontalis*, (B) *M. ibiboboca*, (C) *M. lemniscatus* (D) Sobreposição dos dados obtidos para os três venenos.

4.1.2 Fracionamento dos venenos de *Micrurus* através de cromatografia bidimensional (2D-LC)

Visando obter uma melhor separação das proteínas para conseguir uma melhor análise das mesmas, os venenos brutos das espécies *M. frontalis*, *M. ibiboboca* e *M. lemniscatus* foram fracionados utilizando a cromatografia bidimensional como estratégia metodológica. Por meio desta técnica, os venenos foram, primeiramente, fracionados por CIEX, sendo aplicados na coluna TSK-Gel CM-SW, 15cm x 4,6mm, (Tosoh Biosep, Montgomeryville, EUA). Em um segundo momento, cada fração obtida foi recromatografada por RPC em coluna Source 15 4.6/100 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia). Um melhor grau de separação das proteínas é então conseguido, pois estas são separadas levando em consideração a sua carga líquida em pH específico e o seu caráter hidrofóbico.

A figura 11 mostra os perfís cromatográficos do fracionamento dos venenos de *M. frontalis*, *M. ibiboboca* e *M. lemniscatus*, na primeira dimensão cromatográfica. Todos os venenos apresentaram uma grande quantidade de proteínas capazes de interagir com a coluna TSK-Gel CM-SW, o que mostra que tais venenos são constituídos de proteínas básicas, dado o pH utilizado. Como pode ser observado na figura 11C apenas o veneno da espécie *M. lemniscatus* não apresentou proteínas carregadas negativamente (pH 5,0) eluídas antes do início do gradiente, ou seja, todas as proteínas desse veneno foram capazes de se ligar a coluna de troca catiônica.

Os venenos de *M. frontalis* e de *M. ibiboboca* apresentaram 17 frações cada, sendo as proteínas eluídas entre 0,1 e 1 M de NaCl e 0,01 e 0,9 M de NaCl, respectivamente (Fig. 11A e 11B). Em contrapartida, o veneno de *M. lemniscatus* apresentou um número maior de frações cromatográficas, que foram eluídas entre 0,2 e 1 M de NaCl (Fig. 11C). Dentre os três venenos, apenas o veneno de *M. ibiboboca* não apresentou proteínas sendo eluídas com 1 M de NaCl, embora tenha sido o veneno que apresentou proteínas sendo eluídas com uma menor concentração relativa de sal (Fig. 11B). O fracionamento do veneno de *M. lemniscatus* foi o que apresentou melhor resolução dos picos, demonstrando uma melhor separação das proteínas (Fig. 11C).

A figura 12 representa o perfil cromatográfico do fracionamento das frações da CIEX na segunda dimensão cromatográfica. Cada uma das frações da CIEX foram, posteriormente, aplicadas à coluna Source 15 4.6/100. As proteínas foram eluídas da coluna com gradiente linear de 10 a 80% de ACN.

Os três venenos apresentaram perfis cromatográficos diferentes apesar de terem algumas similaridades. As proteínas do veneno de *M. frontalis* foram eluídas entre 10 e 40% de ACN (Fig. 12A), similar ao que aconteceu com o veneno de *M. ibiboboca* (Fig. 12B), com proteínas eluídas entre 10 e 50% de ACN. Ambos os venenos são constituídos por poucas moléculas hidrofílicas, sendo a maior parte representada por caráter moderadamente hidrofóbico. Já o veneno de *M. lemniscatus* (Fig. 12C) apresentou proteínas com diferentes caracteres de hidrofobicidade, sendo eluídas entre 12 e 80% de ACN. Dentre os três venenos, este último foi o que apresentou as proteínas mais hidrofóbicas, com proteínas sendo eluídas com mais de 50% de ACN, fenômeno que não aconteceu com os venenos de *M. frontalis* e *M. ibiboboca*. O perfil cromatográfico de *M. lemniscatus*, também foi o que mostrou uma melhor resolução dos picos (Fig. 12C).

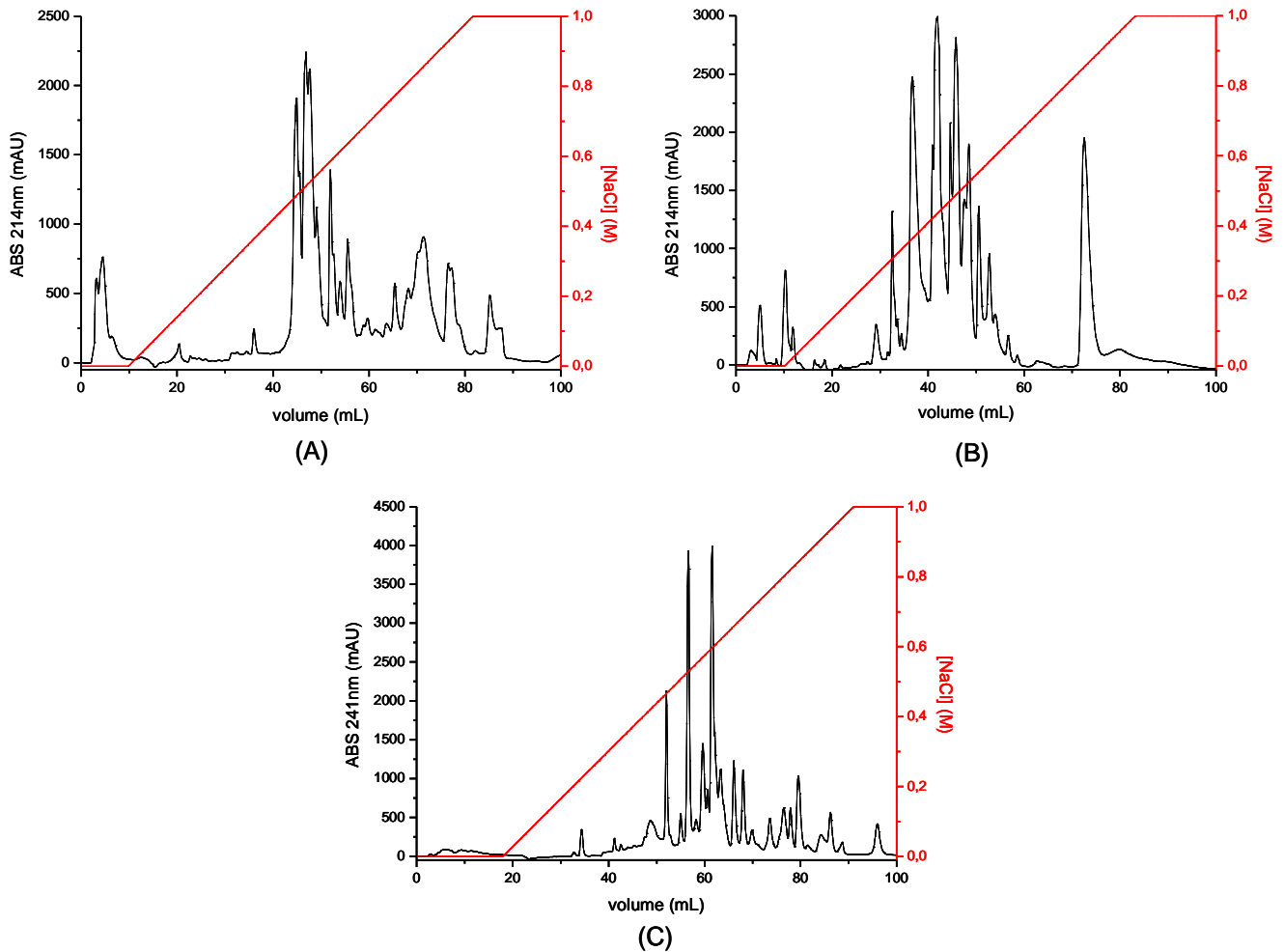


Figura 11: Cromatografia Bidimensional: Primeira dimensão - Troca catiônica (CIEX). Os venenos brutos (2 mg) de *M. frontalis* (A), *M. ibiboboca* (B) e *M. lemniscatus* (C) foram aplicados na coluna de troca catiônica TSK-Gel CM-SW (15 cm x 4,6 mm) equilibrada com acetato de sódio 20 mM, pH 5,0. As amostras foram eluídas por um gradiente linear de NaCl (0 a 1 M), a um fluxo de 0,75 mL/min. Foram coletados 0,4 mL por tubo. A eluição foi monitorada por leitura da absorbância $\lambda = 214\text{nm}$.

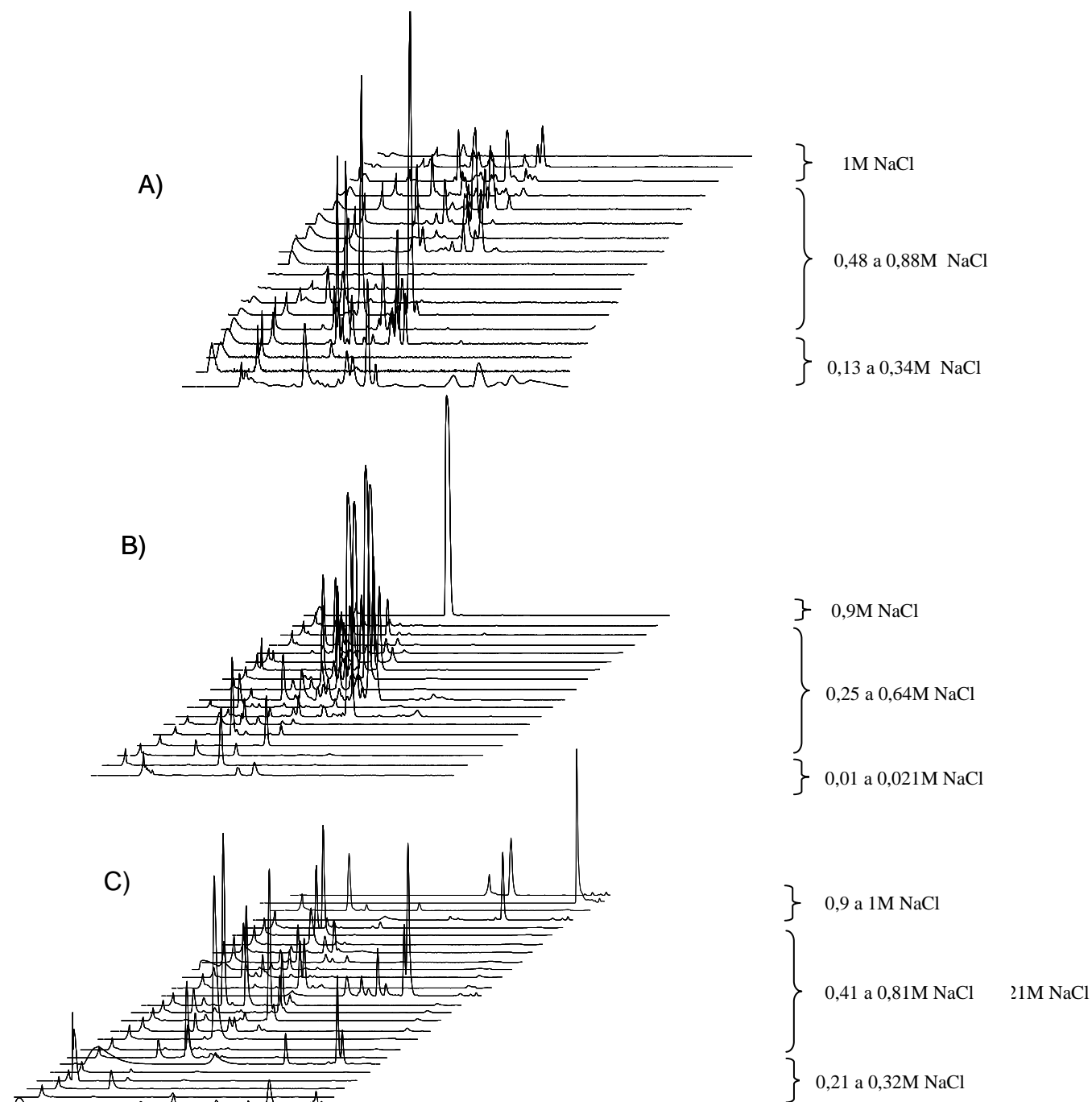


Figura 12: Cromatografia Bidimensional: Segunda dimensão - Fase reversa (RPC) das frações da CIEX. As frações da troca catiônica foram aplicadas na coluna de fase reversa Source 15 4.6/100, equilibrada com a solução de TFA 0,1%. As frações foram eluídas por gradiente linear de 10 a 80% ACN com 0,1% TFA. Foram coletados 0,5 mL por tubo, a um fluxo de 1 ml/min. A eluição foi monitorada por leitura da absorvância $\lambda = 214\text{nm}$. (A) *M. frontalis*, (B) *M. ibiboca* e (C) *M. lemniscatus*.

4.1.3 Análise das massas moleculares dos venenos das serpentes

As análises de massas moleculares das frações eluídas da RPC foram realizadas por meio de espectrometria massa. As frações do veneno de *M. frontalis* foram analisadas utilizando o MALDI-TOF-TOF, enquanto as análises das frações dos venenos de *M. ibiboboca* e *M. lemniscatus* foram realizadas por meio do ESI-Q-TOF. Através da determinação das massas moleculares das proteínas encontradas nestes venenos, já se pode ter uma visualização prévia dos tipos de proteínas encontradas nos mesmos, além de possibilitar a realização de uma comparação bioquímica mais apurada entre os venenos das três espécies.

Como pode ser observado nas tabelas numeradas de 1 a 3, um total de 518 espécies moleculares foram identificadas. Dentre as massas moleculares identificadas, 217 foram observadas no veneno de *M. frontalis*, 181 no veneno de *M. ibiboboca* e 120 no veneno de *M. lemniscatus*. Similaridades e diferenças significativas na composição molecular individual dos venenos foram observadas. As massas moleculares do veneno de *M. frontalis* estão entre 5.874,6 a 27.118,4 Da (Tab. 1), enquanto as massas encontradas no veneno de *M. ibiboboca* e de *M. lemniscatus* estão entre 631,2 a 26.907,3 Da (Tab. 2), e 416,0 a 28.169,6 Da (Tab. 3), respectivamente. Nenhuma espécie molecular com massa até 5 kDa, e entre 16 e 18 kDa foi detectada no veneno de *M. frontalis* através da utilização do MALDI-TOF-MS (Tab. 1). Já o veneno de *M. ibiboboca* não possui constituintes de massas moleculares entre 24 e 26 kDa (Tab. 2). Proteínas com massas entre 14 e 16 kDa não podem ser visualizadas no veneno de *M. lemniscatus* (Tab. 3). Deve ser ressaltado, entretanto, que essas diferenças podem ter sido acentuadas em função das diferentes técnicas de ionização utilizadas (ESI-Q-TOF vs MALDI-TOF-TOF) que podem favorecer o aparecimento de massas moleculares em diferentes faixas de m/z . Assim sendo, o uso do *electrospray* (ESI-Q-TOF) favorece a visualização de menores valores de m/z , enquanto que no MALDI-TOF-TOF) esses valores tendem a ser suprimidos pelos abundantes sinais de matriz que ocorrem na mesma faixa molecular. Ainda, massas moleculares maiores, com maior valor de m/z , tendem a ser mais facilmente observados por ionização do tipo MALDI-TOF-TOF.

Através da utilização da técnica de 2D-LC, ou seja, combinando a cromatografia de troca catiônica com a de fase reversa, foi possível obter 46 proteínas com alto teor de pureza, sendo 7 de *M. frontalis*, 13 de *M. ibiboboca* e 26 de *M. lemniscatus* (Tab. 1 a 3) o que mostra que essa estratégia pode ser adotada para purificação de proteínas específicas do veneno, objetivando a busca de atividades.

A figura 13 mostra as faixas de massas moleculares encontradas em cada veneno, correlacionando com a frequência em que são detectadas. Os três venenos são compostos na sua maior parte de espécies moleculares com massa em torno de 6 a 8 kDa, o que perfaz 65% da composição do veneno de *M. frontalis*, 44% do veneno de *M. ibiboboca*, e 59% do veneno de *M. lemniscatus*, aproximadamente. Proteínas com massas moleculares entre 12 e 14 kDa, são os segundos mais representativos. Estes compostos correspondem a 19,5% do total de massas encontradas no veneno de *M. frontalis* e *M. ibiboboca* e 9 % do veneno de *M. lemniscatus*. Tal fato está de acordo com os resultados preliminares obtidos por LC/MS. Como pode ser observado nas tabelas citadas acima e na figura 13, existe ainda outro grupo representativo no que diz respeito às massas moleculares encontradas nos venenos. São proteínas com massas moleculares acima de 20 kDa que correspondem a aproximadamente 10 %, 7 % e 9 % do total de moléculas detectadas em *M. frontalis*, *M. ibiboboca* e *M. lemniscatus*, respectivamente. Nenhum dos venenos analisados apresentou proteínas com massas moleculares entre 18 e 20 kDa (Fig. 13)T. Uma maior representatividade de proteínas com massas moleculares entre 4 e 6 kDa pode ser encontrado no veneno de *M. ibiboboca* (8,33%), em comparação com os outros dois venenos, o mesmo acontece com as proteínas com massa entre 8 e 10 kDa (4,44%).

Proteínas de alta massa molecular foram visualizadas nas frações de *M. frontalis*, através das análises realizadas no MALDI-TOF-TOF. A maior massa visualizada foi de 51.928,43 Da (Fig.14).

Tabela 1: Lista de massas moleculares das frações da RPC do veneno de *M. frotalis*.

Massas Moleculares (Da)							
5874,6	6551,2	6695,0	6840,5	7166,6	7609,1	13292,7	22358,4
5912,3	6551,9	6696,5	6854,9	7170,0	7728,6	13301,8	25594,2
6040,2	6553,1	6701,0	6870,1	7171,1	8204,9	13306,1	25877,7
6058,9	6554,3	6712,6	6878,4	7190,0	8885,1	13334,0	26055,7
6149,5	6563,6	6715,1	6880,5	7206,8	8920,8	13336,2	26179,0
6157,3	6567,7	6723,4	6886,8	7233,6	8967,8	13342,1	26181,0
6240,6	6603,1	6724,9	6923,7	7252,4	8977,1	13349,0	26204,1
6242,4	6611,3	6726,6	6926,7	7260,1	9009,9	13351,3	26256,1
6282,5	6618,4	6731,6	6932,6	7281,3	11145,6	13354,4	26528,2
6309,0	6623,4	6733,0	6947,4	7295,3	11179,4	13370,2	26553,6
6323,7	6625,7	6734,7	6948,1	7297,3	11185,6	13380,3	26644,2
6326,1	6631,3	6737,8	6955,2	7320,2	12294,6	13443,0	26678,2
6342,8	6640,2	6740,0	6965,0	7407,3	12304,1	13462,0	26736,7
6398,3	6642,3	6743,1	6968,1	7409,5	12976,9	13495,8	26888,9
6400,4	6643,0	6749,9	6975,9	7410,3	12994,7	13510,6	26993,1
6406,8	6645,6	6751,5	6990,2	7412,0	12998,8	13513,1	26997,9
6408,1	6646,9	6757,7	7010,1	7416,1	13000,0	13517,7	27002,0
6437,7	6648,0	6759,7	7018,1	7426,0	13010,8	13530,3	27022,3
6441,9	6651,8	6761,3	7019,6	7431,7	13100,1	13562,9	27035,7
6457,2	6653,3	6770,3	7035,4	7449,2	13104,8	13564,3	27085,3
6490,5	6655,0	6783,2	7037,1	7452,4	13105,2	13583,9	27118,4
6492,4	6666,3	6785,9	7041,9	7472,8	13107,4	13733,7	
6494,4	6670,5	6787,5	7049,1	7481,3	13118,8	13886,2	
6501,6	6674,8	6793,2	7082,1	7507,1	13125,1	13893,2	
6502,9	6676,5	6795,5	7134,5	7521,1	13250,5	13970,5	
6508,4	6678,2	6796,2	7151,5	7536,5	13274,6	14062,0	
6524,1	6688,7	6827,8	7153,3	7583,3	13278,7	14267,9	
6540,4	6691,1	6838,2	7154,0	7593,6	13280	22292,3	

Nota: Os números em negrito representam as proteínas que, após o fracionamento, são observadas com alto grau de pureza. As análises de massas foram realizadas por MALDI-TOF-TOF em modo linear (massas médias) positivo.

Tabela 2: Lista de massas moleculares das frações do RPC do veneno de *M. ibiboboca*.

Massas Moleculares (Da)							
631,2	5950,6	6662,7	6999,4	7388,6	11169,4	13609,3	16985,5
1107,4	5989,1	6667,4	7019,7	7405,7	11194,3	13426,1	16992,9
1163,2	6052,9	6703,7	7043,4	7433,7	11204,3	13454,4	17341,6
1277,4	6134,2	6717,6	7047,6	7504,1	12178,6	13470,6	17343,4
1357,7	6149,7	6738,4	7086,2	7520,6	12305,9	13479,6	17351,4
1365,6	6151,3	6743,5	7128,9	7568,2	12348,3	13482,0	17431,1
1409,4	6162,4	6751,7	7132,8	7589,9	12432,6	13486,2	17704,8
1589,5	6185,4	6766,8	7139,4	7605,7	12480,1	13524,2	21230,8
1676,3	6297,9	6810,1	7178,2	7691,3	12681,5	13535,6	21643,8
3161,6	6311,0	6818,5	7180,2	7709,0	12883,2	13623,8	22339,2
4367,3	6312,4	6830,1	7185,3	7797,4	12937,6	13625,3	22387,3
4509,7	6339,8	6769,6	7222,7	7922,9	13015,6	13636,0	22389,1
4830,6	6374,2	6788,0	7245,2	7990,6	13055,9	13638,5	22409,4
5067,6	6393,8	6790,3	7247,2	8008,4	13072,3	13794,3	22454,6
5278,3	6404,5	6797,9	7249,1	8145,2	13209,0	13908,4	22524,3
5282,1	6433,6	6860,6	7276,2	8525,7	13212,7	14083,0	22637,9
5315,1	6466,2	6861,5	7087,0	8866,2	13269,4	15679,6	22640,0
5372,4	6489,0	6872,0	7110,4	8959,1	13295,1	15908,2	22750,9
5454,2	6492,3	6878,7	7296,0	9460,2	13297,0	16041,4	22865,5
5519,9	6555,3	6894,0	7318,7	9712,6	13314,7	16333,0	26907,3
5566,0	6580,2	6936,1	7334,3	9785,5	13352,2	16683,4	
5717,4	6612,0	6945,6	7335,4	10639,8	13454,4	16684,1	
5792,6	6650,7	6975,4	7376,1	11157,1	13536,8	16977,2	

Nota: Os números em negrito representam as proteínas que após o fracionamento encontraram-se com alto grau de pureza. As análises de massas foram realizadas por ESI-Q-TOF

Tabela 3: Lista de massas moleculares das frações do RPC do veneno de *M. lemniscatus*.

Massas Moleculares (Da)							
416,0	1093,8	6401,1	6862,0	7218,0	7469,6	13067,1	25354,8
436,3	1268,8	6435,2	6944,9	7219,6	7482,3	13082,6	25357,0
575,2	3058,4	6463,4	6946,6	7251,8	7526,1	13225,3	28169,7
612,4	3115,7	6504,1	7103,2	7266,2	7527,3	13238,7	
617,4	3810,4	6527,0	7108,2	7283,0	7529,5	13240,5	
640,4	5790,9	6619,9	7109,7	7284,1	7652,9	13384,9	
728,4	6112,9	6621,8	7111,4	7288,6	7654,3	13939,4	
737,6	6114,3	6670,0	7113,7	7308,3	7722,7	13966,1	
753,4	6150,1	6674,1	7126,7	7324,9	7756,9	17797,5	
755,9	6170,0	6678,0	7127,6	7374,9	7882,0	20135,6	
760,6	6183,3	6679,2	7128,5	7377,6	8062,5	21337,8	
809,3	6248,5	6730,1	7130,1	7386,3	9879,0	22529,5	
815,5	6249,5	6732,5	7143,0	7432,7	10244,3	22532,7	
907,8	6252,1	6746,0	7162,8	7436,0	10536,9	22533,4	
977,6	6253,3	6788,2	7163,7	7446,3	12742,8	22619,2	
1000,6	6312,8	6797,7	7184,9	7455,8	12744,2	22671,2	
1051,9	6350,6	6846,8	7208,6	7467,9	12746,0	22691,8	

Nota: Os números em negrito representam as proteínas que após o fracionamento encontraram-se com alto grau de pureza. As análises de massas foram realizadas por ESI-Q-TOF.

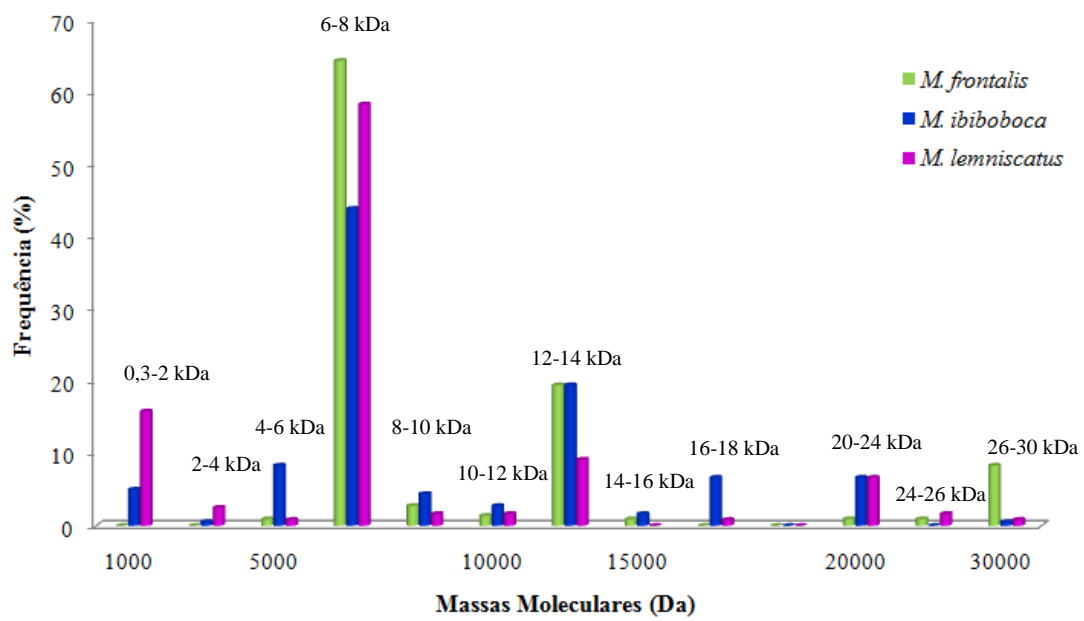


Figura13: Distribuição de massas moleculares em função da frequência de ocorrência nos venenos das serpentes.

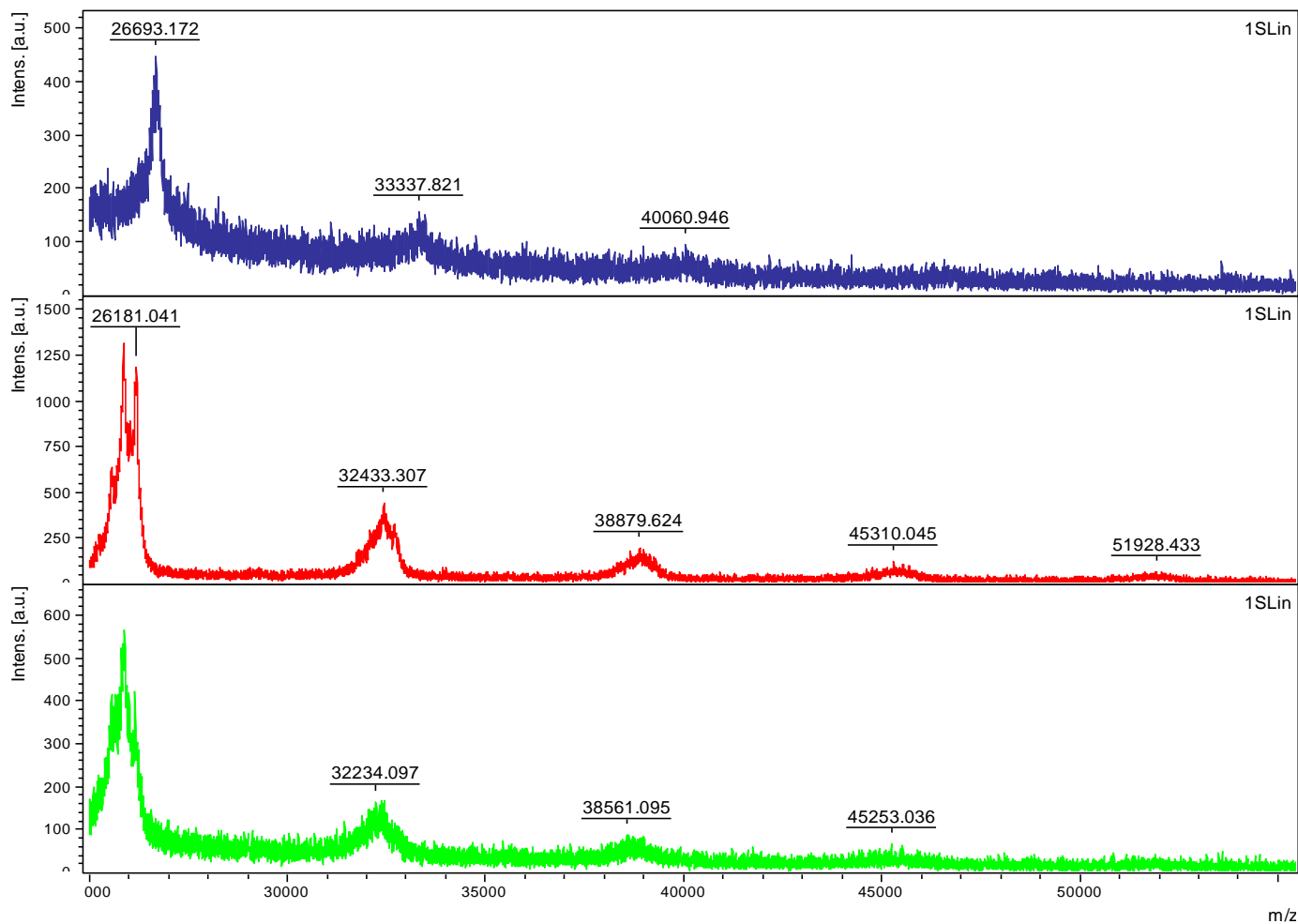


Figura 14: Espectro representativo das análises do MALDI-TOF-TOF das frações do veneno de *M. frontalis*. Os espectros representam três diferentes frações do veneno.

4.1.4 Distribuição das proteínas em relação à concentração de NaCl na CIEX

Para proporcionar uma melhor visualização dos dados apresentados acima, foi realizada uma correlação entre os resultados obtidos no processo de fracionamento por 2D-LC, com os dados de massas obtidos por MS, por meio de um gráfico de dispersão (Fig. 15 e 16), sendo possível, dessa forma, traçar uma relação direta entre os caracteres físico-químicos das proteínas e uma melhor visualização das famílias de proteínas.

A figura 15 mostra a distribuição das massas moleculares em relação às concentrações de NaCl nas quais as frações dos venenos de *M. frontalis*, *M. ibiboboca* e *M. lemniscatus* foram eluídas. Os componentes protéicos predominantes nos venenos de *M. frontalis*, *M. ibiboboca* e *M. lemniscatus* podem ser agrupados em três grandes grupos. O primeiro grupo, também o mais representativo, é o de massas moleculares entre 5 e 10 kDa, que são eluídas em diferentes concentrações de NaCl nos três venenos. O segundo grupo, com proteínas com massas moleculares entre 10 a 15 kDa e o terceiro grupo - e menos representativo -, é o formado pelas proteínas com massas moleculares acima de 20 kDa.

Em todos os venenos analisados, foi possível observar uma distribuição espacial, na qual proteínas com massas moleculares similares se espalharam horizontalmente no eixo x do gráfico. Essa distribuição reflete as diferenças nas características de carga e hidrofobicidade e demonstra a presença de várias isoformas dentro de cada família estrutural, nestes venenos. Com o aumento da concentração de NaCl foi possível separar, satisfatoriamente, proteínas diferentes que apresentavam massas moleculares aproximadas.

Um exemplo de fácil visualização diz respeito as proteínas que possuem massas moleculares entre 10 a 15 kDa, encontradas nos venenos das três espécies (Fig. 15C). Embora, os dados sobre estruturas primárias não estejam disponíveis, pode-se observar que as diferenças na distribuição de carga na faixa de 10-15 kDa, que é atribuído à família de proteínas PLA₂, podem refletir a presença de PLA₂ ácidas e básicas nestes venenos. Ainda, torna-se evidente, a partir do gráfico de dispersão do veneno de *M. ibiboboca* (Fig. 15B) que, no geral, proteínas na faixa de massa das PLA₂ (10-15 kDa)

são mais ácidas, sendo eluídas com uma concentração de 0 a 0,8 M de NaCl, do que aquelas encontradas nos venenos de *M. frontalis* e *M. lemniscatus*, na qual eluem com cerca de 0,4 a 1,0 M de NaCl. A mesma observação é válida para outras famílias de proteínas, como as de massa entre 5-10 kDa, onde grande parte correspondem às 3FTx, embora nota-se uma menor dispersão no eixo x no gráfico do veneno de *M. ibiboboca* (Fig. 15B).

Apesar de ocorrer uma boa separação de isoformas, através da CIEX observa-se a ocorrência de uma co-eluição de proteínas de massas moleculares bem distintas. Tal fato pode ser observado, por exemplo, no fracionamento do veneno de *M. ibiboboca*, onde com 0,5 M de NaCl obteve-se a eluição de proteínas com massas moleculares de 6, 13, e 22 kDa, aproximadamente (Fig. 15B).

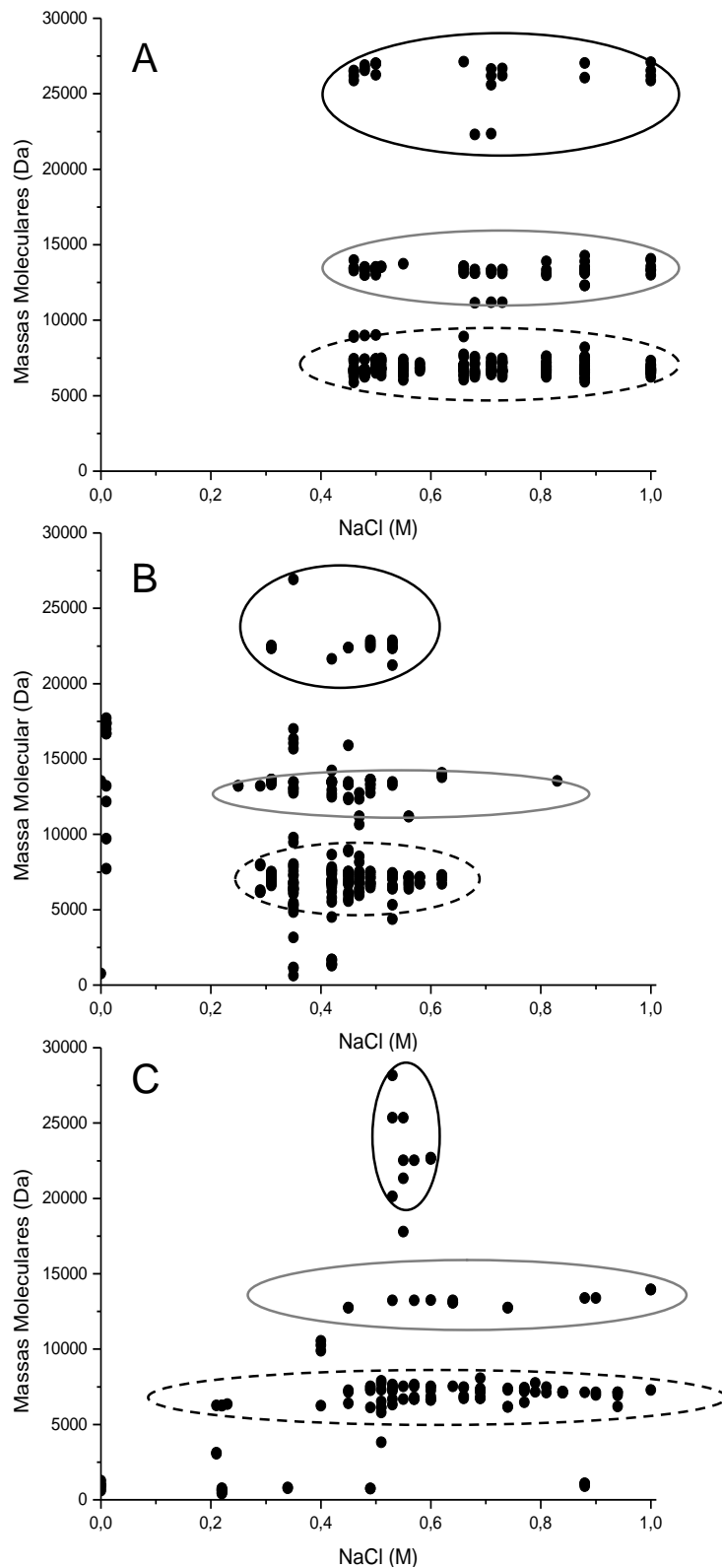


Figura 15: Distribuição das proteínas em função da massa molecular e concentração de NaCl. (A) *M. frontalis*, (B) *M. ibiboca*, (C) *M. lemniscatus*. As massas moleculares circuladas representam a divisão dos três grupos: (- - -) proteínas entre 5-10 kDa, (—) 10-15kDa (—) proteínas com massa acima de 20 kDa.4.1.5 Distribuição das proteínas em relação à concentração de ACN na RPC

A figura 16 representa as massas moleculares das proteínas fracionadas pelo RPC, versus a concentração de ACN em que foram eluídas. De acordo com esta figura, pode-se observar uma tendência ao agrupamento das isoformas, ou seja, proteínas com massas moleculares similares tendem a ser eluídas com uma mesma concentração de ACN, ou concentrações aproximadas. Tal fato remete a uma mesma característica de hidrofobicidade das isoformas. Esta formação de grupos é nítida nos venenos de *M. frontalis* (Fig. 16A) e no veneno de *M. ibiboboca* (Fig. 16 B). Um exemplo que pode ser citado são as proteínas com massas aproximadas entre 6-7 kDa, sendo eluídas entre 20-40% ACN, aproximadamente.

Em contrapartida, o veneno de *M. lemniscatus* não apresentou o mesmo comportamento (Fig. 16 C). As isoformas protéicas foram eluídas em concentrações diferentes de ACN, o que indica que estas apresentam características hidrofóbicas distintas. Tal fato pode sugerir que as isoformas do veneno de *M. lemniscatus* apresentam uma significativa alteração na sua seqüência primária de aminoácidos. Como exemplo podem ser citadas as mesmas proteínas de massas aproximadas entre 6-7 kDa, que neste caso, foram eluídas tanto com 20% de ACN como com 90% do mesmo solvente.

De maneira geral, o padrão de eluição na segunda dimensão é idêntico nos venenos de *M. frontalis* e *M. ibiboboca* (Fig. 16A e B). Todos os grupos de proteínas são eluídos aproximadamente entre 20 e 40% de ACN. Tal fato mostra que ambos os venenos são constituídos de proteínas com caráter mais hidrofílico. Tanto as proteínas de baixa massa molecular, em torno de 6 kDa, como as proteínas de média massa molecular, em torno de 20 kDa, possuem na sua estrutura um significativo número de aminoácidos polares. Já no veneno de *M. lemniscatus*, a concentração de ACN em que as proteínas foram eluídas é mais ampla (Fig. 16C). Neste caso, os grupos protéicos foram eluídos entre 15 e 100% de ACN, aproximadamente, apesar de este veneno apresentar um grande número de proteínas sendo eluídas entre 20 e 40%, como aconteceu com os venenos de *M. frontalis* e *M. ibiboboca*. Isto sugere que o veneno de *M. lemniscatus* tem na sua constituição proteínas hidrofílicas e hidrofóbicas e mostra um veneno com características um pouco diferentes em relação aos demais.

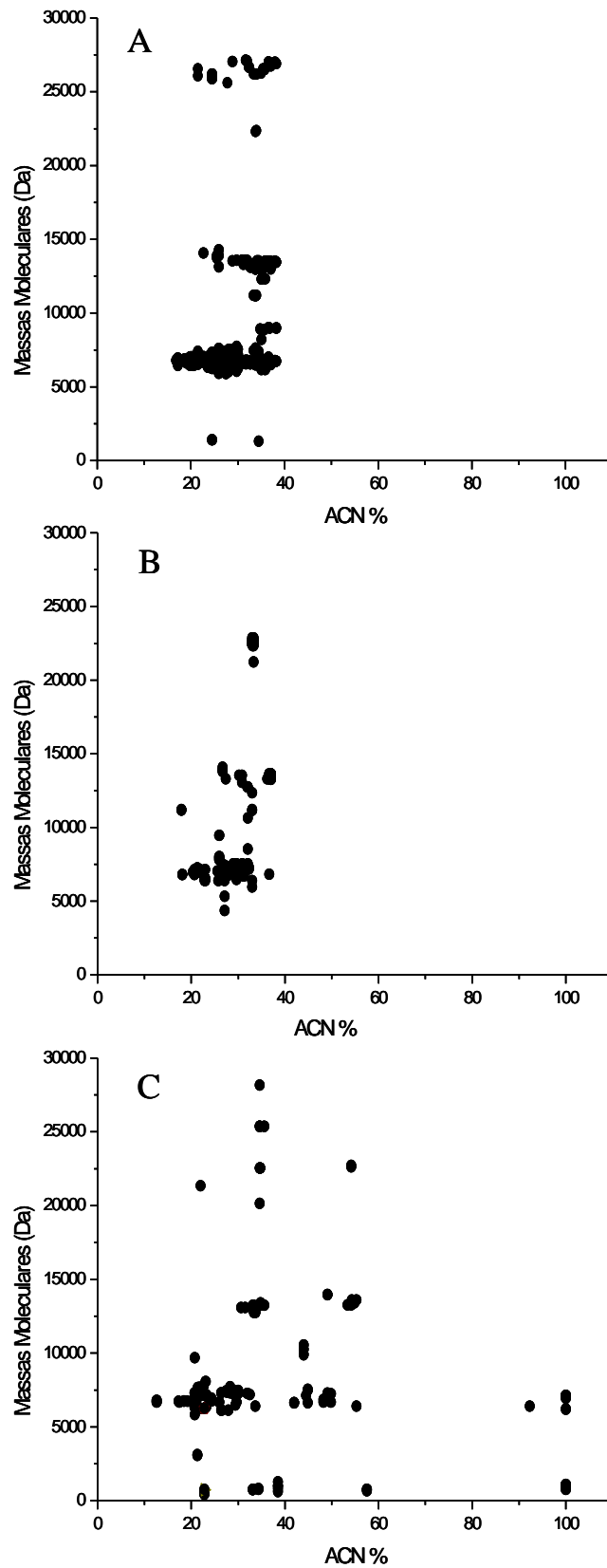


Figura 16: Distribuição das proteínas em função da massa molecular e concentração de ACN. (A) *M. frontalis*, (B) *M. ibiboca*, (C) *M. lemniscatus*.

4.1.5 Análise da composição dos venenos por eletroforese bidimensional

A análise proteômica foi continuada por meio da eletroforese bidimensional, técnica pela qual quatro venenos de *Micrurus* (*M. frontalis*, *M. ibiboboca*, *M. lemniscatus* e *M. spixii*) tiveram seus conteúdos protéicos analisados. O veneno de *M. spixii* foi adicionado nesta segunda abordagem visando o enriquecimento dos dados referentes às avaliações anti-venômicas. Dados que serão descritos, posteriormente. Neste sentido, este veneno foi utilizado como um controle externo, uma vez que os antivenenos utilizados no trabalho não são específicos contra ele e o mesmo tem origem geográfica diferente.

Como visualizado na figura 17, o perfil eletroforético dos venenos de *M. frontalis*, *M. ibiboboca* e *M. lemniscatus*, espécies coletadas no sudeste do Brasil e de *M. spixii*, coletados de espécimes de origem peruana revelaram a presença de similaridades qualitativas. Após a coloração com Coomassie Blue G-250, de forma visual, foram observados um total de 26 *spots* no gel do veneno de *M. frontalis*, 11 *spots* no gel de *M. ibiboboca*, 30 *spots* no gel de *M. lemniscatus* e 20 *spots* no gel de *M. spixii*.

O padrão de distribuição de massa molecular *versus* pI (ponto isoelétrico) mostrou-se praticamente o mesmo entre os quatro venenos analisados. Os venenos mostraram um maior número de proteínas catiônicas, com valores de pI acima de 7, que proteínas aniônicas (pI < 7). Nota-se um agrupamento maior de proteínas nas faixas de baixa e média massa molecular (6 a 21, 5 kDa), embora proteínas de alta massas moleculares possam ser observadas. Observa-se que os quatro venenos apresentam basicamente os mesmos tipos de proteínas, porém estas encontram-se com pequenas diferenças nos valores de pI e de massas moleculares, o que pode implicar em uma variação na composição de aminoácidos entre as proteínas dos diferentes venenos.

Os resultados do gel-2D (Fig. 17) estão de acordo com os resultados obtidos nas análises de 2D-LC e MS (Fig. 15), nos quais pode-se perceber um maior conteúdo protéico nas faixas de massas moleculares entre 6-8 kDa e 12-14 kDa.

Além dos resultados descritos acima, pode-se notar ainda, notadamente em proteínas acima de 50 kDa, uma distribuição serial no sentido horizontal, que indicaria uma variação principalmente nos valores de pI. Tal observação sugere a presença de modificações pós-traducionais (glicosilações, por exemplo) nessas proteínas ou ainda uma variação na composição de aminoácidos, levando ao surgimento de isoformas protéicas.

Embora a 2D-LC tenha se mostrado mais sensível, propiciando o reconhecimento de um maior número de espécies moleculares, através do gel-2D, foi possível a visualização de proteínas com massas moleculares superiores a 50 kDa, em todos os quatro venenos. A realização concomitante das duas técnicas aumenta o poder de resolução analítico e suas utilizações podem ser úteis para estudos que visam promover um inventário de proteínas em determinados venenos.

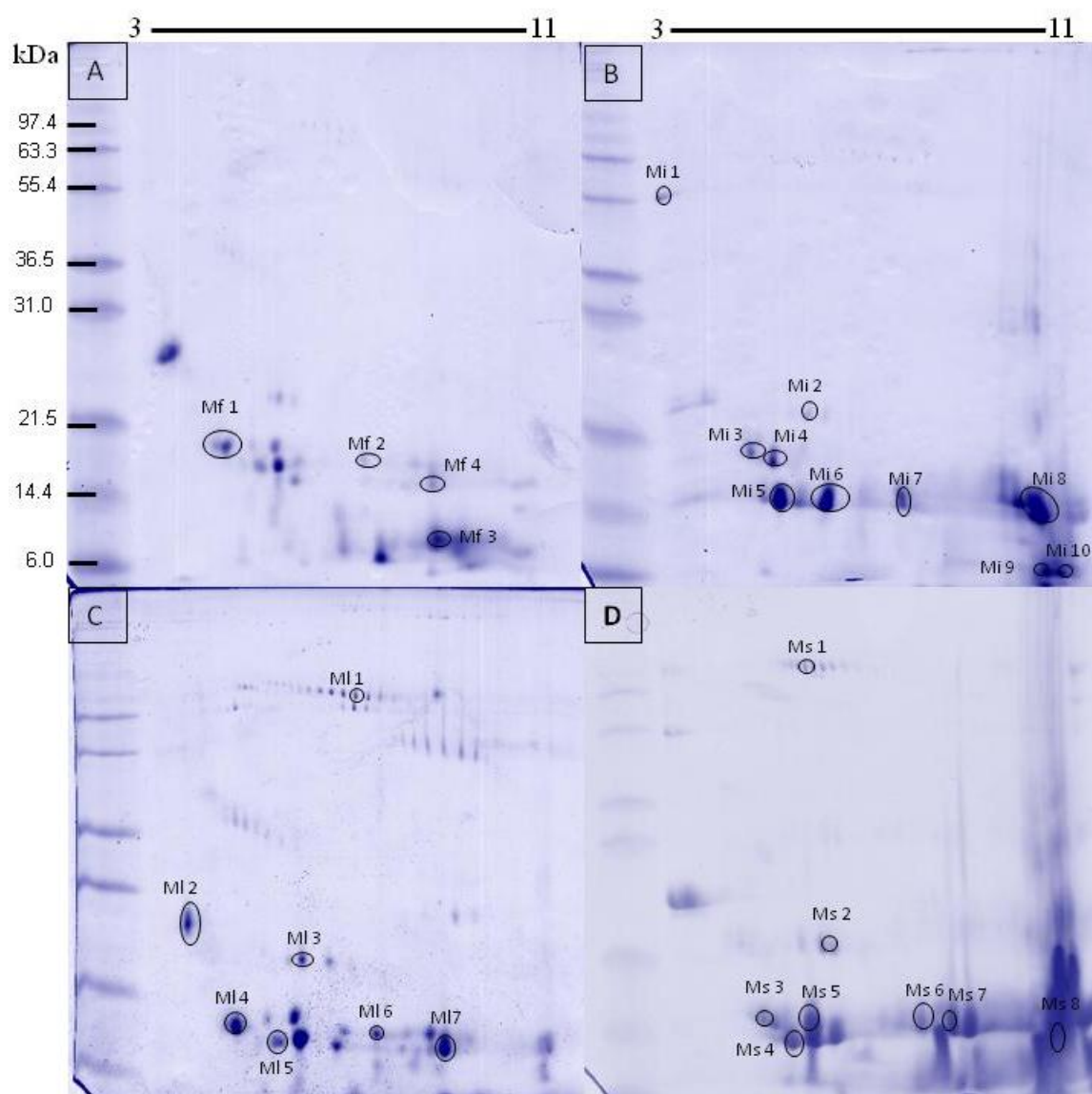


Figura 17: Perfis eletroforéticos de venenos de *Micrurus* por eletroforese bidimensional: *M. frontalis* (A), *M. ibiboboca* (B), *M. lemniscatus* (C) e *M. spixii* (D). A primeira dimensão foi realizada utilizando o gradiente de pH de 3-11 NL, em *strips* de 7cm. A segunda dimensão foi realizada em gel de 12,5%. A coloração foi feita por Coomassie Blue G-250. Os números representam os pontos de diferentes venenos *M. frontalis* (Mf), *M. ibiboboca* (Mi), *M. lemniscatus* (MI) and *M. spixii* (Ms) identificados por sequenciamento *de novo* por MALDI-TOF-TOF/MS/MS.

4.1.6 Identificação de famílias de proteínas dos venenos de *Micrurus*

A identificação de proteínas nos venenos de *Micrurus* utilizados foi realizada através da determinação da sequência primária parcial, usando a degradação de Edman e o sequenciamento por MALDI-TOF-TOF MS/MS. Após o sequenciamento, realizou-se uma busca de similaridade em bancos de dados com as sequências obtidas.

Primeiramente, explorando as análises do 2D-LC, nove proteínas dos venenos de *M. frontalis*, *M. ibiboboca* e *M. lemniscatus* foram purificadas até a homogeneidade, como determinado por espectrometria de massa (MALDI-TOF-TOF or ESI-Q-TOF), sendo posteriormente submetidas ao sequenciamento N-terminal por degradação de Edman. A tabela 4 representa a estrutura primária parcial das proteínas originadas dessa primeira estratégia, assim como as massas moleculares das proteínas sequenciadas e a sua concentração relativa de eluição nos passos cromatográficos (CIEX e RPC). Na última coluna desta tabela, encontram-se os nomes das proteínas depositadas em bancos de dados e das espécies de serpente à partir das quais foram identificadas por terem apresentado maiores graus de similaridade com os aminoácidos das sequências obtidas no presente trabalho.

Como visualizado na tabela 4, as proteínas sequenciadas apresentaram similaridades com neurotoxinas de cadeia curta e longa, *weak* neurotoxinas, PLA₂ e β -bungarotoxina, descritas em venenos de *Micrurus* e outras serpentes da família Elapidae. Observa-se que quatro proteínas, isoladas do veneno de *M. lemniscatus* e com massas moleculares de 6.435,00 Da, 6.730,05 Da, 6.504,00 Da e 6.678,02 Da, mostraram-se similares à neurotoxinas de cadeia curta encontradas nos venenos de *M. surinamensis* e *M. pyrrhocryptus*. Dentre estas proteínas, a de massa molecular de 6.504,00 Da mostrou-se mais hidrofóbica, sendo eluída com 30,6% de ACN, enquanto a de massa de 6.678,02 Da mostrou-se mais básica sendo eluída com 0,57 M de NaCl. A proteína de massa molecular de 7.526,73 Da, também eluída com 0,57 M de NaCl, mostrou-se similar a uma 3FTx isolada do veneno de *M. altirostris*.

Além das neurotoxinas, foram também identificadas por similaridade, uma neurotoxina de cadeia longa com massa molecular de 7.409,05 e uma *weak* neurotoxina com massa molecular de 7.043,37, isoladas dos venenos de *M. frontalis* e *M. ibiboboca*,

respectivamente. A similaridade foi encontrada com proteínas isoladas dos venenos de *M. surinamensis* e *M. pyrrhocryptus*. Ambas as proteínas mostraram-se com o mesmo grau de hidrofobicidade, sendo eluídas com 26,7% de ACN, porém apresentaram caracteres básicos distintos, sendo eluídas com 0,49 M e 0,87 M de NaCl .

Ainda na tabela 4, observa-se que no veneno de *M. lemniscatus*, foram identificadas por similaridade, uma PLA₂, com massa molecular de 13.238,01 Da, similar a uma proteína isolada do veneno de *M. altirostris* e uma proteína com massa molecular de 22.532,74 Da, similar à vestiginina e à cadeia B da β-bungarotoxina, proteínas essas encontradas nos venenos de *Demansia vestigiata* e *Bungarus flaviceps flaviceps*, respectivamente. Esta última, também apresentou similaridade significativa com inibidor do tipo kunitz, do veneno de *Pseudechis australis*. Ambas as proteínas, purificadas do veneno de *M. lemniscatus*, apesar de apresentarem massas moleculares bem diferentes, apresentam aspectos básicos e hidrofóbicos bem parecidos. A proteína com massa molecular de 13.238,01 Da foi eluída da CIEX com 0,57 M de NaCl e 33,2% de ACN, sendo a proteína de 22.532,74 Da eluída com a mesma concentração de sal e com 34,6% de ACN.

Adicionalmente, vários *spots* do gel-2D dos venenos de *M. frontalis*, *M. ibiboboca*, *M. lemniscatus* e *M. spixii* foram selecionados para digestão em gel seguida de sequenciamento *de novo* dos peptídeos trípticos por MALDI-TOF-TOF MS/MS. As proteínas identificadas dos quatro venenos mostraram-se similares à PLA₂, *venom proteins* E2, Frontoxina III, a *weak* neurotoxina, LAO, metaloprotease e proteína tipo lectina-tipo C de outras *Micrurus* e outras serpentes da família Elapidae (Tabela 5).

Do veneno de *M. frontalis* foram identificados 4 *spots*, enquanto do veneno de *M. ibiboboca* identificou-se 10 *spots*, do veneno de *M. lemniscatus* 7 e *M. spixii* 8 *spots*. No veneno de *M. frontalis* dois dos *spots* apresentaram peptídeos que se mostraram similares à fosfolipases dos venenos de *M. altirostris* e *Naja atra*. De acordo com o perfil eletroforético (Fig. 17), esses *spots* apresentam massas moleculares entre 14,4 e 21,5 kDa, sendo uma com pI mais ácido (Mf1) e o outro com pI mais básico (Mf 2). À partir de um spot de mesma faixa de massa molecular, foi identificado um peptídeo tríptico similar a metaloprotease (Mf4), com pI mostrando uma característica básica. Ainda, nesse mesmo veneno um peptídeo com a sequência tríptica de EPCYVSR (Mf

3) mostrou similaridade com *Venom protein E2*, uma proteína já identificada no veneno de *M. pyrrhocryptus* (Tab. 5). O *spot* do gel-2D do qual esse peptídeo foi extraído apresentou uma massa molecular próxima a 7 kDa e um caráter mais básico, com um valor aproximado de pI de 4 (Fig. 17).

Como visto na tabela 5, no veneno de *M. ibiboboca* foram identificadas algumas metaloproteases (Mi 1 a 3) com sequências tríplicas identificadas como YEEL/IQL/ITQR. Ainda, fosfolipases com diferentes massas moleculares e valores de pI, mostraram-se similares à PLA₂ dos venenos de *M. altirostris* e *M. fulvius*. Outros dois *spots* (Mi 9 e Mi 10), que apresentaram massas moleculares menores (≈ 6 kDa) e maior basicidade (pI ≈ 11), de acordo com o gel-2D, mostraram-se similar a *Venom protein E2* e Frotoquina III dos venenos de *M. pyrrhocryptus* e *M. frontalis*, respectivamente.

Através de similaridade, uma LAO foi identificada no veneno de *M. lemniscatus*, similar à LAO identificadas nos venenos de *Naja atra* (Tab. 5). No perfil eletroforético, o *spot* do qual foi extraído o peptídeo identificado (MI 1) apresentou massa molecular maior que 63,3 kDa e pI próximo de 8 (Fig. 18). Neste veneno, também, foram identificados algumas PLA₂ (MI 2,4,6 e 7), uma proteína tipo lectina tipo-C (MI 3) e uma metaloprotease (MI 5) similares a proteínas dos venenos de *M. altirostris*, *Naja atra*, *M. corallinus* e *Echis carinatus sochureki*.

No veneno de *M. spixii*, também, foi identificada uma proteína tipo lectina tipo-C (Ms 2), similar à uma proteína do veneno de *M. corallinus*, com valores de massa molecular e pI parecidos com a identificada no veneno de *M. lemniscatus* (MI 4). Identificou-se também, um peptídeo (Ms 1) similar à uma LAO do veneno de *Bungarus multicinctus*. Os outros peptídeos identificados (Ms 3-7) foram de *spots* com diferentes valores de pI (Fig. 18), que mostraram-se similares a PLA₂ dos venenos de *M. altirostris* e *B. caeruleus* (Tab. 5). Ainda, um peptídeo com a sequência de CYNDFSYTANTVED mostrou-se similar a uma 3FTx (Ms 8), do veneno de *M. altirostris*.

Tabela 4: Sequencia primária N-terminal e identificação de proteínas dos venenos de *M. frontalis*, *M. ibiboboca* e *M. lemniscatus* por degradação de Edman e pesquisa de similaridade

Massa (Da) ¹	NaCl (M) ²	ACN (%) ²	Sequência N-terminal ³	Serpente	Similaridade ⁴
6435,00	0,26	28,4	LKCYVSNKEVTCPEGMNFCEIDVVPTTHG	<i>M. lemniscatus</i>	neurotoxina de cadeia curta MS11 <i>Micrurus surinamensis</i>
6730,05	0,66	17,3	MICYNQSSQPPTTKTCSEG	<i>M. lemniscatus</i>	neurotoxina de cadeia curta D1 <i>Micrurus pyrrhocryptus</i>
6504,00	0,26	30,6	IKCYVLRDKEDTCPEGINFCEKYDVPATHGNVITVQXXAY	<i>M. lemniscatus</i>	neurotoxina de cadeia curta MS11 <i>Micrurus surinamensis</i>
6678,02	0,57	21,4	LICFGPGKDNKQTCPEGKLNCEKYAVSYFHTGACTYLRRGTS	<i>M. lemniscatus</i>	neurotoxina de cadeia curta MS11 <i>Micrurus surinamensis</i>
7043,37	0,87	26,7	LICFIDFSPTAHIVDDCQRGITTCYMKTWRV	<i>M. ibiboboca</i>	Weak neurotoxina E3 <i>Micrurus pyrrhocryptus</i>
7409,05	0,49	26,7	MTCKTCPFETCANSEYCPAGNDIXY	<i>M. frontalis</i>	neurotoxina de cadeia longa MS4 <i>Micrurus surinamensis</i>
7526,73	0,57	26,0	LICYRDTPFTVRTTVSCGNGITKCYRKYWYENRGNRTEGGCGPNNEKYVT	<i>M. lemniscatus</i>	precursor 3FTx <i>Micrurus altirostris</i>
13238,01	0,57	33,2	NLVQFGNMIKCTIPGSSPLKDYADYGCY	<i>M. lemniscatus</i>	precursor de PLA ₂ <i>Micrurus altirostris</i>
22532,74	0,57	34,6	EYQAYRNLPPDNIRGIGFVTAYYYNPRHTCLEFPYGGCNGTRPFKCMIEARTKCDDYFE	<i>M. lemniscatus</i>	Vestigina <i>Demansia vestigiata</i> cadeia B de β -bungarotoxin <i>Bungarus flaviceps flaviceps</i> precursor de inibidor tipo Kunitz <i>Pseudechis australis</i>

Nota: X indica os aminoácidos não identificados; ¹massa molecular observada, ²Eluição na CIEX ([NaCl]) e RPC (% ACN); ³degradação de Edman; ⁴FASTA3 ou BLASTP 2.2.23+ Swiss-Prot e GeneBank banco de dados.

Tabela 5: Identificação de peptídeos tríplicos extraídos da eletroforese bidimensional (digestão *in gel*), por sequenciamento *de novo* via MALDI-TOF-TOF S/MS

Spot	Peptídeo	Sequência MS/MS	Similaridade	Espécies/Elapidae	Banco de Dados
Gel	MS (Da)				
Mf1	1099,46	EFVCNCDR	precursor de fosfolipase A2	<i>Micrurus altirostris</i>	GenBank ID: AED89577.1
Mf2	1794,75	...EEAHDNCYNE...	fosfolipase A2 natatroxina	<i>Naja atra</i>	Swiss-Prot ID: A4FS04.2
Mf3	910,53	EPCYVSR	Venom protein E2 (3FTx)	<i>Micrurus pyrrhocryptus</i>	Swiss-Prot ID: P0CAR7.1
Mf4	1179,66	YEEL/IQL/ITQR	metaloprotease	<i>Echis carinatus sochureki</i>	GenBank: ADI47602
Mi 1	1179,54	YEEL/IQL/ITQR	metaloprotease	<i>Echis carinatus sochureki</i>	GenBank: ADI47602
Mi 2	1179,64	YEEL/IQL/ITQR	metaloprotease	<i>Echis carinatus sochureki</i>	GenBank: ADI47602
Mi 3	1179,52	YEEL/IQL/ITQR	metaloprotease	<i>Echis carinatus sochureki</i>	GenBank: ADI47602
Mi 4	1919,64	CGFCPCDL/IEAANCFK	precursor de fosfolipase A2	<i>Micrurus altirostris</i>	GenBank ID: AED89576.1
	2125,72	YGCYCGYGGSGTP...	fosfolipase A2	<i>Micrurus fulvius</i>	GenBank ID: AAZ29513.1
Mi 5	1947,7	EFVCNCDL/IEAANCFK	precursor de fosfolipase A2	<i>Micrurus altirostris</i>	GenBank ID: AED89576.1
Mi 6	1947,75	EFVCNCDL/IEAANCFK	precursor de fosfolipase A2	<i>Micrurus altirostris</i>	GenBank ID: AED89576.1
Mi 7	1797,64	EAGVHDNTD...	precursor de fosfolipase A2	<i>Micrurus altirostris</i>	GenBank ID: AED89577.1
Mi 8	1769,6	L/IDFADYGCYGL/IR	Phospholipase A2 isoform	<i>Micrurus altirostris</i>	GenBank ID: AED89578.1
Mi 9	910,38	EPCYVSR	Venom protein E2 (3FTx)	<i>Micrurus pyrrhocryptus</i>	Swiss-Prot ID: P0CAR7.1
Mi 10	2307,1	...AL/IDFSPTAHL/IVDDCQR	Frontoxina III (3FTx)	<i>Micrurus frontalis</i>	Swiss-Prot ID: P86422.1
MI 1	1154,62	FDEIVGGFDR	L- amino ácido oxidase	<i>Naja atra</i>	GenBank ID: ABN72546.1
MI 2	1150,63	ENYNL/INL/INR	precursor de fosfolipase A2	<i>Micrurus altirostris</i>	GenBank ID: AED89576.1
MI 3	1005,42	L/TWEWTDNR	precursor de lectina tipo-C	<i>Micrurus corallinus</i>	GenBank ID: ACS74993.1
MI 4	1099,44	EFVCNCDR	precursor de fosfolipase A2	<i>Micrurus altirostris</i>	GenBank ID: AED89577.1
MI 5	1179,7	YEEL/IQL/ITQR	metaloprotease	<i>Echis carinatus sochureki</i>	GenBank: ADI47602
MI 6	1639,7	PSL/IDFSGYGCYCGR	precursor de fosfolipase A2	<i>Micrurus altirostris</i>	GenBank ID: AED89577.1
MI 7	1794,72	...EEAHDNCYNE...	fosfolipase A2 natatroxina	<i>Naja atra</i>	Swiss-Prot ID: A4FS04.2
Ms 1	1484,72	EWYEEFL/ITGM	L- amino ácido oxidase	<i>Bungarus multicinctus</i>	GenBank ID: ABN72539.1
Ms 2	1323,61	YNCPL/IDWL/ISR	precursor de lectina tipo-C	<i>Micrurus corallinus</i>	GenBank ID: ACS74993.1
Ms 3	1099,5	EFVCNCDR	precursor de fosfolipase A2	<i>Micrurus altirostris</i>	GenBank ID: AED89577.1
	2292,51	...SPPL/IL/IDYWYGCYCGR	precursor de fosfolipase A2	<i>Micrurus altirostris</i>	GenBank ID: AED89578.1
Ms 4	2342,24	VHECWPL/IL/ITL/IYS...	precursor de fosfolipase A2	<i>Micrurus altirostris</i>	GenBank ID: AED89578.1
Ms 5	1638,78	PSL/IDFSGYGCYCGR	precursor de fosfolipase A2	<i>Micrurus altirostris</i>	GenBank ID: AED89577.1
Ms 6	1948,01	EFVCNCDLEAANCFK	precursor de fosfolipase A2	<i>Micrurus altirostris</i>	GenBank ID: AED89576.1
	1115,56	Q/KPYNL/INGGPR	phospholipase A2 isoform 2	<i>Bungarus caeruleus</i>	GenBank ID: AAR19228.1
	1247,65	NENYNL/IMPPR	precursor de fosfolipase A2	<i>Micrurus altirostris</i>	GenBank ID: AED89576.1
Ms 7	2960,44	...L/IDFADYGCYCGYGGSGTPVDEL/IDR	precursor de fosfolipase A2	<i>Walterinnesia aegyptia</i>	GenBank ID: ABX82863.1
Ms 8	2369,16	...CYNDFSYTANTVED...	precursor de 3FTx	<i>Micrurus altirostris</i>	GenBank ID: AED89559.1

4.2 Análises anti-venômicas: Reação cruzada entre diferentes venenos de *Micrurus* e anti-*Micrurus*

Para comparar a especificidade dos antivenenos anti-*Micrurus* e seu poder de reconhecimento imunológico, além de possíveis reações cruzadas, foram realizados 2D-*immunoblottings* com diferentes antivenenos mono e polivalente, produzidos em cavalos, contra quatro venenos de espécies de *Micrurus* (*M. frontalis*, *M. ibiboboca*, *M. lemniscatus* e *M. spixii*). Os antivenenos utilizados foram o anti-*M. corallinus*, anti-*M. frontalis*, anti-*M. ibiboboca* e anti-Elapídico (contra *M. frontalis* e *M. corallinus*).

A figura 18 mostra a ocorrência de uma reação cruzada entre os venenos e antivenenos analisados, para a qual várias proteínas de cada veneno foram reconhecidas por diferentes antivenenos de *Micrurus*. Dentre os antivenenos testados, o anti-Elapídico foi o que melhor reagiu contra todos os venenos testados, sendo capaz de reconhecer um maior número de proteínas. Este antiveneno polivalente foi capaz de reconhecer famílias de proteínas com massas moleculares entre 6 e 15 kDa, 21,5 a 36,5 kDa e acima de 55 kDa. Traçando uma correlação entre os resultados do 2D-immunoblotting com os resultados de identificação de proteínas por MS/MS é possível observar que o antiveneno anti-Elapídico apresentou reconhecimento significativo de proteínas como PLA₂, 3FTx, LAO and proteínas tipo lectina tipo-C (Fig. 18 coluna III). As proteínas com massas moleculares entre 21,5 e 36,5 kDa, apesar de não terem sido muito bem visualizadas por Coomassie Blue G-25 no resultado anterior (Fig. 17), foram agora bem visualizadas através da maior especificidade do anti-Elapídico e do anti-Ig G/peroxidase.

De maneira geral, o anti-*M. frontalis* e o anti-*M. ibiboboca*, também, mostraram um bom reconhecimento contra os venenos de *M. frontalis*, *M. ibiboboca*, *M. lemniscatus* e *M. spixii* (Fig. 18 coluna II e IV). Embora, dentre estes venenos testados, o veneno de *M. lemniscatus* mostrou ser o menos reconhecido pelo antiveneno anti-*M. ibiboboca* (Fig. 18 coluna IV, linha B). Famílias de proteínas como as PLA₂, 3FTx, LAO e proteínas tipo lectina tipo-C foram também reconhecidas pelos antivenenos anti-*M. frontalis* e anti-*M. ibiboboca*.

Por outro lado, o anti-*M. corallinus* reagiu fracamente com os venenos de *M. frontalis*, *M. ibiboboca*, *M. lemniscatus* e *M. spixii*. Tal antiveneno foi capaz de reconhecer apenas poucas proteínas com massa molecular acima de 55 kDa, que como identificadas pelo sequenciamento MS/MS, correspondem às LAO e à alguns componentes com baixa massa molecular (Fig. 18 coluna I). Embora estes componentes de baixa massa não tenham sido identificados especificamente no gel-2D realizado com o veneno de *M. spixii*, eles foram identificados em outros venenos como sendo proteínas da família 3FTx. Ainda, o antiveneno anti-*M. ibiboboca* apresentou um forte poder de reconhecimento de proteínas de baixa massa molecular, correspondendo às 3FTx, como pode ser observado no 2D-immunoblotting contra o veneno de *M. frontalis* (Fig.18 linha A e coluna IV).

Em se tratando dos venenos testados, o de *M. frontalis* foi o que apresentou um maior número de proteínas sendo reconhecidas pelo anti-*M. corallinus*, anti-*M. frontalis*, anti-Elapídico e anti-*M. ibiboboca* (Fig.18 linha A). Em alguns casos, o 2D-immunoblotting revelou fraco reconhecimento de proteínas como massas moleculares de 6 kDa, aproximadamente, sendo identificadas como 3FTx. Esse foi o caso dos antivenenos monovalentes anti-*M. corallinus* e anti-*M. frontalis* (Fig. 18 coluna I a III) que não reconheceram adequadamente proteínas dessa família nos venenos de *M. frontalis* e *M. lemniscatus* (Fig. 18 linha A e B).

Já o veneno de *M. spixii* foi o veneno que apresentou um menor número de proteínas sendo reconhecidas por estes antivenenos (Fig. 18 linha D). Neste caso, dentre os antivenenos testados, o reconhecimento maior foi através do anti-*M. ibiboboca* e a maior parte das proteínas reconhecidas foram proteínas com massas moleculares acima de 55 kDa e entre 6 e 14,4 kDa. Famílias de proteínas como LAO, PLA₂ e proteínas tipo lectina tipo-C foram reconhecidas pelos antivenenos monovalentes e polivalentes analisados.

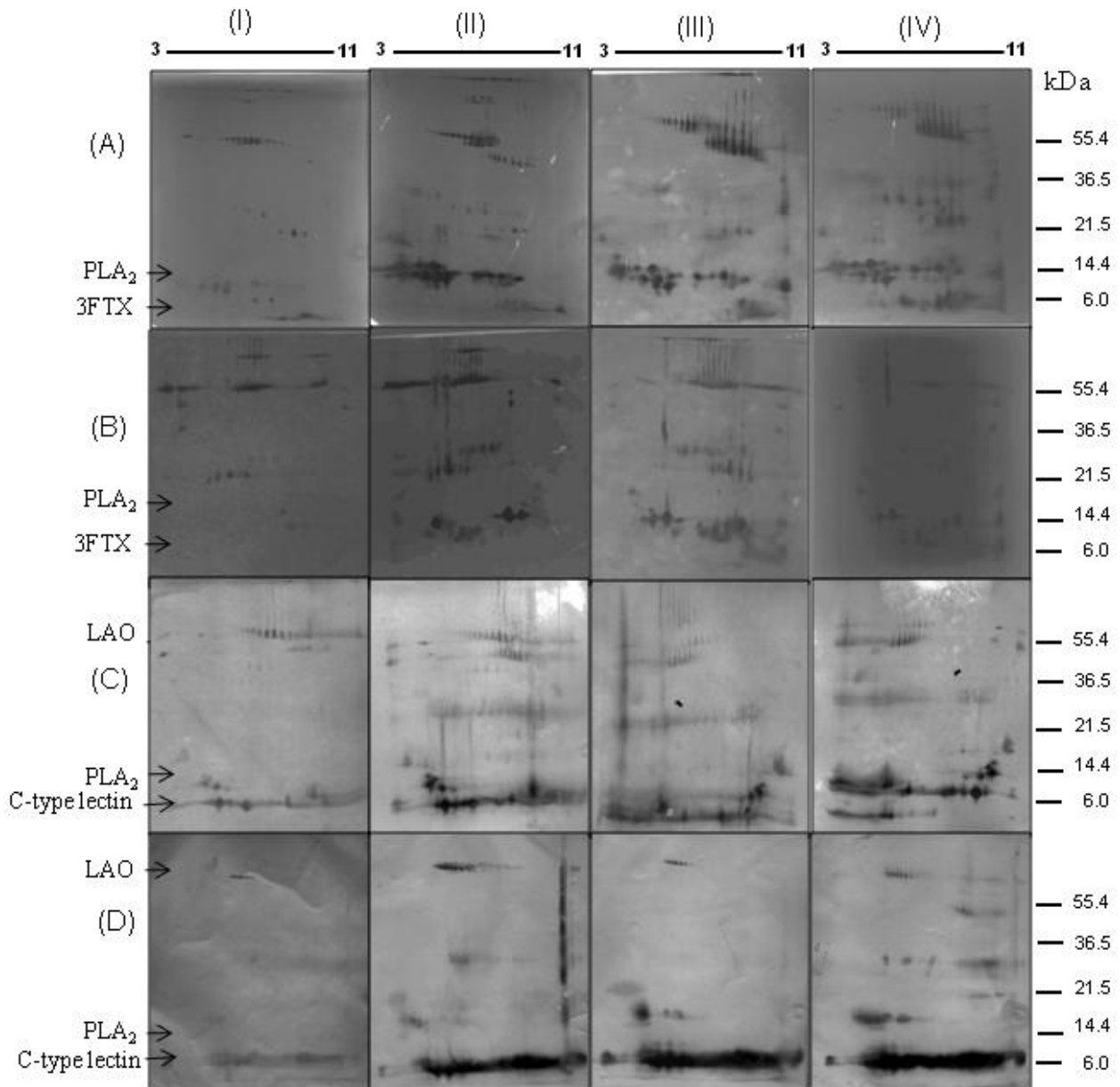


Figura 18: Reação cruzada entre diferentes venenos de *Micrurus* e anti-*Micrurus*. Venenos das espécies (A) *M. frontalis*, (B) *M. lemniscatus*, (C) *M. ibiboboca* e (D) *M. spixii*. Anti-venenos: (I) anti-*M. corallinus*, (II) anti-*M. frontalis*, anti-Elapidico (III) e (IV) anti-*M. ibiboboca*. A eletroforese bidimensional foi realizada em um gradiente de pH de 3-11 NL, em *strip de 7cm*, com a segunda dimensão em gel de 12,5%. Os anti-venenos foram utilizados na diluição de 1:1000 e o conjugado anti-IgG/peroxidase na diluição de 1:500. As marcações nas setas referem-se às famílias de proteínas identificadas posteriormente por MALDI-TOF MS/MS e busca de similaridades.

4.3 Purificação de proteínas da família 3FTx com atividade biológica

Visando um maior conhecimento acerca de uma das famílias de proteínas identificadas nos venenos analisados e o desafio na identificação de componentes com atividades biológicas alternativas, realizou-se a purificação de duas proteínas da família das 3FTx do veneno de *M. lemniscatus*. Após a caracterização bioquímica parcial dessas proteínas, ensaios biológicos de citotoxicidade em células promastigotas de *L. (L) amazonensis* e em células de macrófagos de mamíferos foram realizados. O veneno de *M. lemniscatus* foi escolhido nesta etapa do estudo baseado na sua disponibilidade nos institutos de produção de soro antiofídico, uma vez que este veneno não é utilizado nos protocolos de imunização para a fabricação de soro. Outro fato determinante para o estudo do veneno de *M. lemniscatus* é a ausência de estudos com essas famílias de proteínas nos bancos de dados de proteínas, embora esta espécie seja de ampla distribuição geográfica no Brasil. Ainda, como demonstrado nos resultados anteriores, o veneno de *M. lemniscatus* foi o veneno que mostrou uma melhor resolução e maior facilidade de ser fracionado pela técnica de 2D-LC, apresentando, também, um maior número de constituintes protéicos na faixa de massa molecular das 3FTx.

4.3.1 Purificação das proteínas

O veneno bruto de *M. lemniscatus* foi submetido a três passos cromatográficos, para purificação de proteínas com massas moleculares entre 6 a 7 kDa, que correspondem as massas moleculares de proteínas da família 3FTx, já identificadas neste trabalho. A purificação partiu de um total de 70 mg de veneno bruto.

Na primeira etapa de fracionamento, o veneno bruto foi fracionado através de CIEX, na coluna TSK-Gel CM-SW column, 15 cm X 4.6 mm (Tosoh Biosep, Montgomeryville, USA). As frações de interesse foram novamente fracionadas através da coluna de fase reversa Source 15 4.6/100 (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). No terceiro passo cromatográfico, as frações de interesse foram recromatografadas, também por fase reversa, em coluna C2/C18 ST 4.6/100 (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). Após

os dois primeiros passos cromatográficos, as frações foram analisadas por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF-TOF, para monitoramento das 3FTx e para a determinação das massas moleculares das proteínas purificadas.

A figura 19 mostra o perfil cromatográfico do veneno bruto de *M. lemniscatus* após ser submetido à CIEEX. Como pode ser observado, tal veneno apresenta uma grande quantidade de proteínas catiônicas, apresentando uma boa interação com a coluna (fato já observado em resultados anteriores). Um total de 14 frações foi obtido nesse passo cromatográfico, mostrando boa resolução para esta etapa (MI 1 a 14).

Após análise de massas, a fração MI 4, a qual apresentou constituintes proteicos na faixa de massa de 6 a 7 kDa e sem outras massas proteicas, foi submetida a RPC. Após a eluição com gradiente linear de 10 a 80% de ACN foram obtidas mais quatro frações cromatográficas (MI 4.1 a 4.4) (Fig. 20). A fração mais representativa (MI 4.2) foi recromatografada na coluna de fase reversa C2/C18 ST 4.6/100, resultando em apenas duas frações cromatográficas (Fig. 21). Após análises por espectrometria de massa, observou-se a presença de duas proteínas com alto teor de pureza, com massas moleculares de 6435,4Da e 6504,6 Da (Fig 22 A e B). Tais proteínas foram denominadas de MI 6435 e MI 6504, respectivamente.

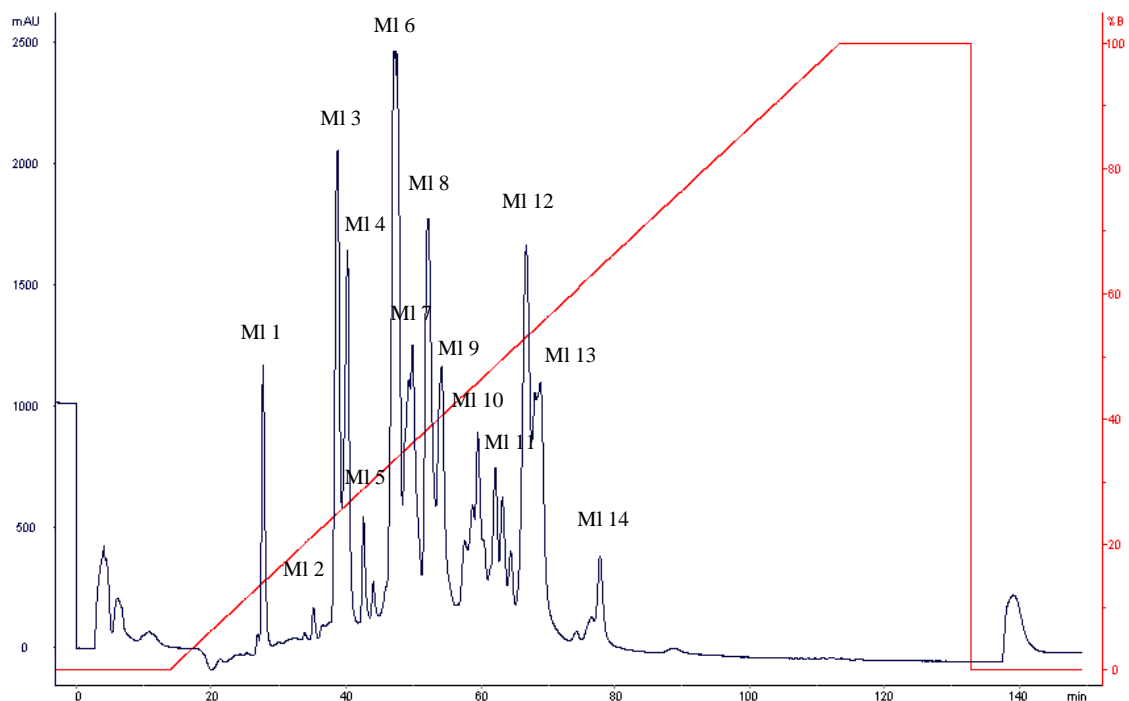


Figura 19: Cromatografia de Troca Catiônica (CIEX) do veneno bruto de *M. lemniscatus*: O veneno bruto de *M. lemniscatus* (70 mg) foi aplicado à coluna de troca catiônica TSK-Gel CM-SW (15 cm x 4,6 mm), equilibrada com acetato de sódio 20 mM, pH 5,0. Foram realizadas cromatografias com 2mg de veneno por vez. As amostras foram eluídas por gradiente linear de NaCl (0 a 1 M), a um fluxo de 0,75 mL/min, durante 100 minutos. Foram coletados 0,4 mL por tubo. A eluição foi monitorada por leitura da absorbância $\lambda = 214\text{nm}$.

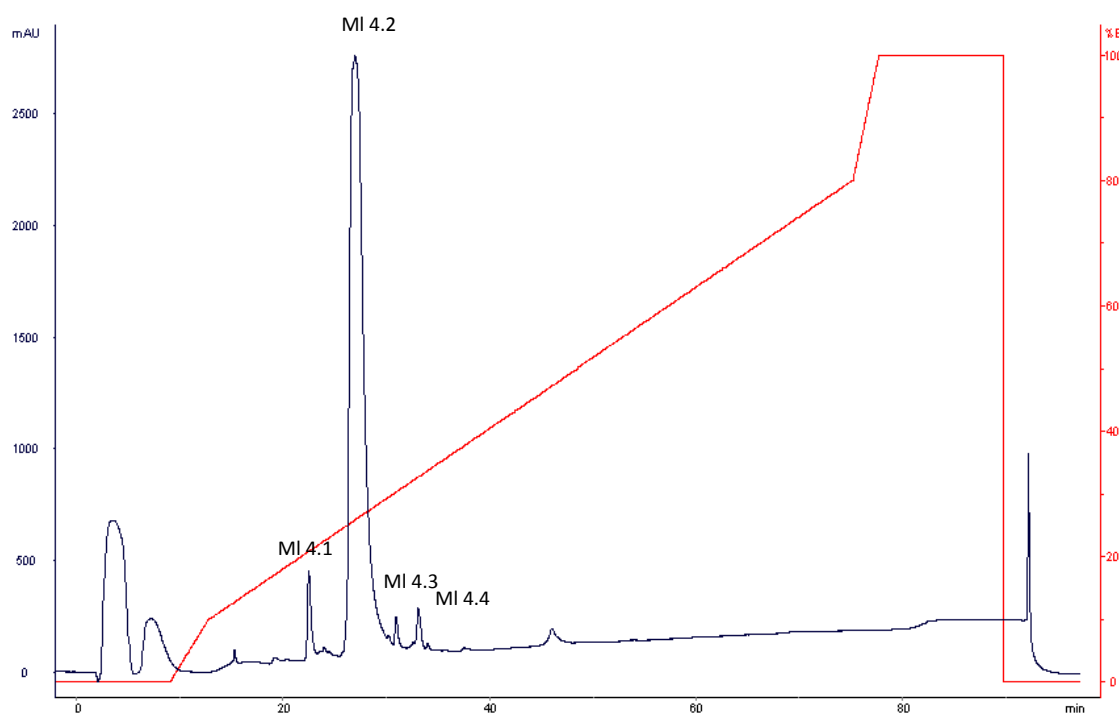


Figura 20: Cromatografia de Fase Reversa das frações provenientes da CIEX: A fração da troca catiônica (MI 4) foi aplicada à coluna de fase reversa Source 15 4.6/100, equilibrada com a solução de TFA 0,1%. As frações foram eluídas por gradiente linear de 10 a 80% ACN com 0,1% TFA, em 63 minutos. Foram coletados 0,5 mL por tubo, a um fluxo de 1 ml/min. A eluição foi monitorada por leitura da absorbância ($\lambda = 214\text{nm}$).

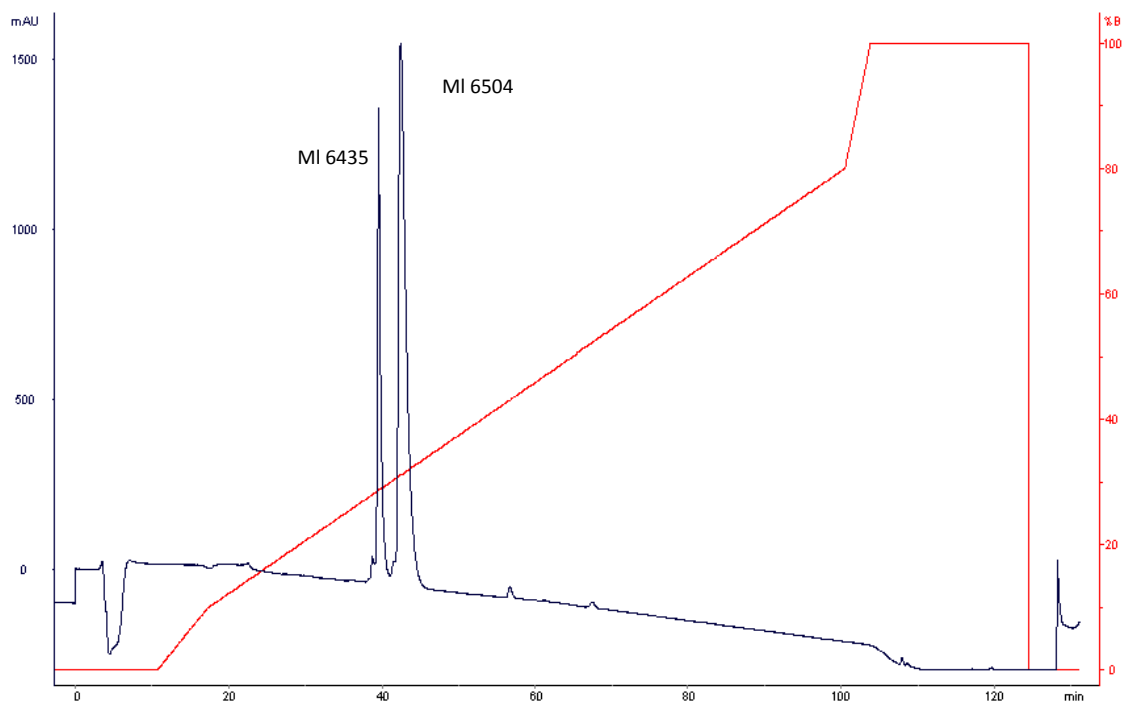


Figura 21: Recromatografia em Fase Reversa da fração MI 4.2: A fração da RPC em coluna Source 15 4.6/100 (MI 4.2) foi aplicada na coluna de fase reversa C2/C18 ST 4.6/100, equilibrada com a solução de TFA 0,1%. As frações foram eluídas por gradiente linear de 10 a 80% ACN com de 0,1% TFA, em 83 minutos. Foram coletados 0,5 mL por tubo, a um fluxo de 1 ml/min. A eluição foi monitorada por leitura da absorbância ($\lambda = 214\text{nm}$).

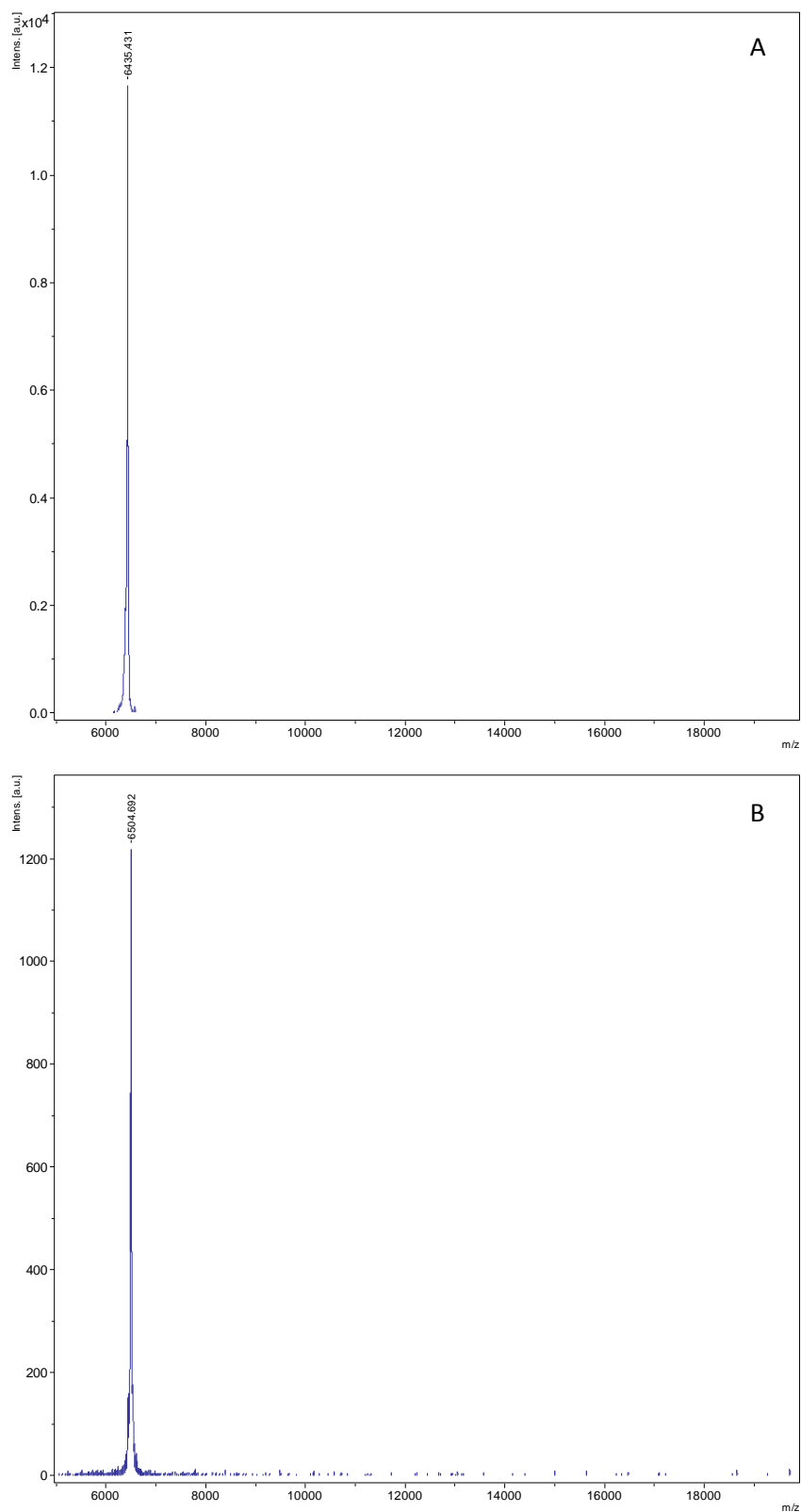


Figura 22: Espectros de massa (MALDI-TOF) das proteínas purificadas do veneno de *M. lemniscatus*. (A) Proteína MI 6435 e (B) Proteína MI 6504. As análises foram realizadas por MALDI-TOF, usando o aparelho Autoflex III (Bruker Daltonics, Billerica, USA) operado de modo linear positivo.

4.3.2 Identificação das proteínas purificadas por sequenciamento N-terminal

As duas proteínas purificadas (MI 6435 e MI 6504), através dos processos cromatográficos, tiveram suas sequências primárias parciais identificadas, pela degradação de Edman. A identificação dos resíduos de aminoácidos, que compõe a região N-terminal de tais proteínas, possibilitou a identificação das mesmas, através de pesquisa de similaridade, em bancos de dados.

A tabela 6 mostra a similaridade da proteína MI 6435 (LKCYVSFNKEVTCPEGMNFCEIDVVPPTHG) com outras proteínas de serpentes que apresentaram menor E(), cujas sequências parciais ou totais foram depositadas em banco de dados Swiss-prot e Gen-bank. Nestas tabelas, também, estão representados o número de identificação da proteína no banco de dados, o nome da proteína que foi similar, o organismo do qual foi identificado e o número de aminoácidos identificados na proteína similar. A proteína MI 6345 similar às neurotoxinas de cadeia curta (máximo de 70%), à citotoxinas (máximo de 60%) e a neurotoxinas de cadeia longa (63%), isoladas dos venenos de *M. surinamensis*, *Naja haje annulifera*, *M. altirostris*, *Hemachatus haemachatus*, *M. corallinus*, *Naja oxiana*, *Naja atra*, *Ophiophagus hannah*, *Naja mossambica*, *Naja nivea*. Todas estas proteínas são da família das 3FTx.

O alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína MI 6435 a proteínas similares está representado na figura 23. Nota-se que os três resíduos de cisteínas identificados na sua sequência são altamente conservados nas sequências das outras proteínas. Ainda, os motivos de sequências LKCY e VTCPEG, também mostram-se com elevado índice de conservação entre a proteína analisada e as demais sequências. Dos 30 resíduos aminoácidos indentificados na região N-terminal da proteína, seis apresentam-se carregados, sendo 4 resíduos polares básicos e 2 resíduos polares ácidos. Em relação á polaridade essa sequência N-terminal mostra-se com uma maior quantidade de resíduos polares.

A tabela 7 mostra a similaridade da proteína MI 6504 (IKCYVLRDKEDTCPEGINFCEKYDVPATHGNVITVQ) com outras sequências protéicas encontradas nos bancos de dados pertencentes a família das 3FTx. Essa

sequência mostrou-se similar a, principalmente, neurotoxinas de cadeia curta, sendo a maior porcentagem de similaridade (84%) mostrada com um precursor de 3FTx isolado do veneno de *M. altirostris*. Embora, o menor E() foi mostrado pela similaridade com uma proteína ligadora a receptores nicotínicos de acetilcolina identificados no veneno de *M. nigrocinctus*. Todas as proteínas similares à MI 6504 foram identificadas em venenos de serpentes da família Elapidae (*M. lemniscatus*, *M. nigrocinctus*, *M. surinamensis*, *M. corallinus*, *M. altirostris*, *P. textilis*, *M. frontalis*, *M. pyrrhocryptus*), sendo a grande maioria de venenos de *Micrurus*.

A figura 24 mostra a sequência N-terminal da proteína MI 6504 alinhada a outras sequências de aminoácidos de proteínas isoladas das espécies acima citadas. Observa-se a conservação dos três resíduos de cisteínas identificados nessa sequência N-terminal, quando comparados às sequências de aminoácidos das outras proteínas. O motivo estrutural IKCY encontra-se conservados nas outras sequências, embora nas demais sequências a isoleucina (I) seja substituída por uma leucina (L). A conservação dos motivos estruturais TCPEG e CEKYXV, também é observada, com algumas alterações de resíduos específicos em determinadas sequências (nesse caso, X é um resíduo de glicina não conservado). Dos 38 resíduos de aminoácidos identificados na sequência parcial da proteína MI 6504, 10 apresentam a cadeia lateral carregada (6 ácidos e 4 básicos). De maneira geral, essa região identificada apresenta uma característica polar.

No alinhamento entre as sequências das proteínas MI 6435 e MI 6504, figura 25, observa-se grande similaridade entre as duas proteínas. Poucas alterações de resíduos de aminoácidos são observadas. As alterações observadas são: 1) o primeiro resíduo de aminoácido de uma leucina na MI 6435 por uma isoleucina na MI 6504; 2) o motivo SFN (dos resíduos 6 a 8 na MI 6435) pelo motivo RDK (dos resíduos 6 a 8 na MI 6504); 3) o resíduo 11, de uma valina (MI 6435) por um ácido aspártico (MI 6504); 4) o resíduo 17, de uma metionina (MI 6435) por uma isoleucina (MI 6504); 5) o motivo IDV (dos resíduos 22 a 24 na MI 6435) pelo motivo KYD (dos resíduos 22 a 24 na MI 6504) e 5) o resíduo 27, de uma treonina por uma alanina.

Tabela 6: Proteínas similares à proteína MI 6435 do veneno de *M. lemniscatus*

Proteínas	Fonte	Organismo	Aminoácidos	Similaridade %	E ()	Classificação	Banco de Dados
1	Neurotoxina de cadeia curta MS11	<i>Micrurus surinamensis</i>	58	70	0,00001	Elapidae	Swiss-Prot: P86094.1
2	Citotoxina-3	<i>Naja haje annulifera</i>	60	66	0,0006	Elapidae	Swiss-Prot: P01459.1
3	precursor 3FTx	<i>Micrurus altirostris</i>	82	70	0,0009	Elapidae	GenBank: AED89569.1
4	Citotoxina-2	<i>Hemachatus haemachatus</i>	61	66	0,002	Elapidae	Swiss-Prot: P24776.1
5	precursor 3FTx	<i>Micrurus corallinus</i>	79	66	0,002	Elapidae	GenBank: ACS74999.1
6	Citotoxina-1	<i>Naja oxiana</i>	60	66	0,003	Elapidae	Swiss-Prot: P01451.1
7	Citotoxina-1	<i>Hemachatus haemachatus</i>	61	66	0,004	Elapidae	Swiss-Prot: P01471.1
8	Cardiotoxina I	<i>Naja atra</i>	81	66	0,007	Elapidae	Swiss-Prot: Q91135.1
9	neurotoxina de cadeia longa OH-56	<i>Ophiophagus hannah</i>	91	63	0,009	Elapidae	Swiss-Prot: Q53B57.1
10	precursor 3FTx	<i>Micrurus altirostris</i>	84	53	0,013	Elapidae	GenBank: AED89573.1
11	Citotoxina-4	<i>Naja mossambica</i>	60	66	0,017	Elapidae	Swiss-Prot: P01452.1
12	Citotoxina-5	<i>Naja mossambica</i>	60	46	0,017	Elapidae	Swiss-Prot: P25517.3
13	Citotoxina-1	<i>Naja nivea</i>	60	66	0,045	Elapidae	Swiss-Prot: P01456.1
14	Citotoxina-7	<i>Naja haje annulifera</i>	60	66	0,045	Elapidae	Swiss-Prot: P01466.1
15	Citotoxina-2	<i>Naja haje annulifera</i>	60	66	0,045	Elapidae	Swiss-Prot: P01462.1

Nota: A busca de similaridade foi realizada pelo programa BLASTP 2.2.23+, usando o Swiss-Prot e o GeneBank como banco de dados, com filtro taxonômico para serpentes.

Tabela 7: Proteínas similares a proteína MI 6504,6 do veneno de *M. lemniscatus*

Proteínas	Fonte	Organismo	Aminoácidos	Similaridade %	E ()	Classificação	Banco de Dados
1	proteína ligadora a receptor de acetilcolina nicotínico	<i>Micrurus nigrocinctus</i>	22	62	1,00E-06	Elapidae	Swiss-Prot: Q9PRQ4.2
2	neurotoxina de cadeia curta MS11	<i>Micrurus surinamensis</i>	58	82	5,00E-06	Elapidae	Swiss-Prot: P86094.1
3	precursor de 3FTx	<i>Micrurus corallinus</i>	84	70	6,00E-06	Elapidae	GenBank: ACS74995.1
4	precursor de 3FTx	<i>Micrurus altirostris</i>	82	72	8,00E-06	Elapidae	GenBank: AED89569.1
5	precursor de 3FTx	<i>Micrurus altirostris</i>	80	67	2,00E-05	Elapidae	GenBank: AED89567.1
6	neurotoxina de cadeia curta 8	<i>Pseudonaja textilis</i>	79	90	6,00E-05	Elapidae	Swiss-Prot: A8HDK1.1
7	α -neurotoxin	<i>Pseudonaja textilis</i>	79	47	7,00E-05	Elapidae	GenBank: AAF75223.1
8	Frontoxina II	<i>Micrurus frontalis</i>	59	67	9,00E-05	Elapidae	Swiss-Prot: P86421.1
9	neurotoxina de cadeia curta	<i>Pseudonaja textilis</i>	79	42	1,00E-04	Elapidae	Swiss-Prot: Q9W7J6.1
10	Venom protein E2	<i>Micrurus pyrrhocryptus</i>	43	67	2,00E-04	Elapidae	Swiss-Prot: P0CAR7.1
11	neurotoxina de cadeia curta 3	<i>Pseudonaja textilis</i>	79	82	5,00E-04	Elapidae	Swiss-Prot: Q9W7K0.1
12	neurotoxina de cadeia curta 2	<i>Pseudonaja textilis</i>	79	90	7,00E-04	Elapidae	Swiss-Prot: Q9W7K1.1
13	neurotoxina de cadeia curta 4	<i>Pseudonaja textilis</i>	79	90	0,001	Elapidae	Swiss-Prot: Q9W7J9.1
14	precursor de 3FTx	<i>Micrurus corallinus</i>	79	82	0,001	Elapidae	GenBank: ACS74999.1
15	neurotoxina de cadeia curta 1/5	<i>Pseudonaja textilis</i>	79	47	0,001	Elapidae	Swiss-Prot: Q9W7K2.1

Nota: A busca de similaridade foi realizada pelo programa BLASTP 2.2.23+, usando o Swiss-Prot e o GeneBank como banco de dados, com filtro taxonômico para serpentes.

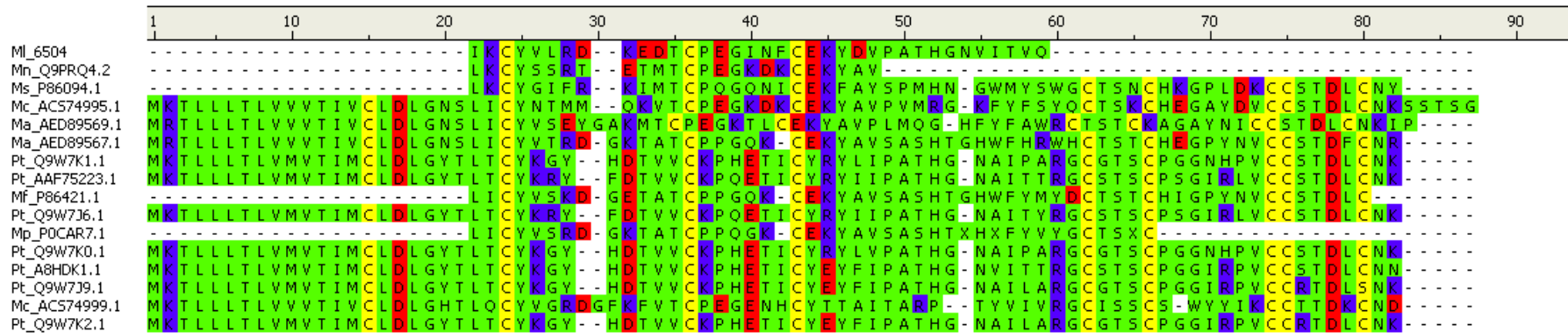


Figura 24: Alinhamento da sequência de aminoácidos da MI 6504 do veneno de *M. lemniscatus* com sequências de proteínas da família das 3FTx. O alinhamento foi realizado através da ferramenta *ClustalX 2.0.11*, no modo de alinhamento múltiplo (Thompson, Gibson *et al.*, 1997). Espaços (*Gaps*) representados por (-) foram introduzidos para maximar a similaridade entre as sequências. Resíduos de aminoácidos negativos (vermelho), resíduos de aminoácidos positivos (azul), resíduos de aminoácidos neutros polares ou apolares (verde) e resíduos de cisteínas (amarelo). *M. lemniscatus* (MI), *M. nigrocinctus* (Mn), *M. surinamensis* (Ms), *M. corallinus* (Mc), *M. altirostris* (Ma), *P. textilis* (Pt), *M. frontalis* (Mf), *M. pyrrhocryptus* (Mp).

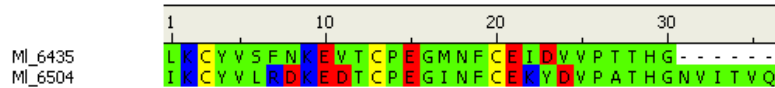


Figura 25: Alinhamento entre as sequências N-terminais das proteínas MI 6435 e MI 6504, isoladas do veneno de *M. lemniscatus*. O alinhamento foi realizado através da ferramenta *ClustralX* 2.0.11, no modo de alinhamento múltiplo (Thompson, Gibson *et al.*, 1997). Resíduos de aminoácidos negativos (vermelho), resíduos de aminoácidos positivos (azul), resíduos de aminoácidos neutros polares ou apolares (verde) e resíduos de cisteínas (amarelo). *M. lemniscatus* (MI).

4.3.3 Ensaio de atividade anti-*Leishmania* e citotoxicidade em macrófago

Com o intuito de analisar possíveis atividades citotóxicas das proteínas MI 6435 e MI 6504, identificadas como pertencentes às famílias das 3FTx, foram testadas sua capacidade tóxica em células de protozoários e células de mamíferos. Para a análise das atividades antiparasitárias das proteínas, as mesmas foram incubadas com formas promastigotas de *L.(L.) amazonensis*, sendo o ensaio de viabilidade celular realizado pelo ensaio de MTT. Posteriormente, a atividade citotóxica foi testada contra macrófagos isolados de camundongos BALB/c, sendo o ensaio de viabilidade celular, também, realizado por análise do MTT.

Como observado na figura 26, ambas as proteínas testadas apresentaram atividade contra formas promastigotas de *L.(L.) amazonensis*. Os resultados foram expressos por valores obtidos por leitura óptica a 570nm, uma vez que as células viáveis são capazes de metabolizar o MTT, formando cristais de formazan, que podem ser identificados neste comprimento de onda. A anfotericina (controle positivo) foi mais ativa na concentração de 50 µg/mL. O mesmo aconteceu com as proteínas MI 6435 e MI 6504 que se mostraram mais ativas na concentração de 50 µg/mL quando comparadas com a concentração de 25 µg/mL, mostrando se tratar uma possível relação dose-dependente.

A tabela 8 mostra a porcentagem de morte dos parasitas utilizando a anfotericina, nas concentrações de 50 µg/mL e 35 µg/mL, e as proteínas MI 6435 e MI

6504, nas concentrações de 50 µg/mL e 25 µg/mL. A anfotericina B, nas concentrações de 50 µg/mL e 35 µg/mL, foi capaz de matar 66% e 50% dos parasitas, respectivamente. Já a porcentagem de morte observada para a proteína MI 6435 foi de 12% e 48%, quando utilizadas as concentrações de 25 µg/mL e 50 µg/mL de proteína. A proteína MI 6504,6 mostrou uma porcentagem de morte de 18% e 38%, nas mesmas concentrações utilizadas da proteína MI 6435.

A figura 27 mostra que as proteínas MI 6435 e MI 6504 mostraram-se tóxicas para macrófagos de mamíferos, na concentração de 50 µg/mL. Essa concentração foi utilizada no experimento pelo fato de ter sido a maior concentração tóxica para as formas promastigotas de *Leishmania*. A mesma citotoxicidade foi observada para anfotericina, porém em menor proporção. A anfotericina foi capaz de matar 3,2% dos macrófagos. Comparando as duas proteínas testadas, observa-se que a proteína MI 6504 mostrou-se menos tóxica, apresentando uma porcentagem de morte de 7,1%, enquanto a proteína MI 6435 foi capaz de matar 14,7% dos macrófagos (Tab. 9).

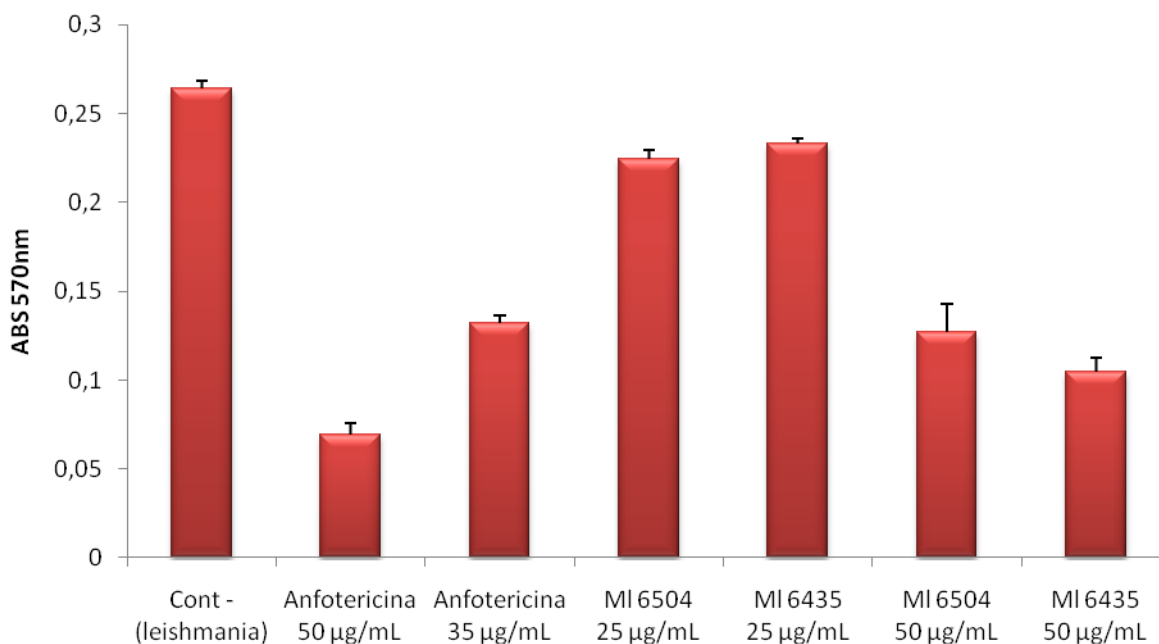


Figura 26: Ensaio de atividade anti-Leishmania. As formas promastigotas de *L.(L). amazonensis* foram cultivadas em meio Schneider completo. A viabilidade celular foi medida pelo ensaio de MTT. A absorbância foi monitorada em comprimento de onda de 570 nm.

Tabela 8: Porcentagem de morte dos parasitas promastigotas de Leishmania

Amostras	Porcentagem de Morte (%)
Amphotericina B (50ug/mL)	66
Amphotericina B (35ug/mL)	50
MI 6504 Da (25 ug/mL)	18
MI 6435 Da (25 ug/mL)	12
MI 6504 Da (50 ug/mL)	38
MI 6435 Da (50 ug/mL)	49

Porcentagem de morte: densidade óptica do controle - menos a densidade óptica da amostra, dividido pela densidade óptica do controle -, multiplicado por 100.

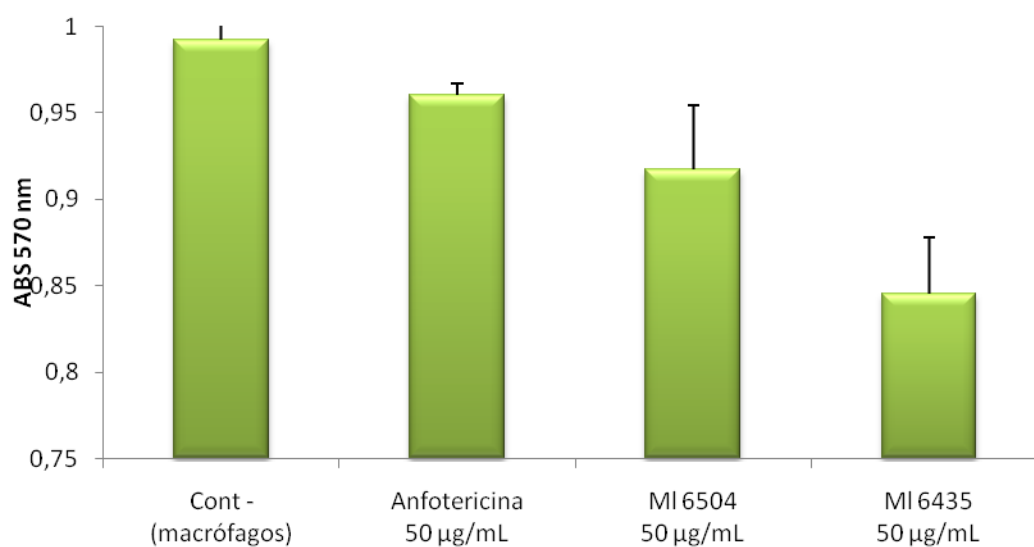


Figura 27: Ensaio de atividade citotóxica em macrófago. Os macrófagos utilizados foram isolados de camundongos BALB/c. A viabilidade celular foi medida pelo ensaio de MTT. A absorbância foi monitorada em comprimento de onda de 570 nm.

Tabela 9: Porcentagem de morte dos macrófagos

Amostras	Porcentagem de Morte (%)
Anfotericina B (50 µg/mL)	3,2
MI 6504 Da (50 µg/mL)	7,1
MI 6435 Da (50 µg/mL)	14,7

Porcentagem de morte: densidade óptica do controle - menos a densidade óptica da amostra, dividido pela densidade óptica do controle -, multiplicado por 100.



5. Discussão

5 Discussão

5.1 Análises Proteômicas dos venenos de *Micrurus*

5.1.1 Análises por 1D-LC, 2D-LC e espectrometria de massas

A caracterização proteômica detalhada dos venenos de serpentes promove uma maior compreensão do repertório de proteínas secretadas que compõe os venenos. Tais proteínas, por sua vez, representam valiosas ferramentas para a compreensão dos processos fisio-patológicos envolvidos no envenenamento e da biologia e ecologia das serpentes, assim como para o desenvolvimento biotecnológico, seja colaborando para a melhoria na produção de soro antiofídico, ou para o desenvolvimento de novas drogas com potencial uso clínico (Ménez, Stöcklin *et al.*, 2006). As técnicas proteômicas propiciam o entendimento de venenos que são considerados raros na natureza e de difícil obtenção, uma vez que a estratégia experimental é baseada, principalmente, no estudo estrutural inicial para posterior análise funcional.

Desta forma, devido a essa inversão metodológica, venenos como os das espécies do gênero *Micrurus* tem tido a possibilidade de serem mais explorados, aumentando o conhecimento dos mesmos. A escassez de estudos sobre os venenos deste gênero, resultado da dificuldade na captura dessas serpentes, raras na natureza, da manutenção em cativeiro, por apresentarem uma alimentação restrita e especializada, e ainda por apresentarem glândulas de venenos morfologicamente pequenas, o que desencadeia em uma produção limitada de veneno.

Até pouco tempo atrás, existiam estudos que abordavam a atividade biológica e enzimática do veneno bruto de *Micrurus*. Porém poucos relatos existiam sobre a composição dos mesmos e sobre a caracterização de proteínas específicas. Mais recentemente, estudos proteômicos e transcriptômicos dos venenos de *M. surinamensis*, *M. pyrrhocryptus*, *M. corallinus*, *M. frontalis*, *M. altirostris* e *M. nigrocinctus* foram realizados, contribuindo para o entendimento dos venenos do gênero (Olamendi-Portugal, Batista *et al.*, 2008; Dokmetjian, Del Canto *et al.*, 2009; Leao, Ho *et al.*, 2009; Moreira, Prates *et al.*, 2010; Corrêa-Netto, Junqueira-De-Azevedo *et al.*, 2011; Fernandez, Alape-Giron *et al.*, 2011).

Neste trabalho, as análises proteômicas para o conhecimento geral dos venenos das espécies *M. frontalis*, *M. ibiboboca* e *M. lemniscatus*, tiveram início com os mesmos sendo submetidos à cromatografia uni e bidimensional, seguidas de análises por espectrometria de massa. Com isso foram gerados conhecimentos acerca dos caracteres físico-químicos das proteínas que compõe os venenos, como massa molecular, hidrofobicidade e basicidade.

Nota-se que os três venenos apresentam, de maneira geral, um caráter básico, sendo constituídos por proteínas compostas estruturalmente por uma maior quantidade de aminoácidos com cargas positivas, uma vez que quase todo o conteúdo protéico destes venenos foi capaz de interagir com a coluna TSK-Gel CM-SW da CIEX. As frações dos venenos de *M. frontalis* foram eluídas entre 0,1 e 1M de NaCl, enquanto as frações dos venenos de *M. ibiboboca* e do veneno de *M. lemniscatus* foram eluídas com 0,001 e 0,09 M de NaCl, respectivamente.

Correlacionando o perfil de eluição das frações da CIEX com as massas detectadas por espectrometria de massa, observou-se que componentes com massas moleculares similares, que indicam possíveis isoformas, foram separados pela eluição salina, enquanto componentes com massas moleculares distintas foram frequentemente co-eluídos. Comportamentos cromatográficos similares foram observados nos fracionamentos dos venenos dos escorpiões (*Tityus serrulatus*, *T. stigmurus*, *T. bahiensis*, *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* e *L. q. hebraeus*) e do veneno do centípeda (*Scolopendra* spp), através dessa mesma técnica (Nascimento, Rates *et al.*, 2006; Rates, Bemquerer *et al.*, 2007).

Ao correlacionar os perfis de eluição das proteínas com gradientes de NaCl e, posteriormente, com gradientes de ACN com as massas moleculares identificadas, tem-se uma visão mais abrangente das famílias de proteínas encontradas nesses venenos, dando novas visões sobre o conteúdo proteômico das espécies avaliadas. As proteínas dos venenos, como as toxinas, apresentam uma estrutura espacial compacta, que permite que sua carga e seu caráter de hidrofobicidade sejam expressos, principalmente, na superfície da molécula (Rosso, Vargas-Rosso *et al.*, 1996), o que influencia no seu comportamento cromatográfico, juntamente com a massa molecular. Entretanto, a

constituição de aminoácidos de uma proteína é o que revela o caráter bioquímico da mesma, ou seja, o seu caráter de basicidade e de hidrofobicidade.

Tais características são de grande relevância, uma vez que são estas que definem a estrutura e a função das proteínas, principalmente, no que se trata da interação proteína-proteína. As PLA₂ (12 a 14 kDa), uma das principais famílias de toxinas de elapídeos e viperídeos, apresentam diversificadas funções biológicas e farmacológicas como consequência da sua interação com diferentes sítios alvos nas células e tecidos. Os sítios alvos e os sítios farmacológicos destas toxinas são complementares em termos de cargas, hidrofobicidade e interação de van der Waal's (Manjunatha Kini, 2003).

A alteração de resíduos de aminoácidos, especialmente os encontrados nas superfícies tridimensionais, pode alterar a ligação da proteína ao seu sítio alvo. Tal fato é evidente no veneno de *Trimeresurus flavoviridis* (Viperidae), no qual as isoformas ácidas [Asp49]PLA₂ (pI 7,9) mostram uma atividade hemolítica e miolítica maior quando comparada as isoformas básicas [Lys49]PLA₂ (pI 10,3). Ainda no mesmo veneno, foi relatado que PLA₂ com diferentes valores de pIs podem exibir atividade indutora de edema (pI 8,6) ou atividade neurotóxica (pI 10,3) (Kihara, Uchikawa *et al.*, 1992).

No presente estudo, a presença de PLA₂ ácidas e básicas também podem ser observadas nos venenos de *M. frontalis*, *M. ibiboboca* e *M. lemniscatus*, embora os dados sobre identificação de estrutura primária não possam, ainda, serem correlacionados. Tal fato pode ser especulado observando-se os gráficos de distribuição de massas *versus* a eluição em NaCl, nos quais observa-se que as proteínas com faixa de massa entre 10 e 15 kDa, se espalham horizontalmente no eixo xy, indicando que as mesmas apresentam massas moleculares aproximadas, porém com cargas líquidas distintas.

Além da sua importância biológica, as diferenças físico-químicas encontradas nas proteínas dos venenos permitem uma melhor separação das mesmas, o que contribui para o estudo de isoformas de toxinas. Um grande conteúdo de isoformas de proteínas das famílias das 3FTx e as PLA₂ são encontradas em venenos elapídicos. No veneno de *M. nigrocinctus*, por exemplo, as PLA₂ foram identificadas em 22 frações enquanto as 3FTx em 18 frações da cromatografia de fase reversa (Fernandez, Alape-Giron *et al.*,

2011), o que expressa diferenças de hidrofobicidade entre as isoformas. De maneira geral nos venenos elapídicos, observa-se que as α -neurotoxinas, pertencentes à família das 3FTx eluem, principalmente, no começo do gradiente de ACN, seguida pelas PLA₂. Em contrapartida, as cardiotoxinas (3FTx) que são extremamente básicas e hidrofóbicas são eluídas no fim do gradiente de ACN (Rosso, Vargas-Rosso *et al.*, 1996).

Em relação à hidrofobicidade, os resultados do 1D-LC demonstraram que os constituintes dos três venenos estudados foram eluídos em concentrações de ACN de 10 a 70%, aproximadamente. Enquanto, que na cromatografia de fase reversa da 2D-LC as frações dos venenos de *M. frontalis* e *M. ibiboboca* apresentaram constituintes mais hidrofílicos, sendo eluídos com uma menor concentração de ACN (10 a 50% ACN), já o veneno de *M. lemniscatus* mostraram ser composto, também, por proteínas mais hidrofóbicas, sendo eluídas entre 10 e 80% de ACN. Vale ressaltar que a diferença no perfil de eluição observado nas duas técnicas está relacionado ao tipo de coluna utilizado nos mesmos, assim como a quantidade de veneno bruto analisado.

Em um estudo realizado, foi feita uma comparação de de venenos de onze espécies de *Micrurus*, por meio de cromatografia de gel filtração e cromatografia de fase reversa, apresentando proteínas mais hidrofóbicas e outras mais hidrofílicas. Os resultados foram similares aos do presente trabalho, mostrando de forma geral uma similaridade no perfil de eluição entre os venenos, porém com pequenas diferenças em relação a concentração de eluição de algumas frações cromatográficas (Da Silva Junior, Griffin *et al.*, 1991). Em contrapartida, outros pesquisadores, ao fracionarem os venenos de *M. nigrocinctus nigrocinctus*, *M. alleni yastesi* e *M. multifasciatus* verificaram que todas as proteínas destes venenos foram eluídas antes de 35% de ACN, sendo, portanto estes venenos constituídos de proteínas mais hirofílicas (Rosso, Vargas-Rosso *et al.*, 1996). Tal resultado foi similar ao do presente trabalho, onde as proteínas dos venenos de *M. frontalis* e *M. ibiboboca* foram eluídas entre 20-40% de ACN, aproximadamente. Comportamento diferente apresentou o veneno de *M. lemniscatus*, no qual as proteínas foram eluídas com um intervalo entre 10 a 80% de ACN.

A característica peculiar do veneno de *M. lemniscatus*, observada nesse trabalho, em possuir proteínas com grandes diferenças de hidrofobicidade, também pode ser observadas em outros venenos. O fracionamento do veneno de *M. dumerilii carinicauda*

foi realizado, através de fase reversa, e duas frações foram eluídas com aproximadamente 20% de ACN. Porém a maioria das frações foi eluída entre 40-70%, com algumas proteínas sendo ainda eluídas com mais de 80% de ACN (Dal Belo, Toyama *et al.*, 2005). O perfil cromatográfico do venenos de *M. n. nigrocinctus*, também, por fase reversa, mostrou as proteínas sendo eluídas entre 5 e 45% de ACN, aproximadamente, com uma fração sendo eluída com 100% de ACN (Alape-Giron, Stiles *et al.*, 1996).

Tal comportamento pode ser observado em outro estudo (Nawarak, Sinchaikul *et al.*, 2003). Analisando outros venenos de elapídeos, como de *Naja naja atra*, *N. n. kaouthia*, *N. n. siamensis*, *N. n. haje*, *Bungarus multicinctus* e *B. fasciatus*, tais autores mostraram que todos estes venenos tiveram uma certa similaridade nos perfis cromatográficos de fase reversa, onde os picos com maiores valores de absorbância foram eluídos entre 35-55% de ACN e os picos com menores valores de absorbância foram eluídos entre aproximadamente 10 e 75% de ACN. Foram também observadas variações nos cromatogramas intra-espécies, nos quais o padrão de eluição foi similar, porém com diferenças quantitativas (diferentes valores de absorbância).

A maioria dos trabalhos proteômicos realizados com os venenos de *Micrurus* (*M. alleni*, *M. multifasciatus*, *M. surinamensis*, *M. nigrocinctus*, *M. altirostris* e *M. corallinus*) se baseia em técnicas cromatográficas unidimensionais usando diferentes tipos de colunas e equipamentos (Rosso, Vargas-Rosso *et al.*, 1996; Olamendi-Portugal, Batista *et al.*, 2008; Corrêa-Netto, Junqueira-De-Azevedo *et al.*, 2011; Fernandez, Alape-Giron *et al.*, 2011). Este fato dificulta, portanto, uma comparação justa entre os perfis cromatográficos dos venenos das espécies estudadas no presente trabalho, com outros venenos de *Micrurus*, previamente descritos. Ainda, neste trabalho a utilização da 2D-LC mostrou ser um caminho auxiliar nas análises proteômicas, por possibilitar uma separação mais efetiva dos constituintes moleculares dos venenos. Esta abordagem pode auxiliar, também, nos estudos de proteínas específicas para realização de ensaios biológicos.

Através da análise de massas por MALDI-TOF/MS e ESI-Q-TOF/MS, o presente trabalho revelou que os venenos de *M. frontalis*, *M. ibiboboca* e *M. lemniscatus* são constituídos por poucas famílias moleculares, em se tratando de agrupamento de massas

moleculares, porém de um grande número de isoformas. As moléculas mais abundantes dos venenos são as que possuem massa entre 6 e 8 kDa, perfazendo 65%, 44% e 59% das moléculas encontradas nos venenos de *M. frontalis*, *M. ibiboboca* e *M. lemniscatus*, respectivamente. O segundo grupo mais expressivo de proteínas apresenta massas moleculares entre 12 e 14 kDa, correspondendo a 19,5% das espécies moleculares dos venenos de *M. frontalis* e *M. ibiboboca* e 9% do veneno de *M. lemniscatus*.

De acordo com a literatura, proteínas com massas moleculares em torno de 6 e 8 kDa e 12 e 14 kDa, são as mais representativas nos venenos da família Elapidae, sendo identificadas como pertencentes à família das 3FTx e das PLA₂, respectivamente (Kini, 1997; Nawarak, Sinchaikul *et al.*, 2003; Kini e Doley, 2010; Corrêa-Netto, Junqueira-De-Azevedo *et al.*, 2011; Fernandez, Alape-Giron *et al.*, 2011).

A composição do veneno pode ser usada para inferência dos efeitos farmacológicos e manifestações clínicas observadas após o envenenamento por *Micrurus*. A grande quantidade de proteínas relacionadas às 3FTx e PLA₂ sugerem que ambas famílias de proteínas são cruciais para a atividade biológica desses venenos, no que se refere a efeitos de paralisia e morte das presas e predadores. Ambas 3FTx e PLA₂ são responsáveis pelas atividades neurotóxicas e morte por parada respiratória, processos observados no envenenamento por serpentes coral (Casais-E-Silva e Furtado, 1996).

Tal perfil de composição de proteínas pode ser observado em venenos de outras espécies de *Micrurus*. O perfil proteômico e transcriptômico dos venenos de *M. altirostris* e *M. corallinus* mostraram que as 3FTx e as PLA₂ correspondem, respectivamente, a 79,5% e 13,7% e 81,7% e 11,9% dos venenos de cada espécie citada (Corrêa-Netto, Junqueira-De-Azevedo *et al.*, 2011). Em outro estudo com o veneno de *M. corallinus*, Leão, Ho *et al.* (2009) verificaram que as 3FTx, perfazem 24%, enquanto as PLA₂ constituem 15% do veneno total. Com uma observação proporcional inversa, outro grupo recentemente demonstraram que a PLA₂ é a família de proteína mais abundante no veneno de *M. nigrocinctus*, correspondendo a 48% do conteúdo total e as PLA₂ aparecem logo atrás, correspondendo apenas a 38% do mesmo veneno (Fernandez, Alape-Giron *et al.*, 2011).

Diferenças nas quantidades relativas das 3FTx e PLA₂ podem refletir diretamente nas atividades farmacológicas e biológicas dos venenos de *Micrurus*. Corroborando com essa observação e com os resultados deste trabalho, o veneno de *M. frontalis* exibiram uma atividade letal superior em camundongos e maior atividade fosfolipásica, quando comparados ao veneno de *M. lemniscatus* (Cecchini, Marcussi *et al.*, 2005). Um estudo realizado por Moraes *et al.* demonstra que a DL₅₀ de *M. frontalis* é de 0,965 mg/kg em camundongo com injeção intraperitoneal, enquanto que para o veneno de *M. ibiboboca* é de 0,990 mg/kg em camundongo (Moraes, Sousa-E-Silva *et al.*, 2003). Por outro lado, o veneno das espécies *M. frontalis*, *M. ibiboboca* e *M. lemniscatus* contêm níveis variáveis de atividade fosfolipásica, embora o veneno de *M. frontalis* apresente menor atividade hidrolítica entre os três venenos analisados (Tanaka, Maria De Fátima *et al.*, 2010). Em relação à resposta edematogênica, os venenos de *M. lemniscatus* (10,8 µg/camundongo) e *M. ibiboboca* (20,5 µg/camundongo) exibiram atividade superior, enquanto o veneno de *M. frontalis* tem uma toxicidade superior (5,72 µg/camundongo) (Sanchez, Freitas *et al.*, 1992; Casais-E-Silva e Furtado, 1996).

No presente trabalho como comentado acima, o conteúdo de PLA₂ foi o mesmo para os venenos de *M. frontalis* e *M. ibiboboca*, enquanto o veneno de *M. lemniscatus* apresentou uma composição menor, o que demonstra a variação no conteúdo fosfolipásico e, conseqüentemente, na sua atividade. Em contrapartida, outro grupo de pesquisa demonstrou que o conteúdo de PLA₂ no veneno de *M. ibiboboca* é superior ao do veneno de *M. frontalis altirostris* (Da Silva Junior, Griffin *et al.*, 1991). Os venenos de várias espécies de *Micrurus* possuem alta atividade fosfolipásica, porém estas variam entre as espécies. Algumas PLA₂ apresentam atividade miotóxicas e estas, também, podem sofrer variação de intensidade, dependendo da espécie (Tan e Ponnudurai, 1992). O grupo de Gutiérrez demonstrou que os venenos de *M. nigrocinctus nigrocinctus*, *M. n. mosquitensis*, *M. carinicauda*, *M. frontalis*, *M. alleni*, e *M. surinamensis* induzem mionecrose em camundongo, em contrapartida veneno de *M. mipartitus* não mostra atividade miotóxica (Gutiérrez, Lomonte *et al.*, 1983).

Ainda, em relação à abundância de 3FTx e PLA₂, outros estudos realizados por diferentes grupos corroboram com os resultados obtidos neste trabalho. No estudo proteômico do veneno de *M. surinamensis*, por meio de análises no MALDI-TOF-TOF,

verificou-se que a maior parte dos componentes proteicos deste veneno estão na faixa de massas moleculares entre 6 e 14 kDa, com um menor número de proteínas com massas moleculares abaixo de 4 kDa e acima de 30 kDa (Olamendi-Portugal, Batista *et al.*, 2008). Através de 1D-gel, foi demonstrado, também, que os venenos de *Micrurus*, eram compostos por proteínas com massa molecular ente 6 e 16 kDa. Dentre as serpentes analisadas nestes estudos estavam espécies como: *M. frontalis*, *M. corallinus*, *M. lemniscatus*, *M. spixii*, *M. surinamensis* e *M. carnicauda dumerilli* (De Oliveira, Assui *et al.*, 2003). Entretanto, essa composição de constituintes moleculares não é exclusiva das serpentes do gênero *Micrurus*, outros venenos elapídicos possuem características moleculares semelhantes. A maior parte dos venenos de espécies de *Naja* e *Bungarus*, são de proteínas com massas moleculares menores que 20 kDa, o que foi observado por gel-1D (Nawarak, Sinchaikul *et al.*, 2003).

5.1.2 Análise da composição dos venenos através 2D-gel

Os resultado obtidos nas análises por gel-2D, no que se refere às faixas de massas moleculares e as cargas das proteínas, foram coerentes com os perfis protéicos obtidos nas análises de 2D-LC/MS, muito embora, o 2D-LC/MS, como esperado, mostrou-se mais sensível e com maior poder de resolução, sendo possível o reconhecimento de um número maior de espécies moleculares. Entretanto, ambas as técnicas podem ser usadas nos estudos proteômicos objetivando melhorar a compreensão da composição dos venenos, principalmente no que se trata de identificação de proteínas por excisão do gel e seqüenciamento por MS/MS.

Os venenos de *M. frontalis*, *M. ibiboboca*, *M. lemniscatus* e adicionalmente, o veneno de *M. spixii*, mostraram uma distribuição de massa molecular e de valores de ponto isoelétrico similares, com uma maior quantidade de proteínas catiônicas em detrimento de proteínas aniônicas. Este fato é sustentado, também, pelo perfil do 2D-LC. Embora proteínas de alta massa molecular possam ser observadas (> 55 kDa), como registrados também nas análises de MALDI-TOF-TOF do veneno de *M. frontalis*, um maior grupo de proteínas com a faixa de massa molecular entre 6 e 21,5 kDa é evidente no gel. Esta observação também é sustentada pelas análises de espectrometria de massa das frações cromatográficas.

Os perfis de gel-2D obtidos neste trabalho mostraram-se similares a outros venenos de *Micrurus* estudados por meio da mesma estratégia metodológica. O veneno de *M. pyrrhocryptus* apresenta um grande número de moléculas básicas, com a existência de dois principais grupos de proteínas de massas moleculares de aproximadamente 7 e 14 kDa. O veneno de *M. surinamensis surinamensis* apresentou aproximadamente 30 proteínas, quando analisado por Gel-2D, sendo os *spots* mais intensos detectados na faixa de massa molecular entre 11 e 25 kDa (Olamendi-Portugal, Batista *et al.*, 2008).

Em contraste, análises de gel-2D de outros venenos elapídicos mostram diferentes padrões de distribuição protéica, revelando uma importante variabilidade entre os venenos de diferentes gêneros dessa família. Por exemplo, análises do veneno de *Naja kaouthia* mostram componentes com massas moleculares entre 7 a 116 kDa, com um grande número de componentes com altos valores de pI (Kulkeaw, Chaicumpa *et al.*, 2007). Ainda, no veneno de *Pseudonaja textilis*, foram detectadas proteínas de massas moleculares que variavam entre 5 e 200 kDa (Birrell, Earl *et al.*, 2006).

Nos resultados dos géis-2D aqui mostrados, numerosos *spots* apresentaram uma distribuição horizontal em série, especialmente na faixa de massa molecular acima de 50 kDa. Tais *spots* são comumente constituídos por uma série de proteínas com diferentes modificações pós-traducionais. O mesmo efeito foi observado no perfil eletroforético do veneno de *P. textilis*, no qual algumas modificações pós-traducionais, incluindo fosforilação, γ -carboxilação e glicosilação, foram identificadas (Birrell, Earl *et al.*, 2006). Algumas toxinas como, LAO, PLA₂ e ainda 3FTx, já foram mostradas por conter modificações pós-traducionais, principalmente glicosilações (De Albuquerque Modesto, Spencer *et al.*, 2006; Osipov, Kasheverov *et al.*, 2008; Ciscotto, Machado De Avila *et al.*, 2009). A maioria das 3FTx não apresenta nenhuma modificação pós-traducional, embora algumas formas glicosiladas de citotoxina 3 tenham sido isoladas à partir do veneno de *N. kaouthia* (Osipov, Kasheverov *et al.*, 2008).

No presente trabalho foram observados *spots* com massas moleculares entre 20 e 30 kDa, nos venenos de *M. frontalis*, *M. ibiboboca* e *M. lemniscatus*. De acordo com outro estudo, o veneno de *M. f. frontalis* contém PLA₂ básicas e ácidas, que mostram massas moleculares entre 21 e 23 kDa, e que tais proteínas reagem fortemente com

anticorpos policlonais contra PLA₂ hipotensiva/hemorrágica HT_g de *N. s. sacutatus* (Francis, Da Silva Junior *et al.*, 1997). Já, no veneno de *N. kaouthia*, proteínas do veneno com massas moleculares entre 25 e 35 kDa, foram identificadas por sequenciamento *de novo*, embora nenhuma similaridade relativas a essas proteínas tenham sido encontrada em bancos de dados (Kulkeaw, Chaicumpa *et al.*, 2007).

Os sinais e sintomas de envenenamento por *Micrurus* são o resultado de um progressivo bloqueio neuromuscular e, em vários casos, a morte é resultado de parada respiratória. Alguns experimentos mostram que as mudanças neurofisiológicas ocasionadas nos casos clínicos são similares às induzidas por α -neurotoxinas (3FTx) e por PLA₂ (Goularte, Da Cruz-Hofling *et al.*, 1999).

A grande variabilidade de isoformas de proteínas que compõe os venenos foi algo bastante proeminente nos venenos analisados neste trabalho. A variabilidade na composição dos venenos tem sido foco de estudo de vários grupos de pesquisa, apresentando-se como um fenômeno bem documentado, que ocorre, principalmente, entre espécies que apresentam uma grande distribuição geográfica. Essa variabilidade ocorre em vários níveis, incluindo interfamília, intergênero, inter e intraespécie. A composição do veneno pode ser influenciada pela origem geográfica e hábitat da serpente, variação sazonal, dieta, idade e dimorfismo sexual (Chippaux, Williams *et al.*, 1991; Menezes, Furtado *et al.*, 2006).

5.1.3 Identificação das famílias de proteínas nos venenos de *Micrurus*

A determinação das estruturas primárias parciais de proteínas dos venenos de *Micrurus* analisados foi realizada por degradação de Edman de proteínas obtidas na 2D-LC e por sequenciamento por espectrometria de massa (MS/MS) de peptídeos trípticos oriundos do gel-2D.

As proteínas que tiveram sua sequência N-terminal determinada, mostram-se similares à α -neurotoxinas de cadeia longa e curta, *weak* neurotoxina, PLA₂ e β -bungarotoxina de outras *Micrurus* e outras serpentes da família Elapidae. Ainda, através do sequenciamento tríptico proteínas foram identificadas como similares à PLA₂, *venom proteins* E2, Frontoxina III, *weak neurotoxin*, LAO, metaloprotease e proteína tipo

lectina-tipo-C de outros venenos elapídicos e nos venenos de *M. frontalis*, *M. ibiboboca*, *M. lemniscatus* e *M. spixii*.

Famílias de proteínas com sequências correlacionadas às identificadas neste trabalho, também foram identificadas, recentemente, nos venenos de *M. nigrocinctus*, *M. altirostris* e *M. corallinus*. No veneno de *M. nigrocinctus*, através de sequenciamento N-terminal e o sequenciamento por espectrometria de massa, foram identificadas diferentes proteínas similares à PLA₂, 3FTx, LAO, proteína tipo lectina-tipo-C, metaloprotease, serino protease, ohanina e nucleotidase (Fernandez, Alape-Giron *et al.*, 2011). Por meio de análises proteômicas conjugadas com análises transcriptômicas, as análises dos venenos de *M. altirostris* e *M. corallinus* mostraram a ocorrência de várias famílias de toxinas similares às PLA₂, 3FTx, inibidor de protease tipo-kunitz, proteínas tipo lectina tipo-C, peptídeos natriuréticos, metaloprotease, veficolina, lipase ácida liposomal, proteínas tipo Ohanina e tipo-*wasprin* (Corrêa-Netto, Junqueira-De-Azevedo *et al.*, 2011).

No presente estudo, a maioria das proteínas foi identificada como similares à PLA₂. A identificação das proteínas sustentam os dados de 2D-LC e do gel-2D, indicando a presença de PLA₂ ácidas e básicas nos venenos de *M. frontalis*, *M. ibiboboca*, *M. lemniscatus* e *M. spixii*. Da mesma forma, a presença de PLA₂ ácidas e básicas nos venenos de *M. frontalis*, também, foi relatada anteriormente (Francis, Da Silva Junior *et al.*, 1997). Dados da literatura mostram que, de maneira geral, as PLA₂ básicas com ação enzimática são mais tóxicas e apresentam um potencial farmacológico maior que as formas neutras e ácidas das PLA₂, e evidenciam que os resíduos de aminoácidos básicos estão diretamente ligados à potencia e a letalidades destas proteínas (Kini e Evans, 1987).

Estudos experimentais descritos na literatura mostram várias atividades enzimáticas detectadas nos venenos de *Micrurus*, como atividade fosfolipásica e L-aminoácido oxidase (Tan e Ponnudurai, 1992). Sintomas neurotóxicos e atividades incluindo cardiotoxicidade, hemólise, formação de edema, e miotoxicidade também são observados nos venenos de *Micrurus* (Weis e Mcisaac, 1971; Moussatché e Melendez, 1979; Gutiérrez, Arroyo *et al.*, 1986), o que corrobora com a presença destas enzimas nos venenos estudados.

Neste trabalho mostrou-se a identificação de diferentes isoformas de PLA₂. Na literatura, o que se tem percebido é que os venenos de serpentes podem ser uma rica fonte de multiformas de PLA₂. Tais enzimas tornam-se interessantes, uma vez, que além da sua ação de digerir a presa, elas promovem várias ações patológicas no ato do envenenamento, através da indução de efeitos farmacológicos (Kini e Evans, 1987). Com cerca de 120 resíduos de aminoácidos e 6 ou 7 ligações dissulfetos, as PLA₂ são enzimas compostas por alfa-hélices e folhas-β (Dufton e Hider, 1983). Como já mencionado, algumas possuem ação pré-sináptica (β-neurotoxinas) com alvos específicos na junção neuromuscular, promovendo a inibição da liberação de neurotransmissores. Outras possuem atividades miotóxicas, despolarizando a membrana de células musculares, levando à necrose (Mebs e Ownby, 1990). As PLA₂ podem ainda apresentar atividade neurotóxica através da ligação na membrana de células nervosas, catalizando a hidrólise de fosfolipídeos, com a produção de lisofosfolipídeos e ácidos graxos livres (Rossetto, Morbiato *et al.*, 2006).

Até recentemente, o veneno de *M. corallinus* era o único veneno de *Micrurus* descrito que apresentava neurotoxinas pré e pós-sinápticas (Vital Brazil, 1987). Entretanto, estudos farmacológicos recentes mostram a presença de uma nova PLA₂ pré-sináptica no veneno de *M. dumerilii carinicauda*. A toxina (MiDCA1) apresenta uma massa molecular de 15 kDa e produz bloqueio irreversível na transmissão neuromuscular de mamíferos e aves, sendo esse bloqueio mediado pela ativação de canais de Na⁺ complementado pelo bloqueio de canais de K⁺ (Dal Belo, Toyama *et al.*, 2005).

No presente trabalho, obteve-se uma sequência N-terminal de uma toxina pré-sináptica, isolada do veneno de *M. lemniscatus*, com massa molecular de 22.532,74 Da. Tal proteína mostrou similaridade com o precursor da cadeia B da β-bungarotoxina do veneno de *Bungarus flaviceps flaviceps*. A β-bungarotoxina é uma proteína básica, heterodimérica, com massa molecular de 21,8 kDa, composta por duas subunidades polipeptídicas diferentes e classificada como uma toxina pré-sináptica. A cadeia A possui atividade fosfolipásica e a cadeia B possui estrutura primária similar ao inibidor de tripsina pancreática bovina (Kondo, Toda *et al.*, 1978). Análises da estrutura tridimensional desta proteína, obtida por meio de cristalografia, mostram, entretanto,

que a conformação terciária da cadeia B é muito diferente do que ocorre no inibidor de tripsina pancreático bovino, o que pode explicar a baixa atividade de inibição de proteases pela cadeia B (Sharma, Karthikeyan *et al.*, 1999).

Várias proteínas aqui identificadas nos quatro venenos analisados possuem similaridades significativas com neurotoxinas da família das 3FTx de outros venenos de *Micrurus* e/ou outros serpentes da família Elapidae. Algumas α -neurotoxinas tem sido previamente descritas, sendo agrupadas baseadas na sua estrutura primária, em neurotoxinas de cadeia longa (65-72 resíduos de aminoácidos e 5 ligações dissulfeto) e neurotoxinas de cadeia curta (60-62 resíduos com 4 ligações dissulfeto) (Harvey, 1991). As β -neurotoxinas bloqueiam a transmissão nervosa por se ligarem aos receptores de acetilcolina na membrana pós-sináptica de músculos esqueléticos e neurônios (Tsetlin, 1999).

Poucas neurotoxinas tem sido caracterizadas até o momento. Recentemente, em um novo estudo foram isoladas seis novas α -neurotoxinas (Fontoxina I a VI) do veneno de *M. frontalis*. Essas toxinas produzem bloqueio na junção neuromuscular através da interação com receptores de acetilcolina nicotínicos na junção neuromuscular de sapo (Moreira, Prates *et al.*, 2010). Deve ser ressaltado, que no presente trabalho foi identificado um peptídeo no veneno de *M. ibiboboca* (AL/IDFSPTAHL/IVDDCQR) que mostrou-se similar a uma isoforma da Frontoxina III, previamente descrita (Moreira, Prates *et al.*, 2010).

A primeira e completa sequência de aminoácidos de uma α -neurotoxina do veneno de *Micrurus*, foi descrita à partir do veneno de *M. nigrocinctus nigrocinctus* (Rosso, Vargas-Rosso *et al.*, 1996). A presença deste tipo de proteína, também, foi detectada no veneno de *M. lemniscatus carvalhoi*. Este veneno mostrou alta reatividade cruzada contra anticorpos anti- α -neurotoxina de cadeia curta e anti- α -bungarotoxin (Cecchini, Marcussi *et al.*, 2005). Na literatura tem sido explorado o potencial farmacológico deste tipo de toxina. Um exemplo é a cobrotoxina, uma α -neurotoxina de cadeia curta, isolada do veneno de *Naja atra* que mostrou uma ótima atividade analgésica (Chen, Zhang *et al.*, 2006). Algumas α -neurotoxina de cadeia curta e longa foram identificada no veneno de *M. surinamensis*, através de digestão trípica e

sequenciamento por MS/MS, estas mostraram-se similares à neurotoxinas identificadas no presente estudo.

No presente estudo, uma sequência peptídica, identificada nos venenos de *M. frontalis* e *M. ibiboboca*, mostrou similaridade significativa com *venom protein E2* (Swiss-Prot ID: POCAR7.1) de *M. pyrrhocryptus*. A *venom protein E2* não possui similaridade significativa com nenhuma outra toxina Elapídica e, por essa razão, foi descrita como representante de uma nova família estrutural nos venenos desta família de serpentes (Dokmetjian, Del Canto *et al.*, 2009). A atividade biológica dessa proteína permanece, até o momento, indeterminada.

Nos Géis-2D dos venenos de *M. lemniscatus* e *M. spixii* foi possível identificar peptídeos relativos à proteínas de alta massa molecular ($\approx 55,4$ kDa) similares às LAO. Estas proteínas são flavoenzimas que catalizam a desaminação oxidativa de L-aminoácidos, com subsequente produção de α -ceto ácidos, H_2O_2 e amônia. As LAOs também apresentam diferentes atividades incluindo indução ou inibição de agregação plaquetária (Li, Yu *et al.*, 1994; Sakurai, Shima *et al.*, 2003; Lu, Clemetson *et al.*, 2005), atividade anticoagulante (Sakurai, Shima *et al.*, 2003), estimulação de formação de edema (Stabeli, Marcussi *et al.*, 2004; Izidoro, Ribeiro *et al.*, 2006; Wei, Wei *et al.*, 2007), atividades hemorrágicas (Stabeli, Marcussi *et al.*, 2004), antibacteriana, antiviral e leishmanicida por mecanismos apoptóticos (Lu, Wei *et al.*, 2002; Wei, Wei *et al.*, 2003; Izidoro, Ribeiro *et al.*, 2006; Ciscotto, Machado De Avila *et al.*, 2009). Embora os mecanismos apoptóticos não estejam completamente elucidados, sabe-se que tem o envolvimento da produção de H_2O_2 , o que promove a oxidação de algumas proteínas na membrana plasmática (Suhr e Kim, 1996; Torii, Naito *et al.*, 1997). As LAO são mais bem caracterizadas em serpentes da família Viperidae, embora tenha sido anteriormente identificada no veneno de *Micrurus* (Olamendi-Portugal, Batista *et al.*, 2008; Leao, Ho *et al.*, 2009).

Nos venenos de *M. frontalis*, *M. ibiboboca* e *M. lemniscatus* foram identificados peptídeos trípticos cuja sequência (YEEL/IQL/ITQR) se mostrou similar à metaloproteases. Os *spots* dos quais foram feitas as extrações dos peptídeos mostraram-se com valores baixos de pI, indicando uma característica mais ácida dessas proteínas,

com massas moleculares dem torno de 55 kDa e entre 14,4 e 21,5 kDa, como observado nos géis-2D.

As metaloproteases podem ser classificadas de acordo com a sua massa molecular em: classe I, que apresentam massas moleculares entre 20-30 kDa; classe II, com massas moleculares ente 30-60 kDa e classe III, que são as maiores e mais potentes em relação a atividade hemorrágica, com massas moleculares entre 60-100 kDa (Bjarnason e Fox, 1988). De acordo com essa classificação pode-se inferir que as metaloproteases indentificadas neste trabalho são metaloproteases de classe I e II. Apresentam em geral, três domínios: um domínio proteolítico, com a presença de íons metálicos no sítio catalítico (na maioria das vezes, Zn^{+2}); um domínio desintegrina, responsável pela ligação à integrinas de plaquetas ou células endoteliais; e um domínio rico em cisteínas, cuja função ainda é desconhecida (Bjarnason e Fox, 1994).

A maioria das metaloproteases é caracterizada como hemorrágicas, uma vez que são capazes de produzir hemorragias na pele camundongos e ratos, por meio da alteração da integridade dos capilares. Além desta atividade mostram, também, atividades fibrinogenolítica, fibrinolítica, apoptótica, e ainda promovem a ativação de protrombina e de fator X e inibição de agregação plaquetária (Fox e Serrano, 2005).

A presença de metaloproteases tem sido associada a venenos de outras espécies de *Micrurus* e de outros Elapídeos (Sun e Bao, 2010; Corrêa-Netto, Junqueira-De-Azevedo *et al.*, 2011). Entretanto, pode-se notar que a atividade hemorrágica não é uma característica que possa ser associada a todos estes venenos. O veneno de *M. pyrrhocryptus*, por exemplo, não apresentou nenhuma atividade hemorrágica quando injetado na pele de ratos (Dokmetjian, Del Canto *et al.*, 2009).

5.2 Análises anti-venômicas

Foram realizados, neste trabalho, ensaios de reação cruzada entre diferentes antivenenos (anti-*M. corallinus*, anti-*M. frontalis*, anti-*M. ibiboboca* e anti-Elapídico) contra os venenos de *M. frontalis*, *M. ibiboboca*, *M. lemniscatus* e *M. spixii*. Entre os antivenenos testados, observou-se que o anti-Elapídico foi o que melhor reagiu contra todos os venenos, reconhecendo proteínas nas faixas de massas moleculares entre 6 e 15 kDa, 21,5 e 36,5 kDa e acima de 55 kDa. O veneno de *M. frontalis* foi o que teve o

maior número de proteínas reconhecidas, seguido dos venenos de *M. ibiboboca* e *M. lemniscatus*. Algumas das proteínas reconhecidas por este antiveneno correspondem as 3FTx, PLA₂, LAO e lectina tipo-C.

Mais recentemente, foi demonstrado que o antiveneno anti-Elapídico produzido pelo Instituto Butantan (*M. frontalis* e *M. corallinus* 1:1) foi capaz de reconhecer vários mas não todos os componentes de venenos outras espécies de *Micrurus*. Ainda, análises por 1D-immunoblotting mostraram que o veneno de *M. corallinus* e *M. ibiboboca* tiveram um maior número de componentes reconhecidos entre os venenos testados e que as proteínas com massa molecular acima de 64 kDa não foram reconhecidas. Ainda, ensaios *in vivo* mostraram que os venenos de *M. corallinus*, *M. frontalis*, *M. lemniscatus*, *M. spixii* e *M. altirostris* são extremamente letais, e que ensaios de neutralização com soro anti-Elapídico do Butantan neutralizou efetivamente os venenos de *M. corallinus*, *M. frontalis* e *M. spixii*, embora a neutralização não tinha sido observada nos venenos de *M. altirostris* e *M. lemniscatus* (Tanaka, Maria De Fátima *et al.*, 2010).

Em termos gerais, no presente trabalho, além do anti-Elapídico, os antivenenos monovalentes anti-*M. frontalis* e anti-*M. ibiboboca* mostraram uma boa capacidade de reconhecer todos os venenos. As mesmas famílias de proteínas reconhecidas pelo anti-Elapídico (FUNED) foram reconhecidas por estes antivenenos monovalentes. Em contrapartida, o anti-*M. corallinus* reagiu fracamente com os venenos de *M. frontalis*, *M. lemniscatus*, *M. ibiboboca* e *M. spixii*.

Tal fato demonstra que, dentre as imunoglobulinas presentes no soro anti-Elapídico produzido pela FUNED, aquelas produzidas contra o veneno de *M. frontalis* são as maiores responsáveis pelo reconhecimento das proteínas dos venenos. Como a capacidade de reconhecimento geral do anti-*M. corallinus* é baixa, pode-se dizer que o veneno de *M. corallinus* é pouco imunogênico, sendo efetivamente pouco responsável pelo reconhecimento das proteínas.

Em um trabalho anterior, foi demonstrado a reação cruzada de diferentes antivenenos de *Micrurus* contra diferentes venenos desse gênero, porém por meio de 1D-immunoblotting. Como observado por estes autores, os antivenenos foram capazes

de reconhecer proteínas de venenos diferentes, o que corrobora com os resultados deste trabalho. O anti- *M. corallinus* reagiu com componentes de baixa massa molecular dos venenos de *Micrurus*, e com proteínas que migraram com massa molecular similar a cardiotoxina do veneno de *Naja kauthia*. O anti-*M. frontalis* reagiu melhor com os venenos de *M. lemniscatus* e *M. spixii*, quando comparado com a reação com os venenos de *M. frontalis* e *M. ibiboboca*. O anti-*M. spixii* reagiu fortemente com o veneno de *M. spixii*, seguido de *M. frontalis*. O veneno de *M. lemniscatus* mostrou forte reação contra o anti-Elapidico utilizado (Prieto Da Silva, Yamagushi *et al.*, 2001).

No presente trabalho, em alguns casos, o *immunoblotting* revelou fraco reconhecimento de proteínas com massas moleculares em torno de 6 a 14,4 kDa, identificadas como da família das 3FTx e PLA₂. O fraco reconhecimento de proteínas dessa família estrutural por antivenenos torna-se um fato preocupante, uma vez que essas proteínas representam os componentes mais tóxicos dos venenos de *Micrurus* e outros venenos da família Elapidae. Embora, tenha sido notado que o anti-*M. ibiboboca* apresentou um forte reconhecimento de proteínas de baixa massa molecular, que correspondem as 3FTx.

Estudos anteriores demonstraram também o baixo poder de reconhecimento das 3FTx e das PLA₂ (Corrêa-Netto, Junqueira-De-Azevedo *et al.*, 2011; Fernandez, Alape-Giron *et al.*, 2011). O perfil de imunoreatividade de antivenenos anti-Elapídicos, produzidos pelo instituto Butantan, contra o veneno de *M. altirostris*, mostrou fraco reconhecimento de proteínas de baixa massa molecular (3FTx e PLA₂) comparado com moléculas de alta massa molecular (serino protease, metaloprotease, LAO, proteína tipo lectina) presentes nos venenos (Corrêa-Netto, Junqueira-De-Azevedo *et al.*, 2011). O *immunoblotting* realizado usando o veneno de *M. nigrocinctus* contra o antiveneno monovalente anti-*M. nigrocinctus* revelou um fraco reconhecimento de componentes das 3FTx, um leve reconhecimento de PLA₂ e um reconhecimento superior de proteínas de alta massa molecular (Fernandez, Alape-Giron *et al.*, 2011). Em outro estudo, a reação cruzada dos venenos de *M. frontalis*, *M. corallinus*, *M. ibiboboca*, *M. hemprichii*, *M. spixii*, *M. fulvius*, *M. altirostris*, *M. surinamensis* e *M. lemniscatus* revelaram que antivenenos monovalentes e polivalentes (anti-*M. corallinus*, anti-*M.*

frontalis, anti-*M. spixii* and anti-Elapídico) reconheceram componentes na faixa de massa de 14,8 a 64,2 kDa (Tanaka, Maria De Fátima *et al.*, 2010).

A correlação entre a massa molecular de uma determinada proteína do veneno e sua imunodepleção por imunoglobulinas dos antivenenos é um fato conhecido, uma vez que a área superficial da proteína, que é diretamente proporcional à massa molecular, é muito importante para provocar a resposta imunológica no ato da imunização (Corrêa-Netto, Junqueira-De-Azevedo *et al.*, 2011).

Dos venenos ensaiados, a menor imunogenicidade foi do veneno de *M. spixii*. Nesse veneno, poucas proteínas reagiram com o anti-*M. corallinus*, anti-*M. frontalis*, anti-*M. ibiboboca* e anti-Elapídico. Esse resultado pode ser explicado, uma vez que o veneno de *M. spixii* usado foi de espécimes originários do Peru, enquanto o veneno de *M. frontalis*, *M. ibiboboca* e *M. lemniscatus* foram coletados em serpentes brasileiras. Vários estudos têm demonstrado a grande variação dietética, ontogenética, geográfica e intraespecífica na composição dos venenos de serpentes (Chippaux, Williams *et al.*, 1991; Warrell, 2004; Sanz, Gibbs *et al.*, 2006). A variabilidade na composição de venenos tem sido estudada por eletroforese uni e bidimensional, sistemas de cromatografia e técnicas de espectrometria de massa (Fry, Wüster *et al.*, 2003; Guércio, Shevchenko *et al.*, 2006; Menezes, Furtado *et al.*, 2006; Calvete, Escolano *et al.*, 2007).

Hoje em dia, no Brasil, o antiveneno anti-Elapídico é fabricado pela hiperimunização de cavalos com quantidades iguais de venenos de *M. corallinus* e *M. frontalis* pelo Instituto Butantan, e com proporções diferentes de ambos os venenos pela FUNED (85% *M. frontalis* e 15% de *M. corallinus*). Comparando os resultados anti-venômicos da literatura relação ao soro produzido pelo Instituto Butantan com os resultados obtidos neste presente trabalho, torna-se claro a necessidade imediata de mais estudos que possam promover uma melhoria na produção de soro, uma vez que observa-se que nem todas as espécies de *Micrurus* tem seu veneno imunodepletado pelos antivenenos comerciais. Além disso, não são todas as famílias de proteínas que são reconhecidas pelas imunoglobulinas presentes nos mesmos. Estratégias de imunização, tendo como primeira visão, a escolha efetiva do veneno a ser utilizado no processo de imunização é de extrema importância.

Nossos resultados trazem uma contribuição neste âmbito, uma vez que demonstram que a alteração do veneno de *M. corallinus* para o veneno de *M. ibiboboca* no protocolo de imunização pode constituir uma via alternativa para aumentar a capacidade de reconhecimento do soro polivalente. Tal fato seria alcançado primeiramente, devido à capacidade do anti-*M. ibiboboca* em reconhecer com maior sensibilidade as proteínas da família das 3FTx, quando comparado com o veneno de anti-*M. corallinus*. O anti-*M. corallinus* apresenta uma baixa capacidade de reconhecimento de proteínas com massas moleculares entre 6 e 14,5 kDa, como mostrado neste trabalho e por Tanaka *et al.* (2010), que são as proteínas mais representativas nos venenos e são as responsáveis pelo caráter letal do mesmo. Vale ressaltar, entretanto, que a utilização do veneno de *M. ibiboboca* para a fabricação do soro anti-Elapídico é, realisticamente, uma alternativa inviável, devido à escassez dessa espécie.

No que se refere aos protocolos de imunização para produção de soro antiofídico, pouco esforço tem sido feito para melhoria na produção do mesmo. Na verdade, no último século, poucas mudanças têm sido observadas, principalmente na tentativa de direcionar a resposta imune para proteínas mais tóxicas, uma vez que, nos venenos, há várias proteínas não tóxicas, porém várias tóxicas mas não imunogênicas (Wagstaff, Sanz *et al.*, 2009). Além, da alteração do veneno no protocolo de imunização, outras formas alternativas como protocolos de imunização com toxinas específicas, tornam-se uma alternativa para melhorar a eficiência no reconhecimento das proteínas dos venenos. A utilização de proteínas das famílias das 3FTx e PLA2, mostra-se essencial nesse processo, pelos seguintes fatos: I) são as proteínas mais abundantes nos venenos; II) são as responsáveis pela maior parte dos efeitos biológicos causados pelo envenenamento, principalmente os efeitos neurotóxicos, III) encontram-se nos venenos como várias isoformas proteicas e IV) apresentam menor reconhecimento pelos antivenenos comerciais.

Desta forma, estudos relacionados aos epítomos dessas proteínas, conciliados à abordagens de bioinformática podem prover um conhecimento mais apurado dos motivos protéicos mais imunogênicos, tanto para geração de proteínas recombinantes, quanto para a produção de peptídeos sintéticos que possam ser utilizados nos protocolos

de imunização. Ainda, pesquisas proteômicas conciliadas às pesquisas anti-venômicas, como feitas no presente trabalho, ajudam na elucidação mais apurada da composição do veneno, além de propiciar a identificação de proteínas que estejam diretamente relacionadas à toxicidade e imunogenicidade dos venenos.

5.3 Ensaio de atividade anti-*Leishmania* e citotoxicidade em macrófago

Os dados proteômicos e anti-venômicos deste trabalho, revelaram a importância da família das 3FTx na composição do veneno. Foi visto que os venenos de *Micrurus* apresentam várias isoformas dessas proteínas com similaridades às α -neurotoxinas de cadeia curta e longa e às citotoxinas. Ainda em relação aos resultados proteômicos, a separação destas isoformas foi obtida com certa facilidade para o veneno de *M. lemniscatus*. Com base nessas informações, e com o intuito de realizar ensaios de citotoxicidade com proteínas dessa família, o veneno dessa espécie foi submetido a ciclos de fracionamento visando a purificação de isoformas de toxinas dessa família. Através de três etapas cromatográficas (cromatografia de troca catiônica e duas de fase reversa) duas proteínas da família das 3FTx, denominadas MI6435 e MI6504, com massas moleculares de 6435,4 Da e 6504,6 Da, respectivamente, foram purificadas a partir do veneno de *M. lemniscatus*. Ambas as proteínas apresentaram atividade citotóxica em células de *L. (L.) amazonensis* e em macrófagos de camundongos.

As proteínas MI 6435 e MI6504 mostraram-se similares à α -neurotoxinas de cadeia curta e longa, de outras espécies de *Micrurus* e outros Elapídeos, sendo que a MI 6435 apresentou similaridade, também, com citotoxinas. De acordo com a literatura, as neurotoxinas de cadeia curta e longa e as citotoxinas fazem parte da família de proteínas não enzimáticas, conhecidas como *three-finger toxins*, que possuem de 60 a 74 resíduos de aminoácidos (Endo e Tamiya, 1991). A característica marcante desta família é sua estrutura tridimensional, que formam três *loops* com folhas β , que emergem de um centro hidrofóbico e globular (Tsetlin, 1999).

Além de mostrarem diferenças em relação à estruturação primária, essas proteínas apresentam atividade biológica distintas. As α -neurotoxinas antagonizam receptores nicotínicos de acetilcolina, enquanto as citotoxinas exercem sua atividade por meio da formação de poros nas membranas das células (Bilwes, Rees *et al.*, 1994;

Tsetlin, 1999). Vale ressaltar, que fazem parte das 3FTx outras proteínas como as k-bungarotoxinas, toxinas muscarínicas, fasciculinas, calciceptina, dendroapsinas, sendo que cada uma apresenta um mecanismo de ação distinto (Kini e Doley, 2010).

A sequência N-terminal da proteína Ml6435 apresentou 70% de similaridade com sequência da α -neurotoxina de cadeia curta M11, do veneno de *M. surinamensis* (Olamendi-Portugal, Batista *et al.*, 2008). Por meio de alinhamento das sequências observou-se que os motivos estruturais mais similares entre estas duas sequências são LKCY e TCP+G (onde + corresponde a um resíduo de E na Ml6435 e um resíduo de Q na proteína M11), havendo a troca de um aminoácido carregado positivamente por um aminoácido neutro. Esta proteína mostrou, também, 66% de similaridade com Citotoxina 3 de *Naja haje annulifera* (Joubert e Taljaard, 1980b), dentre outras citotoxinas (Louw, 1974; Joubert e Taljaard, 1980a; Bougis, Tessier *et al.*, 1983; Dubovskii, Lesovoy *et al.*, 2005). Além do motivo estrutural LKCY, a similaridade entre a Ml6435 e a Citotxina 3, também, foi observada para o motivo TCPEG.

A sequência N-terminal da proteína Ml6504 apresentou 69% de similaridade com a sequência da proteína Mn4 ligadora a receptores nicotínicos, de *M. nigrocinctus* (Alape-Girón, Stiles *et al.*, 1996), uma α -neurotoxina de cadeia curta. O alinhamento dos resíduos de aminoácidos entre as duas sequências mostrou três motivos estruturais similares. O primeiro é +KCY, onde na sequência da proteína Ml6504 o + indica uma isoleucina e na proteína Mn4, indica uma leucina, sendo ambos os aminoácidos carregados positivamente. O segundo motivo estrutural similar é o TCP+G, onde o + equivale a um E na primeira proteína e um Q na segunda proteína. O terceiro motivo estrutural comum é o CEKY. A proteína estudada, também, mostrou-se similar a α -neurotoxina de cadeia curta M11, do veneno de *M. surinamensis* (Olamendi-Portugal, Batista *et al.*, 2008). O motivo estrutural +KCY, também mostram-se similar entre as duas sequências, assim como os motivos TCP+G, (+ é um E na primeira sequência e um Q na segunda), e o motivo CEK+ (onde + é um Y na primeira sequência e um F na segunda). Observa-se assim, a troca de aminoácidos positivos, no primeiro motivo, de um aminoácido carregado por um neutro no segundo motivo, e dois aminoácidos hidrofóbicos no terceiro motivo.

Dentro da família das 3FTx, as citotoxinas e as α -neurotoxinas de cadeia curta são duas classes de proteínas diretamente relacionadas. Estruturalmente, ambas as classes de proteínas apresentam de 59 a 62 resíduos de aminoácidos e quatro ligações dissulfetos conservadas (Kini, 2002). Além dos oito resíduos de cisteínas conservados encontrados em uma região central na estrutura tridimensional, a maioria das 3FTx apresentam resíduos aromáticos, também conservados, necessários para o enovelamento da proteína e que ajudam na estruturação das folhas β antiparalelas (Antil, Servent *et al.*, 1999; Torres, Kini *et al.*, 2001). A distribuição de aminoácidos apolares e polares entre estas classes de proteínas são semelhantes (Kumar, Jayaraman *et al.*, 1997).

Através dos alinhamentos das proteínas MI 6435 e MI 6504 notou-se que os resíduos de cisteínas mostraram-se altamente conservados entre estas proteínas e as sequências das similares de proteínas de outras serpentes. Segundo dados da literatura, análises de estrutura primária e de modelagem molecular, demonstram que as 3FTx apresentam oito resíduos de cisteínas conservados que formam quatro ligações dissulfeto. Estas se agrupam formando um núcleo hidrofóbico, de onde emergem três *loops*, dando a estruturação de três dígitos, estes *loops* são chamados de F1, F2 e F3 (Kini e Doley, 2010). Uma quinta ligação dissulfeto pode ser encontrada no F2 das α -neurotoxinas de cadeia longa, ajudando na formação de um pequeno segmento helicoidal (Endo e Tamiya, 1991).

Comparando as sequência N-terminais das proteínas MI 6435 e MI 6504, com os alinhamentos de diferentes 3FTx de diversos organismos, realizadas por (Galat, Gross *et al.*, 2008), pode-se dizer que: 1) as regiões entre C1 e C13 que correspondem ao motivo CYVSFNKEVTC, na MI 6435 e ao motivo CYVLRDKEDTC, na proteína MI 6504 fazem parte da composição da alça F1; 2) os motivos entre a C13 e C20 corresponde a Lk1, que é a região de volta β , que liga a alça F1 ao F2; 3) o motivo que vai de C20 a G30 (CEIDVVPTTHG) na proteína MI 6435 e o motivo que vai de C20 a Q36 (CEKYDVPTATHGNVITVQ), formam a alça F2.

No alinhamento entre os resíduos de aminoácidos das proteínas MI 6435 e MI 6504, com as outras 3FTx, nota-se a similaridade abrangendo regiões apolares com resíduos de lisina (K) presentes. Segundo estudos de estrutura-função, os sítios citolíticos são formados por aminoácidos hidrofóbicos e básicos. Através de

modificações químicas os sítios citolíticos das citotoxinas foram mapeados (Kini, R. e Evans, H. J., 1989). Estes sítios são formados pelos três alças, onde existe uma região significativamente hidrofóbica que estende do meio ao fim de todas as alças, com a presença de resíduos de lisina carregados positivamente. A modificação da carga desses resíduos de lisina, mostrou que a citotoxina nativa e a com modificação positiva apresentaram atividade citolítica, enquanto a atividade mostrou-se ausente nas citotoxinas com resíduos modificados negativamente e sem cargas (Kini, R. M. e Evans, H. J., 1989).

Por meio da pesquisa de similaridade, alinhamento e da determinação das massas moleculares das proteínas MI 6435 e MI 6504, pode-se dizer que ambas são da família das 3FTx, além de inferir que possam se tratar de α -neurotoxinas de cadeia curta ou citotoxinas. A determinação da sequência primária completa das proteínas, além de ensaios de citotoxicidade e neurotoxicidade podem auxiliar na classificação destas proteínas.

Entretando, em ensaios biológicos posteriores, as proteínas MI 6435 e MI 6504 mostraram se tratar de proteínas citotóxicas. Ambas foram tóxicas para formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e para macrófagos isolados de camundongo, o que pode levar a identificação dessas proteínas como citotoxinas.

A capacidade lítica das citotoxinas isoladas de venenos de serpentes já foi ensaiada em eritrócitos, células epiteliais e linhagens de células tumorais (Dufton e Hider, 1988; Kumar, Jayaraman *et al.*, 1997; Feofanov, Sharonov *et al.*, 2004). Análises experimentais, tem demonstrado que a região hidrofóbica, formada pelos *loops* F1 e F3, representam o principal motivo de ligação à membrana das células. Tal ligação acarreta defeitos na bicamada lipídica levando à formação de poros (Chiang, Chien *et al.*, 1996), após a ligação dos sítios farmacológicos das proteínas aos alvos aniônicos na membrana, como por exemplo, fosfatidilserina (Konshina, Boldyrev *et al.*, 2011).

Outros estudos demonstram que algumas citotoxinas são capazes de penetrar nas células e interagir com alvos intracelulares, como mitocôndrias e lisossomos (Feofanov, Sharonov *et al.*, 2005). Ainda, podem afetar a atividade de algumas proteínas de membrana como proteína cinase C, ATPase dependente de Na^+/K^+ e integrinas (Chiou, Raynor *et al.*, 1993; Kumar, Jayaraman *et al.*, 1997).

No presente trabalho, a proteína MI 6435, cuja sequência de aminoácidos mostrou similaridade com várias citotoxinas de serpentes do gênero *Naja*, foi capaz de matar 48% das células de *Leishmania* e 14,7% de macrófagos, na concentração de 50µg/mL. Em outros estudos, a atividade lítica, também, foi observada pela ação da Citotoxina III, isolada do veneno de *Naja naja atra*, em linfócitos T e células cardíacas (Su, Su *et al.*, 2003), sustentando a afirmativa da MI 6435 ser uma citotoxina. A citotoxina III induz apoptose em linfócitos T CD⁸⁺, tendo início através da interação com proteínas na membrana da célula (Su, Su *et al.*, 2003).

Comparando a atividade citotóxica das proteínas MI 6435 e MI 6504, nota-se que a primeira mostra-se mais tóxica para as células de *Leishmania* e macrófagos. E que a célula mais susceptível às proteínas de isoladas de *M. lemniscatus* são as células de *Leishmania*. Da mesma forma, diferenças de citotoxicidade são observadas por outras toxinas da família Elapidae. Feofanov, Sharonov *et al* (2004) mostraram que as Citotoxinas 1 e 2 de *Naja oxiana*, Citotoxina 3 de *Naja kaouthia* e Citotoxina 1 e 2 de *Naja haje* apresentam diferentes níveis de toxicidade em células leucêmicas promieloblásticas de humano (HL 60), células mielomonocíticas de camundongo (WEHI-3) e células eritroleucêmicas de humanos (K562).

A variação na composição dos aminoácidos das citotoxinas influencia diretamente a sua ligação com vesículas lipídicas, sua capacidade de despolarização de miócitos e atividade hemolítica (Dufton e Hider, 1988; Chien, Chiang *et al.*, 1994). Modificações de alguns resíduos de aminoácidos, principalmente de resíduos de lisina (Lis-12), no primeiro *loop* de uma citotoxina de *N. nigricollis* foram capazes de afetar a sua capacidade de lisar células epiteliais, devido à mudança de carga, sem promover alteração estrutural (Menez, Gatineau *et al.*, 1990).

Da mesma forma, a perda de aminoácidos positivos no *loop* II da Citotoxina III de *Naja naja atra* e a ausência de aminoácidos aromáticos no *loop* I alteram a ligação das proteínas à membrana, assim como sua capacidade citolítica (Stevens-Truss e Hinman, 1997). No presente estudo, ambas as proteínas apesar de mostrarem similaridades em termos de basicidade (ambas são eluídas na mesma concentração de NaCl) e de composição primária, apresentam diferenças de citotoxicidades e trocas pontuais de resíduos de aminoácidos, ao menos na porção da sequência primária avaliada.

Assim sendo, pode-se inferir que o potencial citotóxico das proteínas MI 6435 e MI 6504 está correlacionado com as sequências de aminoácidos das mesmas. No motivo que forma a alça 1 da proteína MI 6435, encontra-se um resíduo de lisina (K), cuja carga positiva pode estar diretamente relacionada à interação dessa proteína com a membrana das células. Em contrapartida, apesar de conter dois resíduos de aminoácidos carregados positivamente (R e K), ocorre a presença, também, de três resíduos com cargas negativas (D, E, D). A presença destes aminoácidos carregados negativamente pode diminuir a interação da proteína com os lipídeos de membrana das células, diminuindo assim a sua atividade citotóxica.

Algumas citotoxinas mostram-se tóxicas para cardiomiócitos, induzindo a despolarização destas células através da abertura de canais Ca^{2+} e inibição de canais de K^+ voltagem dependentes, provavelmente pela interação com proteínas de membrana (Feofanov, Sharonov *et al.*, 2004). Sabe-se que os canais de K^+ voltagem dependentes são expressos em grande número na membrana macrófagos, estando associados com migração, proliferação, ativação e produção de citocinas pelos mesmos (Vicente, Escalada *et al.*, 2003). Tal fato pode explicar a susceptibilidade dos macrófagos às proteínas MI 6435 e MI 6504, indicando que existem possíveis alvos proteicos ou lipídicos na membrana dos mesmos.

Para que as proteínas MI 6435 e MI 6504 fossem utilizadas como futuras moléculas medicamentosas, seria desejável que ambas não apresentassem toxicidade em células de mamíferos. Entretanto, tal fato não foi observado. A toxicidade em macrófagos se apresentou menor em relação à toxicidade em *Leishmania*, o que pode ser explicado, provavelmente, devido às composições lipídica e protéica encontradas em ambas as células. Ainda, a porcentagem de morte dos macrófagos foi menor com a utilização da anfotericina B que quando ambas as proteínas foram utilizadas. Estudos de citotoxicidade mais aprofundados deverão ser realizados, no intuito de correlacionar o poder tóxico da anfotericina B com estas proteínas.

Entretanto, à partir da caracterização bioquímica parcial e da caracterização biológica, pode-se isolar duas novas proteínas da família das 3FTx, do veneno de *M. lemniscatus*, que apresentam citotoxicidade em formas amastigotas de *L. (L.)*

amazonensis e macrófagos de mamíferos. Esse estudo revelou resultados pioneiros no estudo do veneno de *Micrurus*.



6. Conclusão

6 Conclusões

Neste trabalho, as análises proteômicas dos venenos de *M. frontalis*, *M. ibiboboca* e *M. lemniscatus*, por meio de técnicas de cromatografia líquida uni e bidimensional e análises por espectrometria de massa revelaram que proteínas com massa entre 6 e 8 kDa e entre 12 e 14 kDa são as mais abundantes nos venenos. Tais massas moleculares correspondem, principalmente, às proteínas das famílias das 3FTx e PLA₂, respectivamente.

Além disso, esses venenos são compostos por relativamente poucas famílias estruturais, uma vez que uma baixa diversidade de massas moleculares foi observada, formando três grandes grupos distintos de massas moleculares. Entretanto, cada família estrutural é rica em isoformas proteicas que apresentam caracteres de carga e de hidrofobicidade distintos.

Nos venenos das espécies de *Micrurus* analisados foram identificadas por similaridade de estruturas primárias proteínas como: α -neurotoxinas de cadeia curta e longa, *weak* neurotoxina, PLA₂ e β -bungarotoxina, *venom proteins* E2, Frontoxina III, LAO, metaloprotease e proteína tipo lectina tipo-C.

As análises anti-venômicas demonstraram a reação cruzada entre os antivenenos mono e polivalentes de *Micrurus* e os venenos das espécies *M. frontalis*, *M. ibiboboca*, *M. lemniscatus* e *M. spixii*.

O antiveneno anti-Elapidico polivalente produzido pela FUNED, mostrou maior capacidade de reconhecimento das proteínas dos venenos analisados, quando comparado aos antivenenos monovalentes (anti-*M. frontalis*, anti-*M. corallinus* e anti-*M. ibiboboca*). Proteínas das famílias das 3FTx, PLA₂, LAO e lectina tipo-C foram reconhecidas por este antiveneno.

Os antivenenos monovalentes anti-*M. frontalis* e anti-*M. ibiboboca* mostraram, também, uma boa capacidade de reconhecer proteínas de todos os venenos testados. Proteínas como 3FTx, PLA₂, LAO e lectina tipo-C, também foram reconhecidas nestes venenos. Entretanto, o anti-*M. corallinus* reagiu fracamente com os venenos de *M. frontalis*, *M. lemniscatus*, *M. ibiboboca* e *M. spixii*.

A alteração do veneno de *M. corallinus* para o veneno de *M. ibiboboca* no protocolo de imunização pode constituir uma via alternativa para aumentar a capacidade de reconhecimento do soro polivalente, embora esta sugestão seja inviabilizada pela baixíssima disponibilidade de espécimes e, conseqüentemente, do veneno de *M. ibiboboca*.

Análises pioneiras foram realizadas com veneno de *M. lemniscatus*. Duas novas proteínas da família das 3FTx foram purificadas à partir deste veneno. As proteínas denominadas, M16435 e M16504, com massas moleculares observadas de 6435,4 Da e 6504,6 Da, foram similares a α -neurotoxinas de cadeia curta e longa e a citotoxinas, sendo classificadas como citotoxinas. Ambas mostraram-se tóxicas para formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e macrófagos de mamíferos.

A composição de aminoácidos das proteínas M16435 e M16504, principalmente em relação à distribuição de cargas, pode estar diretamente relacionada ao seu poder citotóxico, o que leva a proteína M16435 mostrar maior percentual de morte de células de *Leishmania* e de macrófagos quando comparada à proteína M16504.

De forma geral, o presente trabalho contribui para o conhecimento dos venenos de *Micrurus* abrindo novas perspectivas, não apenas na identificação de novas proteínas e de suas atividades biológicas mas, principalmente, trazem novas visões para melhorias na fabricação de soro antiofídico.



7. Referências Bibliográficas

7 Referências Bibliográficas

AIRD, S. D.; DA SILVA, N. J., JR. Comparative enzymatic composition of Brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms. **Comp Biochem Physiol B**, v. 99, n. 2, p. 287-94, 1991.

AIRD, S. D. et al. Primary structure of γ -bungarotoxin, a new postsynaptic neurotoxin from venom of *Bungarus multicinctus*. **Toxicon**, v. 37, n. 4, p. 609-625, 1999.

ALAPE-GIRON, A. et al. Electrophoretic and immunochemical studies of *Micrurus* snake venoms. **Toxicon**, v. 32, n. 6, p. 713-23, 1994.

ALAPE-GIRÓN, A. et al. Characterization of multiple nicotinic acetylcholine receptor-binding proteins and phospholipases A2 from the venom of the coral snake *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus*. **FEBS letters**, v. 380, n. 1-2, p. 29-32, 1996.

ALAPE-GIRON, A.; STILES, B. G.; GUTIERREZ, J. M. Antibody-mediated neutralization and binding-reversal studies on alpha-neurotoxins from *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus* (coral snake) venom. **Toxicon**, v. 34, n. 3, p. 369-80, 1996.

ALAPE GIRÓN, A. et al. Elapid venom toxins: multiple recruitments of ancient scaffolds. **European Journal of Biochemistry**, v. 259, n. 1 2, p. 225-234, 1999.

ANDRADE, D. V.; ABE, A. S. Relationship of venom ontogeny and diet in *Bothrops*. **Herpetologica**, v. 55, n. 2, p. 200-204, 1999.

ANDRIÃO-ESCARSO, S. H. et al. Myotoxic phospholipases A2 in *Bothrops* snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie**, v. 82, n. 8, p. 755-763, 2000.

ANTIL, S.; SERVENT, D.; MÉNEZ, A. Variability among the sites by which curaremimetic toxins bind to Torpedo acetylcholine receptor, as revealed by identification of the functional residues of α -cobratoxin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 49, p. 34851, 1999.

ARAÚJO, F. et al. Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. **Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, p. 6-12, 2003.

ARROYO, O. et al. Skeletal muscle necrosis induced by a phospholipase A2 isolated from the venom of the coral snake *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus*. **Comp Biochem Physiol B**, v. 87, n. 4, p. 949-52, 1987.

BARROS, A. C. et al. Local effects induced by venoms from five species of genus *Micrurus* sp. (coral snakes). **Toxicon**, v. 32, n. 4, p. 445-52, 1994.

- BEGHINI, D. G. et al. Cross-neutralization of the neurotoxicity of *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops jararacussu* venoms by antisera against crotoxin and phospholipase A2 from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicon**, v. 46, n. 6, p. 604-611, 2005.
- BILWES, A. et al. X-ray Structure at 1.55 Å of Toxin γ , a Cardiotoxin from *Naja nigricollis* Venom: Crystal Packing Reveals a Model for Insertion into Membranes. **Journal of molecular biology**, v. 239, n. 1, p. 122-136, 1994.
- BIRRELL, G. W. et al. Molecular diversity in venom from the Australian Brown Snake, *Pseudonaja textilis*. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 5, n. 2, p. 379, 2006.
- BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic toxins from snake venoms. **Toxin Reviews**, v. 7, n. 2, p. 121-209, 1988. ISSN 1556-9543.
- BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacology & therapeutics**, v. 62, n. 3, p. 325-372, 1994. ISSN 0163-7258.
- BOLANOS, R.; CERDAS, L.; ABALOS, J. W. Venoms of coral snakes (*Micrurus* spp.): report on a multivalent antivenin for the Americas. **Bull Pan Am Health Organ**, v. 12, n. 1, p. 23-7, 1978.
- BON, C. The serum-therapie was discovered 100 years ago. **Toxicon**, v. 34, n. 2, p. 142-143, 1996. ISSN 0041-0101.
- BOUGIS, P. et al. Are interactions with phospholipids responsible for pharmacological activities of cardiotoxins? **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 55, n. 1, p. 49-64, 1983.
- BRADLEY, K. N. Muscarinic toxins from the green mamba. **Pharmacology & therapeutics**, v. 85, n. 2, p. 87-109, 2000.
- BRASIL; SAÚDE, D. D. **Guia de vigilância epidemiológica**: Ministério da Saúde 2005.
- BROWN, R. L. et al. Pseudechetoxin: a peptide blocker of cyclic nucleotide-gated ion channels. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 2, p. 754, 1999.
- BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase A 2 biochemistry. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 23, n. 1, p. 49-59, 2009.
- CADLE, J. Geographic distribution: problems in phylogeny and zoogeography. **Snakes: ecology and evolutionary biology**, p. 77-105, 1987.
- CALVETE, J. J.; ESCOLANO, J.; SANZ, L. Snake venomomics of Bitis species reveals large intragenus venom toxin composition variation: application to taxonomy of

congeneric taxa. **Journal of Proteome Research**, v. 6, n. 7, p. 2732-2745, 2007. ISSN 1535-3893.

CALVETE, J. J. et al. Exploring the venom proteome of the western diamondback rattlesnake, *Crotalus atrox*, via snake venomics and combinatorial peptide ligand library approaches. **J Proteome Res**, v. 8, n. 6, p. 3055-67, 2009.

CALVETE, J. J. et al. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1063-1074, 2005.

CALVETE, J. J. et al. Snake population venomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: Paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. **Journal of Proteomics**, 2011.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The venomous reptiles of Latin America**. Comstock Pub. Associates, 1989.

CAMPBELL, K. R.; CAMPBELL, T. S. The accumulation and effects of environmental contaminants on snakes: a review. **Environmental monitoring and assessment**, v. 70, n. 3, p. 253-301, 2001.

CARDOSO, J. L. C.; WEN, F. H. Introdução ao ofidismo. In: SARVIER (Ed.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. Cardoso, et al. (Orgs.). São Paulo, v.4, 2003. p.3-5.

CASAI-SILVA, L.; FURTADO, M. Biochemical and biological characterization of venoms of *Micrurus* sp. (Serpentes; Elapidae) from the state of Bahia, Brazil. **Toxicon**, v. 34, n. 1, p. 15-16, 1996.

CECCHINI, A. L. et al. Biological and enzymatic activities of *Micrurus* sp. (Coral) snake venoms. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 140, n. 1, p. 125-34, Jan 2005.

CHANG, C.; HONG, S.; SU, M. A study on the membrane depolarization of skeletal muscles caused by a scorpion toxin, sea anemone toxin II and crotonamine and the interaction between toxins. **British journal of pharmacology**, v. 79, n. 3, p. 673, 1983.

CHANG, L. et al. Structure-function studies on Taiwan cobra long neurotoxin homolog. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1480, n. 1-2, p. 293-301, 2000.

CHANG, L.; YANG, C. Role of the N-terminal region of the a chain in bungarotoxin from the venom of *Bungarus multicinctus* (Taiwan-banded krait). **Journal of protein chemistry**, v. 7, n. 6, p. 713-727, 1988.

CHEN, K. C. et al. The mechanism of cytotoxicity by *Naja naja atra* cardiotoxin 3 is physically distant from its membrane-damaging effect. **Toxicon**, v. 50, n. 6, p. 816-824, 2007.

CHEN, Z. et al. A long form neurotoxin from cobra venom produces potent opioid independent analgesia. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 27, n. 4, p. 402-408, 2006.

CHIANG, C. M. et al. Conformational change and inactivation of membrane phospholipid-related activity of cardiotoxin V from Taiwan cobra venom at acidic pH. **Biochemistry**, v. 35, n. 28, p. 9167-9176, 1996.

CHIAPPINELLI, V. Snake venom kappa-neurotoxins distinguish subtypes of neuronal nicotinic receptors. **Gopalkrskankone P and Tan CK eded: Recent advances in toxinology research**, p. 103-20, 1992.

CHIEN, K. Y. et al. Two distinct types of cardiotoxin as revealed by the structure and activity relationship of their interaction with zwitterionic phospholipid dispersions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 20, p. 14473, 1994.

CHIOU, S. H. et al. Cobra venom cardiotoxin (cytotoxin) isoforms and neurotoxin: comparative potency of protein kinase C inhibition and cancer cell cytotoxicity and modes of enzyme inhibition. **Biochemistry**, v. 32, n. 8, p. 2062-2067, 1993.

CHIPPAUX, J. Snake-bites: appraisal of the global situation. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 76, n. 5, p. 515, 1998.

CHIPPAUX, J. P.; GOYFFON, M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. **Toxicon**, v. 36, n. 6, p. 823-846, 1998.

CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, v. 29, n. 11, p. 1279-1303, 1991.

CHU, N. S. Contribution of a Snake Venom Toxin to Myasthenia Gravis: The Discovery of α -bungarotoxin in Taiwan. **Journal of the History of the Neurosciences**, v. 14, n. 2, p. 138-148, 2005.

CISCOTTO, P. et al. Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an l-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, v. 53, n. 3, p. 330-341, 2009.

CLARKE, P. et al. Nicotinic binding in rat brain: autoradiographic comparison of [3H] acetylcholine, [3H] nicotine, and α -bungarotoxin. **The Journal of Neuroscience**, v. 5, n. 5, p. 1307, 1985.

CLISSA, P. B. et al. The effect of jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom, on pro-inflammatory cytokines released by murine peritoneal adherent cells. **Toxicon**, v. 39, n. 10, p. 1567-1573, 2001.

CONDREA, E.; FLETCHER, J. E.; RAPUANO, B. E. Effect of modification of one histidine residue on the enzymatic and pharmacological properties of a toxic phospholipase A2 from *Naja nigricollis* snake venom and less toxic phospholipases A2 from *Hemachatus haemachatus* and *Naja naja atra* snake venoms. **Toxicon**, v. 19, n. 1, p. 61-71, 1981.

CONDREA, E. et al. Ethoxyformylation and guanidination of snake venom phospholipases A2: effects on enzymatic activity, lethality and some pharmacological properties. **Toxicon**, v. 21, n. 2, p. 209-218, 1983.

CORRÊA-NETTO, C. et al. Snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of Brazilian coral snakes, *Micrurus altirostris* and *M. corallinus*. **Journal of Proteomics**, v. In Press, 2011.

CORREA-NETTO, C. et al. Immunome and venomome of *Bothrops jararacussu*: a proteomic approach to study the molecular immunology of snake toxins. **Toxicon**, v. 55, n. 7, p. 1222-1235, 2010.

CORRINGER, P. J.; NOVÈRE, N. L.; CHANGEUX, J. P. Nicotinic receptors at the amino acid level. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 40, n. 1, p. 431-458, 2000.

CREER, S. et al. Genetic and ecological correlates of intraspecific variation in pitviper venom composition detected using matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and isoelectric focusing. **Journal of molecular evolution**, v. 56, n. 3, p. 317-329, 2003.

DA SILVA JÚNIOR, J.; BUCARETCHI, F. **Mecanismo de ação do veneno elapídico e aspectos clínicos dos acidentes**. São Paulo, Brazil: 2003.

DA SILVA JUNIOR, N. J.; GRIFFIN, P. R.; AIRD, S. D. Comparative chromatography of Brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms. **Comp Biochem Physiol B**, v. 100, n. 1, p. 117-26, 1991.

DAL BELO, C. A. et al. Determination of the Amino Acid Sequence of a New Phospholipase A 2 (MIDCA1) Isolated from *Micrurus dumerilii carinicauda* Venom. **The Protein Journal**, v. 24, n. 3, p. 147-153, 2005.

DALTRY, J. C.; WÜSTER, W.; THORPE, R. S. Diet and snake venom evolution. 1996.

DE ABREU, V. A. et al. Neurotoxicity of *Micrurus altirostris* (Uruguayan coral snake) venom and its neutralization by commercial coral snake antivenom and specific antiserum raised in rabbits. **Clinical Toxicology**, v. 46, n. 6, p. 519-527, 2008.

DE ALBUQUERQUE MODESTO, J. C. et al. BE-I-PLA2, a novel acidic phospholipase A2 from *Bothrops erythromelas* venom: isolation, cloning and

characterization as potent anti-platelet and inducer of prostaglandin I₂ release by endothelial cells. **Biochemical pharmacology**, v. 72, n. 3, p. 377-384, 2006.

DE OLIVEIRA, L. et al. Manutenção de serpentes em cativeiro no Instituto Butantan: I–A Longevidade do gênero *Micrurus*. 2005.

DE OLIVEIRA, U. C. et al. Cloning and characterization of a basic phospholipase A₂ homologue from *Micrurus corallinus* (coral snake) venom gland. **Toxicon**, v. 42, n. 3, p. 249-55, 2003.

DEWAN, J. C.; GRANT, G. A.; SACCHETTINI, J. C. Crystal Structure of kappa-Bungarotoxin at 2.3-Å Resolution. **Biochemistry**, v. 33, n. 44, p. 13147-13154, 1994.

DOKMETJIAN, J. C. et al. Biochemical characterization of the *Micrurus pyrrhocryptus* venom. **Toxicon**, v. 53, n. 3, p. 375-82, Mar 1 2009.

DOLEY, R.; KINI, R. Protein complexes in snake venom. **Cellular and molecular life sciences**, v. 66, n. 17, p. 2851-2871, 2009.

DUBOVSKII, P. V. et al. Interaction of three-finger toxins with phospholipid membranes: comparison of S- and P-type cytotoxins. **Biochemical Journal**, v. 387, n. Pt 3, p. 807, 2005.

DUFTON, M.; HIDER, R. Structure and pharmacology of elapid cytotoxins. **Pharmacology & therapeutics**, v. 36, n. 1, p. 1-40, 1988.

DUFTON, M. J.; HIDER, R. C. Classification of phospholipases A₂ according to sequence. **European Journal of Biochemistry**, v. 137, n. 3, p. 545-551, 1983.

EDMAN, P. Method for determination of the amino acid sequence in peptides. **Acta chem. scand.**, v. 4, p. 283-293, 1950.

EGGERTSEN, G.; LIND, P.; SJOQUIST, J. Molecular characterization of the complement activating protein in the venom of the Indian cobra (*Naja N. siamensis*). **Molecular immunology**, v. 18, n. 2, p. 125-133, 1981.

ENDO, T.; TAMIYA, N. Current view on the structure-function relationship of postsynaptic neurotoxins from snake venoms. **Pharmacology & therapeutics**, v. 34, n. 3, p. 403-451, 1987.

ENDO, T.; TAMIYA, N. Structure-function relationships of postsynaptic neurotoxins from snake venoms. **Snake toxins**, p. 165-222, 1991.

ESPINO-SOLIS, G. et al. Antidotes against venomous animals: State of the art and perspectives. **Journal of Proteomics**, v. 72, n. 2, p. 183-199, 2009.

FEOFANOV, A. et al. Comparative study of structure and activity of cytotoxins from venom of the cobras *Naja oxiana*, *Naja kaouthia*, and *Naja haje*. **Biochemistry (Moscow)**, v. 69, n. 10, p. 1148-1157, 2004.

FEOFANOV, A. V. et al. Cancer cell injury by cytotoxins from cobra venom is mediated through lysosomal damage. **Biochemical Journal**, v. 390, n. Pt 1, p. 11, 2005.

FERNANDEZ-GOMEZ, R. et al. Growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani* infantum by different snake venoms: preliminary identification of proteins from Cerastes cerastes venom which interact with the parasites. **Toxicon**, v. 32, n. 8, p. 875-882, 1994.

FERNANDEZ, J. et al. Venomic and antivenomic analyses of the Central American coral snake, *Micrurus nigrocinctus* (Elapidae). **Journal of Proteome Research**, v. 10, p. 1816–1827, 2011.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 969-985, 2005.

FRANCIS, B. et al. Proteins isolated from the venom of the common tiger snake (*Notechis scutatus scutatus*) promote hypotension and hemorrhage. **Toxicon**, v. 31, n. 4, p. 447-458, 1993.

FRANCIS, B. R. et al. Toxins isolated from the venom of the Brazilian coral snake (*Micrurus frontalis frontalis*) include hemorrhagic type phospholipases A2 and postsynaptic neurotoxins. **Toxicon**, v. 35, n. 8, p. 1193-203, Aug 1997.

FRANCO, L. F. Origem e diversidade das serpentes. In: SARVIER (Ed.). **Animais peçonhentos do Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo, 2003. p.13-32.

FRY, B. G. et al. Novel natriuretic peptides from the venom of the inland taipan (*Oxyuranus microlepidotus*): isolation, chemical and biological characterisation. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 327, n. 4, p. 1011-1015, 2005.

FRY, B. G. et al. Electrospray liquid chromatography/mass spectrometry fingerprinting of *Acanthophis* (death adder) venoms: taxonomic and toxinological implications. **Rapid communications in mass spectrometry**, v. 16, n. 6, p. 600-608, 2002.

FRY, B. G.; WÜSTER, W. Assembling an arsenal: origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences. **Molecular biology and evolution**, v. 21, n. 5, p. 870, 2004.

FRY, B. G. et al. Molecular evolution and phylogeny of elapid snake venom three-finger toxins. **Journal of molecular evolution**, v. 57, n. 1, p. 110-129, 2003.

GALAT, A. et al. Conserved structural determinants in three fingered protein domains. **FEBS Journal**, v. 275, n. 12, p. 3207-3225, 2008.

GEORGIEVA, D. et al. Snake Venomic of *Crotalus durissus terrificus* Correlation with Pharmacological Activities. **Journal of Proteome Research**, v. 9, n. 5, p. 2302-2316, 2010.

GERMAN, B. T. et al. Pressure-immobilization bandages delay toxicity in a porcine model of eastern coral snake (*Micrurus fulvius fulvius*) envenomation. **Ann Emerg Med**, v. 45, n. 6, p. 603-8, 2005.

GONCALVES, A. R. et al. Ultrastructural alterations and growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major* induced by *Bothrops jararaca* venom. **Parasitology research**, v. 88, n. 7, p. 598-602, 2002.

GOULARTE, F. C. et al. Electrophysiological and ultrastructural analysis of the neuromuscular blockade and miotoxicity induced by the *Micrurus nigrocinctus* snake venom. **Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam**, v. 49, n. 4, p. 290-6, 1999.

GRIMALDI JR, G.; MCMAHON-PRATT, D.; SUN, T. Leishmaniasis and its etiologic agents in the New World: an overview. **Progress in clinical parasitology; volume 2.**, p. 73-118, 1991.

GUÉRCIO, R. A. P. et al. Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. **Proteome science**, v. 4, n. 1, p. 11, 2006. ISSN 1477-5956.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Pathogenesis of myonecrosis induced by coral snake (*Micrurus nigrocinctus*) venom in mice. **British journal of experimental pathology**, v. 67, n. 1, p. 1-12, 1986. ISSN 0007-1021.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Ontogenetic changes in the venom of the snake *Lachesis muta stenophrys* (bushmaster) from Costa Rica. **Toxicon**, v. 28, n. 4, p. 419-426, 1990.

GUTIÉRREZ, J. M.; LE N, G.; BURNOUF, T. Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: The road ahead. **Biologicals**, 2011.

GUTIÉRREZ, J. M.; LEÓN, G.; LOMONTE, B. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of immunoglobulin therapy for envenomation. **Clinical pharmacokinetics**, v. 42, n. 8, p. 721-741, 2003.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Snake venomomics and antivenomics: proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. **Journal of Proteomics**, v. 72, n. 2, p. 165-182, 2009.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Local effects induced by coral snake venoms: evidence of myonecrosis after experimental inoculations of venoms from five species. **Toxicon**, v. 21, n. 6, p. 777-783, 1983.

GUTIÉRREZ, J. M.; ROJAS, G.; JORGE DA SILVA JR, N. Experimental myonecrosis induced by the venoms of South American *Micrurus* (coral snakes). **Toxicon**, v. 30, n. 10, p. 1299-1302, 1992.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 997-1011, 2005.

GUTIERREZ, J. M. et al. Snake Venomics of the Lesser Antillean Pit Vipers *Bothrops caribbaeus* and *Bothrops lanceolatus*: Correlation with Toxicological Activities and Immunoreactivity of a Heterologous Antivenom†. **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 10, p. 4396-4408, 2008.

HABERMANN, E.; BREITHAUP, H. Mini-review. The crotoxin complex--an example of biochemical and pharmacological protein complementation. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 16, n. 1, p. 19, 1978.

HARRIS, J. et al. The neurotoxicity of the venom phospholipases A2, notexin and taipoxin. **Experimental Neurology**, v. 161, n. 2, p. 517-526, 2000.

HARVEY, A. Structure-function relationships of postsynaptic neurotoxins from snake venoms. **Snake toxins**, p. 165, 1991.

HARVEY, A. et al. Screening of snake venoms for neurotoxic and myotoxic effects using simple in vitro preparations from rodents and chicks. **Toxicon**, v. 32, n. 3, p. 257-265, 1994.

HARVEY, A.; MARSHALL, D.; POSSANI, L. Dendrotoxin-like effects of noxiustoxin. **Toxicon**, v. 30, n. 11, p. 1497-1500, 1992.

HARVEY, A. L. Twenty years of dendrotoxins. **Toxicon**, v. 39, n. 1, p. 15-26, 2001.

HARVEY, A. L. et al. Effects of muscarinic toxins MT1 and MT2 from green mamba on different muscarinic cholinceptors. **Neurochemical research**, v. 27, n. 11, p. 1543-1554, 2002.

HARVEY, M.; APARICIO, E.; A, G. Revision of the venomous snakes of Bolivia: Part I. The coralsnakes (Elapidae: *Micrurus*). **Annals of Carnegie Museum**, v. 72, p. 1-52, 2003.

HENEINE, L.; CATTY, D. Species-specific detection of venom antigens from snakes of the *Bothrops* and *Lachesis* genera. **Toxicon**, v. 31, n. 5, p. 591-603, 1993.

- HERKERT, M. et al. Bungarotoxin is a potent inducer of apoptosis in cultured rat neurons by receptor mediated internalization. **European Journal of Neuroscience**, v. 14, n. 5, p. 821-828, 2001.
- HIGASHI, H. G. et al. Antigenic cross-reactivity among components of Brazilian Elapidae snake venoms. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 28, p. 767-771, 1995.
- HO, P. L. et al. Cloning of an unusual natriuretic peptide from the South American coral snake *Micrurus corallinus*. **Eur J Biochem**, v. 250, n. 1, p. 144-9, 1997.
- IZIDORO, L. F. M. et al. Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from Bothrops pirajai snake venom. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 14, n. 20, p. 7034-7043, 2006.
- JERUSALINSKY, D.; HARVEY, A. L. Toxins from mamba venoms: small proteins with selectivities for different subtypes of muscarinic acetylcholine receptors. **Trends in pharmacological sciences**, v. 15, n. 11, p. 424, 1994.
- JIN, Y. et al. Purification and cloning of cysteine-rich proteins from *Trimeresurus jerdonii* and *Naja atra* venoms. **Toxicon**, v. 42, n. 5, p. 539-547, 2003.
- JORGE DA SILVA, N. Prey specificity, comparative lethality and compositional differences of coral snake venoms. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 128, n. 3, p. 425-456, 2001.
- JORGE JR, S. N.; AIRD, S. Prey specificity, comparative lethality and compositional differences of coral snake venoms. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP**, v. 128, n. 3, p. 425, 2001.
- JOUBERT, F. J.; TALJAARD, N. The complete primary structure of toxin CM-1b from *Hemachatus haemachatus* (Ringhals) snake venom. **Toxicon**, v. 18, n. 2, p. 191-198, 1980a.
- JOUBERT, F. J.; TALJAARD, N.. The complete primary structures of three cytotoxins (CM-6, CM-7 and CM-7A) from *Naja naja kaouthia* (Siamese cobra) snake venom. **Toxicon**, v. 18, n. 4, p. 455-467, 1980b. ISSN 0041-0101.
- KAMIGUTI, A. S.; HAY, C.; ZUZEL, M. Inhibition of collagen-induced platelet aggregation as the result of cleavage of alpha 2 beta 1-integrin by the snake venom metalloproteinase jararhagin. **Biochemical Journal**, v. 320, n. Pt 2, p. 635, 1996.
- KARALLIEDDE, L. Animal toxins. **British Journal of Anaesthesia**, v. 74, n. 3, p. 319-327, 1995. ISSN 0007-0912.
- KARDONG, K. V. The evolution of the venom apparatus in snakes from colubrids to viperids and elapids. **Mem. Inst. Butantan**, v. 46, p. 105-118, 1982.

KARDONG, K. V.. Colubrid snakes and Duvernoy's "venom" glands. **Toxin Reviews**, v. 21, n. 1-2, p. 1-19, 2002. ISSN 1556-9543.

KARLIN, A. Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3, n. 2, p. 102-114, 2002.

KARLSSON, E. et al. Snake toxins with high selectivity for subtypes of muscarinic acetylcholine receptors. **Biochimie**, v. 82, n. 9-10, p. 793-806, 2000.

KARLSSON, E.; MBUGUA, P.; RODRIGUEZ-ITHURRALDE, D. Fasciculins, anticholinesterase toxins from the venom of the green mamba *Dendroaspis angusticeps*. **Journal de physiologie**, v. 79, n. 4, p. 232, 1984.

KASTURIRATNE, A. et al. The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. **PLoS Medicine**, v. 5, n. 11, p. e218, 2008.

KIHARA, H. et al. Myotoxicity and physiological effects of three *Trimeresurus flavoviridis* phospholipases A₂. **IUBMB Life**, v. 28, n. 5, p. 895-903, 1992.

KIM, H. S.; TAMIYA, N. Amino acid sequences of two novel long-chain neurotoxins from the venom of the sea snake *Laticauda colubrina*. **Biochemical Journal**, v. 207, n. 2, p. 215, 1982.

KINI, M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 827-840, 2003.

KINI, R.; EVANS, H. Correlation between the enzymatic activity, anticoagulant and antiplatelet effects of phospholipase A₂ isoenzymes from *Naja nigricollis* venom. **Thrombosis and haemostasis**, v. 60, n. 2, p. 170, 1988.

KINI, R.; EVANS, H. J. A common cytolytic region in myotoxins, hemolysins, cardiotoxins and antibacterial peptides*. **International Journal of Peptide and Protein Research**, v. 34, n. 4, p. 277-286, 1989.

KINI, R. M. **Venom phospholipase A₂ enzymes: structure, function, and mechanism**. John Wiley & Son Ltd, 1997.

KINI, R.. Molecular moulds with multiple missions: Functional sites in three finger toxins. **Clinical and experimental pharmacology and physiology**, v. 29, n. 9, p. 815-822, 2002.

KINI, R. M.; DOLEY, R. Structure, Function and Evolution of Three-Finger Toxins-Mini Proteins with Multiple Targets. **Toxicon**, 2010.

KINI, R. M.; EVANS, H. J. Structure-function relationships of phospholipases. The anticoagulant region of phospholipases A₂. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 30, p. 14402, 1987.

KINI, R. M.; EVANS, H. J.. Role of cationic residues in cytolytic activity: modification of lysine residues in the cardiotoxin from *Naja nigricollis* venom and correlation between cytolytic and antiplatelet activity. **Biochemistry**, v. 28, n. 23, p. 9209-9215, 1989.

KOH, D. C. I.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cellular and molecular life sciences**, v. 63, n. 24, p. 3030-3041, 2006.

KONDO, K.; TODA, H.; NARITA, K. Characterization of Phospholipase A Activity of β -Bungarotoxin from *Bungarus multicinctus* Venom: I. Its Enzymatic Properties and Modification with p-Bromophenacyl Bromide. **Journal of Biochemistry**, v. 84, n. 5, p. 1291, 1978.

KONSHINA, A. G. et al. Snake Cytotoxins Bind to Membranes via Interactions with Phosphatidylserine Head Groups of Lipids. **PloS one**, v. 6, n. 4, p. e19064, 2011. ISSN 1932-6203.

KREIENKAMP, H. J. et al. Investigation of ligand binding sites of the acetylcholine receptor using photoactivatable derivatives of neurotoxin II from *Naja naja oxiana*. **Biochemistry**, v. 31, n. 35, p. 8239-8244, 1992.

KULKEAW, K. et al. Proteome and immunome of the venom of the Thai cobra, *Naja kaouthia*. **Toxicon**, v. 49, n. 7, p. 1026-41, 2007.

KUMAR, T. et al. Snake venom cardiotoxins-structure, dynamics, function and folding. **Journal of biomolecular structure & dynamics**, v. 15, n. 3, p. 431, 1997.

KUMAR, T. K. S. et al. Understanding the structure, function and folding of cobra toxins. **Proc Natl Sci Counc ROC (A)**, v. 23, n. 1, p. 1-19, 1999.

LEAO, L. I.; HO, P. L.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO IDE, L. Transcriptomic basis for an antiserum against *Micrurus corallinus* (coral snake) venom. **BMC Genomics**, v. 10, p. 112, 2009.

LI, S. et al. Proteomic characterization of two snake venoms: *Naja naja atra* and *Agkistrodon halys*. **Biochemical Journal**, v. 384, n. Pt 1, p. 119, 2004.

LI, Z. Y.; YU, T. F.; LIAN, E. C. Y. Purification and characterization of L-amino acid oxidase from king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom and its effects on human platelet aggregation. **Toxicon**, v. 32, n. 11, p. 1349-1358, 1994.

LIRA-DA-SILVA, R. M.; MISE, Y. F.; BRAZIL, T. K. Morbimortalidade por Ofidismo no Nordeste do Brasil (1999-2003). **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79, n. 1, 2009.

LOMONTE, B. et al. Snake venomomics and antivenomics of the arboreal neotropical pitvipers *Bothriechis lateralis* and *Bothriechis schlegelii*. **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 6, p. 2445-2457, 2008.

LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J. M. A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon**, v. 27, n. 7, p. 725-733, 1989.

LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L. Å. Host response to *Bothrops asper* snake venom. **Inflammation**, v. 17, n. 2, p. 93-105, 1993.

LOUW, A. I. Snake venom toxins the complete amino acid sequence of cytotoxin VII4 from the venom of *Naja mossambica mossambica*. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 58, n. 4, p. 1022-1029, 1974.

LU, Q.; CLEMETSON, J.; CLEMETSON, K. Snake venoms and hemostasis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 3, n. 8, p. 1791-1799, 2005.

LU, Q. et al. L-amino acid oxidase from *Trimeresurus jerdonii* snake venom: purification, characterization, platelet aggregation-inducing and antibacterial effects. **Journal of natural toxins**, v. 11, n. 4, p. 345, 2002.

MANJUNATHA KINI, R. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 827-840, 2003.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, n. 12, p. 1749-1800, 1998.

MARQUES, O. A. V. Natural history of the coral snake *Micrurus decoratus* (Elapidae) from the Atlantic Forest in southeast Brazil, with comments on possible mimicry. **Amphibia-Reptilia**, v. 23, p. 228-232, 2002.

MEBS, D.; OWNBY, C. Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities. **Pharmacology & therapeutics**, v. 48, n. 2, p. 223-236, 1990.

MEIER, J. Individual and age-dependent variations in the venom of the fer-de-lance (*Bothrops atrox*). **Toxicon**, v. 24, n. 1, p. 41-46, 1986.

MELGAREJO, A. R. **Serpentes peçonentas do Brasil**. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. SARVIER. Cardoso, J.L.C. et al., São Paulo: 33-61 p. 2003.

MELO, P. A.; OWNBY, C. L. Ability of wedelolactone, heparin, and para-bromophenacyl bromide to antagonize the myotoxic effects of two crotaline venoms and their PLA₂ myotoxins. **Toxicon**, v. 37, n. 1, p. 199-215, 1999.

MÉNEZ, A. Functional architectures of animal toxins: a clue to drug design? **Toxicon**, v. 36, n. 11, p. 1557-1572, 1998.

MENEZ, A. et al. Do cardiotoxins possess a functional site? Structural and chemical modification studies reveal the functional site of the cardiotoxin from *Naja nigricollis*. **Biochimie**, v. 72, n. 8, p. 575-588, 1990.

MÉNEZ, A.; STÖCKLIN, R.; MEBS, D. Venomics' or: the venomous systems genome project. **Toxicon**, v. 47, n. 3, p. 255-259, 2006.

MENEZES, M. C. et al. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. **Toxicon**, v. 47, n. 3, p. 304-12, Mar 2006.

MISONO, K. S. Natriuretic peptide receptor: structure and signaling. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 230, n. 1, p. 49-60, 2002.

MONTECUCCO, C.; GUTIERREZ, J.; LOMONTE, B. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A 2 myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. **Cellular and molecular life sciences**, v. 65, n. 18, p. 2897-2912, 2008.

MONTEIRO, R. Q. et al. Variability of bothrojaracin isoforms and other venom principles in individual jararaca (*Bothrops jararaca*) snakes maintained under seasonally invariant conditions. **Toxicon**, v. 36, n. 1, p. 153-163, 1998.

MORAES, F. V. et al. Biological and immunochemical characterization of *Micrurus altirostris* venom and serum neutralization of its toxic activities. **Toxicon**, v. 41, n. 1, p. 71-9, Jan 2003.

MORDVINTSEV, D. Y. et al. A model for short α -neurotoxin bound to nicotinic acetylcholine receptor from *Torpedo californica*: Comparison with long-chain α -neurotoxins and α -conotoxins. **Computational biology and chemistry**, v. 29, n. 6, p. 398-411, 2005.

MOREIRA, K. G. et al. Frontoxins, three-finger toxins from *Micrurus frontalis* venom, decrease miniature endplate potential amplitude at frog neuromuscular junction. **Toxicon**, v. 56, n. 1, p. 55-63, 2010.

MOUSSATCHÉ, H.; MELENDEZ, T. Some pharmacological observations with Elapidae and Crotalidae snake venoms in the guinea-pig denervated diaphragm. On the specificity of the cholinergic blockade by their venoms. **Revista brasileira de biologia**, v. 39, n. 3, p. 605, 1979.

NASCIMENTO, D. G. et al. Moving pieces in a taxonomic puzzle: venom 2D-LC/MS and data clustering analyses to infer phylogenetic relationships in some scorpions from the Buthidae family (Scorpiones). **Toxicon**, v. 47, n. 6, p. 628-639, 2006.

NAWARAK, J. et al. Proteomics of snake venoms from Elapidae and Viperidae families by multidimensional chromatographic methods. **Electrophoresis**, v. 24, n. 16, p. 2838-2854, 2003.

- NIRTHANAN, S. et al. Neuromuscular effects of candoxin, a novel toxin from the venom of the Malayan krait (*Bungarus candidus*). **British journal of pharmacology**, v. 139, n. 4, p. 832-844, 2003.
- NIRTHANAN, S.; GWEE, M. C. E. Three-finger -neurotoxins and the nicotinic acetylcholine receptor, forty years on. **Journal of pharmacological sciences**, v. 94, n. 1, p. 1-17, 2004.
- OGAY, A. Y. et al. Weak neurotoxin from *Naja kaouthia* cobra venom affects haemodynamic regulation by acting on acetylcholine receptors. **Toxicon**, v. 45, n. 1, p. 93-99, 2005.
- OLAMENDI-PORTUGAL, T. et al. Proteomic analysis of the venom from the fish eating coral snake *Micrurus surinamensis*: novel toxins, their function and phylogeny. **Proteomics**, v. 8, n. 9, p. 1919-32, 2008.
- OLIVEIRA, D. A. et al. Phospholipases A2 isolated from *Micrurus lemniscatus* coral snake venom: behavioral, electroencephalographic, and neuropathological aspects. **Brain Res Bull**, v. 75, n. 5, p. 629-39, 2008.
- OSIPOV, A. et al. Cobra Venom Contains a Protein of the CRISP Family. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 27, n. 3, p. 198-199, 2001.
- OSIPOV, A. V. et al. The first representative of glycosylated three fingered toxins. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, n. 10, p. 2018-2027, 2004.
- OSIPOV, A. V. et al. Naturally Occurring Disulfide-bound Dimers of Three-fingered Toxins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 21, p. 14571, 2008. ISSN 0021-9258.
- OSIPOV, A. V. et al. Cobra venom contains a pool of cysteine-rich secretory proteins. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 328, n. 1, p. 177-182, 2005.
- PAHARI, S.; MACKESSY, S. P.; KINI, R. M. The venom gland transcriptome of the Desert Massasauga Rattlesnake(*Sistrurus catenatus edwardsii*): towards an understanding of venom composition among advanced snakes(Superfamily Colubroidea). **BMC molecular biology**, v. 8, n. 1, p. 115, 2007.
- PASSERO, L. F. D. et al. The effect of phospholipase A2 from *Crotalus durissus collilineatus* on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. **Parasitology research**, v. 102, n. 5, p. 1025-1033, 2008.
- PASSERO, L. F. D. et al. Comparative studies of the anti-leishmanial activity of three *Crotalus durissus* ssp. venoms. **Parasitology research**, v. 101, n. 5, p. 1365-1371, 2007. ISSN 0932-0113.

PAWLAK, J. et al. Denmotoxin, a three-finger toxin from the colubrid snake *Boiga dendrophila* (mangrove catsnake) with bird-specific activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 39, p. 29030, 2006.

PAWLAK, J. et al. Irditoxin, a novel covalently linked heterodimeric three-finger toxin with high taxon-specific neurotoxicity. **The FASEB Journal**, v. 23, n. 2, p. 534, 2009.

PENG, J.; GYGI, S. P. Proteomics: the move to mixtures. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 36, n. 10, p. 1083-1091, 2001.

PETERSON, M. E. Snake bite: coral snakes. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 21, n. 4, p. 183-186, 2006.

PHUI YEE, J. S. et al. Snake postsynaptic neurotoxins: gene structure, phylogeny and applications in research and therapy. **Biochimie**, v. 86, n. 2, p. 137-149, 2004.

PIMENTA, A.; DE LIMA, M. E. Small peptides, big world: biotechnological potential in neglected bioactive peptides from arthropod venoms. **Journal of Peptide Science**, v. 11, n. 11, p. 670-676, 2005.

PIMENTA, D. C. et al. Mass spectrometric analysis of the individual variability of *Bothrops jararaca* venom peptide fraction. Evidence for sex based variation among the bradykinin potentiating peptides. **Rapid communications in mass spectrometry**, v. 21, n. 6, p. 1034-1042, 2007.

PINHO, F. M. O.; OLIVEIRA, E. S.; FALEIROS, F. Acidente ofídico no estado de Goiás. **Rev Assoc Med Bras**, v. 50, n. 1, p. 93-9, 2004.

POSSANI, L. et al. Purification and characterization of a phospholipase A2 from the venom of the coral snake, *Micrurus fulvius microgalbineus* (Brown and Smith). **Biochemical Journal**, v. 179, n. 3, p. 603, 1979.

POSSANI, L. D. et al. Purification and characterization of a phospholipase A2 from the venom of the coral snake, *Micrurus fulvius microgalbineus* (Brown and Smith). **Biochem J**, v. 179, n. 3, p. 603-6, Jun 1 1979.

POUGH, F. H.; JAMIS, C.; HEISER, J. B. **Avida dos vertebrados**: Atheneu Editora 2003.

PRIETO DA SILVA, A. R. et al. Cross reactivity of different specific *Micrurus* antivenom sera with homologous and heterologous snake venoms. **Toxicon**, v. 39, n. 7, p. 949-53, Jul 2001.

PU, X.; WONG, P.; GOPALAKRISHNAKONE, P. A novel analgesic toxin (hannalgesin) from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*). **Toxicon**, v. 33, n. 11, p. 1425-1431, 1995.

RAJAGOPALAN, N. et al. -Cardiotoxin: a new three-finger toxin from *Ophiophagus hannah* (king cobra) venom with beta-blocker activity. **The FASEB Journal**, 2007.

RAMSEY, H. W. et al. Mechanism of shock produced by an elapid snake (*Micrurus f. fulvius*) venom in dogs. **American Journal of Physiology**, v. 222, n. 3, p. 782, 1972.

RATES, B. et al. Venomic analyses of *Scolopendra viridicornis nigra* and *Scolopendra angulata* (Centipede, Scolopendromorpha): Shedding light on venoms from a neglected group. **Toxicon**, v. 49, n. 6, p. 810-826, 2007.

RAW, I. G., R.; HIGASHI, H. G.; KELEN, E. M. Antivenins in Brazil: preparation. In: AT, T. (Ed.). **Handbook of Natural Toxins. Reptile Venoms and Toxins**. . New York: Marcel Dekker, 1991. p.557-81.

RIGONI, M. et al. Snake phospholipase A2 neurotoxins enter neurons, bind specifically to mitochondria, and open their transition pores. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 49, p. 34013, 2008.

RISCH, M. et al. Snake venomics of the Siamese Russell's viper (*Daboia russelli siamensis*)--Relation to pharmacological activities. **Journal of Proteomics**, v. 72, n. 2, p. 256-269, 2009.

ROJAS, C. A.; ALMEIDA SANTOS, S. M.; GONÇALVES, M. R. Epidemiologia dos acidentes ofídicos na região noroeste do estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 8, n. 3, 2007.

ROSSETTO, O. et al. Presynaptic enzymatic neurotoxins. **Journal of neurochemistry**, v. 97, n. 6, p. 1534-1545, 2006.

ROSSETTO, O.; RIGONI, M.; MONTECUCCO, C. Different mechanism of blockade of neuroexocytosis by presynaptic neurotoxins. **Toxicology letters**, v. 149, n. 1-3, p. 91-101, 2004.

ROSSO, J. P. et al. Characterization of α -neurotoxin and phospholipase A2 activities from *Micrurus* venoms. Determination of the amino acid sequence and receptor-binding ability of the major alpha-neurotoxin from *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus*. **Eur J Biochem**, v. 238, n. 1, p. 231-9, 1996.

ROWAN, E. What does β -bungarotoxin do at the neuromuscular junction? **Toxicon**, v. 39, n. 1, p. 107-118, 2001.

ROZE, J. A. **Coral snakes of the Americas: biology, identification, and venoms**. Krieger Publishing Company, 1996.

SAKURAI, Y. et al. Anticoagulant activity of M-LAO, L-amino acid oxidase purified from *Agkistrodon halys blomhoffii*, through selective inhibition of factor IX. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins & Proteomics**, v. 1649, n. 1, p. 51-57, 2003.

SALAZAR, A. M. et al. Hemostatic and toxinological diversities in venom of *Micrurus tener tener*, *Micrurus fulvius fulvius* and *Micrurus isozonus* coral snakes. **Toxicon**, 2011.

SALDARRIAGA, M. M. et al. Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. **Toxicon**, v. 42, n. 4, p. 405-411, 2003.

SALOMÃO, M. G. Estrutura e secreção das glândulas de Duvernoy de *Sibynomorphus mikani* (Colubridae, Dipsadinae) e *Philodryas olfersii* (Colubridae, Xenodontinae), e das glândulas de veneno de *Bothrops jararaca* (Viperidae, Crotalinae) e *Micrurus frontalis* (Elapidae, Elapinae) e a influência dos estados de alimentação e jejum. 120p Inst. Biocienc. Univ, São Paulo, Brazil. 1991.

SANCHEZ, E. et al. Biological activities of venoms from South American snakes. **Toxicon**, v. 30, n. 1, p. 95-103, 1992.

SÁNCHEZ, E. E. et al. Neutralization of two North American coral snake venoms with United States and Mexican antivenoms. **Toxicon**, v. 51, n. 2, p. 297-303, 2008.

SANZ, L. et al. Venom proteomes of closely related *Sistrurus rattlesnakes* with divergent diets. **Journal of Proteome Research**, v. 5, n. 9, p. 2098-2112, 2006.

SARAVIA, P. et al. Geographic and ontogenic variability in the venom of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus*: pathophysiological and therapeutic implications. **Revista de biología tropical**, v. 50, n. 1, p. 337-346, 2002.

SAÚDE, M. D. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**: Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde 2001.

SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1761, n. 11, p. 1246-1259, 2006.

SCHMIDT, R. R.; BETZ, H. Cross-linking of β -bungarotoxin to chick brain membranes. Identification of subunits of a putative voltage-gated potassium channel. **Biochemistry**, v. 28, n. 21, p. 8346-8350, 1989.

SCHWEITZ, H. et al. A new member of the natriuretic peptide family is present in the venom of the green mamba (*Dendroaspis angusticeps*). **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 20, p. 13928, 1992.

SCOTT, D. Phospholipase A2: structure and catalytic properties. **Venom phospholipase A**, v. 2, p. 97-128, 1997.

SERRANO, S. M. T. et al. A multifaceted analysis of viperid snake venoms by two dimensional gel electrophoresis: An approach to understanding venom proteomics. **Proteomics**, v. 5, n. 2, p. 501-510, 2005.

SERVENT, D.; MENEZ, A. Snake neurotoxins that interact with nicotinic acetylcholine receptors. **Handbook of neurotoxicology**, v. 1, p. 385-425, 2001.

SERVENT, D. et al. Only snake curaremimetic toxins with a fifth disulfide bond have high affinity for the neuronal $\alpha 7$ nicotinic receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 39, p. 24279, 1997.

SHARMA, S. et al. Isolation, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of bungarotoxin from *Bungarus caeruleus* (Indian common krait). **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 55, n. 5, p. 1093-1094, 1999.

SHASHIDHARAMURTHY, R. et al. Variation in biochemical and pharmacological properties of Indian cobra (*Naja naja naja*) venom due to geographical distribution. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 229, n. 1, p. 93-101, 2002.

SILVA JR, N. et al. Mecanismo de ação do veneno elapídico e aspectos clínicos dos acidentes. Cardoso JLC, França FOS, Fan HW, Málaque CMS, Haddad Jr V. Animais peçonhentos no Brasil. Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: **Sarvier**, p. 99-107, 2003.

SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R. Chemical modifications of phospholipases A2 from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 855-868, 2003.

STABELI, R. G. et al. Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 12, n. 11, p. 2881-2886, 2004.

STEVENS-TRUSS, R.; HINMAN, C. L. Activities of cobra venom cytotoxins toward heart and leukemic T-cells depend on localized amino acid differences. **Toxicon**, v. 35, n. 5, p. 659-669, 1997.

STRIZHKOV, B. et al. Both neurotoxin II from venom of *Naja naja oxiana* and its endogenous analogue induce apoptosis in tumor cells. **FEBS letters**, v. 340, n. 1-2, p. 22-24, 1994.

SU, M. et al. The Pre-Synaptic Blocking Effect and Phospholipase A2 Activity of Textilotoxin, the Most Toxic Neurotoxin Isolated from the Venom of the Australian Brown Snake, *Pseudonaja textilis*. **Toxicon**, v. 21, p. 143-151, 1983.

SU, S. H. et al. Cardiotoxin-III selectively enhances activation-induced apoptosis of human CD8+ T lymphocytes. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 193, n. 1, p. 97-105, 2003.

- SUHR, S. M.; KIM, D. S. Identification of the snake venom substance that induces apoptosis. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 224, n. 1, p. 134-139, 1996.
- SUN, Q. Y.; BAO, J. Purification, cloning and characterization of a metalloproteinase from *Naja atra* venom. **Toxicon**, 2010.
- TAMBOURGI, D. V. et al. Pro-inflammatory activities in elapid snake venoms. **British journal of pharmacology**, v. 112, n. 3, p. 723, 1994.
- TAMIYA, T.; FUJIMI, T. J. Molecular evolution of toxin genes in Elapidae snakes. **Molecular diversity**, v. 10, n. 4, p. 529-543, 2006.
- TAN, N. H.; PONNUDRAI, G. The biological properties of venoms of some American coral snakes (genus *Micrurus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 101, n. 3, p. 471-474, 1992.
- TAN, N. H.; PONNUDURAI, G. A comparative study of the biological properties of some venoms of snakes of the genus *Bothrops* (American lance-headed viper). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 100, n. 2, p. 361-365, 1991.
- TAN, N. H.; PONNUDURAI, G. The biological properties of venoms of some American coral snakes (Genus *micrurus*). **Comp Biochem Physiol B**, v. 101, n. 3, p. 471-4, 1992.
- TANAKA, G. D. et al. Diversity of *Micrurus* Snake Species Related to Their Venom Toxic Effects and the Prospective of Antivenom Neutralization. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 3, p. 1-60, 2010.
- TANASOV, V. S.; SALOMÃO, M. G.; FURTADO, M. F. D. As corais verdadeiras e o Instituto Butantan: uma busca histórica. IV Reunião Científica Anual do Instituto Butantan, 2002. São Paulo. p.174–174.
- TASHIMA, A. K. et al. Snake venomomics of the Brazilian pitvipers *Bothrops cotiara* and *Bothrops fonsecai*. Identification of taxonomy markers. **Journal of Proteomics**, v. 71, n. 4, p. 473-485, 2008.
- TEMPONE, A.; ANDRADE, H. Bothrops moojeni Venom Kills *Leishmania* spp. with Hydrogen Peroxide Generated by Its-Amino Acid Oxidase. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 280, n. 3, p. 620-624, 2001.
- THEAKSTON, R.; WARRELL, D. Crisis in snake antivenom supply for Africa. **Lancet (British edition)**, v. 356, n. 9247, 2000.
- THEAKSTON, R.; WARRELL, D.; GRIFFITHS, E. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. **Toxicon**, v. 41, n. 5, p. 541-557, 2003.

THOMPSON, J. D. et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 24, p. 4876, 1997.

THWIN, M. M. et al. Recombinant antitoxic and antiinflammatory factor from the nonvenomous snake *Python reticulatus*: phospholipase A2 inhibition and venom neutralizing potential. **Biochemistry**, v. 39, n. 31, p. 9604-9611, 2000. ISSN 0006-2960.

TORII, S.; NAITO, M.; TSURUO, T. Apoxin I, a novel apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity purified from Western diamondback rattlesnake venom. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 14, p. 9539, 1997.

TORRES, A. M. et al. NMR structure of bucanidin, a neurotoxin from the venom of the Malayan krait (*Bungarus candidus*). **Biochemical Journal**, v. 360, n. Pt 3, p. 539, 2001.

TOYAMA, M. H. et al. Isolation of a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicon**, v. 47, n. 1, p. 47-57, 2006.

TSETLIN, V. Snake venom neurotoxins and other 'three finger' proteins. **European Journal of Biochemistry**, v. 264, n. 2, p. 281-286, 1999. ISSN 1432-1033.

UTKIN, Y. N. et al. "Weak Toxin" from *Naja kaouthia* Is a Nontoxic Antagonist of 7 and Muscle-type Nicotinic Acetylcholine Receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 19, p. 15810, 2001. ISSN 0021-9258.

VERHEIJ, H. M. et al. Correlation of enzymatic activity and anticoagulant properties of phospholipase A2. **European Journal of Biochemistry**, v. 112, n. 1, p. 25-32, 1980.

VICENTE, R. et al. Differential voltage-dependent K⁺ channel responses during proliferation and activation in macrophages. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 47, p. 46307, 2003.

VITAL-BRAZIL, O. Venenos ofídicos neurotóxicos. **Rev. Assoc. Med. Bras**, v. 26, p. 212-8, 1980.

VITAL BRAZIL, O. Coral snake venoms: mode of action and pathophysiology of experimental envenomation (1). **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 29, n. 3, p. 119-26, 1987.

VITAL BRAZIL, O.; FONTANA, M. Ações pré-juncionais e pós-juncionais da peçonha da cobra coral *Micrurus corallinus* na junção neuromuscular. **Mem Inst Butantan**, v. 4, p. 47-48, 1983.

WAGSTAFF, S. C. et al. Combined snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of the ocellated carpet viper, *Echis ocellatus*. **Journal of Proteomics**, v. 71, n. 6, p. 609-623, 2009.

WANG, C. H. et al. Glycosphingolipid-facilitated membrane insertion and internalization of cobra cardiotoxin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 1, p. 656, 2006.

WARRELL, D. Snakebites in Central and South America: epidemiology, clinical features, and clinical management. **The venomous reptiles of the western hemisphere**, v. 2, p. 709-761, 2004.

WATANABE, L. et al. Amino acid sequence and crystal structure of BaP1, a metalloproteinase from *Bothrops asper* snake venom that exerts multiple tissue damaging activities. **Protein science**, v. 12, n. 10, p. 2273-2281, 2003.

WEI, J. F. et al. Purification, characterization and biological activity of an L-amino acid oxidase from *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. **ACTA BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA SINICA-CHINESE EDITION-**, v. 35, n. 3, p. 219-228, 2003.

WEI, X. L. et al. Purification, characterization and potent lung lesion activity of an L-amino acid oxidase from *Agkistrodon blomhoffii ussurensis* snake venom. **Toxicon**, v. 50, n. 8, p. 1126-1139, 2007.

WEIS, R.; MCISAAC, R. J. Cardiovascular and muscular effects of venom from coral snake, *Micrurus fulvius*. **Toxicon**, v. 9, n. 3, p. 219-228, 1971.

WELDON, C. L.; MACKESSY, S. P. Biological and proteomic analysis of venom from the Puerto Rican Racer (*Alsophis portoricensis*: Dipsadidae). **Toxicon**, v. 55, n. 2-3, p. 558-569, 2010.

WESTERLUND, B. et al. The three-dimensional structure of notexin, a presynaptic neurotoxic phospholipase A2 at 2.0 Å resolution. **FEBS letters**, v. 301, n. 2, p. 159-164, 1992.

WHO. **WHO Guidelines for the Production Control and Regulation of Snake Antivenom Immunoglobulins**. Geneva: World Health Organization Geneva 2010.

WU, P. F.; CHANG, L. S. Genetic organization of A chain and B chain of bungarotoxin from Taiwan banded krait (*Bungarus multicinctus*). **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 15, p. 4668-4675, 2000.

YAMAZAKI, Y. et al. Cloning and characterization of novel snake venom proteins that block smooth muscle contraction. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 11, p. 2708-2715, 2002.

YAMAZAKI, Y.; MORITA, T. Structure and function of snake venom cysteine-rich secretory proteins. **Toxicon**, v. 44, n. 3, p. 227-231, 2004.

YANG, C. Structure-function relationship of phospholipase A2 from snake venoms. **Toxin Reviews**, v. 13, n. 2, p. 125-177, 1994.

ZELANIS, A.; TRAVAGLIA-CARDOSO, S. R.; DE FÁTIMA DOMINGUES FURTADO, M. Ontogenetic changes in the venom of *Bothrops insularis* (Serpentes: Viperidae) and its biological implication. **South American Journal of Herpetology**, v. 3, n. 1, p. 43-50, 2008.

Secretaria da Saúde de Minas Gerais www.saude.mg.gov.br/

Fonte: Instituto Vital Brasil – Fotos de Serpentes Peçonhentas: *Micrurus lemniscatus* (http://www.ivb.rj.gov.br/galeria_micrurus/micrurus_4.html)

Fonte: Instituto Ciência Hoje - Banco de Imagens CH ONLINE (<http://cienciahoje.uol.com.br/images/ch%20on-line/galeria/3334d.jpg>)

2011 - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/>