

SILVIO RINCON FILHO

IDENTIFICAÇÃO DE COMPONENTE CARDIOTÓXICO DO VENENO DA
SERPENTE *Micrurus surinamensis*

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

Março – 2020

SILVIO RINCON FILHO

IDENTIFICAÇÃO DE COMPONENTE CARDIOTÓXICO DO VENENO DA
SERPENTE *Micrurus surinamensis*

Orientador: Dr. Carlos Delfin Chávez Olórtegui

Dissertação submetida ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

Março - 2020

043

Rincon Filho, Silvio.

Identificação de componente cardiotoxico do veneno da serpente *Micrurus surinamensis* [manuscrito] / Silvio Rincon Filho. - 2020.

45 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Carlos Delfin Chávez Olórtegui.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Serpentes. 2. Venenos de Serpentes. 3. Cardiotoxicidade. I. Chávez Olórtegui, Carlos Delfin. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE SILVIO RINCON FILHO.
 Aos quatro dias do mês de agosto de 2020 às 09:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Identificação de componente cardiotoxico do veneno da serpente *Micrurus surinamensis*", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Bioquímica. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Carlos Delfin Chavez Olortegui, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Marília Martins Melo (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Miriam Chaves Schultz (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Carlos Delfin Chavez Olortegui - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado:

APROVADO
 REPROVADO

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 04 de agosto de 2020.

Dr. Marília Martins Melo (UFMG)

Profª Leda Quercia Vieira
 Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
 em Bioquímica e Imunologia

Dr. Miriam Chaves Schultz (UFMG)

Dr. Carlos Delfin Chavez Olortegui - Orientador (UFMG)

Profª Leda Quercia Vieira
 Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
 em Bioquímica e Imunologia

RESUMO

Introdução: O envenenamento pela serpente *Micrurus surinamensis* é bem descrito por sua neurotoxicidade. O quadro neurotóxico evidenciado em indivíduos envenenados se dá pela predominância de toxinas do grupo *three-finger toxins* (3FTx) e fosfolipases do tipo A2 (PLA2). Recentemente, foi observada em estudo com cobaias, a capacidade cardiotoxica deste veneno. **Objetivo:** O foco deste trabalho foi purificar uma toxina com potencial cardiotoxicidade. **Metodologia:** Para isto, foram realizadas três diferentes cromatografias partindo do veneno total, analisando o perfil proteico por SDS-PAGE e identificando as frações cardiotoxicas por ensaio de viabilidade celular em cardiomioblastos (linhagem H9c2) entre cada etapa cromatográfica. A fração mais homogênea que apresentou cardiotoxicidade foi submetida a sequenciamento manual. **Resultados:** Diferentes frações apresentaram atividade, sendo uma destas frações composta por uma lectina do tipo-C de serpente (LTC). Frente à exposição da H9c2 à LTC purificada, a concentração efetiva capaz de levar a redução da viabilidade celular em 50% (EC_{50}) foi de 9.8µg/mL. Além disso, as células incubadas com esta cardiotoxina formam agregados celulares, o que indica que ligações cruzadas estão sendo formadas e, possivelmente, essa LTC se trata de uma lectina do tipo-C que mantém os motivos de ligação à carboidratos. **Conclusão:** Determinou-se que diferentes constituintes presentes no veneno de *Micrurus surinamensis* apresentam potencial cardiotoxico, sendo um destes uma LTC.

Palavras-chave: Cardiotoxicidade, caracterização, lectina-tipo C, veneno.

ABSTRACT

Introduction: Poisoning by *Micrurus surinamensis* snakes leads patients to a well described neurotoxic effect. These clinical effects are caused by three-finger toxins (3FTx) and phospholipase A2 (PLA2), which are the most abundant compounds in this snakes' venom. Nevertheless, a cardiotoxic effect of whole venom was described in guinea pig. **Objective:** This project aimed to purify one protein capable of inducing cardiotoxicity. **Methods:** Starting from whole venom, three chromatography steps were performed, screening for the cardiotoxic fractions by viability assay in cardiomyoblasts (H9c2) and analysing their profile by SDS-PAGE. The most homogeneous cardiotoxic fraction was sequenced by *de novo* sequencing. **Results:** Different fractions showed cardiotoxicity, one of them was constituted by a snake C-type lectin. This purified C-type lectin reduced H9c2 viability by 50% (EC_{50}) in a concentration of 9.8 μ g/mL. Cells exposed to this cardiotoxin formed aggregates, indicating that this C-type lectin maintained its carbohydrate-binding motif. **Conclusion:** Therefore, we demonstrated that different components in *Micrurus surinamensis* venom were cytotoxic to cardiomyoblasts in vitro, identifying one of them as a C-type lectin.

Keywords: Cardiotoxicity, characterization, C-type lectin, venom.

FIGURAS

Figura 1	Crânio de serpentes e presas especializadas das classes solenóglifa e proteróglifas	13
Figura 2	Casos e severidade de envenenamento pelos quatro gêneros de maior importância no Brasil.....	14
Figura 3	Serpente <i>Micrurus surinamensis</i>	15
Figura 4	Distribuição geográfica de serpentes <i>Micrurus surinamensis</i> .	15
Figura 5	Citotoxicidade em H9c2 frente à exposição ao veneno de <i>Micrurus surinamensis</i>	26
Figura 6	Purificação I - S-200 veneno total de <i>Micrurus surinamensis</i> ...	27
Figura 7	Purificação II - Troca aniônica da fração S2 obtida a partir da S-200.....	29
Figura 8	Purificação III - Gel filtração de amostra D4 e a análise de frações obtidas.....	30
Figura 9	Microscopia óptica de linhagem H9c2 após tratamento com fração G7.....	31
Figura 10	Perfil da fração G7 por espectrometria de massa	32

TABELAS

Tabela 1	Composição de veneno de <i>Micrurus surinamensis</i> e atividades dos grupos de proteínas.....	17
-----------------	--	----

ABREVIATURAS E SIGLAS

3FTx - *Three-finger toxins*

BCRJ - Banco de células do Rio de Janeiro

CK-MB - creatina-quinase e sua isoenzima MB

DEAE-sepharose - dietilaminoetil-sepharose

EC₅₀ - Concentração efetiva média

INS - Instituto Nacional de Salud

KDa - Kilodaltons

LMProt - Laboratório Multiusuário de Proteômica

LTC - Lectina do tipo-C

MALDI/TOF - Ionização e dessorção a laser assistida por matriz/tempo de voo

MS/MS - espectrometria em tandem

M. surinamensis - *Micrurus surinamensis*

mg - miligramas

mL - mililitros

mM - milimolar

µg - microgramas

µL - microlitros

nm - nanômetros

NaCl - Cloreto de sódio

OMS - Organização Mundial da Saúde

PBS - Tampão fosfato-salino

pH - potencial hidrogeniônico

PLA2 - Fosfolipase do tipo A2

rpm - Rotações por minuto

SAB - Soro albumina bovina

SFB - Soro fetal bovino

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

SVMP - Metaloproteases

SVSP - Serinoproteases

Tris-HCl - tris(hidroximetil)aminometano - ácido clorídrico

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
Ofidismo	12
Gênero <i>Micrurus</i>	14
Envenenamento e tratamento de indivíduos acidentados por serpentes	
<i>Micrurus</i> sp.	16
Componentes presentes no veneno	16
Cardiotoxicidade e citotoxicidade mediada pelo envenenamento	18
OBJETIVOS	20
Objetivos gerais	20
Objetivos específicos	20
METODOLOGIA	21
Purificação de proteína cardiotóxica	21
SDS-PAGE e coloração pelo método de prata	22
Cultivo de cardiomioblastos linhagem H9c2	22
Ensaio de viabilidade celular	22
Microscopia óptica	24
Digestão trípica de proteína cardiotóxica	24
Sequenciamento <i>de novo</i> de fragmentos da proteína	24
Análises estatísticas	25
RESULTADOS	26
Atividade veneno total de <i>M. surinamensis</i> em linhagem H9c2 e primeira etapa cromatográfica	26
Cromatografia de troca aniônica da fração S2	28
Gel filtração G-75 da fração D4	29
Digestão, sequenciamento manual da proteína de 20 KDa e caracterização bioquímica	31
DISCUSSÃO	35
CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1. INTRODUÇÃO

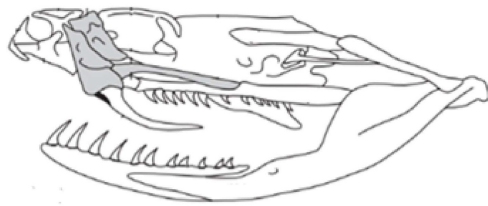
1.1. Ofidismo

Os acidentes relacionados ao envenenamento por serpentes, são também chamados acidentes ofídicos. Estes acidentes foram reincluídos em junho de 2017 pela Organização Mundial da Saúde (OMS) no grupo de doenças tropicais negligenciadas, uma vez que haviam sido removidos em 2013 (CHIPPAUX, 2017). A inclusão dos acidentes ofídicos neste grupo se deve principalmente ao fato de que os mesmos ocorrem em países de clima tropical e em desenvolvimento, afetando principalmente pessoas em zona rural e de baixa renda (RORIZ *et al.*, 2018). Segundo dados publicados pela Wellcome Trust (2019), a cada cinco minutos, 50 pessoas são mordidas por serpentes. Destas cinquenta, vinte e cinco são envenenadas, quatro apresentam sequelas permanentes e uma morre. Anualmente, em torno de 1.8 milhão de pessoas são afetadas, levando de 81 mil a 138 mil mortes (OMS, 2019). No entanto, a notificação de casos é baixa e, portanto, os dados são subestimados (LONGBOTTOM *et al.*, 2018).

O envenenamento destes indivíduos se dá pela injeção de toxinas a partir da mordida de serpentes. As presas destes animais são especializadas, capazes de penetrar na pele do indivíduo (DU PLESSIS; BROECKHOVEN; LE ROUX, 2018), inoculando o veneno a partir de ductos que às conectam à glândula de veneno (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017). Apesar deste sistema, podem ocorrer as chamadas “mordidas secas”, em que não ocorre a inoculação de veneno e, conseqüentemente, não há envenenamento (NAIK, 2017). Quanto às presas especializadas, as serpentes são separadas em quatro classes: solenóglifas, com as presas móveis e na porção anterior do maxilar, no qual estão incluídas as serpentes da família Viperidae; proteróglifas, como serpentes da família Elapidae são classificadas, apresentando presas fixas e também na porção anterior (Figura 1); opistóglifas, com presas especializadas localizadas na região posterior do maxilar e; áglifas, que possuem os dentes com tamanhos aproximados e, ao contrário dos outros grupos, não apresentam sulcos, portanto não sendo consideradas presas especializadas (BERKOVITZ; SHELLIS, 2017). Além do envenenamento pela mordida, algumas

serpentes são também capazes de cuspir veneno que, uma vez em contato com os olhos, leva à oftalmia (TAN, N; WONG, KY; TAN, C, 2017).

Solenóglifa - Viperidae



Proteróglifa - Elapidae

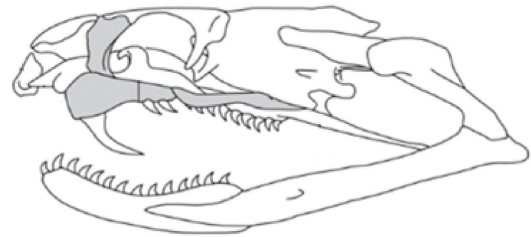


Figura 1: Crânio de serpentes e presas especializadas das classes solenóglifa e proteróglifas. A esquerda, esquema de presa especializada de serpentes da família Viperidae, classificadas como solenóglifas, por apresentarem presas maiores e que são flexíveis. Serpentes da família Elapidae (Imagem à direita) são classificadas como proteróglifas, pela presença de presas menores e imóveis na porção anterior da mandíbula. (Adaptado: DEUFEL, CUNDALL, 2006).

Grande parte das serpentes mais importantes estão compreendidas nas famílias Elapidae e Viperidae (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017). Segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), no Brasil, existem quatro gêneros pertencentes a estas famílias que são de alta relevância clínica com as respectivas porcentagens de casos ocorridos em 2017 (levando em conta somente os quatro gêneros): *Bothrops* (86%); *Crotalus* (11%); *Lachesis* (2%) e; *Micrurus* (1%) (MISE; LIRA-DA-SILVA; CARVALHO, 2018). Apesar da baixa incidência de casos relacionados ao gênero *Micrurus*, 28% dos casos evoluem para classificação final grave. Portanto, é considerado um envenenamento mais grave quando comparado a evolução deste quadro em indivíduos acidentados por outros gêneros, uma vez que representa o dobro do segundo gênero mais grave (*Crotalus* - 14%) (Figura 2) (Ministério da Saúde, SINAN, 2019).

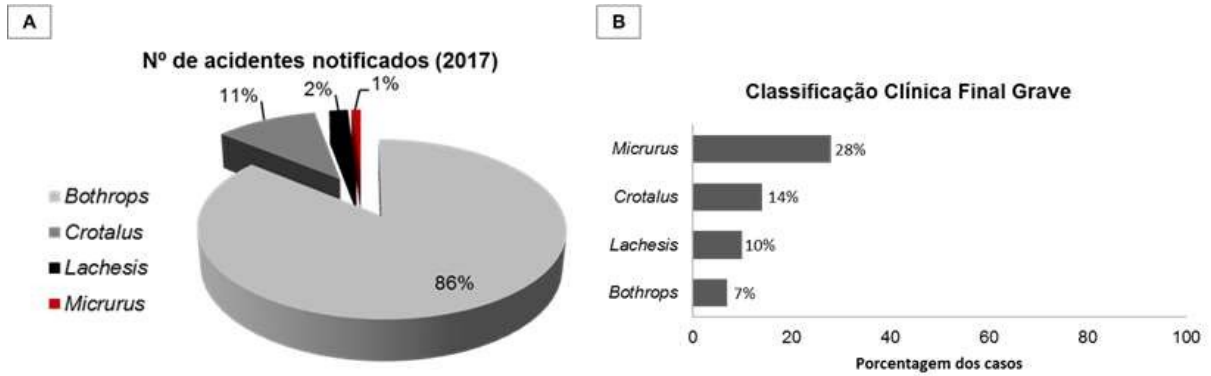


Figura 2: Casos e severidade de envenenamento pelos quatro gêneros de maior importância no Brasil. À esquerda, estão demonstrados os dados publicados pelo SINAN, referentes à porcentagem de acidentes notificados entre os gêneros *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* e *Crotalus*. Na figura B, são apresentadas as porcentagem dos casos que evoluíram para classificação final grave dentro de cada gênero (SINAN, 2017).

1.2. Gênero *Micrurus*

Serpentes do gênero *Micrurus* pertencem à família Elapidae, juntamente com os gêneros *Leptomicrurus* e *Micruroides*. Este gênero é amplamente distribuído nas Américas (LOMONTE *et al.*; 2016). Foram identificadas no Brasil, até o presente trabalho, 34 diferentes espécies do gênero *Micrurus* (THE REPTILE DATABASE, 2019), sendo uma delas a serpente, *Micrurus surinamensis* (CUVIER, 1817). Morfologicamente, essas serpentes apresentam um padrão de anéis em cores vermelho-preto-amarelo característico, com as escamas da cabeça na cor vermelha e bordas pretas (Figura 3). Quanto às suas presas especializadas, estas serpentes são caracterizadas como proteróglifas (OLIVEIRA, NORONHA, LOZANO, 2017).

O nome desta espécie se deu pela descoberta da mesma no Suriname (MORAIS *et al.*, 2011), entretanto, a mesma está distribuída em outros países como Guiana, Guiana Francesa, Venezuela, Colômbia, Equador, Peru, Bolívia e nas regiões norte, nordeste e centro-oeste do Brasil (Figura 4) (OMS, 2008). Nestes territórios, as *M. surinamensis* são encontradas tanto em perímetros urbanos, quanto em proximidade a eles (FERREIRA BISNETO *et al.*, 2019), apresentando habitat aquático - razão pela qual é popularmente conhecida como cobra-coral aquática -, alimentando-se principalmente de peixes (SILVA *et al.*, 2017).



Figura 3: Serpente *Micrurus surinamensis*. Imagem registrando o padrão de cores característico da *M. surinamensis* (Fonte: <https://flickr.com/photos/cowyeow/8438137514/in/photostream/>)

Estas serpentes não apresentam comportamento agressivo, sendo os acidentes relacionados à manipulação ou por pisar nas mesmas (OLIVEIRA; NORONHA; LOZANO, 2017), apresentando os indivíduos acidentados, sintomas característicos do envenenamento elapídico.



Figura 4: Distribuição geográfica de serpentes *Micrurus surinamensis*. Mapa indicando os países e regiões nas quais são consideradas áreas de risco tratando-se da espécie *M. surinamensis*. No Brasil, são demarcados principalmente as regiões norte, nordeste e centro-oeste (Organização Mundial da Saúde, 2008).

1.3. Envenenamento e tratamento de indivíduos acidentados por serpentes *Micrurus* sp.

Devido ao tamanho das presas e à abertura mandibular reduzida das serpentes deste gênero, o envenenamento se torna menos frequente, justificando a baixa incidência em relação aos outros gêneros (GUERRA *et al.*, 2019). Apesar de menos frequente, os casos de envenenamento por estas serpentes são, em sua maioria, severos. Em um relato de caso envolvendo um jovem de 18 anos mordido por uma *M. surinamensis*, foram descritos os seguintes sintomas: os efeitos locais foram a observação da lesão da mordida e parestesia (sensação sem estímulo), com ausência de dor; quanto aos efeitos sistêmicos, o indivíduo apresentava visão comprometida e ptose palpebral (fácies miastênica), dificuldade em falar, andar e respirar (PARDAL *et al.*, 2010). Estes sintomas são bem característicos aos envenenamentos por cobras-corais, sendo que nos casos mais graves e na ausência de tratamento, o indivíduo pode evoluir para uma parada respiratória e morte (SANZ *et al.*, 2019).

O tratamento atualmente utilizado no Brasil é a administração de 10 ampolas do soro antielapídico, sendo este produzido a partir da hiperimunização de cavalos, utilizando um *pool* contendo veneno das serpentes *Micrurus corallinus* e *Micrurus frontalis* (DE CASTRO *et al.*, 2019). Em casos mais severos, podem ser também administrados anticolinesterásicos (PARDAL *et al.*, 2010).

1.4. Componentes presentes no veneno

Venenos são constituídos de toxinas produzidas em glândulas conectadas às presas, pelas quais variedades de toxinas são injetadas. Os constituintes presentes nestes venenos variam entre diferentes espécies e até mesmo dentro de uma mesma espécie, à depender de fatores como clima, dieta, idade e localização (BRAHMA *et al.*, 2015). Serpentes da família Elapidae e Viperidae apresentam diferença marcante nos principais componentes de seu veneno. Enquanto as espécies pertencentes à primeira possuem predominantemente *three-finger toxins* (3FTx) e fosfolipase do tipo A2 (PLA2), o veneno das englobadas na segunda

família é principalmente constituído de metaloproteases (SVMP), serinoproteases (SVSP) e PLA2 (TASOULIS; ISBISTER, 2017).

Estes dois principais grupos de proteínas (3FTx e PLA2) compõe mais de 80% do veneno de *M. surinamensis* e são responsáveis pelo quadro neurotóxico característico, atuando ambos na junção neuromuscular. Enquanto as PLA2 atuam no neurônio, levando a depleção de vesículas contendo neurotransmissores por desestabilizar suas membranas, as 3FTx atuam como antagonistas, competindo com a acetilcolina pelo seu receptor na fibra muscular (TANAKA *et al.*, 2016).

Tabela 1 - Composição de veneno de *Micrurus surinamensis* e atividades dos grupos de proteínas.

Grupo	Porcentagem	Número de Resíduos	Peso Molecular (KDa)	Atividade
Three-finger toxin	63,47	59-65	8	Neurotoxicidade, citotoxicidade necrose (GUTIÉRREZ <i>et al.</i> , 2017)
Fosfolipase A2	19,77	115-120	13-15	Miotoxicidade, neurotoxicidade (GUTIÉRREZ <i>et al.</i> , 2017)
Inibidor de serinoprotease do tipo Kunitz	13,905	59-61	7	Inibidor de serino protease (INAGAKI, 2017)
Lectina Tipo-C	0,99	149-150	17	Anticoagulante, pro-coagulante e trombocitopenia (GUTIÉRREZ <i>et al.</i> , 2017)
Metaloprotease P-III	0,67	614	73	Ativa cascata de coagulação e degrada matrix extracelular (em especial fibrinogênio) (KINI; KOH, 2016)
Aminopectidase N	0,415	958	115	Conversão kalidina em bradicinina (promove hipotensão) (AIRD <i>et al.</i> , 2017)
Hialuronidase	0,245	465	56	Degradação matriz extracelular (GUTIÉRREZ <i>et al.</i> , 2017)
Guanilil Ciclase	0,14	368	44	Torna cíclica proteína com resíduo N-terminal de glutamina (AIRD <i>et al.</i> , 2017)
Fator de crescimento nervoso	0,085	244	29	Contribui para liberação de óxido nítrico e histamina (AIRD <i>et al.</i> , 2017)
Cistatina	0,055	136	16	Inibidor de protease (RICHARDS <i>et al.</i> , 2010)
Fosfolipase B	0,005	547-551	65	Hidrólise de lipídeos de membrana (AIRD <i>et al.</i> , 2017)

Fonte: AIRD *et al.*, 2017

A maioria dos estudos quanto à caracterização bioquímica dos venenos de *Micrurus* sp. estão relacionados com esses dois principais grupos de proteínas, permanecendo os dados relacionados aos outros 20% de constituintes em estudos transcriptômicos e proteômicos. Aird e colaboradores (2017) caracterizaram o proteoma do veneno de diferentes *Micrurus* sp.. Neste trabalho, demonstraram que, além dos dois principais componentes, o veneno de *Micrurus surinamensis* apresentava também outros nove grupos de proteínas (Tabela 1). No mesmo trabalho, foi demonstrada a variedade entre a composição do veneno desta serpente com as demais espécies de *Micrurus* sp.. Esta diferença foi abordada por Tanaka e

colaboradores (2010) que, além disso, demonstraram que a reatividade cruzada do soro comercial antielapídico com o veneno de *Micrurus surinamensis* era baixa.

1.5. Cardiotoxicidade e citotoxicidade mediada pelo envenenamento

Dentre as ações de toxinas presentes no veneno de serpentes, estão presentes proteínas que induzem cardiotoxicidade (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017). Já foram relatados diferentes grupos de proteínas que geram esse efeito. As sarafotoxinas, presentes no veneno de serpentes da subfamília Atractaspidinae (GUTIÉRREZ *et al.*, 2017), assim como proteínas presentes em serpentes da família Elapidae, como as cobra cardiotoxinas de *Naja atra* (WANG *et al.*, 2005) e PLA2 cardiotoxinas (CHINNASAMY *et al.*, 2020), são alguns exemplos destes grupos de proteínas.

Apesar de não tão comum, existem casos em compostos cardiotoxícos, juntamente com proteínas que impactam na hemostase, levam estes indivíduos envenenados à sofrerem infarto do miocárdio. Em um relato de caso publicado em Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco, Brasil, um homem de 53 anos foi mordido por uma coral (gênero *Micrurus*) e, em seu quadro clínico, apresentou infarto do miocárdio, além de outras lesões como falência renal e trombocitopenia (GOMES *et al.*, 2018).

Esta cardiotoxicidade já foi abordada por Cher e colaboradores (2005), demonstrando que, dentre os órgãos afetados pelo envenenamento experimental de camundongos por *Naja sputatrix* (Elapidae) o coração foi o mais afetado. Avaliando níveis de expressão gênica, aproximadamente 50% dos genes que apresentaram alterações ocorreram no coração, em sua maioria *upregulated*. Estes genes estavam relacionados à resposta imune, processos apoptóticos e ao metabolismo celular. Já ao avaliar fisiologicamente, o eletrocardiograma apresentou diversas alterações como bradicardia, arritmia e distúrbios que indicavam isquemia.

Assim como por *Naja sputatrix*, Reis (2017) demonstrou que o veneno de *Micrurus surinamensis*, além de neurotóxico, também apresenta capacidade cardiotoxica. Cobaias submetidas ao envenenamento experimental, apresentaram alterações no eletrocardiograma, elevação dos níveis séricos de creatina-quinase e

sua isoenzima MB (CK-MB), além de serem observadas lesões na musculatura cardíaca por microscopia óptica e eletrônica. No entanto, não foram identificados os componentes responsáveis por esta atividade.

A validação de citotoxicidade de componentes em linhagem celulares tecido-específico já são usualmente aplicados em estudos sobre venenos. Casais-e-Silva e colaboradores (2016) abordaram a capacidade do veneno de *Micrurus lemniscatus* de induzir miotoxicidade. Este grupo buscou então purificar uma PLA2 presente no veneno que seria uma das responsáveis por essa ação. Os autores purificaram uma proteína (lemnitoxina) e avaliaram sua capacidade miotóxica em modelo animal (*Swiss-Webster mice*) e validaram a miotoxicidade em célula muscular (linhagem murina C2C12). Em seus resultados observaram que tanto em animal quanto em cultura de células, esta miotoxicidade foi observada, reforçando a eficiência dos estudos baseados na validação em cultura de células.

Tendo em vista esta baixa reatividade cruzada e a lacuna no conhecimento sobre as atividades bioquímicas dos demais componentes do veneno quanto à suas atividades, fazem-se necessários estudos que caracterização do veneno desta serpente, para otimizar o tratamento de indivíduos acidentados. Uma vez descrita a atividade cardiotóxica do veneno, é importante também isolar e identificar qual ou quais componentes apresentam tal atividade.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Purificar, sequenciar e caracterizar bioquimicamente uma proteína do veneno da serpente *Micrurus surinamensis* com potencial cardiotoxicidade.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar a viabilidade celular de cardiomioblastos linhagem H9c2 frente ao veneno total de *Micrurus surinamensis*;
- Purificar proteína capaz de reduzir a viabilidade de cardiomioblastos;
- Avaliar impacto de proteína purificada na viabilidade celular de cardiomioblastos;
- Sequenciar proteína cardiotoxica;
- Alinhar proteína obtida com proteínas de identidade semelhantes

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Purificação de proteína cardiotoxica

Cinquenta miligramas (mg) do veneno de *Micrurus surinamensis*, cedidos pelo Instituto Nacional de Salud (INS), Lima, Peru, foram solubilizadas em um mililitro (mL) de tampão bicarbonato de amônio 50 milimolar (mM), pH 7.8. Em seguida, o veneno foi centrifugado à 10.000 xg por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi submetido à cromatografia de exclusão molecular (16/60 Sephacryl S-200 HR), e eluído com dois volumes de coluna, em fluxo 0,5ml/min, utilizando o mesmo tampão em que o veneno foi solubilizado. As frações coletadas foram rapidamente congeladas, liofilizadas e ressuspensas em tampão fosfato-salino (PBS) 50mM. Após ressuspensas, as mesmas foram dosadas pelo método de Lowry (LOWRY; *et al.*, 1951).

A fração S2 obtida na gel filtração, foi submetida em cromatografia utilizando uma resina de troca aniônica dietilaminoetil-sepharose (DEAE-sepharose). Quatro miligramas da fração foram diluídas para um volume final de 1mL em tampão Tris-HCl (tris(hidroximetil)aminometano - ácido clorídrico) 20mM (pH=8.0). Previamente, a DEAE-sepharose (4,5 mL) foi equilibrada com dois volumes de coluna no mesmo tampão que a amostra foi ressuspensa. A cromatografia seguiu-se de 3 etapas: aplicação da amostra, lavando com dois volumes de coluna; eluição com cinco volumes de coluna em gradiente de 0% à 100% de tampão tris-HCl 20mM, 500 mM de cloreto de sódio (NaCl) (pH=8.0) e; finalizando com dois volumes de coluna à 100% de tampão de eluição. As frações foram dialisadas contra PBS 5mM e liofilizadas. Para uso, ressuspendeu-se as amostras em PBS 50 mM e dosou-as pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951).

A fração D4 resultante da troca aniônica foi submetida à uma terceira etapa de separação, sendo esta uma gel filtração usando a resina Superdex TM G-75 10/30. Dois miligramas da fração foram diluídos em 1mL de tampão bicarbonato de amônio 50 mM (pH=7.5) e submetidos à cromatografia. A coluna foi previamente equilibrada no mesmo tampão em que a amostra foi ressuspensa. Desta vez as

amostras obtidas no coletor em volumes de 1,5 mL foram previamente dosadas pelo método de Lowry, sendo posteriormente liofilizadas.

Entre cada etapa cromatográficas, as frações foram analisadas em SDS-PAGE como descrito no item 3.2. Além disso, também foi realizado um *screening* das frações obtidas durante os processos cromatográficos para verificar quais apresentavam capacidade de redução da viabilidade celular da linhagem H9c2, descrito no item 3.4.

3.2. SDS-PAGE e coloração pelo método de prata

O perfil de proteínas presentes em cada fração foi analisado por SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970). Foram aplicadas 10 µg de amostras por poço, realizando a separação em gel de concentração de 4% e de separação de 15% de acrilamida. A revelação dos géis foram realizadas pelo método de coloração por prata. Primeiramente, as proteínas foram fixadas ao gel, agitando por uma hora em solução fixadora (metanol 50%, ácido acético 12%, formaldeído 0,04%). Lavou-se o gel 3 vezes, por 7 min cada, com água destilada, seguido por incubação por 1 min em solução de tiosulfato (0,04 g/100mL) e então repetindo a etapa de lavagem. Incubou-se o gel sob agitação por 20 min em solução de prata (0,1 g AgNO₃, 75 µL de formaldeído, 100 mL de água destilada). Lavou-se rapidamente o gel, revelando em seguida com solução de desenvolvimento (3g NaCO₃, 25 µL formaldeído, 1 mL de solução de tiosulfato, 50 mL água destilada), parando com solução 50% metanol, 12% ácido acético e fotodocumentando-os.

3.3. Cultivo de cardiomioblastos linhagem H9c2

Células da linhagem H9c2 derivadas do miocárdio de *Rattus norvegicus* e provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), foram cultivadas a 37°C em estufa umidificada com atmosfera de 5% de CO₂, em meio DMEM (Sigma-Aldrich - D777) suplementado com bicarbonato de sódio (3,7 g/L), 10% de soro fetal bovino SFB (Thermo Scientific - HyClone), 0,2% de antibiótico gentamicina (10 U.I./mL) (Gibco by Life Technologies), 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco -

10.000 unidade/mL) e 1% de glutamina (Gibco - 200 mM). As células foram cultivadas até atingirem 80% de confluência para serem utilizadas nos experimentos.

3.4. Ensaio de viabilidade celular

Os ensaios de viabilidade foram realizados em três etapas: Plaquear as células em placas de cultura de 96 poços; incubar o veneno/frações por 24h com as células e; determinar a viabilidade celular pelo ensaio com alamarBlue™, com leitura de fluorescência em Varioskan™. Este ensaio foi realizado com o veneno total, avaliando se o mesmo era capaz de reduzir a viabilidade celular desta linhagem. A mesma metodologia foi realizada após cada etapa de purificação com todas as frações obtidas, atuando como um *screening* pelas frações cardiotoxícas..

Os frascos de cultivo contendo à H9c2 foram lavadas com PBS 50 mM e tripsinizadas. Para determinar a concentração celular, as células foram contadas em câmara de Neubauer pela seguinte equação:

$$N^{\circ} \text{ de células por mL} = ((\text{Total de células contadas})/4) * \text{fator de diluição} * 10^4$$

As células foram diluídas para concentração de 10^4 células/poço e plaqueadas em placas de 96 poços em duplicata para cada teste, sendo eles: Controle positivo - somente células sem teste; Controle negativo - somente meio suplementado, sem célula e sem teste - e; 7 pontos de diluição do veneno/fração a ser testada, incubando por 24h em estufa de CO₂.

Para a segunda etapa foram preparadas as diluições das frações, partindo da concentração de 40 µg/mL, até 0.625 µg/mL, em diluições seriadas 1:2, com exceção das frações obtidas da troca iônica, que partiram da concentração de 30 µg/mL. As placas foram incubadas por 24h em estufa de CO₂.

Para determinar a viabilidade, removeu-se a solução teste e adicionou-se o reagente alamarBlue™. A placa foi incubada em estufa de CO₂ por 3h, ao abrigo da luz. Após a incubação, a placa foi submetida à leitura no equipamento Varioskan™, utilizando comprimentos de onda de excitação de 540 nm e emissão de 590 nm. Os

testes foram então normalizados a partir dos controles, considerando como viabilidade de 100% o controle positivo.

3.5. Microscopia óptica

Após as 24h de tratamento da linhagem H9c2 com a fração G7, como descrito no tópico 3.4, os poços tratados foram observados em microscopia óptica (EVOS XL Core - Lente de aumento 20x/0.40) e fotografadas.

3.6. Digestão triptica de proteína cardiotoxica

A proteína responsável pelo efeito cardiotoxico foi identificada por sequenciamento manual a partir de fragmentos de tripsinização da proteína.

Como descrito no tópico 3.3, foi preparado um SDS-PAGE, no entanto aplicando 15µg das amostras, fração D4 e controle positivo - soro albumina bovina (SAB). Finalizada a corrida, o gel foi corado por 30min com o corante Coomassie blue R-350 (GE Healthcare PhastGel™ PlusOne™ Coomassie™ Tablets) sob agitação. Em seguida, excisou-se as bandas de 20 kilodaltons (KDa) da fração D4, a banda de SAB como controle positivo e uma região do gel sem amostra como controle negativo. Para sequenciar a amostra, seguiu-se o protocolo descrito por Shevchenko e colaboradores (1996) adaptado para gel corado por Coomassie blue. Inicialmente o gel foi lavado três vezes por 15min com 200 µL de bicarbonato de amônio 25 mM/50% acetonitrila pH=8.0, sendo a última lavagem *overnight*. Em seguida o protocolo foi o mesmo, reduzindo, alquilando e tripsinizando o gel. As amostras foram concentradas à um volume próximo de 5 µL e então mantidas em -80°C.

3.7. Sequenciamento *de novo* de fragmentos da proteína

Para o sequenciamento manual, os peptídeos obtidos foram submetidos à ionização e dessorção a laser assistida por matriz/tempo de vôo (MALDI/TOF).

Foram aplicados em placa *polished steel* 1µL de cada amostra digerida. O mesmo foi feito com um calibrante para peptídeos, a fim de calibrar o equipamento.

Assim que seca, a placa foi inserida no equipamento (AutoFlex, Bruker Co., Germany), situado no Laboratório Multiusuário de Proteômica (LMProt), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A primeira etapa consistiu em calibrar o equipamento, seguindo da identificação do perfil dos peptídeos obtidos, utilizando intensidade do laser à 37%.

Com o perfil dos peptídeos obtido dos controles e da amostra, partiu-se para o método de espectrometria em tandem (MS/MS). Fragmentou-se os peptídeos selecionados pelo método LIFT em gás argônio, sequenciando manualmente pela identificação dos íons y e correlacionando com os íons b, obtendo assim a sequência do peptídeo.

As sequências foram submetidas à um blastp, na página do Centro Nacional de Informações Biotecnológicas (NCBI). Utilizou-se o banco de dados *non-redundant protein sequences*, filtrando por sequências de serpentes.

Proteínas com maiores *scores* de diferentes espécies de serpentes, foram então salvas em arquivo FASTA e submetidas à alinhamento de múltiplas sequências, utilizando o programa Clustal Omega.

3.8. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism 8, utilizando a análise de variância One-way ANOVA. Valores de $p < 0.05$ foram considerados como significativos.

4. RESULTADOS

4.1. Atividade veneno total de *M. surinamensis* em linhagem H9c2 e primeira etapa cromatográfica

Com o ensaio de viabilidade celular realizado com o veneno total de *Micrurus surinamensis* observou-se que o mesmo apresenta capacidade de reduzir a viabilidade celular dos cardiomioblastos e que a redução dessa viabilidade é dose-dependente. A concentração efetiva média do veneno sob a viabilidade celular da linhagem H9c2 foi de 13 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 5).

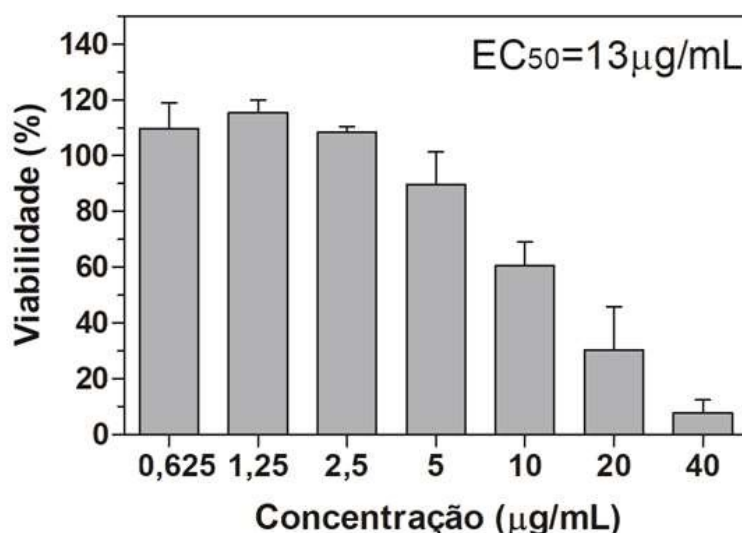


Figura 5: Citotoxicidade em H9c2 frente à exposição ao veneno de *Micrurus surinamensis*. A incubação por 24h da linhagem H9c2 frente à diferentes concentrações do veneno de *M. surinamensis*.

Após submetido a cromatografia de exclusão molecular em coluna S-200, o veneno de *M. surinamensis* foi separado em sete frações diferentes de acordo com sua massa molecular. Pela intensidade do sinal no cromatograma (Figura 6A) e pela dosagem de Lowry (dados não demonstrados) a fração S2 foi a mais abundante no veneno, enquanto as frações S5 e S6 foram as presentes em menor quantidade. Como observado no SDS-PAGE de cada fração, de fato o veneno foi separado de

acordo com a massa das proteínas, variando entre proteínas de maior massa obtidas na fração S1 (maiores que 50 KDa), enquanto a fração S7 apresentou proteínas de massa inferiores à 15 KDa. A fração mais homogênea, com menor distribuição de proteínas observado no gel foi a fração S4, enquanto as frações mais heterogêneas foram a S1 e S2 (Figura 6B).

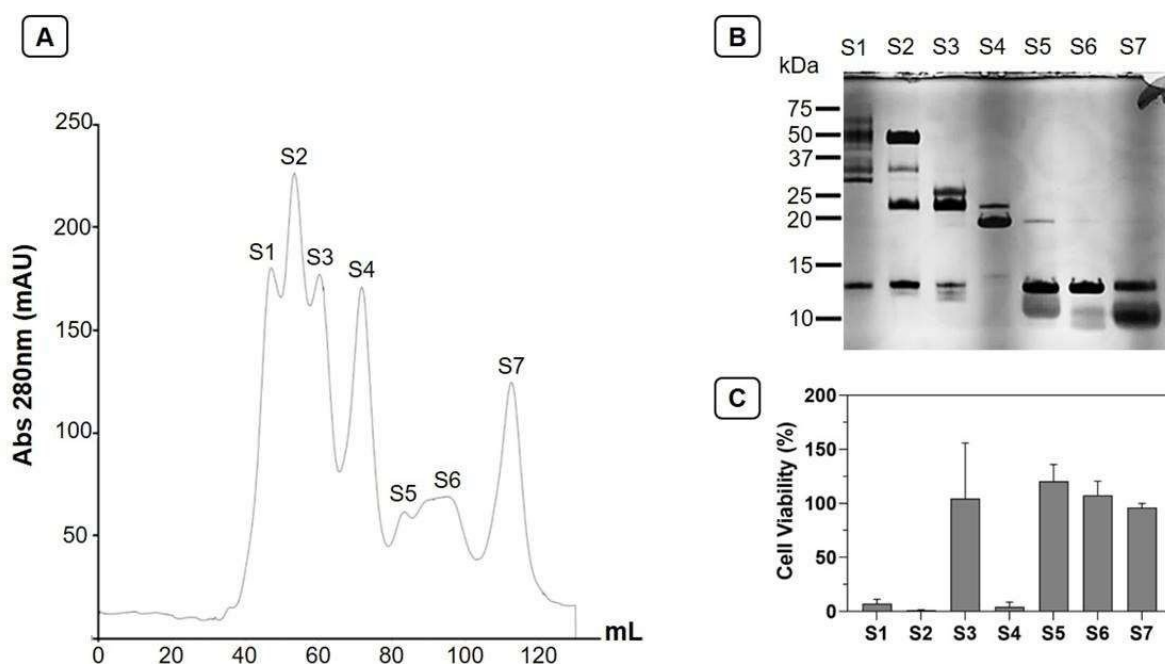


Figura 6: Purificação I - S-200 veneno total de *Micrurus surinamensis*. (A) Cromatograma da purificação de 50mg de veneno em resina 16/60 Sephacryl S-200, evidenciando as 7 frações obtidas. (B) SDS-PAGE demonstrando o perfil proteico de cada fração, corado pelo método de prata. (C) O gráfico demonstra a redução da viabilidade da H9c2 frente à incubação com 40 μ g/mL das frações S1, S2 e S4. As frações S3, S5, S6 e S7, mesmo nesta concentração, não demonstraram atividade.

Quando cardiomioblastos foram expostos às frações obtidas a partir desta cromatografia, nem todas foram capazes de levar à redução da viabilidade celular. Dentre as frações, somente as frações S1, S2 e S4 foram capazes de levar a redução da viabilidade celular (Figura 6C) e esta capacidade foi concentração dependente, ou seja, quanto maior a concentração da fração, maior era a capacidade de redução da viabilidade celular (dados não demonstrados). Mesmo na maior concentração testada (40 μ g/mL), as frações S3, S5, S6 e S7 não foram capazes de reduzir a viabilidade desta linhagem celular (Figura 6C). Quando calculada a concentração efetiva média (EC₅₀) das frações S1, S2 e S4, obtivemos o

valor de 9,9 $\mu\text{g/mL}$, 2,8 $\mu\text{g/mL}$ e 6,8 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Visto isso, a fração com maior atividade cardiotoxicidade foi a fração S2.

4.2. Cromatografia de troca aniônica da fração S2

A partir da cromatografia realizada submetendo a fração S2 à coluna contendo DEAE, foram purificadas cinco frações. O não-ligado à resina foi a menor parte da fração S2, enquanto outras quatro frações foram eluídas a partir de diferentes concentrações de NaCl (Figura 7A). Dentre as frações, a que apresentou maior concentração de proteínas foi a fração D4, seguida da fração D5 (Dados não demonstrados).

Quanto à composição destas frações, todas ainda apresentavam-se heterogêneas. A fração D1 é composta por proteínas em torno de 20 KDa até 150 KDa, enquanto outras frações são compostas por uma menor faixa, contendo proteínas entre 25 KDa e 75 KDa (Figura 7B).

Ao tratar da capacidade de reduzir a viabilidade de cardiomioblastos, somente a fração D5 não demonstrou atividade, mesmo na maior concentração testada (30 $\mu\text{g/mL}$). A fração D1 foi a que apresentou a maior capacidade de reduzir a viabilidade celular desta linhagem celular ($EC_{50}=2,3 \mu\text{g/mL}$) (Figura 7C). No entanto, devido ao baixo rendimento obtido desta fração, não foi possível realizar outras etapas de purificação e, portanto, a segunda com maior capacidade, fração D4, que apresentou EC_{50} de 18,4 $\mu\text{g/mL}$, foi selecionada para uma terceira etapa cromatográfica. As frações D2 e D3 também foram capazes de reduzir a viabilidade das células, todavia, a concentração efetiva média das mesmas foram mais que o dobro da fração D4, sendo elas de 35,4 $\mu\text{g/mL}$ e 43,8 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Figura 7C).

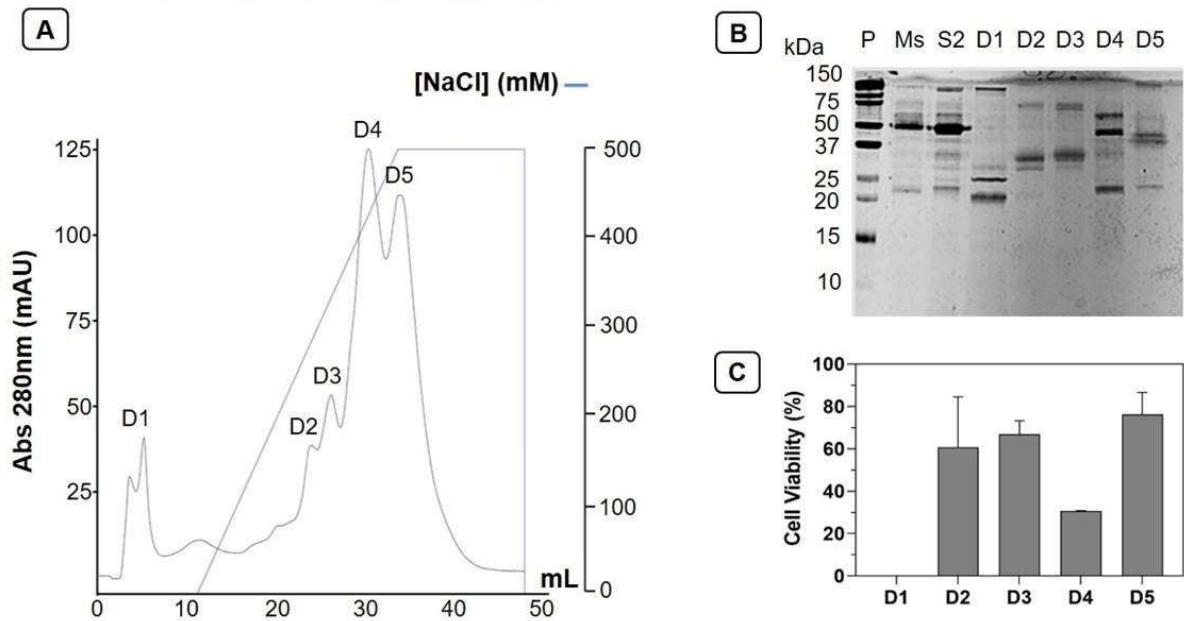


Figura 7: Purificação II - Troca aniônica da fração S2 obtida a partir da S-200. (A) Cromatograma da fração 2 em DEAE-sepharose, evidenciando 5 frações. (B) SDS-PAGE corado pelo método de prata demonstram o resultado da purificação da fração 2. (C) Ensaio citotóxico em linhagem H9c2 de cada fração obtida (30 µg/mL).

4.3. Gel filtração G-75 da fração D4

Após analisar fatores como capacidade de redução de viabilidade celular dos cardiomioblastos e da quantidade de fração disponível, a fração D4 foi selecionada para a terceira cromatografia. Os 2 mg aplicados na coluna G-75 resultaram em quatro frações observadas no cromatograma, sendo a primeira fração a mais abundante (Figura 8)..

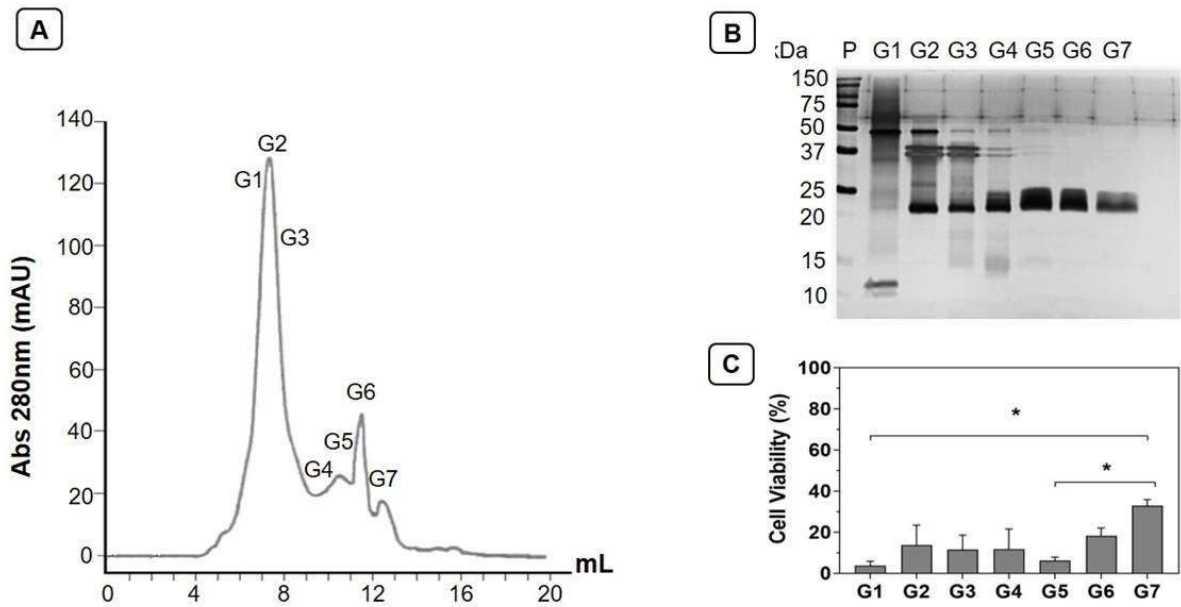


Figura 8: Purificação III - Gel filtração de amostra D4 e a análise de frações obtidas. (A) Cromatograma obtido a partir da purificação em Superdex TM G-75 da fração D4, no qual foram coletados sete frações. (B) SDS-PAGE corado pelo método de prata, apresentando o perfil protéico das frações obtidas na cromatografia. Nas cinco primeiras frações, observa-se a presença de diferentes proteínas, enquanto nas duas últimas, o gel evidencia apenas uma banda em torno de 20 KDa. (C) Ensaio citotóxico, apresentando o impacto de cada fração na linhagem H9c2. Observa-se que todas as frações foram capazes de reduzir a viabilidade celular, incluindo as frações mais homogêneas (G6 e G7). As frações G1 e G5 apresentaram maior citotoxicidade ($p < 0.05$) quando comparado à fração G7.

Apesar das quatro frações observáveis no cromatograma, as análises foram realizadas utilizando as frações obtidas no coletor separadamente. Quanto à constituição, dentre estas frações, as bandas mais evidentes foram proteínas de 50 KDa, duas próximas à 37 KDa e uma entre 20-25 KDa. A fração G1 era principalmente constituída da fração de maior massa, e a mesma foi observada nas frações G2 até a G5. As duas bandas próximas à 37 KDa surgiram na fração G2 e se mantiveram visíveis, da mesma forma que a banda de maior massa, até a G5. Já a banda próxima à 20 KDa foi observada desde a fração G2 até a última fração coletada, sendo a única banda observada nas frações G6 e G7 (Figura 8B).

Avaliando a capacidade de redução da viabilidade celular de cada fração, todas elas apresentaram atividade. A fração G1 apresentou alta capacidade de redução da viabilidade de H9c2, com concentração efetiva média de 2.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As demais frações heterogêneas também apresentaram capacidade de redução da viabilidade celular não apresentando diferença significativa entre si ($p > 0.05$). Quanto

às frações mais homogêneas em relação a proteína próxima à 20 KDa (G6 e G7), a fração G5 demonstrou maior capacidade de redução da viabilidade celular na fração quando comparado à fração G7 ($p < 0.05$). A fração G7, que apresentou maior homogeneidade, apresentou concentração efetiva média de 9,81 $\mu\text{g/mL}$. Ao analisar as células após 24h de tratamento com 5 $\mu\text{g/mL}$ da fração G7 sob microscopia óptica, a mesma levou à alterações na morfologia dos cardiomioblastos. Além de levar à morte celular e a presença de debris, pôde-se observar a formação de agregados celulares (Figura 9).

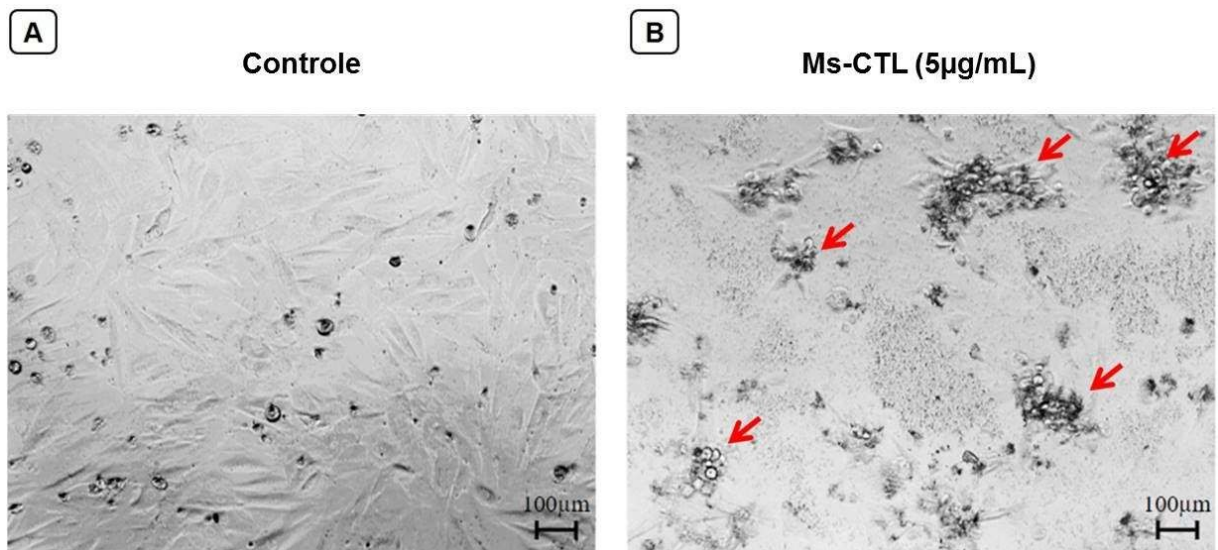


Figura 9: Microscopia óptica de linhagem H9c2 após tratamento com fração G7. Na figura A, observa-se a morfologia das células após 24h sem tratamento, mantendo formato fusiforme, aderidas à placa e confluentes. Já após 24h de exposição à 5 $\mu\text{g/mL}$ da fração G7 (B), grande parte das células estão mortas, observando grande quantidade de *debris*. Além disso pode-se observar a presença de agregados celulares (seta vermelha), indicando que a interação com a proteína está formando ligações-cruzadas (Aumento: 20x/0.40).

4.4. Digestão, sequenciamento manual da proteína de 20 KDa e caracterização bioquímica

Anteriormente à tripsinização da proteína, a massa da proteína de aproximadamente 20 KDa foi determinada, submetendo a fração G7 à espectrometria de massa (MALDI/TOF). Foi observado apenas um íon apresentando uma relação m/z de 23.461 Da (Figura 10A).

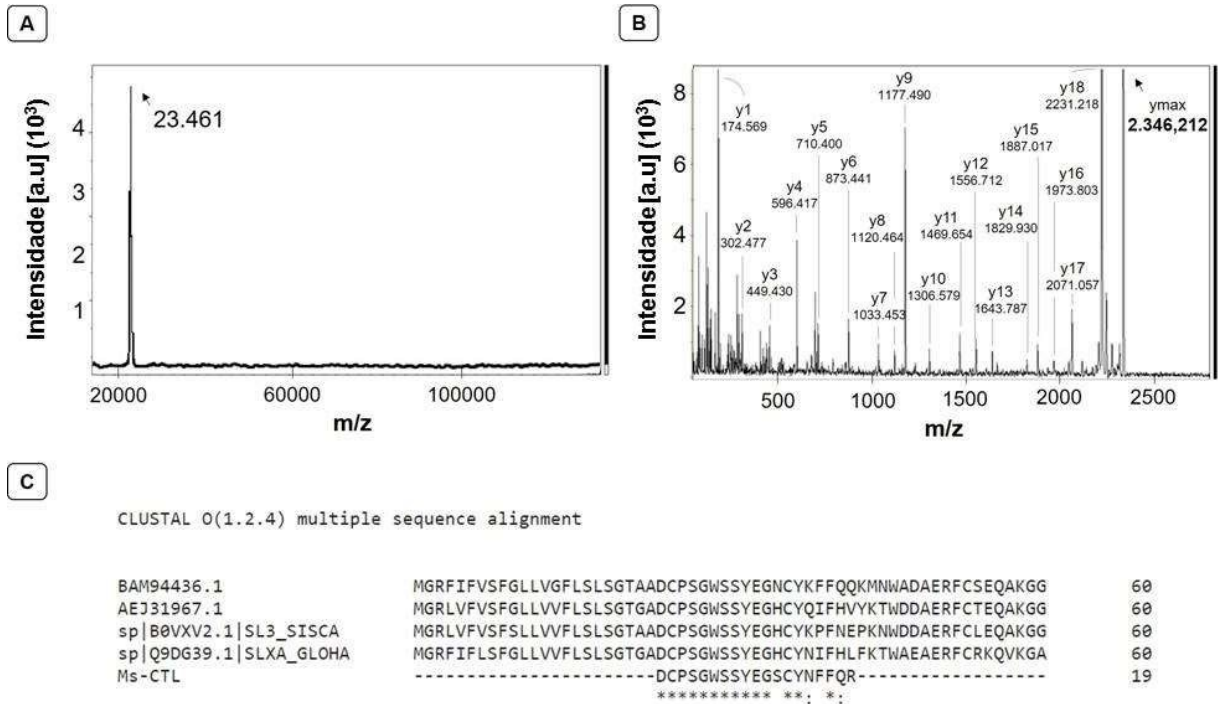


Figura 10: Perfil da fração G7 por espectrometria de massa. (A) Espectro de massa por ionização do tipo MALDI/TOF da fração G7. Apenas um íon com relação m/z de 23.461 Da observável. (B) Sequenciamento manual pelos íons y gerados após fragmentação do peptídeo de 2.346 Da. Este peptídeo foi obtido a partir da tripsinização da proteína de 23.461 Da. (C) Alinhamento realizado pelo software Clustal Omega da sequência do peptídeo com diferentes LTC de veneno de serpente com alta homologia.

A partir da tripsinização da banda de 23 KDa obtida a partir do SDS-PAGE da fração D4, foram obtidos diversos peptídeos que variaram entre massas de 649 Da à 2.346 Da. Dentre estes peptídeos, o de massa 2.346 Da foi fragmentado pelo método LIFT em câmara colisora em gás argônio, gerando fragmentos que possibilitaram o sequenciamento manual completo. Além deste íon, os demais íons também foram fragmentados, no entanto, os fragmentos não ionizaram nas matrizes testadas de forma que o sequenciamento manual fosse possível. Neste método, o peptídeo de 2.346 Da foi fragmentado e ionizado com sucesso, apresentando uma sequência composta por 19 aminoácidos, sendo ela **NH₂-DCPSGWSSYEGSCYNFFQR-COOH** (Figura 10C).

Para identificar qual seria a possível proteína obtida, utilizou-se o banco de dados *non-redundant protein sequences*, filtrando por proteínas com sequências similares presentes em serpentes. O *score* máximo foi de 59.2 bits, com cobertura de 94% da sequência e 88.89% de identidade com parte da sequência de uma

lectina do tipo-C (LTC). Além desta, a sequência apresentou identidade com outras LTC's, de serpentes de diferentes espécies variando em identidades de 77% - 92%, e coberturas maiores que 73%.

Utilizando o programa Clustal Omega, sequências de lectinas do tipo-C de diferentes espécies foram alinhadas com o fragmento de 2.346 Da. Com isto, observou-se que o peptídeo obtido é mais próximo à região N-terminal da proteína. Além disso, a sequência deste peptídeo é conservada mesmo em lectinas do tipo-C entre diferentes espécies de serpentes (Figura 10C).

5. DISCUSSÃO

A variabilidade da composição de venenos entre diferentes espécies de serpentes e até mesmo entre serpentes de uma mesma espécie são fatores que podem comprometer o tratamento de indivíduos acidentados (AINSWORTH *et al.*, 2018). No proteoma de diferentes espécies de *Micrurus* spp. apresentado por Aird e colaboradores (2017), destacou-se a diferença da composição do veneno entre as elas, apesar da predominância de 3FTx e PLA2. Outro fator interessante neste mesmo trabalho foi que duas serpentes *M. surinamensis*, uma capturada no estado Pará e outra no Maranhão, apresentaram variações em seu proteoma. Em relação ao tratamento de indivíduos acidentados pelas serpentes deste gênero, Tanaka e colaboradores (2010), demonstraram que o perfil protéico dos venenos utilizados na produção do soro antielapídico são diferentes quando comparados com a composição do veneno de *M. surinamensis*. Também evidenciaram que a reatividade cruzada entre o soro e o veneno desta serpente, avaliada pelo método ELISA e por Western blot, era baixa e a menor entre outras *Micrurus* spp..

Uma vez apresentados esses resultados, revelam-se ser essenciais estudos sobre os componentes presentes no veneno desta serpente, a fim de otimizar o tratamento de indivíduos acidentados. Partindo dos dados apresentados por Reis (2017) quanto à cardiotoxicidade do veneno de *Micrurus surinamensis*, objetivamos identificar compostos presentes nesse veneno responsáveis por esta característica.

Visando reduzir o uso de animais, métodos alternativos baseados na aplicação de cultura de células foram optados neste trabalho. A H9c2 foi a selecionada, uma vez que é a linhagem que apresenta características mais próximas à células cardíacas primárias, além de sua aplicação na literatura já ser bem descrita (HESCHELER *et al.*, 1991; LAGE *et al.*, 2019).

Quando o veneno total foi incubado com as células, o mesmo foi capaz de reduzir a viabilidade celular de forma dose dependente. Esta redução demonstra que componentes presentes no veneno estão ativando alguma via de morte nestas células cardíacas. Após a primeira etapa de purificação, três das sete frações foram capazes de levar a redução da viabilidade celular. Nota-se, portanto, que não

apenas uma proteína presente no veneno possui potencial cardiotoxicidade. O SDS-PAGE das frações aponta que as frações cardiotoxícas são compostas por proteínas iguais ou maiores à 20 KDa, descartando a atividade de peptídeos e do grupo das 3FTx's, uma vez que a última citada apresenta massas entre 6 e 8 KDa (OLAMENDI-PORTUGAL *et al.*, 2008).

A cromatografia de troca aniônica apontou que, majoritariamente, as proteínas presentes na fração S2 possuíam o ponto isoelétrico inferior ao pH=8,0, uma vez que a maioria destas se ligaram à resina. Já a menor parte desta fração foi constituída de proteínas com ponto isoelétrico próximo ou maior que pH=8.0. As quatro primeiras frações obtidas foram capazes de reduzir a viabilidade celular dos cardiomioblastos. Como observado na figura 7B, o perfil de bandas indica que não há nenhuma banda que seja comum às quatro frações simultaneamente. Este dado indica que, além da fração S1 e S4 da cromatografia de exclusão molecular, na fração 2 estão presentes diferentes proteínas com potencial cardiotoxíco, indicando que existem mais de três proteínas que possuem esta atividade.

Com a cromatografia em coluna G-75, foram obtidas frações heterogêneas, sendo a fração G7 a mais homogênea, na qual é possível visualizar a banda de 23 KDa, enquanto as demais apresentaram diferentes bandas de proteínas. Quando avaliada a capacidade citotóxica, foi possível observar que todas reduziram a viabilidade das células na concentração de 40 µg/mL. Entre as frações G1 - G6, não houve diferença estatisticamente significativa. Ao observar pelo padrão de bandas destas frações, a banda de 23 KDa é a única na fração G7 e apresentou efeito citotóxico e, no entanto, essa banda não está presente na fração G1. Isso indica que na fração D4 também existe mais de uma proteína com potencial efeito cardiotoxíco.

Tanto a banda de 50 KDa quanto a de 23 KDa estão presentes nas outras frações, o que deveria aumentar a citotoxicidade pela atividade das duas proteínas, entretanto, outras proteínas também estão presentes, o que reduz a concentração destas proteínas cardiotoxícas em específico, indicando que existem proteínas nestas frações que não induzem a cardiotoxicidade. A fração G5 também apresentou diferença estatística quando comparada a fração G7, o que pode ser mediado pelo aumento da proporção das proteínas de 50 KDa e 23 KDa em relação às outras, aumentando a citotoxicidade.

Dentre os peptídeos obtidos a partir da tripsinização da proteína de 20 KDa, um foi ionizado e sequenciado com sucesso. Este peptídeo composto por 19 aminoácidos apresentou massa, apontada pelo equipamento MALDI/TOF, de 2.346 Da. A massa teórica deste peptídeo dada pela sequência de aminoácidos é de 2.233 Da, sendo relativamente menor que a massa indicada pelo equipamento (2.346Da). No entanto, como o processo de alquilação aumenta a massa dos resíduos a cada cisteína em 57 Da e este peptídeo possui duas cisteínas, as massas teórica e a massa obtida pela ionizador, são equivalentes. A partir do sequenciamento do peptídeo, esta equivalência entre a massa teórica e a obtida pelo ionizador, confirma que a sequência deste peptídeo de fato está correta, assim como valida a calibração e sensibilidade do equipamento.

Uma vez submetida a sequência à um blastp, a sequência apresentou alta identidade com diversas lectinas do tipo-C de serpentes. Estas lectinas estão presentes em venenos de serpentes tanto de forma individual, quanto associadas com metaloproteases do tipo PIII, estando ambas as formas presentes em venenos de *Micrurus surinamensis* (AIRD *et al.*, 2017). No entanto a garantia de que essa proteína purificada não é associada com uma metaloprotease é devido ao fato de que as cromatografias empregadas foram brandas, além de que a sequência apresentou alta identidade com lectinas do tipo-C não associadas à metaloproteases. Não houve utilização de solventes capazes de romper pontes dissulfeto, o que refuta uma possível lectina purificada a partir da quebra de ligação entre estas proteínas e metaloproteases (KINI; KOH, 2016).

As lectinas do tipo-C “verdadeiras” recebem esse nome por sua capacidade de ligação a carboidratos (lectina) e por serem dependentes do íon cálcio (tipo-C). Esse grupo de proteínas é constituído por duas subunidades, α e β , que se dimeriza em homodímeros ou heterodímeros, podendo também se oligomerizar, formando estruturas ainda mais complexas (ARLINGHAUS; EBLE, 2012). Também estão presentes no veneno de serpentes as proteínas semelhantes à lectina do tipo-C, proteínas que apresentam o mesmo padrão conformacional das lectinas propriamente ditas, entretanto não possuem a especificidade de ligação à carboidratos. Uma diferença marcante entre estas proteínas é quanto à conservação de uma sequência E/Q-P-D/N (resíduo 113-115) em um *loop* menor na estrutura

quaternária das lectinas do tipo-C que conferem essa capacidade de ligação à carboidratos. Por outro lado, as proteínas semelhantes às lectinas do tipo-C não possuem este motivo, assim como o *loop*, não sendo capazes de ligar à carboidratos. Porém, esse segundo grupo se liga a diferentes proteínas, assim demonstrando um importante papel no envenenamento (EBLE, 2019 ; CLEMETSON, 2010; AIRD *et al.*, 2017). Este motivo está presente mais próximo à região C-terminal. Como o peptídeo da proteína que foi purificada corresponde à aproximadamente 9% da proteína e o mesmo se trata de uma região mais próxima à região N-terminal, não podemos afirmar se a proteína se trata de uma lectina do tipo-C propriamente dita ou de uma proteína semelhante à lectina do tipo-C.

Ao observar as células tratadas com a proteína após 24h, foi possível observar agregados celulares (Figura 9). A presença destes agregados indica ligações cruzadas entre estas células formados pela interação com a proteína. O ensaio *in vitro* para identificação de lectinas do tipo-C clássicas se baseia em ensaios de hemaglutinação. Nestes ensaios, as LTC clássicas se ligam a carboidratos de membrana presente em hemácias, formando ligações cruzadas e provocando agregação. Um carboidrato muito presente na membrana de cardiomiócitos é o ácido siálico. Este carboidrato possui uma alta afinidade pelo íon cálcio, íon importante presente no domínio de ligação à carboidrato das LTC (STEGEMANN *et al.*, 1990). Estes fatores apontam para a possibilidade de que a proteína se trate de uma lectina do tipo-C clássica que mantém a capacidade de ligação a carboidratos e, possivelmente, formando ligações cruzadas se ligando ao ácido siálico.

Estas proteínas possuem atividade não enzimática, atuando principalmente na homeostase. Em um artigo de revisão publicado por Arlinghaus & Eble (2012), diferentes LTC's e seu papel fisiológico foram apontadas, quanto à capacidade de interagirem com fatores de coagulação, plaquetas e integrinas. Enquanto algumas LTC's atuam como pro-coagulantes, outras apresentam atividade antagônica, levando a um bloqueio da ativação da cascata de coagulação. Apesar desta atividade convencional, trabalhos recentes apontaram a capacidade de LTC's de levarem a morte celular.

Pathan e colaboradores (2017) demonstraram a capacidade de uma LTC purificada a partir do veneno de *Daboia russelii* de levar a morte celular de uma linhagem de célula de câncer de pulmão (A549). Esta proteína, nomeada daboialectina, foi capaz de interagir com estas células, levando a alterações no citoesqueleto e a indução de processos pró-apoptóticos, reduzindo assim a viabilidade celular desta linhagem. Este trabalho apontou que, além de influenciar na homeostase, algumas lectinas também são capazes de gerar citotoxicidade, de mesma forma que a lectina purificada e apresentada neste trabalho.

Ensaio com o envenenamento por *Micrurus surinamensis* em cobaias (REIS, 2017), evidenciaram que uma ou mais proteínas presentes no veneno são capazes de levar a cardiotoxicidade. As cobaias teste apresentaram alterações no eletrocardiograma, aumento dos níveis séricos de CK-MB e lesões na musculatura esquelética cardíaca. Com o presente trabalho, testes de citotoxicidade em cardiomioblastos (H9c2) evidenciaram que diferentes frações purificadas do veneno total levaram à redução da viabilidade celular e que, uma destas proteínas se trata de uma lectina do tipo-C. Zanotty e colaboradores (2019) identificaram no veneno de *Lachesis muta muta* uma LTC que apresentava atividade cardiotóxica, a mutacitina-1. Essa proteína foi capaz, em embriões de *Zebra fish*, de levar também à alterações cardíacas, assim como danos no pericárdio e indução à apoptose.

A lectina do tipo-C purificada neste trabalho foi capaz de reduzir a viabilidade celular de cardiomioblastos, sugerindo que esta proteína é capaz de gerar cardiotoxicidade. Trabalhos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa, avaliaram a capacidade do veneno de *M. surinamensis* em reduzir a viabilidade celular de outros tipos de células, como do epitélio renal (Vero), queratinócitos (HaCat) e glioma (U373). Como resultado, observamos que a concentração de veneno necessária para gerar citotoxicidade nas duas primeiras linhagens foi bem mais alta quando comparada com H9c2, enquanto que a linhagem U373, mesmo nas maiores concentrações testadas, não foi impactada pelo veneno (dados não demonstrados). Com isso, pode-se inferir que a atividade dos componentes cardiotóxicos são específicos e não possuem uma toxicidade generalizada, uma vez que nem toda linhagem é sensível ao veneno.

Estes resultados reforçam a presença de toxinas presentes no veneno de *M. surinamensis* que levam à cardiotoxicidade, como apresentado em trabalhos experimentais *in vivo*.

6. CONCLUSÃO

Com os resultados do presente trabalho, observou-se que o veneno de *Micrurus surinamensis* foi capaz de reproduzir atividade citotóxica em cardiomioblastos, como demonstrado por Reis e colaboradores (2017) pelos testes em cobaias. Além disso, essa potencial cardiotoxicidade é ocasionada por mais de uma proteína presente no veneno. Uma destas proteínas obtida foi caracterizada bioquimicamente e sequenciada, sendo ela uma lectina do tipo-C, que nomeamos Ms-CTL..

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AINSWORTH, S.; *et al.*. The paraspecific neutralisation of snake venom induced coagulopathy by antivenoms. **Communications Biology**. v. 1, n. 34, 2018.

AIRD, S. D. *et al.*. Coralsnake Venomics: Analyses of Venom Gland Transcriptomes and Proteomes of Six Brazilian Taxa. **Toxins**. v. 9, n. 187, 2017.

ARLINGHAUS, F. T.; EBLE, J. A. C-type lectin-like proteins from snake venoms. **Toxicon**. v. 60, n. 4, 2012.

BERKOVITZ, B.; SHELLIS, R. P. The Teeth of Non-Mammalian Vertebrates: Reptiles 2: Snakes. 1 ed. Academic Press, 2017.

FERREIRA BISNETO, P. Coral snake bites in Brazilian Amazonia: perpetrating species, epidemiology and clinical aspects. **Toxicon**. v. 27, n. 175, 2019.

BRAHMA, R. K.; *et al.* Venom gland transcriptomics for identifying, cataloging, and characterizing venom proteins in snakes. **Toxicon**. v. 93, p. 1-10, 2015.

CASAI-SILVA, L. L.; *et al.* Lemnitoxin, the major component of *Micrurus lemniscatus* coral snake venom, is a myotoxic and pro-inflammatory phospholipase A2. **Toxicology Letters**. v. 257, p. 60-71, 2016.

CHER, C. D. N.; *et al.* Molecular basis of cardiotoxicity upon cobra envenomation. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 62, p. 105-118, 2005.

CHINNASAMY, S.; *et al.* Combining in silico and in vitro approaches to identification of potent inhibitor against phospholipase A2 (PLA2). **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 144, p.53-66, 2020.

CHIPPAUX, J.; Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease!. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**. v. 23, n. 38, 2017.

CLEMETSON, K. J. Snake C-type lectins (snaclecs) that inhibit or activate platelets by binding to receptors. **Toxicon**. v. 56, p. 1236-1246, 2010.

DE CASTRO, K. L. P.; *et al.* A Combined Strategy to Improve the Development of a Coral Antivenom Against *Micrurus* spp. **Frontiers in Immunology**. v. 10, n. 2422, 2019.

DU PLESSIS, A.; BROECKHOVEN, C.; LE ROUX, S. G.; Snake fangs: 3D morphological and mechanical analysis by microCT, simulation, and physical compression testing. **GigaScience**. v. 7, p. 1-8, 2018.

EBLE, J. A. Structurally Robust and Functionally Highly Versatile—C-Type Lectin (-Related) Proteins in Snake Venoms. **Toxins**. v. 11, n. 136, 2019.

GOMES, R. A. F.; *et al.* Myocardial Infarction after Snake Bite. **International Journal of Cardiovascular Sciences**. v. 31, n. 1, 2018.

GUERRA, G. F. C.; *et al.* Potential Geographic Distribution of the Genus *Micrurus* Wagler, 1824 (Serpentes: Elapidae) and Antivenom Supply in Rio de Janeiro State, Brazil. **Oecologia Australis**. v. 23, n. 3, 2019.

GUTIÉRREZ, J. M.; *et al.* Snakebite envenoming. **Nature Reviews Disease Primers**. v. 3, n. 17063, 2017.

HESCHELER, J. *et al.* Morphological, Biochemical, and Electrophysiological Characterization of a Clonal Cell (H9c2) Line From Rat Heart. **Circulation Research**. v. 69, n. 6, 1991.

KINI, R. M.; KOH, C. Y. Metalloproteases Affecting Blood Coagulation, Fibrinolysis and Platelet Aggregation from Snake Venoms: Definition and Nomenclature of Interaction Sites. **Toxins**. v. 8, n. 284, 2016.

LAEMMLI, U. Cleavage of Structural Protein during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**. v. 227, p. 680-685, 1970.

LAGE, R.; *et al.* Omentin protects H9c2 cells against docetaxel cardiotoxicity. **PLOS One**. v. 14, n. 2, 2019.

LOMONTE, B.; *et al.* Venoms of *Micrurus* coral snakes: Evolutionary trends in compositional patterns emerging from proteomic analyses. **Toxicon**. v. 122, p. 7-25, 2016.

LOWRY, O. H.; *et al.* Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. **Journal of Biological Chemistry**. v. 193, p. 265-275, 1951.

LONGBOTTOM, J.; *et al.* Vulnerability to snakebite envenoming: a global mapping of hotspots. **Lancet**. v. 392, p. 673-684, 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação. (2017). Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def>>. Acesso em: 09 dez. 2019.

MISE, Y. F.; LIRA-DA-SILVA, R. M.; CARVALHO, F. M. Time to treatment and severity of snake envenoming in Brazil. **Revista Panamericana de Salud Pública**. v. 42, 2018.

MORAIS, D. H.; *et al.* Squamata, Elapidae, *Micrurus surinamensis* (Cuvier, 1817): New records and distribution map in the state of Mato Grosso, Brazil, with notes on diet and activity period. **Check List**. v. 7, n. 3, 2011.

NAIK, B. S. "Dry bite" in venomous snakes: A review. **Toxicon**. v.133, p. 63-67, 2017.

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, p. 1919-1932, 2008.

OLIVEIRA, F. B.; NORONHA, M. D. N.; LOZANO, J. L. L. Biological and molecular properties of yellow venom of the Amazonian coral snake *Micrurus surinamensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 50, n. 3, 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Snakebite envenoming. 8 abr. 2019
Disponível
em:<<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming>>.
Acesso em: 03 dez. 2019.

PARDAL, P. P. O.; *et al.* Envenomation by *Micrurus* Coral Snakes in the Brazilian Amazon Region: Report of Two Cases. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 52, n. 6, 2010.

PATHAN, J.; *et al.* Daboiactin, a C-type lectin from Russell's viper venom induces cytoskeletal damage and apoptosis in human lung cancer cells *in vitro*. **Toxicon**. v. 127, p. 11-21, 2017.

REIS, L. P. G. Estudo clínico do envenenamento experimental por *Micrurus surinamensis* em cobaias (*Cavia porcellus*). Belo Horizonte, 2017.

RORIZ, K. R. P. S.; *et al.* Epidemiological study of snakebite cases in Brazilian Western Amazonia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 51, n. 3, 2018.

SANZ, L.; *et al.* Comparative venomomics of Brazilian coral snakes: *Micrurus frontalis*, *Micrurus spixii spixii*, and *Micrurus surinamensis*. **Toxicon**. v. 166, p. 39-45, 2019.

SHEVCHENKO, A.; *et al.* Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels. **Analytical Chemistry**. v. 68, p. 850-858, 1996.

SILVA, F. M.; *et al.* Aquatic adaptations in a Neotropical coral snake: A study of morphological convergence. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**. v. 56, p. 382-394, 2018.

STEGEMANN, M.; *et al.* The cell surface of isolated cardiac myocytes-A light microscope study with use of fluorochrome-coupled lectins. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**. v. 22, p. 787-803, 1990.

TAN; N. H.; WONG, K. Y.; TAN, C. H. Venomomics of *Naja sputatrix*, the Javan spitting cobra: A short neurotoxin-driven venom needing improved antivenom neutralization. **Journal of Proteomics**. v. 157, p. 18-32, 2017.

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, 2010.

TANAKA, G. D.; *et al.* *Micrurus* snake species: Venom immunogenicity, antiserum cross-reactivity and neutralization potential. **Toxicon**. v. 117, p. 59-68, 2016.

TASOULIS, T.; IBISTER, G. K. A Review and Database of Snake Venom Proteomes. **Toxins**. v. 9, n. 290, 2017.

THE REPTILE DATABASE. Disponível em:
<http://reptile-database.reptarium.cz/advanced_search?taxon=Elapidae&genus=Micrurus&location=Brazil&submit=Search>. Acesso em: 11 dez. 2019.

WANG, C.; *et al.* Cobra cardiotoxin-induced cell death in fetal rat cardiomyocytes and cortical neurons: different pathway but similar cell surface target. **Toxicon**. v. 46, p.430-440, 2005.

WELLCOME TRUST. Snakebites: making treatments safe, effective and accessible. Disponível em: <<https://wellcome.ac.uk/what-we-do/our-work/snakebites>>. Acesso em: 02 dez. de 2019.

ZANOTTY, Y. *et al.* Mutacytin-1, a New C-Type Lectin-Like Protein from the Venezuelan Cuaima (*Lachesis muta muta* Linnaeus, 1766) (Serpentes: Viperidae) Snake Venom Inducing Cardiotoxicity in Developing Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos. **Zebrafish**. v. 16, n. 4, 2019.