

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISIOLOGIA E
FARMACOLOGIA

Prospecção, síntese química e caracterização
farmacológica de toxinas de peçonhas
Elapidae (*Micrurus lemniscatus*) e Conidae
sobre o sistema colinérgico

MARCELA CRISTINE SILVA

Belo Horizonte
2017

MARCELA CRISTINE SILVA

Prospecção, síntese química e caracterização
farmacológica de toxinas de peçonhas Elapidae
(*Micrurus lemniscatus*) e Conidae sobre o
sistema colinérgico

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Fisiologia e Farmacologia.

Área de Concentração: Fisiologia.

043

Silva, Marcela Cristine.

Prospecção, síntese química e caracterização farmacológica de toxinas de peçonhas Elapidae (*Micrurus lemniscatus*) e Conidae sobre o sistema colinérgico [manuscrito] / Marcela Cristine Silva. - 2017.

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia. Co-orientador: Dr. Denis Servent.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Farmacologia - teses. 2. Toxinas - Teses. 3. Conotoxinas. 4. Veneno de serpentes. 5. Receptores colinérgicos. I. Perez-Garcia, Maria Elena de Lima. II. Servent, Denis. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 615

**"PROSPECÇÃO, SÍNTESE QUÍMICA E CARACTERIZAÇÃO
FARMACOLÓGICA DE TOXINAS DE PEÇONHAS ELAPIDAE
(MICRURUS LEMNISCATUS) E CONIDAE SOBRE O
SISTEMA COLINÉRGICO"**

MARCELA CRISTINE SILVA

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia 15 de dezembro de 2017, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:


PROF. DR. CÉLIO JOSÉ DE CASTRO JÚNIOR
SANTA CASA DE BELO HORIZONTE


PROFA. DRª. LÍGIA ARAÚJO NAVES KUSHMERICK
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS


DRª. MARIA REGINA LOPES SANDOVAL
INSTITUTO BUTANTAN


PROF. DR. THIAGO VERANO BRAGA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS


PROFª. DRª. MARIA ELENA DE LIMA PEREZ GARCIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ORIENTADORA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

Belo Horizonte, 15 de dezembro de 2017

Este trabalho foi realizado com participação dos seguintes centros de pesquisa:

- Laboratório de Venenos e Toxinas Animais do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG;
- Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Belo Horizonte, MG;
- Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), Brasília, DF;
- Laboratoire de Toxinologie Moléculaire et Biotechnologies, Le Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives (CEA - Saclay), Paris, França;
- Laboratoire de Spectrometrie de Masse, Université de Liège, Liège, Bélgica.



E contou com o apoio financeiro das seguintes instituições: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Toxinas (INCTTOX), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).



DEDICATÓRIA

Às mulheres da [minha] vida...
Em especial a minha maior
inspiração: Maria das Graças Silva.

AGRADECIMENTOS

Desafio tão grande quanto escrever essa tese foi redigir esses agradecimentos - contemplando a todos que fizeram parte da minha trajetória - talvez porque a vida não caiba em uma análise de regressão e não é pelo valor p que descobrimos a significância das pessoas em nossa vida. Dessa forma agradeço:

Ao Clóvis e ao Lino, professores, incentivadores e amigos inspiradores, sempre presentes, desde a graduação na querida Universidade Federal de Viçosa.

À Maria Elena, minha orientadora ao longo dos últimos 6 anos. Obrigada por todo apoio, direcionamento científico e por ser tão HUMANA desde as constantes caronas, compreensão das ausências e cuidado quase maternal.

À Dra. Juliana Cassoli (Creidi), Dra. Fernanda Silva Torres (Fê) e Jamil Silvano por serem meus mentores nesse universo proteômico, pela disponibilidade e prontidão em ajudar e pelos importantes ensinamentos. Obrigada também pelo companheirismo e amizade.

Ao Daniel dos Santos (“Deniel”) por além de mentor, ser meu “suporte” em quase todos os experimentos bioquímicos. Pelas longas jornadas de trabalho, análises, críticas, amizade e momentos de descontração.

Ao professor Dr. Ricardo Orlando, do Departamento de Química, pelo interesse despretensioso em cooperar e pelas discussões e direcionamentos químicos tão carentes na minha formação de bióloga.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, da Fundação Ezequiel Dias – FUNED (Belo Horizonte – MG), em especial à Jaqueline Leal, ao Thiago Soares e a Dra. Márcia Borges, pelas contribuições diretas, experimentos e discussões científicas.

Ao Dr. Marcelo Bemquerer, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - CENARGEN (Brasília - DF) pela intensa colaboração no sequenciamento das proteínas.

Ao Núcleo de Análise de Biomoléculas (NuBiomol) da Universidade Federal de Viçosa, por fornecer as facilidades para a condução dos experimentos e análises de massas. Reconheço o apoio financeiro das seguintes agências brasileiras: Fapemig, CAPES, CNPq, Finep, SisNaNO e MCTI.

Aos servidores técnico administrativos, e com um carinho especial à Cyntia Menezes, Rodner Rodrigues, Orlando Mattos, Júlio César e Vinícius Cunha, por serem sempre solícitos a todas as nossas demandas e vivenciarem conosco essa montanha russa chamada pós-graduação.

Ao Laboratório de Venenos e Toxinas Animais e a todos os colegas e amigos dessa jornada científica.

Ao Programa de Fisiologia e Farmacologia (PGFisFar), docentes e discentes, pelas oportunidades, conhecimento compartilhado e amigos reconhecidos.

Às famílias belo-horizontinas Fernandes Alves de Barros e Magalhães Emerich que me acolheram e acolhem com tanto carinho fazendo com que eu me sinta sempre em casa. Obrigada pelo amor e generosidade!

Aos amigos Juliana Benevenuto (Veizinha), Felipe Vieira Freitas (Granadet’s), Bruna Emerich (Brunet’s), Ana Paula de Faria Gonçalves (Anitcha), Paula Eillanny Marinho (Paulete), Ana Carolina

Fialho Dias (Querol), Aglaia Beatriz Batista Soares (Aglaiet's), Natália Salazar de Castro (Nat), Pollyanna Alves de Barros (Pollyzinha), Juliana Cassoli (Ju Creidi), Lorena Maciel e Luciana Barbosa (Djovens Lo e Lu), Carolina Alves de Barros (Carol), Joyce Lopes (Joycelene) e Suelen Pessata Ferraz (Su) obrigada pela paciência, sessões desabafo, conversas filosóficas, risadas, choros, coreografias ensaiadas, festinhas, cumplicidade, aparo e todo amor envolvido!

Ao Daniel Valente de Oliveira (mocinho), obrigada pela amizade, companheirismo de sempre, incentivo diário, amor e amadurecimento conjunto. A “corrida” continua... E a Agra Lúcia Valente de Oliveira e toda família Valente pela acolhida e carinho.

À minha família, obrigada pelo apoio incondicional, pelo orgulho demonstrado a cada conquista, pelo suporte emocional nos momentos difíceis, de desespero e distância e pelos acontecimentos mais malucos, dignos de novela mexicana. Que a união e a tranquilidade nos conduza, mesmo na ausência física das nossas referências.

À minha mãe, Maria das Graças Silva, obrigada por ser você! Obrigada pelo zelo, disciplina e empoderamento... pela coragem, força e presença... pelos não e por todos os sins, por mais difíceis que fossem... obrigada pela abdicação e empenho (em cada faxina e trouxa de roupa lavada) e por nunca me limitar, pois hoje eu sei que posso ser e ir onde eu quiser!

E no que tange o período de estágio sanduíche, em Paris - França: Je tiens à remercier,

L'Institut de Biologie et de Technologies de Saclay (iBiTec-S) / Service d'Ingénierie Moléculaire des Protéines (SIMOPRO) / Laboratoire de Toxinologie Moléculaire et Biotechnologies (LTMB)/ Equipe Toxines, Récepteurs et Canaux Ioniques du Le Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives (CEA - Saclay).

Messieur Docteur Denis SERVENT, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe, pour le qu'il a apporté à mon accompagnement ainsi que pour la pertinence et la qualité de sa direction scientifique. Je souhaite lui exprimer avec ces quelques lignes toute ma gratitude.

Les Messieurs Gilles MOURIER, Philippe ROBIN, Pascal KESSLER, Nicolas GILLES, Jordi MOLGÓ, Romulo ARAOZ, Oscar PEREIRA, Robert THAI, Steven DUBOIS, Olivier COMBES, Loïc MARTIN et Mesdames Muriel AMAR, Evelyne BENOIT pour leurs disponibilités, leur soutien et leurs conseils continu; ainsi que pour leurs enseignements qui m'ont permis d'élargir mon champ de vision (m'ouvrir à d'autres perspectives). Je n'oublierai jamais leurs amitiés et les moments amusant que l'on a partagés ensemble.

À mes amis Lidia CICCONE, Manon LANCIEN, Laura DROCTOVÉ, Daad SARRAF, Steve REYNAUD, Justyna CIOLEK, Livia TEPHI, Tânia GONCALVES, Monika KAMINSKA, Alexandre SAMPAIO, Claire LAMOISE, Amandine GAUDIN, Claudia RODRIGUES, Ana GONLAÇALVES et Linda GONLAÇALVES un grand merci pour l'amitié, l'affection, les échanges culturels et bien sur pour la patience avec mon français. Un second grand merci pour m'avoir tout de suite intégré et pour tous les déjeuners et pots partagés ensemble. Vous me manquerez toujours!

À la Cité Internationale Universitaire de Paris, et plus précisément à la Maison du Brèsil et à tous les amis que j'ai pu rencontrer là-bas: en particulier Micaela VICTOR, Laura LÓPEZ, Mariem MARRAKCHI, Ablo DIANKA et surtout les « Crème de la Crème ». À Aline Ribeiro Passos, Marcos Roberto Pina (Marcuuuus), Leônidas Prado (Le bon chocolat), Camila Coelho (Camiliá), Diogo Borges

(Diogó), Priscila Rotier (Pri) et Luis Guilherme Virgílio, vous serez toujours dans mon coeur. Merci beaucoup pour tous les moments, les voyages et les folies passés ensemble.

Après tout, pourquoi pas ? Il faut profiter...

Uma vez fui viajar e nunca mais voltei... Não por rebeldia ou por ter decidido ficar, simplesmente mudei! Cruzei fronteiras que eu nunca imaginaria cruzar. Nem no mapa, nem na vida. E meu mundo cresceu... e como cresceu. Fui tão longe que olhar para trás não era confortável, era motivador! Conheci o que posso chamar de professores e acessei conhecimentos que nenhum livro poderia me ensinar. Não por serem secretos, mas por serem vividos. Acrescentei ao dicionário da minha vida novos significados para as palavras liberdade, companheirismo, curiosidade, medo, amor e respeito. Reaprendi o valor de alguns gestos, como a espontaneidade de sorrisos, a troca de olhares, o poder do diálogo e a máxima “vai dar certo”. Fui acolhida por “estranhos”, famílias, caronas, bancos, praças e museus. Viajei! Conheci ruas, estações, aeroportos, muitas cidades e 16 países. E ainda quero conhecer muito mais. Entretanto, chãos e humanos, ambos podem ser igualmente frios ou restauradores. Vivenciei meus livros de história e geografia, os filmes da sessão da tarde, brinquei na neve como uma criança e fiz amigos de verdade. Amigos de estrada não sucumbem ao espaço e nem ao tempo. Vivi além da imaginação da Marcela que saiu de casa aos 17 anos. Contrariei expectativas e acumulei riquezas imateriais. Permiti ao meu corpo e à minha mente experimentar outros estados de vivência e consciência e acrescentei marcas definitivas. Redescobri o que me fascina. Senti calores no peito e dei espaço para meu coração acelerar mais do que uma rotina qualquer permitiria. E quer saber? Conheci outras versões de mim mesma e também da saudade. Como nós, ela pode ser dura. Com ela, reavaliei minhas prioridades, e meus abraços, dei mais respeito à algumas palavras e me apaixonei ainda mais por meus amigos e familiares. Ainda tenho muito que aprender. Na verdade, tais experiências apenas me dirigem para uma certeza - que ainda tenho muito lugar para conhecer, pessoas a cruzar e conhecimento para experimentar. Uma vez fui viajar... e a partir deste momento compreendi que qualquer viagem é uma ida sem volta!

Adaptação do texto de Marcelo Penteadó

RESUMO

Os venenos animais passaram por grande pressão evolutiva até atingirem seus alvos com alta afinidade e seletividade. Constituem assim, recursos ilimitados para descoberta de novas drogas. Apesar da diversidade de alvos, gostaria de destacar a transmissão colinérgica (TC). Dentre as toxinas proteicas que interferem na TC, algumas das famílias mais abundantes correspondem às *three fingers* (3FTxs) - presentes principalmente na peçonha das serpentes Elapidae - e as α -conotoxinas de gastrópode marinhos do gênero *Conus*. Dessa forma esta tese compreende uma introdução sobre o potencial das toxinas na TC e outros dois capítulos: prospecção de 3FTxs de uma espécie de cobra coral brasileira e prospecção de potenciais novas subfamílias de α -conotoxinas. Para compor a primeira parte, a peçonha de *Micrurus lemniscatus* foi fracionada por HPLC e a toxina MI4 (7201,12 Da) foi selecionada e estudada em receptores muscarínicos e nicotínicos por técnicas de *binding*, além de quantificação de monofosfato de inositol (IP1), citotoxicidade e espectroscopia de dicroísmo circular. MI4 apresentou atividade muscarínica M3, nicotínica (Torpedo $2\alpha 1\beta 1\delta\gamma$) e ausência de citotoxicidade. Surpreendentemente, a versão sintética de MI4, MiLTx1, não apresentou nenhum efeito sobre a TC, mesmo em concentrações 100x maiores. Ambas toxinas compartilham da mesma sequência, massa e padrão de fragmentação, no entanto, quando co-injetadas em cromatografia de fase reversa exibem 3 min de diferença no tempo de eluição, confirmando que elas não são idênticas. Algumas hipóteses, como a presença de D-aminoácidos na sequência da MI4 ou que a atividade colinérgica observada não provém do pico majoritário, mas de algum contaminante da toxina (grau de pureza ~98%), podem explicar os resultados contraditórios. MonoS8, fração a partir da qual MI4 foi inicialmente purificada, apresentou atividade sobre os receptores M3 e Torpedo, o que já era esperado. Porém a resposta muscarínica observada foi de agonismo e não antagonismo, como observado anteriormente para MI4. Após essa constatação, MonoS8 foi purificada e 6 picos / toxinas puderam ser submetidos a verificação da atividade. MonoS8 7 (6.782,7 Da) foi o único pico / toxina que competiu com o radioligante e em seguida teve sua atividade concentração-resposta confirmada. Não foi possível definir o caráter agonista / antagonista bem como a afinidade, e a concentração da toxina, devido a limitação de material. A peçonha de *M. lemniscatus* possui uma diversidade de toxinas 3FTxs as quais são de difícil purificação, porém evidenciamos pela primeira vez uma toxina muscarínica M3, provavelmente agonista, através da ligação direta ao receptor. Para o segundo capítulo desta tese, 18 peptídeos foram selecionados, a partir do consórcio VENOMICS, com padrão de cisteínas CC_C_C (clássico de α -conotoxinas) potencialmente ativos na TC. Os peptídeos foram sintetizados quimicamente e caracterizados quanto ao alvo farmacológico. Nenhuma das sequências apresentou atividade adrenérgica $\alpha 1$, muscarínica M1, ou nicotínica neuronal ($\alpha 3\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$ e a quimera $\alpha 7$ -5HT3). Adicionalmente, a atividade dos 18 peptídeos foi avaliada sobre a junção neuromuscular de hemidiafragma de ratos, e 2 deles, potencializaram a contração enquanto outros 2 a inibiram. Dentre esses peptídeos ativos, avaliou-se a atividade nicotínica Torpedo, através de técnicas de *binding* e eletrofisiologia. Apenas P010378*

competiu de maneira concentração dependente com o radioligante, enquanto ambos isômeros de P020581 reduziram a corrente residual de ACh, de maneira também concentração dependente, em ovócitos de *Xenopus* incorporados com $2\alpha 1\beta 1\delta\gamma$. Cinco das amostras iniciais mostraram atividade nicotínica muscular, apesar de não serem completamente caracterizadas. Esses estudos de prospecção abrem um enorme espaço de investigação para descobertas de novas toxinas com diferentes perfis de seletividade e interação aos receptores colinérgicos. Uma grande limitação da bioprospecção tradicional de compostos nativos, é a quantidade considerável de material necessário. Por isso os avanços tecnológicos têm contribuído significativamente para a melhoria da investigação das peçonhas e as abordagens ômicas tem um papel essencial no desenvolvimento de toxinas como ferramentas terapêuticas.

Palavras-chave: toxinas, *three fingers*, transmissão colinérgica, Elapidae, *Micrurus*, *Conus*, conotoxinas, Venomics

ABSTRACT

Toxins from animal venoms went through great evolutionary pressure, which undoubtedly contributed for their high affinity and selectivity to their molecular targets. Therefore, they constitute unlimited resources for the discovery of new drug candidates. There is a diversity of possible targets for animal toxins, however here I would like to highlight the cholinergic transmission (CT). Among the protein toxins which have CT as a target, one of the most abundant families correspond to the three fingers toxins (3FTxs) - found mainly in Elapidae snake venoms - and the α -conotoxins, isolated from the venom of marine gastropod molluscs of the genus *Conus*. This thesis comprehends an introduction about the potential toxins which might modulate CT and 2 different chapters: prospecting of 3FTxs of a Brazilian coral snake specie and prospecting of new α -conotoxin subfamilies. Therefore, for the accomplishment of the first part of the thesis, the venom of *Micrurus lemniscatus* was fractioned by HPLC and MI4 toxin (7201.12 Da) was isolated, chemically synthesized and studied on muscarinic and nicotinic receptors by binding techniques and inositol monophosphate (IP1) measurement. MI4 demonstrated M3 muscarinic and Torpedo nicotinic activity, on the other hand it did not show any cytotoxicity. Surprisingly, the synthetic version of MI4, MiLTx1, had no effect on CT even at concentrations 100x higher than those tested for the native toxin. Both toxins share the same sequence, mass and fragmentation pattern. However, when the native toxin and its synthetic version were co-injected in reverse phase chromatography, they exhibit 3 min difference in elution time, confirming that they are not identical. One of the hypothesis for this difference is the presence of D-aminoacids in MI4 or that the major peak of MI4 is not responsible for the observed cholinergic activity. Some minor contaminant, could explain this contradictory result. MonoS8, the fraction from where MI4 was firstly purified, showed activity on M3 and Torpedo receptors, as expected. However, the observed muscarinic response was agonism and not antagonism, as previously observed for MI4. After that, MonoS8 was purified and only 6 toxins obtained could be submitted to activity verification. MonoS8 7 (6782.7 Da) was the only peak / toxin that could compete with the radioligand and then had its concentration-response activity confirmed. However, agonist / antagonist character as well as the affinity and concentration of the toxin, were not possible to be determined due to the limited amount of material. The venom of *M. lemniscatus* has a myriad of 3FTxs toxins which are difficult to purify. However, for the first time, we have detected a M3 muscarinic, probable agonist, toxin through direct binding to the receptor. On the second chapter of this thesis, 18 peptides were selected from the VENOMICS Project, with cysteine pattern CC_C_C (classical α -conotoxins) potentially active on CT. The peptides were chemically synthesized and characterized according to its pharmacological target. None of them showed adrenergic α 1, muscarinic M1, or neuronal nicotinic activities (α 3 β 2, α 3 β 4, α 4 β 2 and α 7-5HT3 chimera). In addition, the activity of the 18 peptides was evaluated on the neuromuscular junction of rat hemidiaphragm and our data have shown that 2 peptides potentiated and 2 inhibited the contraction. Among those active peptides, the Torpedo nicotinic activity was evaluated in isolated receptors through

binding and electrophysiology techniques. Only P010378* competed in a concentration dependent manner with the radioligand. Furthermore, both isomers of P020581 reduced the residual current of ACh in *Xenopus* oocytes incorporated $2\alpha 1\beta 1\delta\gamma$ receptors. Five of the initial samples showed a muscle nicotinic activity, although these toxins could not be completely characterized. Our prospecting studies highlights a promising research field for discovering new toxins with different profiles of selectivity and interaction with cholinergic receptors. A major limitation of bioprospecting native compounds is the considerable amount of material required. Therefore, technological advances have contributed significantly to the improvement of venom research, and omics approach play an essential role in the development of toxins as therapeutic tools.

Keywords : toxins, three fingers, cholinergic transmission, Elapidae, *Micrurus*, *Conus*, conotoxins, Venomics

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Estrutura do receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR).....	26
Figura 2 Representação esquemática de um membro típico da classe de receptores acoplado à proteína G.....	28
Figura 3 <i>Micrurus lemniscatus</i>	33
Figura 4 Estruturas tridimensionais de toxinas <i>three fingers</i> (3FTx).....	35
Figura 5 Transferência de energia de ressonância fluorescente entre um doador e uma molécula aceptora, por HTRF®.....	51
Figura 6 Representação esquemática da formação de uma ligação amida.....	53
Figura 7 Fracionamento da peçonha da serpente <i>Micrurus lemniscatus</i>	57
Figura 8 Fracionamento da peçonha da serpente <i>Micrurus lemniscatus</i> e obtenção da toxina M14	61
Figura 9 Verificação de pureza e identificação da massa da toxina M14.....	62
Figura 10 Sequenciamento da toxina M14.....	63
Figura 11 Curvas de competição da toxina M14 <i>versus</i> [3H]N-metilescopolamina, em membranas expressando receptores muscarínicos.....	65
Figura 12 Quantificação da liberação de monofosfato inositol (IP1) mediada pela toxina M14 sobre receptores muscarínicos humanos hM3 expressos em células CHO.....	66
Figura 13 Competição da toxina M14 <i>versus</i> 125I-Tyr54- α -bungarotoxina em membranas expressando receptores nicotínicos Torpedo - 2 α 1 β 1 δ γ	67
Figura 14 Ensaio de toxicidade celular.....	68
Figura 15 Síntese química da toxina MiLTx1.....	70
Figura 16 Perfil analítico da toxina sintética MiLTx1.....	71
Figura 17 Espectroscopia de dicroísmo circular.....	72
Figura 18 Curvas de competição da toxina MiLTx1 <i>versus</i> [3H]N-metilescopolamina, em membranas expressando receptores muscarínicos (mAChR).....	73
Figura 19 Quantificação de monofosfato inositol (IP1) mediada pela toxina MiLTx1 sobre receptores muscarínicos hM3 expressos em células CHO.....	74
Figura 20 Curvas de competição da toxina MiLTx1 <i>versus</i> 125I-Tyr54- α -bungarotoxina em membranas expressando receptores nicotínicos Torpedo - 2 α 1 β 1 δ γ	75
Figura 21 Perfis de eluição das toxinas nativa M14 e toxinas sintéticas MiLTx1, co-injetadas em sistema HPLC.....	76
Figura 22 Fracionamento da peçonha da serpente <i>Micrurus lemniscatus</i> e obtenção da fração MonoS8.....	78
Figura 23 Curvas de competição da fração MonoS8 <i>versus</i> [3H]N-metilescopolamina, em membranas expressando receptores muscarínicos (mAChR).....	79
Figura 24 Quantificação da liberação de monofosfato inositol (IP1) mediada pela MonoS8 sobre receptores muscarínicos M3 expressos em células CHO.....	80
Figura 25 Ensaio de toxicidade celular.....	81
Figura 26 Fracionamento da MonoS8 e obtenção das toxinas puras.....	82
Figura 27 Competição das toxinas isoladas da fração MonoS8 <i>versus</i> [3H]N-metilescopolamina, em membranas expressando receptores muscarínicos M3.....	83
Figura 28 Figura conclusão - capítulo 1.....	88
Figura 29 Diversidade morfológica de <i>Conus</i>	91
Figura 30 Aparato venenoso de <i>Conus</i>	92
Figura 31 Nomenclatura de conotoxinas.....	95
Figura 32 Classificação de conopeptídeos em categorias.....	96
Figura 33 Organização da proteína precursora de um conopeptídeo.....	97
Figura 34 Comparação entre prepropeptídeos da superfamília A.....	100
Figura 35 Peptídeos isolados de <i>Conus</i>	105
Figura 36 Isômeros estruturais das α -conotoxinas com padrão de cisteínas I.....	106
Figura 37 Fluxo de trabalho da plataforma Tag-lite® (Cisbio) para construção do receptor-SNAP-lumi4®-Tb e ensaios de competição com sondas fluorescentes.....	126
Figura 38 Ilustração do sistema utilizado para registrar a contração do músculo.....	128

Figura 39 Competição das conotoxinas <i>versus</i> o antagonista Bodipy-prazosin® em células HEK-293 expressando receptores adrenérgica $\alpha 1$	135
Figura 40 Competição das conotoxinas <i>versus</i> o antagonista telenzepina D2 em células HEK-293 expressando receptores muscarínicos M1	137
Figura 41 Competição das conotoxinas <i>versus</i> [3H]N-metilescopolamina em membranas expressando receptores muscarínicos M1 (mAChR).....	138
Figura 42 Competição das conotoxinas <i>versus</i> [3H]-epibatidina ou 125I-Tyr54- α -BgTx em membranas expressando receptores nicotínicos neuronais.....	140
Figura 43 Curvas de competição das conotoxinas P010378* A, B e P010389 <i>versus</i> [3H]-epibatidina em membranas expressando receptores nicotínicos neuronais $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$	142
Figura 44 Inibição da amplitude de contração promovida pelas conotoxinas em preparações neuromusculares em modelo de hemidiafragma de rato	144
Figura 45 Curva de competição das conotoxinas <i>versus</i> 125I-Tyr54- α -bungarotoxina em membranas expressando receptores nicotínicos Torpedo - $2\alpha 1\beta 1\delta\gamma$	145
Figura 46 Avaliação do possível efeito nas correntes residuais de ACh de receptores nicotínicos Torpedo - $2\alpha 1\beta 1\delta\gamma$, em HiClamp, para as conotoxinas P010404, P014710 e P020581	146
Figura 47 Avaliação do possível efeito nas correntes residuais de ACh de receptores nicotínicos Torpedo - $2\alpha 1\beta 1\delta\gamma$, em HiClamp, para os isômeros P020581	147
Figura 48 Figura conclusão - Capítulo 2.....	153

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Exemplos de drogas derivadas de proteínas de venenos animais, aprovadas pelo FDA (<i>Food and Drug Administration</i>)	24
Tabela 2 Dose letal média (DL50) calculada a partir da peçonha de serpentes do gênero <i>Micrurus</i> ..	32
Tabela 3 Classificação estrutural das neurotoxinas <i>three fingers</i> de venenos de serpentes que interagem com receptor nicotínico muscular de acetilcolina	36
Tabela 4 Constantes de inibição para toxinas muscarínicas.....	39
Tabela 5 Padronização das etapas de purificação das toxinas da peçonha da serpente <i>Micrurus lemniscatus</i> , com massa próxima a 7.200 Da.....	44
Tabela 6 Sequências dos fragmentos das toxinas obtidos por: a) digestão enzimática seguido de MS/MS, b) ISD e c) degradação de Edman	59
Tabela 7 Superfamília de genes de conotoxinas.....	99
Tabela 8 Padrão de cisteínas das conotoxinas	102
Tabela 9 Alvos farmacológicos das conotoxinas	104
Tabela 10 Conopeptídeos como agentes farmacêuticos para tratamento de uma gama de distúrbios neurológicos	109
Tabela 11 Proporção de DNA utilizado para transfecção dos diferentes subtipos de receptores nicotínicos neuronais em células de rim embrionário humano (tsA-201).....	121
Tabela 12 Sequências com padrão de cisteínas característico das α -conotoxinas (CC-C-C) selecionadas à partir da plataforma Mambaz	132
Tabela 13 Conotoxinas submetidas aos testes farmacológicos	134

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 3FTx: *three fingers toxins*
- 5-HT₃: receptor 5-hydroxitriptamina 3
- α -Bgtx: α -Bungaratoxina
- ACh: acetilcolina
- AChE: acetilcolinesterase
- AChBP: *ACh Binding Protein*
- ACN: acetonitrila
- BSA: *bovine serum albumin* / soro bovino albumina
- BT: *binding* total
- cAMP: adenosina monofosfato cíclico
- CB: carbacol
- CD: espectroscopia de dicroísmo circular
- CHO: células de ovário de hamster chinês
- CMV: promotor de citomegalovírus
- CPM: contagens por minuto
- Da: Dalton (unidade de medida de massa molecular / equivalente a grama/mol)
- DAG: 1,2-diacilglicerol
- DCM: diclorometano
- DMSO: dimetilsulfóxido
- DPM: desintegração por minuto
- DTT: ditioneitol
- EDTA: ácido etileno-diaminotetra-acético
- FDA: *United States Food and Drug Administration*
- Fmoc: grupo 9-fluorenilmetoxicarbonila
- FRET: *Fluorescence Resonance Energy Transfer Technology*
- GPCR: *G protein-coupled receptors* / receptores acoplados à proteína G
- GSH: glutationa em sua forma reduzida
- GSSG: glutationa em sua forma oxidada
- HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (ácido 2-etanossulfônico)
- HPLC: *High performance liquid chromatography* (Cromatografia líquida de alta eficiência)
- HTRF: *Homogeneous Time Resolved Fluorescence*
- IP1: monofosfato de inositol
- IP3: inositol 1,4,5-trisfosfato
- ISD: *In Source Decay*
- LC-MS: cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas

LGIC: canais ionotrópicos regulados por ligantes
MALDI: *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*
MLA: Metil-caconitina
MS: espectrometria de massas
MS/MS: espectrometria de massas em *tandem*
m/z: relação massa sobre carga
nAChR: receptor nicotínico de acetilcolina
NE: noradrenalina
NMDA: receptor de ácido N-metil-D-aspártico
NMM: N-metilmorfolina
NMP: N-metilpirrolidona
NMS: N-metilescopolamina
NS: *binding* não específico
PBS: *Phosphate-buffered saline*
pH: concentração hidrogeniônica
PEI: polietileno-imina
PIP2: 4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol
PLA2: fosfolipase A2
ppm: parte por milhão
PTMs: modificação pós traducional
PTH-AA: aminoácido em fenil tio-hidantoína
RPC: *Reversed Phase Chromatography*
RyR: receptores de rianodina
SNC: sistema nervoso central
SNP: sistema nervoso periférico
TCEP: Tris(carboxyethyl)phosphine
TFA: ácido tricloroacético
TIPS: triisopropilsilano
TOF: *time-of-flight*
TR: *Time resolved Measurement*
UV: ultravioleta

Notação dos aminoácidos

Aminoácido	Símbolo	Código de letra única
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Ácido aspártico	Asp	D
Asparagina	Asn	N
Cisteína	Cys	C
Ácido glutâmico	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

Alfabeto grego

Pronúncia	Minúscula	Maiúscula
alfa	α	A
beta	β	B
gama	γ	Γ
delta	δ	Δ
épsilon	ϵ	E
dzeta	ζ	Z
eta	η	H
teta	θ	Θ
iota	ι	I
capa	κ	K
lâmbda	λ	Λ
mi	μ	M

Pronúncia	Minúscula	Maiúscula
ni	ν	N
ksi	ξ	Ξ
omicron	\omicron	O
pi	π	Π
rho	ρ	P
sigma	σ	Σ
tau	τ	T
upsilon	υ	Y
phi	ϕ	Φ
khi	χ	X
psi	ψ	Ψ
ômega	ω	Ω

SUMÁRIO

Introdução geral	22
Capítulo 1	30
Toxinas “<i>three fingers</i>” e a neurotransmissão colinérgica	
1 INTRODUÇÃO	31
1.1 Biologia de serpentes Elapidae.....	31
1.2 Composição da peçonha Elapidae	33
1.2.1 Toxinas <i>three fingers</i> (3FTxs)	34
1.3 Toxinas <i>three fingers</i> e a neurotransmissão colinérgica	37
1.3.1 Receptores nicotínicos	37
1.3.2 Receptores muscarínicos.....	38
2 JUSTIFICATIVA.....	40
3 OBJETIVOS	41
3.1 Objetivos específicos.....	41
4 MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 Material.....	42
4.1.1 Químicos, toxinas, radioligantes e fluoróforo.....	42
4.1.2 Materiais biológicos.....	42
4.2 Estratégias de fracionamento e purificação das toxinas	43
4.3 Espectrometria de massas	45
4.4 Sequenciamento de proteínas	45
4.4.1 <i>In Source Decay</i> (ISD).....	45
4.4.2 Digestão enzimática e sequenciamento “de novo”	46
4.4.3 Degradação de Edman	46
4.5 Processamento dos espectros de massa e busca de similaridades de sequências em banco de dados.....	47
4.6 Quantificação do conteúdo proteico	47
4.7 Preparação de membranas	48
4.7.1 Preparação de membranas expressando diferentes receptores muscarínicos (mAChR)...	48
4.7.2 Preparação de membranas Torpedo.....	48
4.8 <i>Binding</i> : ensaios de competição.....	49
4.8.1 Ensaios de competição em membranas expressando receptores muscarínicos humanos (mAChR hM1-5)	49
4.8.2 Ensaios de competição em membranas expressando receptores nicotínicos Torpedo - $2\alpha 1\beta 1\delta\gamma$	49
4.8.3 Quantificação do traçador radioativo e análise dos dados	50
4.9 Cultura de células	50
4.10 Quantificação de monofosfato de inositol (IP1)	50
4.11 Teste de viabilidade celular	52

4.12 Síntese química.....	53
4.12.1 <i>Folding</i> e caracterização	55
4.12.2 Co-injeção.....	55
4.13 Espectroscopia de Dicroísmo Circular	55
5 Resultados	56
5.1 Purificação e sequenciamento das toxinas e busca por similaridade em bancos de dados	56
5.2 Caracterização da atividade farmacológica da toxina M14	64
5.3 Síntese química da toxina nativa M14 - MiLTx1	68
5.4 Caracterização farmacológica da toxina sintética MiLTx1	72
5.5 Co-injeção.....	76
5.6 Identificação e caracterização de toxinas na fração MonoS8	77
6 Discussão.....	84
7 Conclusão.....	87
8 Perspectivas.....	89
Capítulo 2.....	90
α-Conotoxinas “<i>scaffold</i>” e a neurotransmissão colinérgica	
1 INTRODUÇÃO	91
1.1 Biologia de cones marinhos	91
1.2 Composição da peçonha.....	93
1.3 Nomenclatura dos conopeptídeos	94
1.4 Classificação dos conopeptídeos	95
1.4.1 Superfamília de genes.....	97
1.4.1.1 Classificação em superfamílias.....	98
1.4.1.2 Superfamília A.....	100
1.4.2 Padrão de cisteína	101
1.4.3 Famílias farmacológicas	103
1.4.3.1 α -conotoxinas.....	105
1.5 Conotoxinas: produtos naturais como fármacos.....	107
1.6 Consórcio Venomics.....	111
2 JUSTIFICATIVA.....	113
3 OBJETIVOS	115
3.1 Objetivos específicos.....	115
4 MATERIAL E MÉTODOS	116
4.1 Material	116
4.1.1 Químicos, toxinas, radioligantes e fluoróforos.....	116
4.1.2 Animais e materiais biológicos.....	117
4.2 Métodos.....	117
4.2.1 Identificação e seleção das sequências	117
4.2.2 Síntese química.....	118

4.2.2.1 <i>Folding</i> e caracterização	118
4.2.3 Quantificação do conteúdo proteico	119
4.2.4 Expressão de nAChR em células de rim embrionário humano (HEK)	120
4.2.4.1 Bactéria e condições de cultivo	120
4.2.4.2 Transformação bacteriana.....	120
4.2.4.3 Purificação do DNA plasmidial.....	120
4.2.4.4 Transfecção em células tsA-201	121
4.2.4.5 Recuperação das células	121
4.2.5 Preparação de membranas Torpedo.....	122
4.2.6 <i>Binding</i> : ensaios de competição utilizando traçadores radioativos.....	122
4.2.6.1 Ensaios de competição em membranas expressando receptores nicotínicos neuronais: $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$ e $\alpha 7$ -5HT ₃	122
4.2.6.2 Ensaios de competição em membranas expressando receptor nicotínico muscular: Torpedo - $2\alpha 1\beta 1\delta\gamma$	123
4.2.6.3 Ensaios de competição em membranas expressando receptor muscarínico (m AChR M1)	123
4.2.6.4 Quantificação do traçador radioativo e análise dos dados	123
4.2.7 <i>Binding</i> : ensaios de competição utilizando sondas fluorescentes.....	123
4.2.7.1 Tecnologia HTRF®	123
4.2.7.2 Tecnologia SNAP-tag®.....	124
I - Plasmídeo codificador do receptor de interesse fundido a SNAP.....	124
II - Transfecção e expressão dos receptores-SNAP.....	124
III - Marcação dos receptores-SNAP com Lumi4-Terbium (-tag®)	124
4.2.7.3 Ensaios de competição em membranas expressando receptores muscarínicos hM1- SNAP-tag® e adrenérgicos $\alpha 1$ -SNAP-tag®, conjugados com o fluoróforo HTRF correspondente	127
4.2.8 Registro da força contrátil de preparações neuromusculares de ratas	127
4.2.8.1 Eutanásia e dissecação.....	127
4.2.8.2 Registro da força contrátil.....	128
4.2.9 Efeito na corrente residual de acetilcolina de nAChR Torpedo microtransplantados em ovócitos de <i>Xenopus</i>	129
4.2.9.1 Extração de ovócitos de <i>Xenopus</i>	129
4.2.9.2 Microtransplantação dos nAChR Torpedo em ovócitos de <i>Xenopus</i>	130
4.2.9.3 Registros eletrofisiológicos.....	130
5 Resultados	131
5.1 Seleção das sequências de conotoxinas	131
5.2 Síntese química das sequências de conotoxinas selecionadas	133
5.3 Atividade farmacológica das conotoxinas	134
5.3.1 Investigação da possível atividade adrenérgica $\alpha 1$ em ensaios de <i>binding</i> utilizando sondas fluorescentes	135
5.3.2 Investigação da possível atividade muscarínica M1 em ensaios de <i>binding</i> utilizando sondas fluorescentes e radioativas	136

5.3.3 Investigação da possível atividade nicotínica neuronal $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$ e $\alpha 7$ -5HT ₃ em ensaios de <i>binding</i>	139
5.3.5 Investigação da possível atividade das conotoxinas sobre preparações neuromusculares em modelo de hemidiafragma de rata.....	143
Figura 44 Inibição da amplitude de contração promovida pelas conotoxinas em preparações neuromusculares em modelo de hemidiafragma de rato.....	144
5.3.5 Investigação da possível atividade nicotínica Torpedo - $2\alpha 1\beta 1\delta\gamma$ em ensaios de <i>binding</i>	144
5.3.6 Investigação do possível efeito nas correntes residuais de ACh de receptores nicotínicos Torpedo - $2\alpha 1\beta 1\delta\gamma$, incorporados em ovócitos de <i>Xenopus laevis</i>	145
6 Discussão.....	148
7 Conclusão.....	152
8 Perspectivas.....	155
Conclusão geral.....	155
Referências bibliográficas.....	157
Apêndice.....	
Anexos.....	

INTRODUÇÃO GERAL

A produção de toxinas por uma grande variedade de organismos que vão desde células únicas (bactérias, fungos) a seres complexos (como plantas e animais) é um fenômeno bem conhecido na biologia, permitindo que esses organismos respondam ao meio ambiente de forma defensiva ou ofensiva (Lahiani *et al.*, 2017). Os peptídeos e as proteínas dos venenos vem sendo aperfeiçoados ao longo de milhões de anos, sob pressão evolutiva, para atingirem seus alvos com alta afinidade e em muitos casos, com refinada seletividade (King, 2011). De fato, a gama de agentes químicos disponíveis, a partir de fontes naturais, pode ser considerada o ápice de um programa de descoberta de drogas com recursos ilimitados (King, 2011).

A história do uso de venenos animais como fonte de tratamentos médicos é muito antiga. O uso da peçonha de serpentes pela medicina Ayurveda - para prolongar a vida, tratar artrite e doenças gastrointestinais - data do século VII a.c., enquanto as secreções secas da pele de sapo são utilizadas há mais de 1.000 anos pela medicina chinesa, como agentes diuréticos, anestésicos e anticancerígenos. Tarântulas são utilizadas na medicina tradicional indígena do México, da América Central e do Sul, para tratar uma variedade de doenças que variam de asma a câncer; e peçonhas de serpentes, desde a década de 30, para tratar condições de poliomielite, esclerose múltipla, reumatismo, dor intensa e neuralgia do trigêmeo (King, 2011). No entanto, a era moderna do uso de drogas, baseada em venenos, começou na década de 70, com o desenvolvimento do captopril®, a partir de componentes da peçonha da serpente brasileira *Bothrops jaracaca* (Ferreira, 1965; Cushman e Ondetti, 1991; Opie e Kowolik, 1995).

Numerosas toxinas peptídicas e proteicas derivadas de peçonhas, estão em fase de ensaios clínicos ou pré-clínicos, sendo utilizadas para uma gama de terapias, incluindo câncer, dor crônica, insuficiência cardíaca congestiva, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral e doenças autoimunes, tais como esclerose múltipla. Existem cerca de sessenta medicamentos peptídicos no mercado (alguns são exemplificados na **Tabela 1**) e em 2010 eles arrecadaram juntos, US\$13 bilhões (Thayer, 2011).

O número de toxinas isoladas e identificadas cresce constantemente, e suas estruturas moleculares e mecanismos de ação, vem sendo cada vez melhor elucidados. A grande maioria dessas toxinas atua por meio de modulação de cascatas de sinalização, essenciais à célula eucariótica, ou por interferência direta com o equilíbrio iônico, mantido pela barreira da membrana celular (Gutman e Lazarovici, 1997).

Uma vez iniciada a interação celular toxina-hospedeiro, as respostas bioquímicas subsequentes são perturbadas e, na maioria dos casos, uma resposta patológica é evidente, podendo levar inclusive à morte celular. Processos intracelulares vitais, como metabolismo energético, modificações pós-

tradicionais, estabilidade do citoesqueleto, expressão gênica, motilidade, secreção, divisão celular e outras funções específicas, podem ser comprometidas. Sob condições fisiológicas, a interação de alvos celulares com seus ligantes naturais resulta em alterações controladas dos níveis intracelulares de segundos mensageiros, tais como adenosina monofosfato cíclico (cAMP), Ca^{2+} , inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3) ou 1,2-diacilglicerol (DAG) (Lahiani *et al.*, 2017).

Entre essa diversidade de alvos, destaco a transmissão colinérgica, conduzida pela acetilcolina (ACh). O estudo da sinalização colinérgica em nível periférico e central tem sido intenso objeto de pesquisa, em grande parte, devido à associação da transmissão colinérgica com um número considerável de doenças neurológicas, mas também porque um amplo repertório de toxinas naturais e sintéticas tem como alvo, um ou outro componente de suas sinapses (Prado *et al.*, 2017).

A ACh foi identificada por Sir Henry Dale em 1914-15, mas foi Otto Loewi quem primeiro demonstrou seu papel como um mensageiro químico ou neurotransmissor. Descobertas importantes evidenciaram o papel da ACh não-neuronal (Wessler e Kirkpatrick, 2008; Kessler *et al.*, 2017; Wessler e Kirkpatrick, 2017), modulando e controlando a proliferação celular, diferenciação, secreção, migração, apoptose, locomoção, eventos angiogênicos, organização do citoesqueleto e movimentos de íons e água (Wessler e Kirkpatrick, 2008; Campoy *et al.*, 2016), juntamente com regulação da resposta anti-inflamatória (Rosas-Ballina *et al.*, 2011), secreção de insulina (Rodriguez-Diaz *et al.*, 2011) e função cardíaca (Roy *et al.*, 2013; Roy *et al.*, 2016). Além da sua atividade moduladora, a ACh também atua como um dos principais neurotransmissores no sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP). No SNC, ela está envolvida na termorregulação, controle motor e processos cognitivos como atenção, memória, aprendizagem e alerta, enquanto que no SNP, via inervação parasimpática, a ACh controla funções como contração da muscular lisa, homeostase, modulação de taxa e força cardíaca e secreção glandular (Westfall e Westfall, 2011; Kessler *et al.*, 2017; Naser e Kuner, 2017).

Receptores nicotínicos para ACh (nAChR) são canais ionotrópicos regulados por ligantes (LGIC) e fazem parte de um grupo discreto de canais iônicos que se abrem e conduzem íons em resposta a ligantes específicos (Alexander, Peters, *et al.*, 2015). A interação com o ligante causa uma mudança conformacional na estrutura do receptor proteico, promovendo a abertura do canal, pelo qual os íons permeáveis fluem por um processo passivo conduzido pelo gradiente eletroquímico e, em última instância, resulta na despolarização da membrana. A modulação do bloqueio pode ocorrer através da ligação de moduladores alostéricos endógenos ou exógenos. No SNC e na junção neuromuscular, os LGICs medeiam a transmissão sináptica rápida, em intervalos de μs à ms. Essa transmissão envolve a liberação de um neurotransmissor pré-sináptico e a subsequente ativação de receptores pós-sinápticos. Muitas toxinas de serpentes, como a toxina *three finger* (3FTx) α -Bungaratoxina (α -BgTx) (Utkin, 2013) tem o nAChR como alvo.

Tabela 1 Exemplos de drogas derivadas de proteínas de venenos animais, aprovadas pelo FDA (*Food and Drug Administration*)

Protein or derivative	Number of residues	Disulfide bonds	Source of venom protein	Molecular target	Mode of delivery	Indication	Plasma half-life (h)	FDA approval	Company	Ref.
Captopril [‡] (Capoten [®])	Non-peptide mimetic	0	Pit viper (snake)	ACE	Oral	Hypertension	1.9	1981	Bristol-Myers Squibb	[15]
Eptifibatide [§] (Integrilin [®])	6 (cyclic)	0	Pygmy rattlesnake	$\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin receptor	Parenteral (intravenous infusion)	Acute coronary syndromes	2.5	1998	Merck	[84]
Tirofiban [¶] (Aggrastat [®])	Non-peptide mimetic	0	Saw-scaled viper (snake)	$\alpha_{IIb}\beta_3$ integrin receptor	Parenteral (intravenous infusion)	Acute coronary syndromes	2.0	1999	Iroko Cardio and Merck (USA only)	[85]
Bivalirudin [#] (Angiomax [®])	20	0	Medicinal leech	Thrombin	Parenteral (intravenous infusion)	Coagulation during surgery	~ 0.5	2000	The Medicines Co.	[86]
Ziconotide ^{**} (Prialt [®])	25	3	Cone snail	Ca _v 2.2 channel	Intrathecal	Chronic pain	< 1.0	2004	Azur Pharma and Eisai (Europe)	[87]
Exenatide (Byetta [®])	39	0	Lizard (Gila monster)	GLP-1 receptor ^{††}	Parenteral (subcutaneous injection)	Type 2 diabetes	2.4	2005	Amylin and Eli Lilly	[88]
Batroxobin (Baquting)	231	6	Lancehead snake	Fibrinogen	Parenteral (i.v. infusion)	Perioperative bleeding	2.0 (rats)	Outside USA ^{§§}	Nuokang Biopharma	[89]

*Drugs are listed in order of year of FDA approval.

[‡]Mimic of the active site of the ACE inhibitor teprotide.

[§]Mimic of KGD sequence in the snake disintegrin barbourin.

[¶]Mimic of RGD sequence in the snake disintegrin echistatin.

[#]Bivalirudin is a synthetic analog of hirudin, a direct thrombin inhibitor from the saliva of the medicinal leech *Hirudo medicinalis*.

^{**}Ziconotide (also known as SNX-11) is a synthetic version of ω -conotoxin MVIIA.

^{††}Glucagon-like peptide 1 receptor (a G protein-coupled receptor).

^{§§}Batroxobin is only used clinically outside of the USA to treat a range of thrombotic disorders, include stroke, pulmonary embolism, deep vein thrombosis, myocardial infarction and (primarily in China) perioperative bleeding.

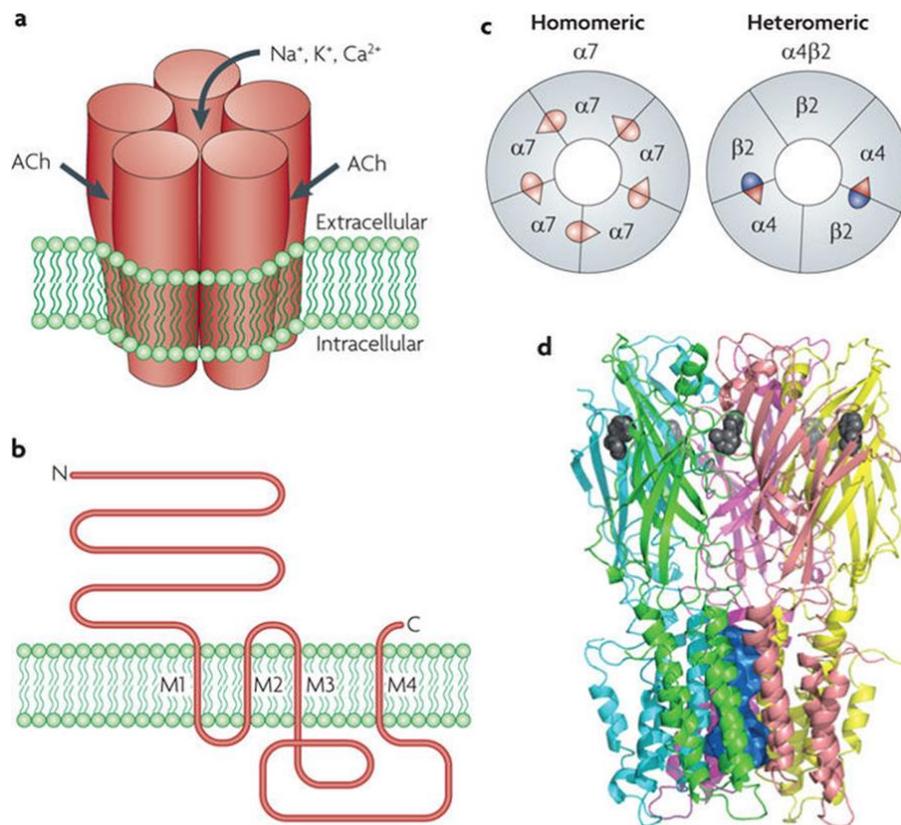
Fonte: (King, 2011)

Os nAChRs são proteínas alostéricas transmembranares de aproximadamente 290 kDa que estão envolvidos em respostas iônicas à ACh (Corringer *et al.*, 2000; Grutter e Changeux, 2001; Karlin, 2002). Todos nAChR são formados pela associação de cinco subunidades dispostas simetricamente em torno do poro iônico em um plano perpendicular à membrana (**Figura 1**) formando um canal catiônico permeável a Na⁺, K⁺ e, em alguns casos, aos íons Ca²⁺ (Taly *et al.*, 2009).

Cada subunidade é composta por um grande domínio amino terminal que contribui para a formação do poro de ligação; quatro domínios que atravessam a membrana (M1, M2, M3, M4); um loop citoplasmático grande e variável entre M3 e M4; e um loop pequeno extracelular na porção C-terminal. Os domínios M2 das cinco subunidades contribuem para a formação do poro do canal catiônico (Nirathanan e Gwee, 2004). Foram identificados genes que codificam um total de 17 subunidades - α 1-10, β 1-4, γ , δ e ϵ (Alexander *et al.*, 2017) e todas as subunidades, com exceção de α 8 (presente apenas em aves), foram descritas em mamíferos. Os sítios de ligação do ligante ortostérico são formados por resíduos dentro de pelo menos três domínios peptídicos na subunidade α (componente principal) e três na subunidade adjacente (componente complementar).

Os nAChR musculares estão presentes na junção neuromuscular de animais adultos na estequiometria $2\alpha 1\beta 1\delta\epsilon$, enquanto no músculo esquelético embrionário predomina $2\alpha 1\beta 1\delta\gamma$, a mesma configuração encontrada nos órgãos elétricos de *Torpedo marmorata* - modelo muito utilizado para estudos *in vitro*.

Os nAChRs $\alpha 7$ e $\alpha 4\beta 2$ são amplamente expressos no CNS, enquanto outros nAChR as subunidades têm uma expressão mais restritas (Gotti *et al.*, 2009). Outros receptores nicotínicos são montados como combinações das subunidades α (2-6) e β (2-4). Para as subunidades $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ e $\beta 2$ e $\beta 4$, combinações em pares de α e β (por exemplo, $\alpha 3\beta 4$ e $\alpha 4\beta 2$) são suficientes para formar um receptor funcional *in vitro*, mas muito mais configurações podem existir *in vivo*. É a variabilidade da estequiometria das subunidades que influencia as propriedades biofísicas e características farmacológicas do receptor. As subunidades $\alpha 7$, $\alpha 8$ e $\alpha 9$ são funcionais homopentaméricas, mas também podem combinar com uma segunda subunidade para constituir uma montagem heteromérica (Ex.: $\alpha 7\beta 2$ e $\alpha 9\alpha 10$) (Alexander *et al.*, 2017).



Nature Reviews | Neuroscience

Figura 1 Estrutura do receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR)

A figura resume a estrutura e organização dos nAChR. **A)** Os nAChRs são oligômeros transmembranares, permeáveis a cátions, constituídos por cinco subunidades. **B)** Cada subunidade consiste de um grande domínio extracelular amino-terminal, um domínio transmembrana e um domínio citoplasmático variável. O domínio extracelular, entre as subunidades, carrega os sítios de ligação à acetilcolina (ACh) - nicotina. O número de sítios de ligação por pentâmero, dependendo da sua composição, de dois (em nAChRs musculares ou nAChR do cérebro $\alpha 4\beta 2$) para cinco (no homopentâmero $\alpha 7$). Sítios para os moduladores alostéricos estão localizados no domínio transmembrana. **C)** Os dois tipos principais dos nAChRs cerebrais são o homomérico $\alpha 7$ e o heteromérico $\alpha 4\beta 2$. Além das subunidades principais ($\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ e $\alpha 6$) e subunidades complementares ($\beta 2$ e $\beta 4$) do nAChR, outras subunidades ($\alpha 5$ e $\beta 3$) também se organizam em vários hetero-oligômeros. **D)** Vista lateral de um modelo nAChR $\alpha 7$, mostrando cinco moléculas de nicotina (cinza escuro) nos sítios de ligação e o poro do canal iônico (azul escuro). Fonte: (Changeux, 2010)

Já os receptores acoplados à proteína G (GPCR), compartilham uma arquitetura comum: um único polipeptídeo com um N-terminal extracelular, um C-terminal intracelular e sete domínios hidrofóbicos helicoidais transmembranares (7TM) ligados por três circuitos extracelulares e três intracelulares. Em humanos, já foram identificados quase 800 GPCRs, dos quais mais de 50% exibem

funções sensoriais - olfato (~ 400), paladar (33), percepção de luz (10) e sinalização de feromônios (5). Os outros 350 GPCRs não sensoriais, medeiam a sinalização celular por ligantes que variam em tamanho de pequenas moléculas lipídicas a peptídeos e proteínas grandes (Alexander, Davenport, *et al.*, 2015; Lahiani *et al.*, 2017). Alguns dos GPCRs típicos são receptores colinérgicos muscarínicos (mAChR) (**Figura 2**) os quais respondem ao neurotransmissor ACh. Eles apresentam distribuição generalizada e estão envolvidos no controle de inúmeras respostas do sistema nervoso autônomo. Esta família de receptores acoplados à proteína G consiste em cinco membros designados M1-M5 (Bonner, 1989; Caulfield e Birdsall, 1998) e tem entre 460 e 590 resíduos de aminoácidos (Harvey, 2001). A família de genes como um todo, mostra 26,3% de identidade, sendo mais evidente as sequências correspondentes às alças intracelulares. O terceiro loop intracelular, região que interage com a proteína G, é particularmente variável, mostrando apenas 2,7% de identidade entre os subtipos, comparado com uma média de 66% de identidade encontrada nos domínios transmembranares conservados (Lahiani *et al.*, 2017). Os mAChR parecem possuir locais de ligação alostérica topograficamente distintos, com pelo menos um, localizado na alça extracelular e no segmento mais externo de diferentes hélices transmembranaras. Estes locais são menos conservados entre os subtipos de receptores e assim oferecem potencial para maior seletividade. Os 18 primeiros aminoácidos presentes no terceiro loop intracelular dos receptores M1, M3 e M5 possuem um alto grau de homologia enquanto, nos receptores M2 e M4, essa região é idêntica (Ishii e Kurachi, 2006).

Dessa forma, os mAChR são classicamente subdivididos em dois grandes grupos com base em sua eficiência de acoplamento primária para as proteínas G (Caulfield e Birdsall, 1998; Wess, 2004). Os subtipos ímpares (M1, M3 e M5) são conhecidos por se acoplarem a Gq, a qual estimula a atividade da fosfolipase C (PLC). O resultado imediato é a hidrólise do 4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol (PIP₂) presente na membrana em polifosfatos de inositol. O inositol 1,4,5-trisfosfato (IP₃), dada sua estrutura hidrossolúvel, migra pelo citosol e ativa receptores específicos de IP₃ (IP₃R) depletando os estoques de Ca²⁺ do retículo endoplasmático (RE). Aumentada a concentração de Ca²⁺ no citosol, os receptores de rianodina (RyR) são ativados pelo Ca²⁺ (liberação de Ca²⁺ induzida pelo Ca²⁺), auxiliando na depleção dos estoques de Ca²⁺ do RE e consequente ativação de fenômenos dependentes de Ca²⁺, como a contração do músculo liso e a secreção. O segundo produto da reação da PLC, o 1,2-diacilglicerol (DAG), associado à membrana plasmática devido à sua estrutura hidrofóbica, ativa a proteína cinase C (PKC) (em conjunto com Ca²⁺) e a fosfatidilserina. Esse braço da via atua na fosforilação de inúmeras proteínas, produzindo várias respostas fisiológicas. A ativação dos receptores M1, M3 e M5 também pode ativar a fosfolipase A₂ (PLA₂), levando a liberação de ácido araquidônico e a consequente síntese de eicosanoides que resulta na estimulação autócrina/parácrina da ciclase de adenilil com consequente aumento do AMP cíclico (AMPC). Estes efeitos são secundários a elevação de Ca²⁺ intracelular (Eglen, 2005; Brunton, 2012). M2 e M4 interagem preferencialmente via Gi/o, inibindo a atividade da adenilil-

ciclase, ativando os canais GIRK e inibindo canais para Ca^{2+} voltagem dependentes (Wess *et al.*, 2007). As consequências funcionais desses efeitos são hiperpolarização e a inibição das membranas excitáveis.

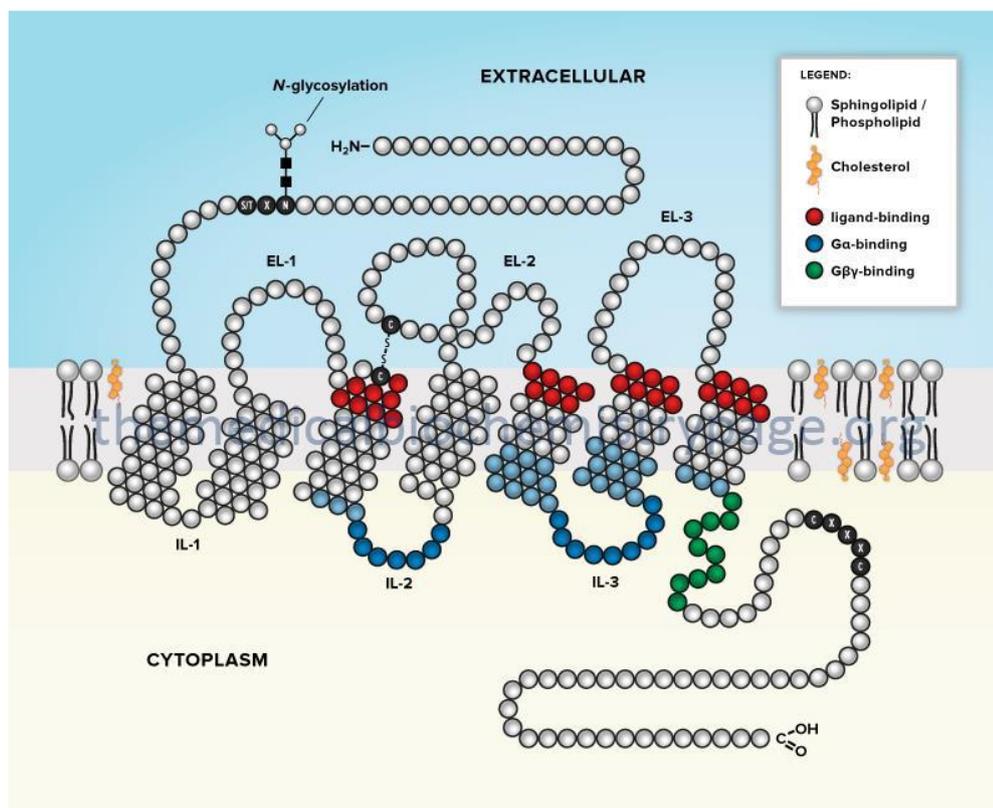


Figura 2 Representação esquemática de um membro típico da classe de receptores acoplado à proteína G

Os receptores muscarínicos possuem sete segmentos hidrofóbicos transmembranas. Esferas vermelhas, azuis e verdes representam os resíduos de aminoácidos importantes para ligação da acetilcolina (ACh) e da proteína G, assim como descrito no inserto da figura. Características estruturais incluem três alças extracelulares (EL-1, EL-2 e EL-3) e três alças intracelulares (IL-1, IL-2 e IL-3). (Fonte: <<http://themedicalbiochemistrypage.org/signal-transduction.php>>, acesso em 22 de julho de 2013)

As vias colinérgicas estão envolvidas na modulação de processos cognitivos, como atenção e memória. Isso vem sendo particularmente evidente na doença de Alzheimer, onde comprometimento da sinalização colinérgica evoca sintomas prejudiciais. Cientificamente, o sistema colinérgico é especialmente interessante devido à sua rica plasticidade, exemplificado pela expressão mutável de AChRs nicotínicos e muscarínicos durante estágios de desenvolvimento e envelhecimento, a modulação difere entre grupo de idade específica e de substâncias farmacológicas e recreativas (Wess, 2004; Melroy-Greif *et al.*, 2016). A modulação não só difere entre os grupos etários, mas também entre os

sexos. Por exemplo, o efeito analgésico de inibir a degradação de ACh via o inibidor de acetilcolinesterase (AChE), a neostigmina, mostrou ser 5x mais efetivo em ratos fêmeas que machos (Chiari *et al.*, 1999).

Além disso, muitos subtipos de receptores colinérgicos foram melhor compreendidos e completamente elucidados com auxílio de toxinas animais que reconhecem diferencialmente essas proteínas de membrana (King, 2011; Lahiani *et al.*, 2017). Essas toxinas que afetam a função colinérgica, foram selecionadas evolutivamente, e vem se tornando ferramentas para obtenção de informações sobre os mecanismos e papéis desempenhados pelos receptores colinérgicos, a AChE e elementos pré-sinápticos envolvidos na liberação da ACh. Kessler e colaboradores (2017), em um dos seus últimos trabalhos, destaca as toxinas *three fingers* (3FTxs) encontradas nas peçonhas de serpentes Elapidae, como importantes ferramentas moduladoras da neurotransmissão colinérgica devido à especificidade à diferentes receptores.

Tendo como base a diversidade e a seletividade de toxinas elapídicas para os receptores colinérgicos - representadas aqui pelas moléculas obtidas da peçonha da espécie *Micrurus lemniscatus*, bem como das α -conotoxinas obtidas do gênero *Conus*, neste trabalho realizou-se a prospecção e a caracterização de novas toxinas animais moduladoras desse sistema.

CAPÍTULO 1

TOXINAS “*THREE FINGERS*” E A NEUROTRANSMISSÃO COLINÉRGICA

1 INTRODUÇÃO

1.1 BIOLOGIA DE SERPENTES ELAPIDAE

As serpentes da família Elapidae são mais encontradas na Ásia, África e Austrália, onde se destacam os gêneros *Naja*, *Bungarus* e *Oxyuranus*. Nas Américas, há mais de 120 espécies e subespécies, popularmente conhecidas como “cobras corais”, divididas em três gêneros: *Micruroides*, com 1 espécie; *Leptomicrourus* com 3, e *Micrurus*, com quase 70 espécies (Melgarejo, 2003b; Vitt, 2004). O gênero *Micrurus* apresenta ampla dispersão geográfica, ocorrendo nos Estados Unidos, México, na Mata Atlântica, do nordeste ao sudeste do Brasil, e no Cerrado, além de outros países da América do Sul (Vitt, 2004). No Brasil, encontramos 40 diferentes táxons (Bucarechi *et al.*, 2016).

A maioria das cobras corais tem um padrão de cor de alguma combinação de vermelho, amarelo ou branco e preto, geralmente dispostos em anéis. A cabeça é oval, recoberta por grandes placas simétricas, os olhos são pequenos e pretos, quase sempre localizados numa faixa preta da cabeça. O pescoço não é bem pronunciado, devido ao desenvolvimento da musculatura cervical, bem como dos ossos cranianos; ambos adaptados a escavação. O corpo, cilíndrico, é recoberto por escamas lisas, e a cauda, curta e roliça, dá nome ao principal gênero, *Micrurus* (termo de origem grega, que significa “cauda curta”). A abertura bucal é reduzida e repercute diretamente no tamanho das presas ingeridas; animais “longos e finos”, como serpentes, anfisbenídeos e peixes (Sazima e Abe, 1991) com comprimento aproximado de 2,5 mm para uma coral de 90 cm. A injeção da peçonha é, portanto, difícil e superficial, o que é compensado por um hábito peculiar, o de morder sem soltar, de forma a prolongar o período de inoculação (Slowinski, 1995). O conjunto de limitações anatômicas e funcionais, associado à baixa agressividade destas serpentes pode explicar a baixíssima incidência de acidentes humanos por corais, restritos principalmente a pessoas que manipulam estes animais.

Os últimos dados do Ministério da Saúde são referentes a 2015, ano em que foram notificados 18.565 acidentes com serpentes, dos quais, 139 foram causados por *Micrurus* - menos de 0,5% (Datusus, 2015). Ensaio *in vitro* de toxicidade permitiram calcular a dose letal (DL50) para cada espécie (**Tabela 2**), sendo *Micrurus lemniscatus* a quarta espécie, dentre as nove corais avaliadas, com peçonha mais tóxica.

As toxinas das peçonhas foram selecionadas durante a evolução para conferir aos animais a capacidade de subjugar suas presas e proteger-se contra predadores. Apesar da enorme diversidade de toxinas animais, a maioria pertence a um número limitado de superfamílias de proteínas enzimáticas (serino proteases, fosfolipases, metaloproteinases, etc) e não enzimáticas (3FTxs, Kunitz, peptídeos knottin, etc.) as quais foram recrutadas de forma convergente em vários organismos para executar funções similares (Fry *et al.*, 2008; Sunagar *et al.*, 2013). Enquanto as toxinas enzimáticas contribuem

principalmente para a lenta imobilização e digestão da presa, as toxinas não enzimáticas estimulam a imobilização rápida através de seus efeitos neurotóxicos ou cardiotoxicos (Kessler *et al.*, 2017).

As peçonhas de *Micrurus* apresentam atividade neurotóxica (Brazil, 1987; Barros *et al.*, 1994; Cecchini *et al.*, 2005; Bucarechi *et al.*, 2016), miotóxica (Gutierrez *et al.*, 1992), nefrotóxica (De Roodt Ar *et al.*, 2012), hemorrágica (Francis *et al.*, 1997), edematogênica (Barros *et al.*, 1994) e hemolítica (Francis *et al.*, 1997; Arce-Bejarano *et al.*, 2014). No entanto, em humanos, o bloqueio neuromuscular é a marca registrada do envenenamento sistêmico por *Micrurus spp.* (Brazil, 1987). As neurotoxinas responsáveis por este bloqueio são as fosfolipases A2 (PLA2; 12-14 kDa), que bloqueiam a liberação de ACh, ou as 3FTxs (6-8 kDa), que bloqueiam os nAChR.

O tratamento específico para envenenamento por *Micrurus* consiste na aplicação intravenosa do antiveneno heterólogo, que no Brasil, é produzido pelo Instituto Butantan a partir da imunização de cavalos com uma mistura contendo quantidades equivalentes da peçonha de *M. corallinus* e *M. frontalis*. Tendo em vista o fato de que as peçonhas de *Micrurus* podem exibir uma diversidade de composição e toxicidade, o antiveneno terapêutico pode não ser capaz de reconhecer e neutralizar completamente todos os principais componentes das distintas espécies encontradas no país.

Tabela 2 Dose letal média (DL50) calculada a partir da peçonha de serpentes do gênero *Micrurus*

A dose necessária de uma dada substância para matar 50% da população em teste (DL50), usada como parâmetro de toxicidade, foi definida em grupos de ratos, por injeção intraperitoneal de diferentes concentrações da peçonha. O número de mortes foi registrado durante 48 h. As peçonhas mais letais foram: *M. corallinus*, *M. spixii*, *M. altirostris*, *M. lemniscatus* e *M. frontalis*. Fonte: (Tanaka *et al.*, 2010)

Venoms	LD₅₀ (µg)
<i>Micrurus ibiboboca</i>	76 (67–89)
<i>Micrurus lemniscatus</i>	13 (7–22)
<i>Micrurus fulvius</i>	64 (52–88)
<i>Micrurus altirostris</i>	9 (7–13)
<i>Micrurus spixii</i>	8 (6–16)
<i>Micrurus surinamensis</i>	58 (43–87)
<i>Micrurus corallinus</i>	7 (5–27)
<i>Micrurus frontalis</i>	22 (4–29)
<i>Micrurus hemprichii</i>	47 (20–88)

Results are expressed in µg venom/mouse (18–22 g), and the 95% confidence limits are included in parenthesis.
doi:10.1371/journal.pntd.0000622.t001

A serpente *Micrurus lemniscatus* (**Figura 3**) apresenta um porte maior, quando comparada às outras cobras corais, podendo chegar a 1,5 metros 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* (Melgarejo, 2003a). Habitam em áreas florestadas e abertas, geralmente em locais com bastante umidade, e também ambientes antropizados (Vitt, 2004). Observa-se tanto atividade diurna quanto noturna, principalmente durante a estação chuvosa, de novembro à fevereiro.



Figura 3 *Micrurus lemniscatus*

A cobra coral *Micrurus lemniscatus* pertence a família Elapidae. Fonte: <<http://www.flickr.com/photos/nclarkii/3903579203/sizes/z/in/photostream/>>, acesso em 11 de agosto de 2011.

1.2 COMPOSIÇÃO DA PEÇONHA ELAPIDAE

A peçonha de um único espécime de serpente pode conter de 50 a 200 componentes tóxicos, como proteínas e peptídeos (Tan *et al.*, 2003), no entanto, o número de motivos estruturais é limitado e geralmente não excede uma dúzia de estruturas (Calvete *et al.*, 2007).

Tendo em vista essa diversidade, as proteínas da peçonha de elapídeos podem ser classificadas em diferentes famílias, sendo os inibidores de proteases, as lectinas, as PLA2, as serinoproteases, as

metaloproteases e as 3FTxs algumas das mais bem caracterizadas. Dentro de uma mesma família podem-se observar similaridades em termos estruturais, podendo haver, entretanto, divergências nos aspectos farmacológicos (Kini, 2002; Kini e Doley, 2010).

As toxinas 3FTxs formam uma das maiores famílias de moléculas farmacologicamente bioativas, inicialmente descritas em espécies Elapidae (mambas, najas, cobras corais, kraits, Hydrophiidae, etc) e mais tardiamente descobertas em Colubridae (Kini e Doley, 2010; Utkin, 2013) bem como também reportadas em transcritos de viperídeos e crotalídeos (Jiang *et al.*, 1987; Pahari *et al.*, 2007; Fry *et al.*, 2008). Apesar de revelada uma ampla distribuição taxonômica desta superfamília, em Elapidae, a proporção de 3FTxs em relação às outras toxinas é predominante, como demonstrado pelas análises proteômicas e transcriptômicas de várias peçonhas.

Por exemplo, na glândula de veneno da king cobra, *Ophiophagus hannah*, ou na mamba, *Dendroaspis angusticeps*, as 3FTx representam 70% de todas as toxinas (Vonk *et al.*, 2013; Lauridsen *et al.*, 2016), enquanto que nas cobras corais *Micrurus clarki* (Lomonte *et al.*, 2016), *Micrurus lemniscatus* (Silva, 2013) e *Micrurus tschudii* (Sanz *et al.*, 2016) essa preponderância atinge 48%, 79% e 95% respectivamente.

Nosso grupo mostrou que peçonhas de diferentes espécies de *Micrurus* (*M. frontalis*, *M. ibiboboca* e *M. lemniscatus*) são ricas em toxinas 3FTxs, sendo as massas moleculares entre 6-8 kDa as mais recorrentes nas peçonhas analisadas (Ciscotto *et al.*, 2011). Apesar da grande diversidade de espécies do gênero, poucos estudos foram realizados utilizando peçonhas ou toxinas purificadas.

1.2.1 Toxinas *three fingers* (3FTxs)

As 3FTxs são polipeptídeos de cadeia curta não enzimáticos, com massa molecular entre 6-8 kDa (60-80 resíduos de aminoácidos) (Dufton e Hider, 1988; Endo e Tamiya, 1991) e um alto teor de pontes dissulfeto (muitas vezes quatro ou cinco e, em casos raros, três ou seis) (Kessler *et al.*, 2017). Apresentam como estrutura secundária 3 folhas- β , as quais formam 3 loops a partir de um robusto núcleo central globular estabilizado por 4 pontes dissulfeto (Endo e Tamiya, 1991; Kordis e Gubenek, 2000; Kini e Doley, 2010). Porém, algumas toxinas contêm uma quinta ponte dissulfeto na alça I ou na alça II. Esses loops assemelham-se a três dedos assim dando jus ao nome.

Elas podem ser divididas em (**Figura 4** e **Tabela 3**): 1) 3TFxs de cadeia curta, 60-62 resíduos de aminoácidos e 4 pontes dissulfeto; 2) 3TFxs de cadeia longa, 66-75 resíduos de aminoácidos, com uma extensão helicoidal na alça II, devido a 5ª ponte dissulfeto; 3) 3TFxs não convencionais, possui 5ª ponte na alça I, que apresenta posição ortogonal em relação ao centro da proteína, também são conhecidas como “weak toxins” pois quando inicialmente caracterizadas mostraram baixa toxicidade, em concentrações μM , quando se ligavam a receptores nicotínicos periféricos; 4) 3TFxs não-convencionais com extensão do C ou N-terminal, assim como o grupo anterior, apresentam 5 pontes

dissulfeto na alça I e uma adição de 2-9 resíduos de aminoácidos na porção de extensão (Menez, 1998; Kini e Doley, 2010).

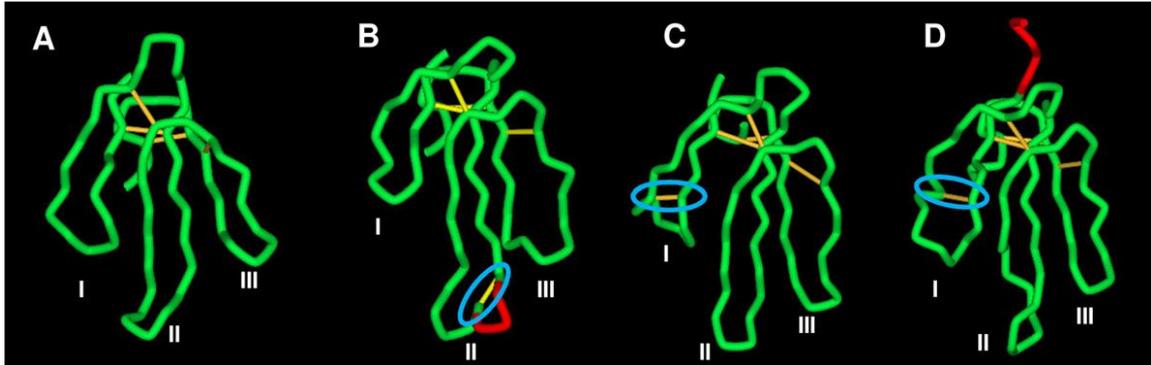


Figura 4 Estruturas tridimensionais de toxinas *three fingers* (3FTx)

As estruturas mostram os loops e pontes dissulfeto. A) Cadeia curta (Erabutoxina (1QKD)); B) Cadeia longa (k-bungarotoxina (1KBA)), C) Toxina não convencional (Candoxin (1JGK)) e D) Toxina não convencional com extensão N- terminal (Demotoxina (2H5F)). As extensões, da alça II (em B) devido à quinta ponte de dissulfeto e do N-terminal (em D) são destacadas na cor vermelha. Em amarelo são assinaladas as pontes dissulfeto e em azul destaca-se a quinta ponte dissulfeto. Fonte: (Kini e Doley, 2010)

Tabela 3 Classificação estrutural das neurotoxinas *three fingers* de venenos de serpentes que interagem com receptor nicotínico muscular de acetilcolina

	Structural characteristics	Primary molecular target	Other molecular targets	Source
Short-chain neurotoxins	Three-fingered monomers of 60 – 62 amino-acid residues with four conserved disulfide bonds.	High affinity for muscle or <i>Torpedo</i> ($\alpha 1$) ₂ $\beta 1$ $\gamma\delta$ nAChR (K_d approximately 10^{-9} – 10^{-11} M).		<i>Elapidae</i> and <i>Hydrophidae</i> species. Typical examples include erabutoxin-a (<i>Laticauda semifasciata</i>), toxin- α (<i>Naja nigricolis</i>).
Long-chain neurotoxins	Three-fingered monomers of 66 – 74 amino-acid residues with four conserved disulfide bonds and an additional disulfide bond at the tip of loop II.	High affinity for muscle or <i>Torpedo</i> ($\alpha 1$) ₂ $\beta 1$ $\gamma\delta$ nAChR (K_d approximately 10^{-9} – 10^{-11} M).	High affinity (K_d approximately 10^{-8} – 10^{-9} M) antagonists of the neuronal $\alpha 7$ nAChR.	Isolated from <i>Elapidae</i> species. Typical examples include α -bungarotoxin (<i>Bungarus multicinctus</i>), α -cobratoxin (<i>Naja kaouthia</i>).
A typical long-chain neurotoxins	Three-fingered monomers of 69 amino-acid residues and four conserved disulfide bonds.	High affinity for <i>Torpedo</i> ($\alpha 1$) ₂ $\beta 1$ $\gamma\delta$ nAChR (K_d approximately 10^{-11} M).		Toxins Lc-a and Lc-b, isolated exclusively from <i>Laticauda colubrina</i> (<i>Hydrophidae</i>).
Non-conventional neurotoxins	Three-fingered monomers of 65 – 67 amino-acid residues with four conserved disulfide bonds and an additional disulfide bond at the tip of loop I.	Some (WTX, <i>Naja kaouthia</i>) have low affinity (K_d approximately $>10^{-6}$ M) and some (Candoxin, <i>Bungarus candidus</i>) have high affinity (K_d approximately 10 nM) for muscle or <i>Torpedo</i> ($\alpha 1$) ₂ $\beta 1$ $\gamma\delta$ nAChR.	Candoxin (<i>Bungarus candidus</i>) is a high affinity antagonist (K_d approximately 50 nM) of the neuronal $\alpha 7$ nAChR.	Exclusively from <i>Elapidae</i> species. Typical examples include candoxin (<i>Bungarus candidus</i>), WTX (<i>Naja kaouthia</i>), Wntx-5 (<i>Naja sputatrix</i>).

Fonte: (Nirthanan e Gwee, 2004)

As 3FTxs de serpentes são estrutural e funcionalmente heterogêneas e as variações das sequências nas alças facilitam suas adaptações funcionais, permitindo que elas reconheçam uma grande variedade de alvos moleculares com excelente especificidade (Kini e Doley, 2010). A sua diversidade molecular é consequência da duplicação de genes de famílias de proteínas reguladoras-chaves, o que pode resultar em muitas isoformas da mesma proteína (Sunagar *et al.*, 2013).

Essas toxinas podem atuar em diferentes vias (Kessler *et al.*, 2017), interagindo com a AChE; integrinas (Mcdowell *et al.*, 1992; Wu *et al.*, 2006); fatores de coagulação (Banerjee *et al.*, 2005) ou mostrando um efeito citolítico (Dufton e Hider, 1988). Elas também podem interagir com canais para Ca^{2+} do tipo L (Dewille *et al.*, 1991); canais iônicos associados a acidose tecidual (ASICs) (Diochot *et al.*, 2012), receptores GABA_A (Rosso *et al.*, 2015), receptores adrenérgicos (Maiga *et al.*, 2013), além de atuarem em nAChRs (Tsetlin, 1999), e GPCRs, tais como os mAChRs (Adem *et al.*, 1988; Ducancel *et al.*, 1991; Servent e Fruchart-Gaillard, 2009; Servent *et al.*, 2011).

1.3 TOXINAS *THREE FINGERS* E A NEUROTRANSMISSÃO COLINÉRGICA

O arsenal de neurotoxinas de serpentes que interferem na neurotransmissão colinérgica consiste em uma variedade de toxinas que tem como alvo múltiplos subtipos de AChR tanto nicotínicos quanto muscarínicos, em nível central e periférico. Os principais componentes neurotóxicos da peçonha Elapidae são neurotoxinas que se ligam aos nAChRs pós-sinápticos da junção neuromuscular (Lee, 1972; Karlsson, 1979), referidas como curaremiméticas ou α -neurotoxinas. A junção neuromuscular do músculo esquelético também é suscetível às neurotoxinas que atuam pré-sinápticamente. Toxinas muscarínicas também foram isoladas da peçonha das mambas (*Dendroaspis spp.*), e são antagonistas ou agonistas em vários subconjuntos de receptores muscarínicos no cérebro, bem como em locais periféricos (Bradley, 2000; Jerusalinsky *et al.*, 2000; Karlsson *et al.*, 2000; Potter, 2001).

1.3.1 Receptores nicotínicos

Neurotoxinas de cadeia curta e de cadeia longa, ligam-se com alta afinidade (Kd aproximadamente 10^{-9} - 10^{-11} M) a nAChRs Torpedo / muscular $2\alpha 1\beta 1\gamma\delta$ (Servent e Menez, 2001). No entanto as neurotoxinas de cadeia curta tendem a associar-se à nAChR 6-7 vezes e dissociar 5-9 vezes, mais rapidamente que as neurotoxinas de cadeia longa (Chicheportiche *et al.*, 1975). As neurotoxinas de cadeia longa, diferentemente das de cadeia curta, também são capazes de se ligar com alta afinidade (Kd aproximadamente 10^{-8} - 10^{-9} M) aos nAChRs neuronais homopentaméricos $\alpha 7$, $\alpha 8$ e $\alpha 9$ bem como

aos heteropentaméricos compostos pelas subunidades $\alpha 7$ - $\alpha 10$ (Servent *et al.*, 1997; Antil-Delbeke *et al.*, 2000; Servent *et al.*, 2000).

Um dos alvos primários das peçonhas de serpentes é o sistema nervoso periférico, a junção neuromuscular em particular, onde a neurotransmissão é inibida, promovendo a paralisia dos músculos esqueléticos, incluindo os da respiração (Nirthanan e Gwee, 2004). Claramente, portanto, o estudo da interação de toxinas com o a junção neuromuscular é de grande importância para a clínica.

Uma contribuição significativa feita por peptídeos de peçonhas de serpente para ciência e medicina, e que colaborou para o desenvolvimento da farmacologia molecular - cerca de 40 anos atrás, foi a descoberta da neurotoxina curaremimética, α -Bgtx da krait *Bungarus multicinctus* (polipeptídeo de 74 resíduos de aminoácidos, 8 kDa, e 5 pontes dissulfeto). A descoberta da α -Bgtx e ortólogos de outras espécies, também permitiu a localização de nAChRs *in situ* e a identificação de subtipos em vários tecidos musculares e neurais, tornando hoje, os nAChRs um dos receptores mais bem caracterizados (Nirthanan e Gwee, 2004). Os sinais clínicos de intoxicação incluem dificuldade respiratória e paralisia neuromuscular. Sua toxicidade (DL50) está entre 0,2-1,2 mg/kg de camundongo (Crosland, 1988), no entanto a toxina não atravessa a barreira hematoencefálica (Polztejera *et al.*, 1975). Uma série de resíduos de aminoácidos são importantes na ligação de α -Bgtx aos nAChRs, consistente com a hipótese de que as interações ocorrem de maneira multiponto entre a toxina e o receptor (Endo e Tamiya, 1987; Stroud *et al.*, 1990). Devido a sua alta afinidade com as diferentes subunidades de nAChRs (Kd 10^{-12} - 10^{-9} M), a α -Bgtx tem sido usada como uma ferramenta para identificar, localizar e quantificar nAChRs isolados do órgão elétrico de Torpedo, músculos de mamíferos e tecidos cerebrais.

1.3.2 Receptores muscarínicos

A primeira toxina muscarínica de uma peçonha foi isolada da serpente elapídica *Dendroaspis angusticeps* (Mamba verde africana) (Adem *et al.*, 1988) e desde então, agonistas e/ou antagonistas muscarínicos isolados da peçonha de serpentes dessa mesma família tem sido identificados e caracterizados (Adem *et al.*, 1988; Jerusalinsky *et al.*, 1993; Jerusalinsky e Harvey, 1994; Jerusalinsky *et al.*, 1995; Jolkkonen *et al.*, 1995; Adem e Karlsson, 1997; Bradley, 2000; Karlsson *et al.*, 2000; Kukhtina *et al.*, 2000; Chung *et al.*, 2002; Harvey *et al.*, 2002). Estas toxinas apresentam alta afinidade pelos mAChRs (Karlsson *et al.*, 2000; Servent e Fruchart-Gaillard, 2009) e são chamada de toxinas muscarínicas.

As toxinas MT1-MT7, foram isoladas de *D. angusticeps* enquanto MT α , MT β e MT γ foram isoladas da mamba negra, *D. polylepis* (Jolkkonen *et al.*, 1995). MT2, é a toxina mais abundante na peçonha da mamba verde, sendo encontrada em uma concentração de 10 mg/g de peçonha, o que representa cerca de 50% da quantidade total de toxinas nesta peçonha. Já MT7 foi encontrada em uma proporção 100x menor (Servent *et al.*, 2011). Apesar da semelhança de estrutura, as toxinas

muscarínicas interagem diferencialmente com os subtipos dos mAChR (ver detalhes na **Tabela 4**). Por exemplo, MT7 é a toxina mais potente e seletiva para mAChR M1 com um K_i de 14 pM, MT α é potente, mas se liga aos mAChR M2-5 com um K_i na faixa de 2-40 nM, enquanto a MT3 é potente e muito seletiva para mAChR M4 com um K_i de 2 nM (Servent *et al.*, 2011). A DL50 para MTs ainda não foi determinada, mas nenhuma letalidade foi observada em ratos (Joubert, 1985). As MTs são usadas como ferramentas farmacológicas para identificação, localização e atividade mAChRs no córtex frontal cerebral, bem como em neurônios do estriado que se projetam para o *globus pallidus* para entender seu papel na cognição, memória e movimento (Bradley, 2000).

Tabela 4 Constantes de inibição para toxinas muscarínicas

Em experimentos de competição utilizando [3H]N-metilescopolamina ([3H]-NMS) e membranas preparadas a partir de células de ovário de hamster chinês (células CHO) expressando os cinco subtipos de receptores muscarínicos humanos (hM1-5), as constantes de inibição (K_i) foram determinadas para diferentes toxinas muscarínicas de mambas. Fonte: (Servent *et al.*, 2011)

mAChR subtypes	Muscarinic toxins				MT α	
	MT1	MT2	MT3	MT7	venom	synthetic
M1	20–35 nM ^{a,b}	360 nM–1.5 μ M ^b	78–300 nM ^{b,c}	14 pM ^a	23 nM ^d	>300 nM ^e
M2	>1 μ M ^b	>2 μ M ^b	>1 μ M ^{b,c}	>10 μ M ^a	44 nM ^d	>300 nM ^e
M3	>1 μ M ^b	>2 μ M ^b	>1 μ M ^{b,c}	>10 μ M ^a	3 nM ^d	>300 nM ^e
M4	30–72 nM ^b	760 nM–1.9 μ M ^b	2 nM ^{b,c}	>10 μ M ^a	5 nM ^d	>300 nM ^e
M5	>1 μ M ^b	>2 μ M ^b	>1 μ M ^{b,c}	>10 μ M ^a	8 nM ^d	>300 nM ^e

^a (Mourier *et al.*, 2003; Fruchart-Gaillard *et al.*, 2006).

^b (Karlsson *et al.*, 2000).

^c (Bradley, 2000).

^d (Jolkkonen *et al.* 1995a,b).

^e (Koivula *et al.*, 2010).

Em 2011, foi isolada a primeira toxina muscarínica da peçonha da serpente *M. lemniscatus*, MT-M1 α (7.048 Da), e seus 12 primeiros resíduos de aminoácidos da sequência N-terminal foram sequenciados. Esta sequência parcial mostrou alta homologia às proteínas 3FTxs e atividade antagonista nos mAChRs do hipocampo de ratos (IC₅₀ 33,1 nM) (Da Silva *et al.*, 2011). Este é o único fragmento de toxina muscarínica, da espécie, depositado nos bancos de dados do UniProt (Fonte: <<http://www.uniprot.org/uniprot/P0DJB0>>, acesso em 20 de março de 2018).

A segunda toxina muscarínica isolada da peçonha de *M. lemniscatus*, MT-M11 (7.232 Da), foi obtida em nosso laboratório (Silva, 2013). Em experimentos preliminares no músculo liso longitudinal (MLL) do íleo isolado de cobaia, quando comparado ao carbacol (300 nM), MT-M11 (41,5 nM) apresentou efeito contrátil máximo (Emáx) de 27,3% e sua atividade foi parcialmente bloqueada (52,8%) quando pré-incubada com o agonista inverso muscarínico não seletivo, atropina (1 nM). MT-M11 apresentou atividade muscarínica 100 vezes mais potente que a peçonha, sugerindo que ela seja um

dos principais componentes responsáveis pelo efeito contrátil do MLL, uma vez que a atividade específica depende diretamente da pureza da amostra.

A alta proporção de 3FTxs na peçonha da serpente *M. lemniscatus* associada a essas toxinas parcialmente descritas nos encorajou a investigar em mais detalhes, moléculas com atividade colinérgica e caracterizá-las em nível bioquímico e farmacológico.

2 JUSTIFICATIVA

As 3FTxs tem uma grande diversidade de funções biológicas e uma abundância de sequências conhecidas, as quais apresentam alta seletividade aos alvos farmacológicos.

No entanto, apesar do registro de mais de 50 anos de pesquisa com 3FTxs, ainda há muito a ser estudado com essas toxinas (Wang *et al.*, 2014). Mais de 500 sequências foram determinadas até agora, e a maioria delas, ainda é pouco caracterizada em nível estrutural e funcional, sendo que, para uma fração significativa, um alvo molecular ainda não foi identificado. Como este grupo de proteínas não-enzimáticas apresenta efeitos tóxicos potentes, as investigações têm contribuído significativamente para a compreensão destes efeitos, bem como dos mecanismos farmacológicos envolvidos. Muitos grupos têm estudado estas toxinas, quanto às suas estruturas, funções, bem como, a distribuição dos respectivos receptores alvo e o detalhamento molecular de processos fisiológicos envolvidos (Tsetlin, 1999; Karlsson *et al.*, 2000; Servent *et al.*, 2000; Kini, 2002; Nirathanan e Gwee, 2004; Fruchart-Gaillard *et al.*, 2006; Pawlak *et al.*, 2006; Pahari *et al.*, 2007; Rajagopalan *et al.*, 2007; Kini e Doley, 2010; Moreira *et al.*, 2010; Da Silva *et al.*, 2011; Fernandez *et al.*, 2011; Naimuddin *et al.*, 2011; Diochot *et al.*, 2012; Fruchart-Gaillard *et al.*, 2012; Carbajal-Saucedo *et al.*, 2013; Sunagar *et al.*, 2013; Utkin, 2013; Vonk *et al.*, 2013; Blanchet *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014; Lauridsen *et al.*, 2016; Lomonte *et al.*, 2016; Rivera-Torres *et al.*, 2016; Sanz *et al.*, 2016; Kessler *et al.*, 2017). Além disso, essas toxinas são utilizadas no potencial esclarecimento de patologias relacionadas à disfunção desses receptores, como doença de Alzheimer, Parkinson, esquizofrenia, dependência de drogas e outras (Langmead *et al.*, 2008; Servent e Fruchart-Gaillard, 2009; Ventura *et al.*, 2010; Scarr, 2012).

A peçonha das serpentes americanas do gênero *Micrurus* é rica em 3FTxs, as quais podem ter vários alvos farmacológicos, no entanto, estas peçonhas são ainda pouco exploradas (Tanaka *et al.*, 2010; Ciscotto *et al.*, 2011). Os avanços tecnológicos têm contribuído significativamente para a melhoria da investigação das peçonhas, e as abordagens proteômicas tem um papel essencial neste processo (Calvete, 2013; Brahma *et al.*, 2015). Dessa forma, nos propusemos neste trabalho, isolar - 3FTxs da peçonha da serpente *Micrurus lemniscatus* com faixa de massa próxima a 7.200 Da - sequenciar, sintetizar quimicamente e caracterizar farmacologicamente as toxinas de interesse.

3 OBJETIVOS

Purificação e caracterização proteômica de toxinas 3FTxs (em torno de 7.200 Da) da peçonha de *Micrurus lemniscatus*, seguida da síntese química e avaliação farmacológica sobre sistema colinérgico.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Elaborar e otimizar métodos cromatográficos e purificar 3FTxs (em torno de 7.200 Da) da peçonha de *Micrurus lemniscatus*, por meio de High Performance Liquid Chromatography (HPLC) / Cromatografia líquida de alta eficiência;
- ✓ Analisar a massa/carga (m/z) das frações e toxinas de interesse, por espectrometria de massas;
- ✓ Obter as sequências das toxinas purificadas utilizando as técnicas de *In Source Decay*, Degradação de Edman e digestão enzimática seguida de Sequenciamento “de novo”;
- ✓ Processar os dados e buscar alinhar por similaridade, a(s) sequência(s) da(s) 3FTxs obtidas, com sequências de outras toxinas 3FTxs de peçonhas de serpentes, em bancos de dados proteômicos;
- ✓ Sintetizar quimicamente as toxinas de interesse, por estratégia Fmoc;
- ✓ Proporcionar o *folding* (enovelamento) e correta formação das pontes dissulfeto das toxinas obtidas por síntese química;
- ✓ Determinar a possível estrutura secundária das toxinas sintéticas, em solução, utilizando a Espectroscopia de Dicroísmo Circular;
- ✓ Avaliar a atividade das toxinas, nativas e sintéticas, frente aos mAChR clonados de humano (mAChRh) e transfectados em células CHO e em receptores nicotínicos Torpedo ($2\alpha1\beta1\delta\gamma$), por técnicas de *binding*;
- ✓ Verificar a possível ativação de mAChR pela(s) toxina(s) de interesse, utilizando células CHO expressando estavelmente o subtipo de hM3, através de ensaios IP-One Tb®;
- ✓ Avaliar a citotoxicidade das toxinas por AlamarBlue®;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Químicos, toxinas, radioligantes e fluoróforo

Acetonitrila (ACN), ácido tricloroacético (TFA), α -ciano-4-hidroxicinâmico, ácido 2,5-diidroxibenzoico, ácido sinapínico, 1,5-diaminonaftaleno, SEQUA-BRENE/Polybrene, N-metilpirrolidona (NMP), N-metilmorfolina (NMM), diclorometano (DCM), piperidina, anisol, tioanisol, triisopropilsilano (TIPS), resina Wang-LL, ditiotretol (DTT), guanidina, Tris, ácido etileno-diaminotetra-acético (EDTA), glutatona em sua forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), carbacol (CB), N-metilescopolamina (NMS), endoproteinase Glu-C V8 e todos os outros químicos foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA) ou de outras fontes padrão. Tripsina Gold livre e tripsina imobilizada (Promega, Madison, Wisconsin, EUA). Protein Calibration Standard I, Peptide Calibration Standard (Bruker Daltonics, Billerica, Massachusetts, EUA). PTH-AA (Shimadzu, Quioto, Japão). IP-One Tb® (Cisbio Bioassays, Codolet, França). AlamarBlue, Gibco F-12 Nutrient Mix GlutaMax™, penicilina, estreptomicina e afotericina B e todos os reagentes para cultura celular foram adquiridos da Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, EUA). Aminoácidos com grupamento Fmoc, 22-(6-cloro-1-Hbenzotriazol-1-il)-1,1,3,3, -tetrametilamina hexafluorofosfato (HCTU) foram adquiridos da Activotec (Cambridge, Reino Unido). [125I]Tyr54- α -bungarotoxina ([125I] α -BgTx) (90 Ci/mmol) foi adquirido da Amersham Biosciences (Little Chalfont, Reino Unido). N-metil-[3H]-escopolamina ([3H]-NMS) (84 Ci/mmol), MicroScint-0 e polietileno-imina (PEI) foram adquiridos da PerkinElmer (Waltham, Massachusetts, EUA).

4.1.2 Materiais biológicos

O pool de peçonha liofilizada, das serpentes da espécie *Micrurus lemniscatus* (316,6 mg, obtidos de 99 indivíduos, com data de extração de 1998 a 2002), foi cedido pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED, Belo Horizonte, MG, Brasil). A peçonha foi alíquotada em 2, 5, 10 e 20 mg e estocada em freezer (-20 °C) até o momento da purificação. As alíquotas foram diluídas em 2 mL de H₂O Mili-Q® (0,1% TFA, v/v) e submetidas à purificação.

As células de ovário de hamster chinês (CHO) expressando de forma estável os diferentes receptores muscarínicos humanos clonados (hM2-hM5), foram gentilmente fornecidas pelo Prof. Pierre Olivier Couraud (Institut Cochin de Génétique Moléculaire, Paris, França). As membranas preparadas a partir de células CHO expressando o subtipo de receptor muscarínico humano (hM1) foram adquiridas comercialmente (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, EUA).

Raias vivas, *Torpedo marmorata*, foram compradas do Service Modèles Biologiques da Estação Biológica de Roscoff (Roscoff, França). Os experimentos foram realizados de acordo com orientações da Comunidade Europeia para o Tratamento de Animais de Laboratório, com o edital oficial apresentado pelo Ministério da Agricultura da França e as recomendações da Declaração de Helsinski. Os protocolos foram aprovados pelo Departamento de Direção de Proteção Animal e pelo Comitê de Cuidados e Uso de Animais do CNRS. As membranas de eletrócitos, expressando nAChRs subtipo $2\alpha 1\beta 1\delta\gamma$ (taxa de expressão ~40% do conteúdo de proteína da membrana) foram purificadas a partir do órgão elétrico de *T. marmorata* como descrito anteriormente (Hill *et al.*, 1991; Araoz *et al.*, 2012).

4.2 ESTRATÉGIAS DE FRACIONAMENTO E PURIFICAÇÃO DAS TOXINAS

A peçonha foi fracionada em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (*High-Performance Liquid Chromatography* - HPLC) utilizando diferentes equipamentos - ÄKTAexplorer 100, ÄKTA Pure, ÄKTApurifier e ETHAN LC (todos da Amersham Biosciences, Little Chalfont, Reino Unido). As leituras de absorbância foram realizadas por detectores UV (214 e 280 nm) e as toxinas 3FTxs foram purificadas em três etapas cromatográficas. Ver detalhes das estratégias de purificação na **Tabela 5** e no fluxograma no **Anexo 1A**.

A melhor estratégia observada (estratégia D1.1 e D2.1 - ver fluxograma no **Anexo 1A**) consiste de uma cromatografia de troca catiônica em coluna Mono STM 4.6/100 PE (TricornTM) previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 20 mM pH 5,0 (solução A) na qual 5 mg da peçonha foram eluídos em tampão acetato de sódio 20 mM pH 5,0 em 1 M de NaCl (solução B), gradiente segmentado (0 a 60% NaCl; 10 mM NaCl/min; fluxo 1 mL/min). As frações contendo as amostras com m/z em torno de 7.200 Da foram submetidas a uma cromatografia de fase reversa (*Reversed Phase Chromatography* - RPC) em coluna analítica SupelcosilTM LC-18 (25 cm x 4.6 mm, 5 μ m) 0,1% TFA/tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 v/v ou 0,1% TFA/H₂O Mili-Q[®] v/v (solução A) e eluídas em 0,1% TFA/ACN v/v (solução B) gradiente segmentado (15 a 50% de B; 0,5% de B/min.; fluxo de 1 mL/min). Ao final das duas etapas as frações continham de 2 a 5 componentes e para separá-los foi realizada uma terceira etapa, RPC, coluna analítica Phenomenex Kinetex C18 (15 cm x 4.6 mm, 2,6 μ m) 0,1% TFA/H₂O Mili-Q[®] v/v (solução A) e 0,1% TFA/ACN v/v (solução B) gradiente segmentado (15 a 40% de B; 0,5% de B/min.; fluxo de 1 mL/min). As proteínas eluídas foram coletadas manualmente ou pelo coletor automático de frações, Frac920 (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Reino Unido).

Tabela 5 Padronização das etapas de purificação das toxinas da peçonha da serpente *Micrurus lemniscatus*, com massa próxima a 7.200 Da

Estratégia	1º Passo cromatográfico	2º Passo cromatográfico	3º Passo cromatográfico
A	<p>Cromatografia de Fase Reversa Coluna semipreparativa Discovery®C18 (25 cm x 10 mm, 5 µm) 10 mg da peçonha 0,1% TFA/H2O Mili-Q® v/v (solução A1) 0,1% TFA/ACN v/v (solução B1) gradiente linear (0 a 60% de B1; 0,7% de B1/min.; fluxo de 5 mL/min.)</p>	<p>Cromatografia de Fase Reversa coluna analítica Supelcosi™ LC-18 (25 cm x 4,6 mm, 5 µm) 0,1% TFA/H2O Mili-Q® v/v (solução A1) e 0,1% TFA/ACN v/v (solução B1) gradiente segmentado (20 a 50% de B1; 0,9% de B1/min.; fluxo de 1 mL/min.)</p>	
		<p>Cromatografia de Fase Reversa coluna analítica Supelcosi™ LC-18 (25 cm x 4,6 mm, 5 µm) 0,1% TFA/H2O Mili-Q® v/v (solução A1) e 0,1% TFA/ACN v/v (solução B1) gradiente isocrático (19 a 30% de B1; variando de 1 em 1%; 1% de B1/min.; fluxo de 1 mL/min.).</p>	
B	<p>Cromatografia de troca catiônica coluna Mono S™ 4,6/100 PE (Tricom™) 2, 20 e 5 mg da peçonha tampão acetato de sódio 20 mM pH 5,0 (solução A2), tampão acetato de sódio 20 mM pH 5,0 em 1M de NaCl (solução B2) gradiente linear (0 a 100% NaCl; 6,53 mM de NaCl/min, fluxo 1 mL/min) gradiente segmentado (0 a 60% NaCl; 10,08mM NaCl/min; fluxo 1 mL/min) gradiente segmentado (0 a 60% NaCl; 5,04 mM NaCl/min; fluxo 1 mL/min) gradiente isocrático (5,7, 10, 13, 15, 17, 20, 22, 25, 30% de NaCl; fluxo 1 mL/min)</p>	<p>Cromatografia de Fase Reversa coluna analítica Supelcosi™ LC-18 (25 cm x 4,6 mm, 5 µm) 0,1% TFA/H2O Mili-Q® v/v (solução A1) e 0,1% TFA/ACN v/v (solução B1) gradiente segmentado (20 a 50% de B1; 1, 1,7 e 2% de B1/min.; fluxo de 1 mL/min.)</p>	<p>Cromatografia de Fase Reversa coluna analítica Supelcosi™ LC-18 (25 cm x 4,6 mm, 5 µm) 0,1% TFA/H2O Mili-Q® v/v (solução A1) e 0,1% TFA/ACN v/v (solução B1) gradiente linear (0 a 100% de B1; 2% de B1/min.; fluxo de 1 mL/min.)</p>
		<p>Cromatografia de Fase Reversa coluna analítica Supelcosi™ LC-18 (25 cm x 4,6 mm, 5 µm) 0,1% TFA/H2O Mili-Q® v/v (solução A1) e 0,1% TFA/ACN v/v (solução B1) gradiente segmentado (0 a 60% de B1; 0,5% de B1/min.; fluxo de 1 mL/min.)</p>	<p>Cromatografia de Fase Reversa coluna analítica Supelcosi™ LC-18 (25 cm x 4,6 mm, 5 µm) 0,1% TFA/H2O Mili-Q® v/v (solução A1) e 0,1% TFA/ACN v/v (solução B1) gradiente segmentado (20 a 50% de B1; 0,25 e 0,125% de B1/min.; fluxo de 1 mL/min.) gradiente segmentado (10 a 40% de B1; 0,25% de B1/min.; fluxo de 1 mL/min.)</p>
		<p>Cromatografia de Fase Reversa coluna analítica Source™ 5 (15 cm x 4,6 mm, 5 µm) 0,1% TFA/H2O Mili-Q® v/v (solução A1) e 0,1% TFA/ACN v/v (solução B1) gradiente segmentado (0 a 60% de B1; 2 e 3% de B1/min.; fluxo de 1 mL/min.)</p>	
		<p>Cromatografia de Fase Reversa coluna analítica Supelcosi™ LC-18 (25 cm x 4,6 mm, 5 µm) 0,1% TFA/tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 v/v (solução A3) e 0,1% TFA/ACN v/v (solução B1) gradiente segmentado (2 a 60% de B1; 0,7 e 1% de B1/min.; fluxo de 1 mL/min.)</p>	
C	<p>Cromatografia de troca catiônica coluna Mono S™ 4,6/100 PE (Tricom™) 5 mg da peçonha tampão acetato de sódio 20 mM pH 5,0 (solução A2), tampão acetato de sódio 20 mM pH 5,0 em 1M de NaCl (solução B2) gradiente segmentado (0 a 60% NaCl; 10,08mM NaCl/min; fluxo 1 mL/min)</p>	<p>Cromatografia de Fase Reversa coluna analítica Supelcosi™ LC-18 (25 cm x 4,6 mm, 5 µm) 0,1% TFA/H2O Mili-Q® v/v (solução A1) e 0,1% TFA/ACN v/v (solução B1) gradiente segmentado (15 a 50% de B1; 0,5% de B1/min.; fluxo de 1 mL/min.)</p>	<p>Cromatografia de Fase Reversa coluna analítica Supelcosi™ LC-18 (25 cm x 4,6 mm, 5 µm) 0,1% TFA/tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 v/v (solução A3) e 0,1% TFA/ACN v/v (solução B1) gradiente segmentado (15 a 50% de B1; 0,5% de B1/min.; fluxo de 1 mL/min.)</p>
D	<p>Cromatografia de troca catiônica coluna Mono S™ 4,6/100 PE (Tricom™) 5 mg da peçonha tampão acetato de sódio 20 mM pH 5,0 (solução A2), tampão acetato de sódio 20 mM pH 5,0 em 1M de NaCl (solução B2) gradiente segmentado (0 a 60% NaCl; 10,08mM NaCl/min; fluxo 1 mL/min)</p>	<p>Cromatografia de Fase Reversa coluna analítica Supelcosi™ LC-18 (25 cm x 4,6 mm, 5 µm) 0,1% TFA/tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 v/v (solução A3) e 0,1% TFA/ACN v/v (solução B1) gradiente segmentado (15 a 50% de B1; 0,5% de B1/min.; fluxo de 1 mL/min.)</p>	<p>Cromatografia de Fase Reversa coluna analítica Phenomenex Kinetex C18 (15 cm x 4,6 mm, 2,6 µm) 0,1% TFA/H2O Mili-Q® v/v (solução A1) e 0,1% TFA/ACN v/v (solução B1) gradiente segmentado (15 a 40% de B1; 0,5% de B1/min.; fluxo de 1 mL/min.) ou Cromatografia de Fase Reversa coluna analítica Phenomenex Kinetex EVO C18 (15 cm x 4,6 mm, 2,6 µm) 0,1% TFA/H2O Mili-Q® v/v (solução A1) e 0,1% TFA/ACN v/v (solução B1) gradiente segmentado (15 a 40% de B1; 0,5% de B1/min.; fluxo de 1 mL/min.) ou Cromatografia de Fase Reversa coluna analítica Phenomenex Kinetex F5 (15 cm x 4,6 mm, 2,6 µm) 0,1% TFA/H2O Mili-Q® v/v (solução A1) e 0,1% TFA/ACN v/v (solução B1) gradiente segmentado (15 a 40% de B1; 0,5% de B1/min.; fluxo de 1 mL/min.)</p>
		<p>Cromatografia de Fase Reversa coluna analítica Supelcosi™ LC-18 (25 cm x 4,6 mm, 5 µm) 0,1% TFA/H2O Mili-Q® v/v (solução A1) e 0,1% TFA/ACN v/v (solução B1) gradiente segmentado (15 a 50% de B1; 0,5% de B1/min.; fluxo de 1 mL/min.)</p>	

4.3 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

As análises por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption/ionization - Time of Flight*) foram realizadas no espectrômetro AutoFlex III MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics, Billerica, Massachusetts, EUA), com o software Flex Control 2.4.30.0 (Bruker Daltonics, Billerica, Massachusetts, EUA) e no UltraflexIII MALDI-TOF-TOF (Bruker Daltonics, Billerica, Massachusetts, EUA) do Núcleo de Análise de Biomoléculas da Universidade Federal de Viçosa. As amostras provenientes de cada etapa cromatográfica foram misturadas à solução saturada de diferentes matrizes (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) - α -ciano-4-hidroxicinâmico, superDHB (90% de ácido 2,5-diidroxi-benzóico e 10% α -ciano-4-hidroxicinâmico) e ácido sinapínico (1:1 v/v) - e depositadas diretamente em placas MTP AnchorChip 600/384, cocristalizadas à temperatura ambiente. Para as amostras resultantes de uma troca catiônica, antes das análises de massas foram realizadas dessalinizações em Millipore® Ziptips C18. Para a determinação da massa média das moléculas de 5.000 a 20.000 Da, foi empregado o modo positivo linear com calibração externa utilizando o padrão de calibração de proteínas preconizado pelo fabricante (Protein Calibration Standard I, Bruker Daltonics, Billerica, Massachusetts, EUA). Para a determinação das massas monoisotópicas das moléculas de 900 - 5.000 Da, foi utilizado o modo refletido com base no padrão de calibração (Peptide Calibration Standard, Bruker Daltonics, Billerica, Massachusetts, EUA) recomendado pelo fabricante para o processo de calibração externa. Os espectros obtidos foram analisados através do software FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics, Billerica, Massachusetts, EUA).

4.4 SEQUENCIAMENTO DE PROTEÍNAS

As toxinas purificadas foram sequenciadas por diferentes técnicas.

4.4.1 *In Source Decay (ISD)*

Para determinar a sequência parcial de algumas toxinas, análises por espectrometria de massas em MALDI-TOF foram realizadas no espectrômetro AutoFlex III MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics, Billerica, Massachusetts, EUA), com o software Flex Control 2.4.30.0 (Bruker Daltonics, Billerica, Massachusetts, EUA). As toxinas foram misturadas à solução saturada de 1,5-diaminonaftaleno (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) (1:1 v/v) diretamente na placa MTP 384 ground steel e cocristalizadas à temperatura ambiente. Para a determinação da sequência foi empregado o modo ISD utilizando como calibração externa o padrão de albumina bovina purificada (Sigma-

Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). Os dados foram analisados utilizando-se o programa FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics, Billerica, Massachusetts, EUA).

4.4.2 Digestão enzimática e sequenciamento “de novo”

As toxinas isoladas (10 e 50 µg) foram reduzidas, alquiladas e submetidas a digestão enzimática, pela tripsina Gold livre e tripsina imobilizada, ambas da Promega (clivagem seletiva na porção c-terminal de arginina ou lisina) e pela endoproteínase Glu-C V8 da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA) (clivagem seletiva na porção c-terminal de ácido glutâmico), de acordo com os respectivos protocolos propostos pelos fabricantes, com modificações. Os espectros de fragmentação MS/MS dos peptídeos oriundos das clivagens enzimáticas foram adquiridos, o perfil foi analisado e as respectivas seqüências foram determinadas utilizando o software FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics, Billerica, Massachusetts, EUA) e PepSeq 1.2 (University of Waterloo, Canadá).

4.4.3 Degradação de Edman

A seqüência de aminoácidos N-terminal das toxinas foi determinada por degradação automatizada de Edman, utilizando o sequenciador automático PPSQ-21 A (Shimadzu, Quioto, Japão), de acordo com a metodologia preconizada pelo fabricante.

Cerca de 100 µg da amostra solubilizada em 30 µL de solução TFA:H₂O:ACN (0,1:0,5:0,5) foi aplicada sobre um disco de fibra de vidro previamente tratado com o polímero SEQUA-BRENE/Polybrene (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), de acordo com os procedimentos padrões do equipamento. A derivatação foi seguida da etapa de conversão do intermediário tiazolina em PTH-aminoácido, por uma solução aquosa de TFA a 25%. A separação dos PTH-aminoácidos ocorreu em uma coluna de fase reversa (WAKOSIL-PTH 250 x 4,6 mm, Japão) com eluição conduzida em condição isocrática pela fase móvel PTH-AA (Shimadzu, Quioto, Japão), fornecida pelo fabricante. Os PTH-aminoácidos foram identificados pelos tempos de retenção por comparação aos padrões, utilizando o software PPSQ-30 Analysis (Shimadzu, Quioto, Japão).

4.5 PROCESSAMENTO DOS ESPECTROS DE MASSA E BUSCA DE SIMILARIDADES DE SEQUÊNCIAS EM BANCO DE DADOS

Os espectros de MS e MS/MS foram processados (*smoothing, background subtraction*) utilizando o software FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics, Billerica, Massachusetts, EUA) e as buscas por similaridades foram realizadas contra a base de dados do NCBI ou UniProtKB/SwissProt. Foi utilizado a ferramenta BLASTp, disponível em <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>; FASTA (EMBL-EBI), disponível em <<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fast>> e Clustal Omega (EMBL-EBI), disponível em <<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>>.

4.6 QUANTIFICAÇÃO DO CONTEÚDO PROTEICO

A estimativa da concentração proteica e do valor total em mg, obtido após todo o processo de purificação, foi realizada através da leitura de absorbância a 280 nm em BioMate™ 3S (Thermo Scientific). O valor da concentração dado por espectrofotometria UV foi aplicado segundo a lei de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon \times c \times l$$

Onde:

A: absorbância, ϵ : épsilon molar da amostra, c: concentração, l: distância percorrida pelo feixe luminoso

Para as frações semipurificadas ou toxinas para as quais o ϵ não era possível de ser calculado (pois a sequência era desconhecida) foi realizada uma estimativa através da leitura a 220 nm seguida da relação 1mg/mL equivale a 1.

Para as membranas preparadas a partir de células CHO as quantificações proteicas foram realizadas de acordo com o método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

4.7 PREPARAÇÃO DE MEMBRANAS

4.7.1 Preparação de membranas expressando diferentes receptores muscarínicos (mAChR)

Os estoques de membranas utilizados foram preparados a partir de células de ovário de hamster chinês (CHO) expressando de forma estável os diferentes mAChR clonados de humanos (hM2-hM5). Elas foram crescidas em condições padrão (37 °C, atmosfera de 5% de CO₂) em meio Gibco® F-12 Nutrient Mix GlutaMax™, contendo 10% de soro fetal bovino, 100 unid/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina e 0,25 µg/mL anfotericina B. Todos os reagentes foram adquiridos da Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, EUA). Com 100% de confluência, o meio foi removido e as células desprendidas da placa com ajuda do tampão Versen (PBS + 5 mM EDTA). As células foram lavadas com tampão fosfato gelado e centrifugadas a 1.700 g por 10 min a 4 °C. O *pellet* foi suspenso em tampão gelado (1 mM EDTA, 25 mM Na₃PO₄ e 5 mM MgCl₂, pH 7,4) e homogeneizado com um homogeneizador Potter-Elvehjem (Fisher Scientific Labosi). O homogenato foi centrifugado a 1.700 g por 15 min a 4 °C. O *pellet* foi ressuspenso em tampão, homogeneizado e novamente centrifugado. Os sobrenadantes combinados foram centrifugados a 35.000 g por 30 min a 4 °C. Por fim o *pellet* foi solubilizado no mesmo tampão (0,1 mL/placa). As concentrações de proteínas foram determinadas de acordo com o método de Lowry com albumina de soro bovino (BSA) como padrão. As membranas foram aliquotadas e armazenadas a -80 °C.

4.7.2 Preparação de membranas Torpedo

Os espécimes de *Torpedo marmorata* - mantidos em água do mar artificial convencional - foram anestesiados com 0,03% de triclaína (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) diluída a água, antes da incisão cirúrgica dos órgãos elétricos (Araoz *et al.*, 2015). As membranas contendo nAChR 2α1β1δγ foram preparadas a 4 °C a partir de órgãos elétricos de Torpedo recém-dissecados e fatiados utilizando procedimentos previamente descritos (Hill *et al.*, 1991; Miledi *et al.*, 2006; Krieger *et al.*, 2008). Resumidamente, as membranas do órgão elétrico foram picotadas em pequenos pedaços, ressuspensas em água fria contendo 0,1 mM fluoreto de fenilmetilsulfonil, 0,02% de azida e homogeneizadas em homogeneizador de tecidos, seguido de centrifugação. O sobrenadante foi recolhido e o pellet novamente homogeneizado e centrifugado. Em seguida foram realizadas sucessivas centrifugações em um gradiente de sacarose e as frações contendo as membranas com os receptores foram reunidas. A preparação foi ressuspensa em glicina 5 mM e as concentrações de proteínas foram determinadas de acordo com o método de Lowry com BSA como padrão. As membranas foram aliquotadas e armazenadas a -80 °C até a utilização.

4.8 BINDING: ENSAIOS DE COMPETIÇÃO

Para os ensaios de ligação / competição no equilíbrio, o radioligante foi utilizado em uma concentração próxima ao K_d e as preparações de membranas foram utilizadas em uma concentração ótima, determinada previamente para cada lote e teste de ligação específico. Os ensaios e as condições são descritos a seguir.

4.8.1 Ensaios de competição em membranas expressando receptores muscarínicos humanos (mAChR hM1-5)

O traçador radioativo utilizado foi [3H]N-metilescopolamina ([3H]-NMS) e as membranas foram preparadas a partir de células CHO expressando os cinco subtipos de mAChR hM1-5.

Ensaio de competição, em placa 96 poços, foram preparados utilizando 0,1 (hM1) e 20 μ g (hM2-hM3) de suspensão de membrana e 1 nM [3H]-NMS em 100 μ L de solução de reação, conduzidos à temperatura ambiente e em tampão de incubação 10 mM fosfato de sódio, 135 mM NaCl, 2,5 mM KCl pH 7,4, 0,1% de PBS-BSA, pH 7,6. A ligação total (*binding* total - BT) foi mensurada na presença de [3H]-NMS (1nM) enquanto a ligação não-específica (*binding* não específico - NS) foi mensurada na presença do traçador radioativo e excesso de NMS não marcado (1 μ M). A curva concentração-resposta de NMS (controle positivo) corresponde à NMS (1 μ M - 20 fM) na presença de [3H]-NMS (1nM). Após 4h (tempo para atingir o equilíbrio), a incubação foi encerrada por filtração com 10 mM Tris-HCl pH 7,2 a 4 °C, em sistema Cell Harvesters (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, EUA), em microplaca UniFilter-96 GF/B (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, EUA) saturada previamente com 0,5% polietileno-imina (PEI).

4.8.2 Ensaios de competição em membranas expressando receptores nicotínicos Torpedo - $2\alpha 1\beta 1\delta\gamma$

Uma suspensão de membranas dos eletrócitos, expressando nAChRs subtipo $2\alpha 1\beta 1\delta\gamma$ e purificadas a partir do órgão elétrico de *Torpedo marmorata* foi utilizada para todos os ensaios de *binding*.

Ensaio de competição com nAChR Torpedo, em placa 96 poços, foram preparados utilizando 0,05 μ g de membrana e 1 nM 125I-Tyr54- α -bungarotoxina (125I-Tyr54- α -BgTx) em 100 μ L de solução de reação, conduzidos à temperatura ambiente e em tampão de incubação 10 mM fosfato de sódio, 135 mM NaCl, 2,5 mM KCl pH 7,4, 0,1% de PBS-BSA, pH 7,6. BT foi mensurado na presença de 125I-Tyr54-C (1nM) enquanto a NS foi mensurada na presença do traçador radioativo e excesso de α -BgTx

não marcada (1 μM). A curva concentração-resposta de $\alpha\text{-BgTx}$ corresponde a $\alpha\text{-BgTx}$ (1 μM - 20 fM) na presença de $^{125}\text{I-Tyr54-}\alpha\text{-BgTx}$ (1nM). Após 3h (tempo para atingir o equilíbrio), a incubação foi encerrada por filtração com PBS (1x) a 4 °C, em sistema Cell Harvesters (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, EUA), em microplaca UniFilter-96 GF/B (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, EUA) saturada previamente com 0,5% PEI.

4.8.3 Quantificação do traçador radioativo e análise dos dados

Um total de 25 μL /poço do coquetel de cintilação, MicroScint-0 (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, EUA) foi adicionado aos filtros secos e a quantificação foi dada à medida que o coquetel de cintilação absorveu a radiação emitida pelo radioligante e emitiu um sinal de luz, liberando energia. Esta luz foi detectada pelos fotomultiplicadores do contador beta TopCount NXT (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, EUA) o qual fornecem contagens por minuto (CPM), que podem ser convertidas em desintegração por minuto (DPM) levando em consideração a eficiência de rendimento do dispositivo de 33% para trítio e 45% para iodo.

Os dados de competição foram ajustados pela equação empírica de Hill utilizando Kaleidagraph (Synergy software, Reading, Pensilvânia, EUA) a partir da qual os valores de IC50 foram extrapolados. Os dados representam no mínimo dois experimentos independentes, em duplicatas.

4.9 CULTURA DE CÉLULAS

Células CHO aderentes expressando estavelmente mACh hM3 foram crescidas em condições padrão (37 °C, atmosfera de 5% de CO_2) em meio Gibco® F-12 Nutrient Mix GlutaMax™, contendo 10% de soro fetal bovino, 100 unid/mL penicilina, 100 $\mu\text{g/mL}$ estreptomicina e 0,25 $\mu\text{g/mL}$ afotericina B. Todos os reagentes foram adquiridos da Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, EUA).

4.10 QUANTIFICAÇÃO DE MONOFOSFATO DE INOSITOL (IP1)

IP-One Tb® (Cisbio Bioassay), permite a quantificação direta de monofosfato de inositol (IP1) - metabólito estável na presença de LiCl - resultante da degradação de IP3 induzido pela cascata de ativação de GPCRs (Gq), em cultura celular aderente ou em suspensão, através de um ensaio imunocompetitivo.

O ensaio apresenta tecnologia *Homogeneous Time Resolved Fluorescence* (HTRF®) e combina Transferência de Energia de Ressonância de Förster, também chamada de *Fluorescence Resonance Energy Transfer Technology* (FRET) com *Time Resolved Measurement* (TR) (**Figura 5**). A técnica, baseada na transferência de energia entre dois fluoróforos - doador e aceitador - é constituída de tal forma que o comprimento de onda de emissão do doador corresponde ao de excitação do aceitador. Dessa forma é possível estudar a interação entre duas moléculas próximas, cada uma associada a um fluoróforo (Degorce *et al.*, 2009).

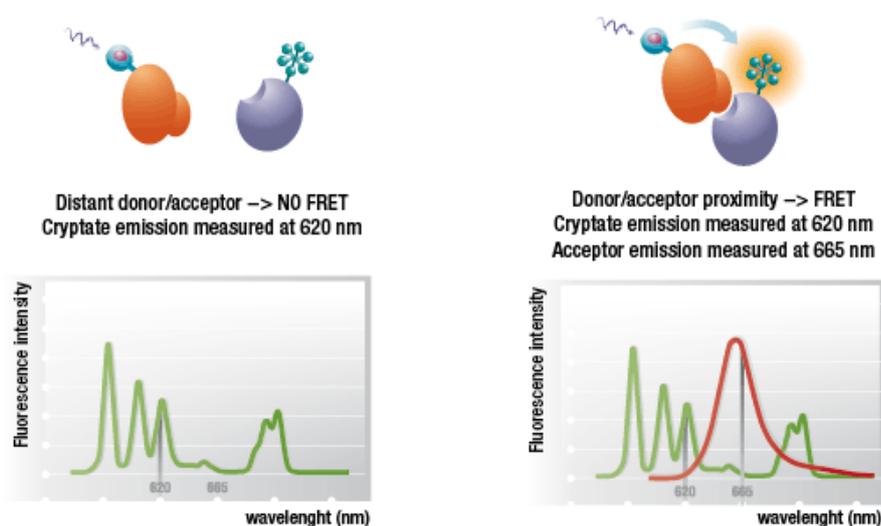


Figura 5 Transferência de energia de ressonância fluorescente entre um doador e uma molécula aceitadora, por HTRF®

Quando as duas moléculas estão em proximidade e o doador está excitado, a sua fluorescência emitida irá, por sua vez, excitar o aceitador e será possível detectar a fluorescência deste último. O ruído de fundo é minimizado devido ao atraso, na ordem de μs , do registro da fluorescência, após a excitação do doador, de modo que as emissões não específicas de curto prazo são extintas. Devido a característica de fluorescência prolongada dos fluoróforos HTRF®, é possível assim, uma medição específica e total. Um sistema FRET é definido pelo raio de Förster R_0 que corresponde à distância para a qual a eficiência de transferência é de 50%. (Fonte: < <http://www.cisbio.com/china/drug-discovery/tr-fret-basics>>, acesso em 16 de agosto de 2017)

IP-One Tb® consiste em um anticorpo monoclonal específico para IP1 marcado com a sonda doadora Lumi4®-Tb cryptate (emissão à 620 nm) que compete com o IP1 nativo, produzido pela célula e com a sonda aceitadora IP1-d2 (emissão à 665 nm). O sinal produzido é específico e inversamente proporcional a concentração de IP1 no padrão ou no lisado celular.

Células CHO expressando mAChR hM3 foram ressuspendidas em Stim B (IP-One Tb®, Cisbio Bioassay) e plaqueadas em uma densidade de 10.000 células/poço (previamente quantificadas em em câmara de Neubauer) por em microplaca 384 poços (Greiner-Bio) em 30 µL de solução de reação. As células foram tratadas com 20 µM de carbacol (CB, controle positivo) ou com diferentes concentrações das toxinas (diluídas em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,6) e incubadas por 30 min a 37°C. Para a detecção foram adicionadas as sondas IP1-d2 e o anticorpo Anti-IP1 cryptate Tb, diluídos em tampão de lise (IP-One Tb®, Cisbio Bioassay) seguido de incubação, também de 30 min. Para os ensaios de verificação da atividade antagonista foi realizada uma pré-incubação de 30 min com 12 µM NMS ou com diferentes concentrações das toxinas. A curva padrão e o controle, que não requerem células, foram preparados com IP1 calibrador (IP-One Tb®, Cisbio Bioassay), diluído em Stim B. Todos os pontos foram realizados em triplicatas. A placa foi levada ao leitor de placas CLARIOstar (BMG LABTECH, Waltham, Massachusetts, EUA) e a relação 665 nm / 620 nm foi determinada e normalizada como indicado pelo fabricante (<http://www.cisbio.com/china/drug-discovery/htrf-ratio-and-data-reduction>).

4.11 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR

No ensaio de viabilidade celular foi utilizado o reagente AlamarBlue® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). O teste baseia-se na capacidade redutora das células metabolicamente ativas converterem a molécula ativa resazurina em resorufin, um indicador fluorescente, capaz de ser detectado. Células danificadas e não viáveis têm menor atividade metabólica inata, e geram um sinal proporcionalmente menor.

Células CHO expressando mAChR hM3 foram plaqueadas em uma densidade de 10.000 células/poço (100 µL) (previamente quantificadas em em câmara de Neubauer) em microplaca 96 poços e crescidas por 24 h em condições padrão (como já descrito). As células foram tratadas com 215 µM tampão fosfato (controle positivo) ou 0,15% DMSO (controle negativo) e diferentes concentrações das toxinas (diluídas em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,6). O reagente AlamarBlue® foi adicionado logo em seguida e a placa incubada por 4 h a 37°C, protegidas da luz, como indicado pelo fabricante. Todos os pontos foram realizados em triplicatas, a placa foi levada ao leitor de placas CLARIOstar (BMG LABTECH, Waltham, Massachusetts, EUA) e a leitura da fluorescência foi realizada utilizando o comprimento de onda de excitação de 540-570 nm (pico a 570 nm) e emissão a 580-610 nm (pico a 585 nm). Os resultados foram avaliados pelo gráfico da intensidade de fluorescência *versus* concentração do composto.

4.12 SÍNTESE QUÍMICA

As sínteses químicas em fase sólida foram realizadas de acordo com a metodologia proposta por Merrifield (1963) em sintetizador automático Prelude Protein Technologies (Gyros Protein Technologies, Uppsala, Suécia).

A técnica baseia-se no uso de um composto químico (ativador) que reage com o grupo carboxila (-COOH) de um N_α-acil-aminoácido ou N_α-acil-fragmento peptídico (doador de acila ou agente acilante) e o torna mais reativo ao grupo amina (H₂N-) ou fragmento peptídico C_α-bloqueado (receptor de acila ou agente nucleofílico) do outro aminoácido, resultando na liberação de água e formação da ligação peptídica entre eles (R1-CONH-R2) (**Figura 6**). Depois do primeiro aminoácido os demais são acoplados, de maneira linear, no sentido C- para o N-terminal por repetidos ciclos de desproteção do N_α e reações de acoplamento até atingir a sequência desejada. As cadeias laterais funcionais são protegidas por grupos estáveis às condições de reação utilizadas durante a elongação do peptídeo. Depois do acoplamento o excesso de reagentes é removido por filtração e lavagem sem quaisquer perdas ou dano ao material sintetizado. Ao final o peptídeo é clivado da resina concomitantemente a remoção dos grupos protetores das cadeias laterais (Machado *et al.*, 2004; Amblard *et al.*, 2006).

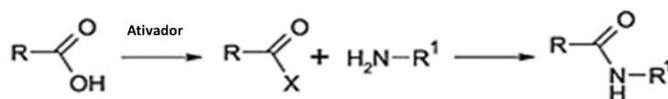


Figura 6 Representação esquemática da formação de uma ligação amida

Fonte: adaptado de (Machado *et al.*, 2004)

Foi empregado como suporte sólido a resina Wang - LL (baixa carga) funcionalizada com o último aminoácido (C-terminal) - copolímero de estireno - 1% de divinilbenzeno - e a síntese peptídica das toxinas foi realizada na escala de 12,5 μmoles utilizando aminoácidos com extremidade α-amino dos doadores de acila, protegidos pelo grupamento Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonila) da Activotec (Cambridge, Reino Unido). Os aminoácidos foram utilizados com as seguintes proteções das cadeias laterais reativas: ter-butil éter (Glu, Asp), ter-but-1 éter (Ser, Thr, Tyr), Tritil (Cys, His, Asn, Gln), t-butyloxy-carbonyl (Trp), 2,2,5,7,8-pentamethyl-chromane-6-sulfonil (Arg), ter-butoxicarbonil (Lys). Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Phe e Pro não apresentam cadeias laterais funcionais e, portanto, não são protegidas. Todos os aminoácidos foram obtidos da Activotec (Cambridge, Reino Unido). As pesagens foram feitas na balança analítica ATX224 (Shimadzu, Quioto, Japão) com precisão de 0,001 g.

Inicialmente foi pesada uma massa de 43 mg de resina e antes da ligação do primeiro derivado de aminoácido ao suporte polimérico, a resina foi previamente desprotegida para remoção do grupo protetor Fmoc. Cada aminoácido foi acoplado 2x por 10 min, seguindo a proporção 1:1:2 Fmoc-aminoácidos/HCTU/NMM em NMP (0,1 M final). Para as sequências de fragmentos 25-33 (YQKKWDDYK) para a primeira síntese e 19-34 (AGKGICYQKKWDDYKG) para a segunda síntese, o acoplamento foi realizado 4x por 10 min, devido às dificuldades intrínsecas da síntese dessas sequências. Uma terceira síntese com uma modificação de um resíduo de aminoácido da sequência C-terminal - NNCN para DNCN - também foi realizada. Depois da incorporação de cada resíduo, a resina foi acetilada durante 5 min com um excesso de 50x da mistura de anidrido acético e NMM em NMP (2,5 mL). As lavagens da resina após as etapas de acoplamento e desproteção, foram realizadas com 20% de piperidina em NMP e NMP, por 3 min (2 mL), empregando-se os solventes alternadamente, seguidas por uma lavagem final com DCM.

O segundo e demais aminoácidos da sequência peptídica foram acoplados seguindo este mesmo ciclo de acoplamento/desproteção, e após o acoplamento do último resíduo, o peptídeo foi transferido do reator para uma seringa, lavado e filtrado por 2x com DCM seguido de secagem sob pressão.

Dando continuidade, na etapa de clivagem, a resina e os grupos protetores da cadeia lateral foram removidos, utilizando uma solução de TFA/tioanisol/anisol/TIPS/H₂O (82:5:5:2,5:5) e submetidos à agitação durante 2 h. O peptídeo bruto foi obtido após quatro sequências de lavagem/precipitação/centrifugação em éter diisopropílico gelado, seguido de dissolução em 10% de ácido acético e liofilização.

A toxina linear foi analisada por HPLC, RPC, coluna X-BridgeTM BHE C18-300-5 semi-preparativa (Waters, EUA) (250 x 10 mm), 0,1% TFA/H₂O Mili-Q® v/v (solução A) e 0,1% TFA/ACN v/v (solução B) gradiente segmentado (10 a 50% de B; 1% de B/min; fluxo de 4 mL/min). A verificação da pureza foi realizada por cromatografia analítica, RPC, coluna X-BridgeTM peptide BHE C18 (Waters, EUA) (250 x 4,6 mm), 0,1% TFA/H₂O Mili-Q® v/v (solução A) e 0,1% TFA/ACN v/v (solução B) gradiente segmentado (0 a 60% de B; 1% de B/min; fluxo de 1 mL/min) e por espectrometria de massas utilizando ESI-MS (Bruker, Billerica, Massachusetts, EUA).

4.12.1 *Folding* e caracterização

Os peptídeos purificados foram reduzidos em 10 mM DTT / guanidina-Tris HCl 6 M e incubados por 1 h a 37 °C, seguida da adição de uma solução degaseificada de guanidina-HCl 0,5 M / Tris-HCl 0,1 M, EDTA 1 mM pH 8,0, na presença de glutatona em sua forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) ambas a 1 mM (a uma concentração de 0,1 mg/mL do peptídeo) e incubação por 48h a 4 °C.

Após a acidificação com 20% TFA, a purificação das toxinas “*refolded*” foi realizada por HPLC, RPC, coluna X-Bridge™ BHE C18-300-5 semi-preparativa (Waters, EUA) (250 x 10 mm), 0,1% TFA/H₂O Mili-Q® v/v (solução A) e 0,1% TFA/ACN v/v (solução B) gradiente segmentado (20 a 40% de B; 0,5% de B/min; fluxo de 4 mL/min). A verificação da pureza foi realizada por cromatografia analítica, RPC, coluna X-Bridge™ peptide BHE C18 (Waters, EUA) (250 x 4,6 mm), 0,1% TFA/H₂O Mili-Q® v/v (solução A) e 0,1% TFA/ACN v/v (solução B) gradiente segmentado (0 a 60% de B; 1% de B/min; fluxo de 1 mL/min) e por espectrometria de massas utilizando ESI-MS (Bruker, Billerica, Massachusetts, EUA).

4.12.2 Co-injeção

Para a verificação da coeluição das toxinas nativa e sintética as injeções das amostras foram realizadas individualmente e em conjunto, ou seja, co-injetadas em sistema HPLC, de forma sequencial, e seus tempos de retenção analisados. As condições utilizadas foram: cromatografia analítica, RPC, coluna X-Bridge™ peptide BHE C18 (Waters, EUA) (250 x 4,6 mm), 0,1% TFA/H₂O Mili-Q® v/v (solução A) e 0,1% TFA/ACN v/v (solução B) gradiente segmentado (0 a 60% de B; 1% de B/min; fluxo de 1 mL/min).

4.13 ESPECTROSCOPIA DE DICROÍSMO CIRCULAR

Para obter informações sobre a estrutura secundária da toxina sintética MiLTx1 foi realizada uma espectroscopia de dicróismo circular (CD) como proposto por (Beychok, 1966).

Os espectros de dicróismo circular foram registrados em espectropolarímetro J-815 (Jasco, Easton, EUA). As leituras foram obtidas a 20 °C, em cubeta de quartzo com 0,1 cm de caminho óptico e toxina MiLTx1 à 10 µM diluída em água. Os espectros foram registrados 190 - 250 nm em três varreduras.

5 RESULTADOS

5.1 PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DAS TOXINAS E BUSCA POR SIMILARIDADE EM BANCOS DE DADOS

Buscando por métodos mais adequados para a purificação da(s) toxina(s), 4 diferentes estratégias cromatográficas foram elaboradas e a metodologia com melhor resolução e reprodutibilidade, estratégia D1.1 e D2.1 (**Anexo 1A**), foi utilizada nos experimentos seguintes.

Na 1ª etapa de purificação, uma cromatografia de troca catiônica, foram obtidas 17 frações semi-purificadas (**Figura 7**). Nas frações 6, 11 e 12 (F6, F11 e F12) as massas na faixa de interesse (em torno de 7.200 Da) foram majoritárias, no entanto, essa faixa de massa também foi observada em outras frações, mas com menor intensidade. Dessa forma, para melhor aproveitamento dessas massas menos representativas, os 57 cromatogramas, obtidos por cromatografia de troca catiônica, e os respectivos espectros de massas de cada uma de suas frações - obtidos por MALDI-TOF - foram sobrepostos, analisados e as amostras correspondentes foram reunidas, resultando assim em 17 frações, numeradas de 1 a 17 (MonoS1 a MonoS17), as quais foram submetidas a uma nova etapa cromatográfica.

Na 2ª etapa de purificação, uma RPC, as 17 frações foram equilibradas em tampão salino ou água, e eluídas em ACN de acordo com o melhor perfil de separação. Os picos identificados, com faixa de massas em torno de 7.200 Da, foram reunidos por semelhança m/z e agrupados às frações obtidas anteriormente por outras estratégias cromatográficas, sendo então renomeadas de 3ª1 a 3ª13. Para obtenção das toxinas isoladas, as 13 frações semi-purificadas foram submetidas à 3ª e última etapa de purificação, também por RPC.

Ao longo de todo o processo de padronização (envolvendo as estratégias A, B, C e D) até obtenção das amostras de interesse puras, foram realizadas 232 cromatografias. Purificamos 14 toxinas, com m/z na faixa de 7.200 Da, e 5 com m/z entre 6.000-7.000 Da, porém, muito representativas na peçonha. Elas foram selecionadas e parcialmente sequenciadas. Para as 19 toxinas (10 µg), previamente digeridas com tripsina, foram adquiridos 46 diferentes íons MS, sendo que para 5 destes íons a obtenção da sequência foi possível. Para a digestão com a enzima Glu-C V8 foram utilizadas 12 toxinas (50 µg) e obtivemos 32 diferentes íons MS, dos quais 11 foram passíveis de sequenciamento (os íons obtidos foram descritos no **Anexo 1B**). Os íons para os quais a sequência não foi parcial ou completamente descrita apresentavam espectros de baixa resolução ou o sequenciamento não foi confirmado pela série complementar y ou b. Em alguns espectros, também foi identificado que, os íons mais abundantes eram produtos de autólise da digestão enzimática.

Além do sequenciamento “de novo” foram utilizadas outras técnicas para identificação das sequências dos fragmentos das toxinas (**Tabela 6**): *In Source Decay* (ISD) e a degradação de Edman, a qual nos permitiu identificar regiões N-terminais das sequências.

Para o sequenciamento por ISD foram testadas 12 toxinas dentre as quais obtivemos 2 sequências: uma sequência de 21 resíduos de aminoácidos (do 12º ao 31º resíduo) da toxina MI13, a qual apresentou identidade de 76% à toxina Bucandin de *Bungarus candidus* (krait da Malásia) e uma sequência de 7 resíduos da toxina MI10, para a qual não se encontrou similaridade significativa com outras toxinas (**Tabela 6**). Para a toxina MI14 a obtenção da sequência não foi possível, no entanto ela apresentou o mesmo padrão de fragmentação observado para a toxina MI13, levando-nos a inferir que são toxinas homólogas.

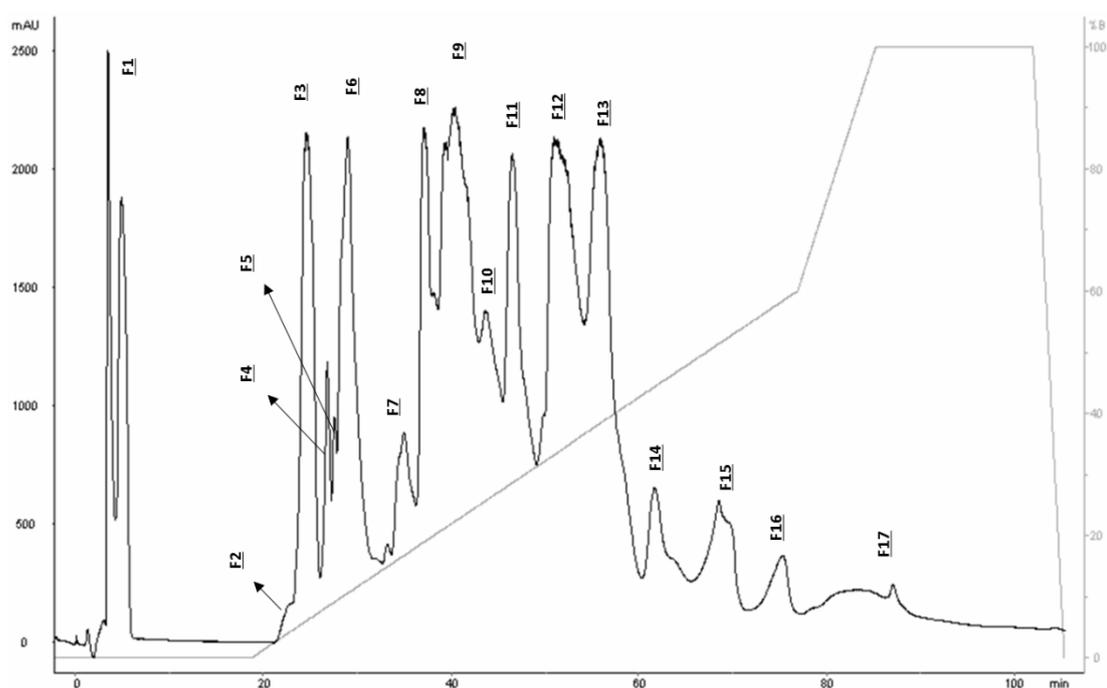


Figura 7 Fracionamento da peçonha da serpente *Micrurus lemniscatus*

Figura representativa de uma das 57 cromatografias líquidas de troca catiônica. Coluna Mono S™ 4.6/100 PE (Tricorn™), previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 20 mM pH 5,0 (solução A) na qual 5 mg da peçonha foram aplicados e eluídos em tampão acetato de sódio 20 mM pH 5,0 em 1 M de NaCl (solução B), gradiente segmentado (0 a 60% NaCl; 10 mM NaCl/min; fluxo 1 mL/min). A eluição foi monitorada por absorvância, a 214 nm. No eixo x tem-se o tempo e no eixo y tem-se a intensidade da absorvância e a porcentagem de eluição da solução B. Foram obtidas 17 frações semi-purificadas, e suas massas foram identificadas por MALDI-TOF.

No sequenciamento por degradação de Edman os melhores resultados foram alcançados somente para cinco toxinas: MI1, MI4, MI8, MI9 e MI19 (**Tabela 6**), sendo que para as quatro primeiras

foram obtidos 26 ciclos bem-sucedidos cuja identificação dos resíduos de aminoácidos foi possível. Para M119, um bom sinal foi adquirido até o décimo resíduo, no entanto essa sequência isolada não apresentou nenhuma similaridade à outras sequências depositadas em bancos de dados.

De posse dos 23 fragmentos diferentes, obtidos através das três técnicas de sequenciamento, verificou-se que algumas amostras apresentaram o mesmo padrão de fragmentação, e conseqüentemente, os mesmos íons. Logo, para os alinhamentos contra as bases de dados considerou-se uma única amostra, para a qual manteve-se o nome da amostra original com maior número de fragmentos/ resíduos.

Devido à ausência de regiões complementares não foi possível sobrepor todas as sequências obtidas, inviabilizando o completo sequenciamento das amostras. A identificação de resíduos isóbaros (Leu / Ile) ou quase isóbaros (Gln / Lys), bem como qualquer outra ambigüidade, foi baseada na similaridade com sequências proteicas depositadas em bancos de dados, sendo, portanto, apenas uma sugestão. M113 e M114 foram identificados como uma mesma amostra, com 25 resíduos sequenciados, a qual apresentou alta similaridade à toxina Bucandin (*Bungarus candidus*). Para M119 foi possível sugerir 55% de sua sequência após comparação contra a Short neurotoxin D1 de *Micrurus pyrrhocryptus*. A toxina M19 teve 38 resíduos de aminoácidos identificados, o que corresponde a 62% da sequência quando alinhada e comparada a toxina MALT0063C (*Micrurus altirostris*). Já M14, com alta identidade à Frontoxin IV, de *Micrurus frontalis*, teve 83% da sequência obtida (**Anexo 1C**).

Com base na faixa de massa de interesse, na sequência melhor elucidada e na maior quantidade de material, M14 foi definida como a toxina a ser caracterizada ao longo do trabalho. Ela foi purificada em 3 etapas cromatográficas (**Figura 8**), sua massa foi identificada (**Figura 9**) e seus fragmentos sequenciados e sobrepostos como já descrito. A sequência completa foi determinada por ISD (em colaboração com o Laboratoire de Spectrometrie de Masse da Université de Liège, Bélgica) e digestão enzimática seguida da determinação do *peptide mass fingerprinting*. A toxina proposta (**Figura 10**) é uma quimera entre a sequência determinada e a Frontoxin IV, com a qual apresenta 75% de identidade. Sua massa monoisotópica é de 7.201,12 Da, no entanto a massa calculada corresponde 7.202,01 Da, ou seja, uma diferença de quase 1 Da da massa mensurada. Essa diferença pode ser devido a uma incerteza da extremidade C-term X-NNCN ou X-DNCN-NH₂. No entanto, como essas toxinas não são amidadas a sequência considerada mais provável foi X-NNCN.

Tabela 6 Sequências dos fragmentos das toxinas obtidos por: a) digestão enzimática seguido de MS/MS, b) ISD e c) degradação de Edman

Modo de aquisição	Query (sequência submetida)			Subject (sequência encontrada)			
	$[M+H]^+$ <i>exp.</i>	Amostra	Sequencia	Nome / massa	Espécie	Atividade	Identidade
MS/MS (Digestão enzimática com Glu-C V8)	926,3	M15 e M17	HWWRLLE	não encontrou similaridade significativa			
	1666,6	M110	MLERGCAANC PQME	Frontoxin IV (FTx IV) / 7420 Da	<i>Micrurus frontali</i>	antagonista de nAChR da junção neuromuscular de rãs	12/14 (86%)
	2147,7	M119	GQCYKKTWRD HRGTLLE	Three-finger toxin A1 (MlatA1) / 6525,39 Da	<i>Micrurus laticollaris</i>	antagonista de nAChR fetal e adulto e α -7 neuronal de maneira dose dependente	15/17 (88%)
				Short chain alpha neurotoxin DH / 6435,34 Da	<i>Micrurus diastema</i>	não descrita	15/17 (88%)
				Three-finger toxin 5a / 6553,41 Da	<i>Micrurus tener</i>	não descrita	15/17 (88%)
	2259,6	M119	MLCYNQSSQ PPTKTCSE	Neurotoxin D1 / 6533 Da	<i>Micrurus pyrrhocryptus</i>	não descrita	17/19 (89%)
	2243,9	M114	RCGVSGCHLK TGCSDD	Putative three finger toxin precursor	<i>Micrurus altirostris</i>	não descrita	13/16 (81%)
				Bucandin / 7285 Da	<i>Bungarus candidus</i>	aumenta a liberação pré-sináptica de Ach	13/16 (81%)
	2346,9	M11, M14 e M110	TCPAKGLCYQ QKWDDYQGE	Long neurotoxin MS2 / 7309 Da	<i>Micrurus surinamensis surinamensis</i>	antagonista de nAChR	14/20 (70%)
	2403,9		TCPAGKGLCY QKKWDDYQGE				15/20 (75%)
	2777		TCPAGKGLCY QKKWDDYQGE IME				15/20 (75%)
	2720	M11 e M14	WNGKGLCYQK KWDYKGTSG KE	Long neurotoxin MS5 / 7189 Da	<i>Micrurus surinamensis</i>	antagonista de nAChR da junção neuromuscular	9/15 (75%)
	2491,6	M18 e M19	GHYNVCCSTD LCNHN	Three-finger toxin 4b / 6363,23 Da	<i>Micrurus tener</i>	não descrita	14/15 (97%)
				Frontoxin II (FTx II) / 6560 Da	<i>Micrurus frontalis</i>	antagonista de nAChR muscular	12/13 (92%)
				Mipartoxin-1 / 7038 Da	<i>Micrurus mipartitus</i>	antagonista de nAChR da junção neuromuscular	12/13 (92%)
2531,6		GGLYPVCCST DLCNHLT	Short neurotoxin 2 (SNTX2) / 8596 Da	<i>Pseudonaja textilis</i>	antagonista de nAChR muscular	12/14 (86%)	
			3FTx-Pse-217 / 6213,11 Da	<i>Pseudonaja modesta</i>	não descrita	15/17 (86%)	

Continuação da Tabela 6

Modo de aquisição	Query (sequência submetida)			Subject (sequência encontrada)			
	$[M+H]^+$ <i>exp.</i>	Amostra	Sequencia	Nome / massa	Espécie	Atividade	Identidade
MS/MS (Digestão enzimática com Tripsina)	1046	M14	HTSLLCCR	Frontoxin IV	<i>Micrurus frontalis</i>	bloqueador nAChR da junção neuromuscular	8/8 (100%)
	1380	M14	CQANCPQMESR	Frontoxin IV	<i>Micrurus frontalis</i>	bloqueador nAChR da junção neuromuscular	9/10 (89%)
	2064	M113	WDYFEYGCYC DSR	Acidic phospholipase A2 2 (APLA2-2) / 13053,45 Da	<i>Ophiophagus hannah</i> (king cobra)	Fospholipase A2	9/12 (75%)
	2339,3	M114	CTDNNYVCQF VCNCDR	PLA2-Pse-8/ 14049,31 Da	<i>Pseudonaja modesta</i>	Fospholipase A2	11/16 (71%)
	2423	M116, M113 e M114	SSPLKDYADY GCYCGR	Phospholipase A2 (svPLA2) / 15702 Da	<i>Micrurus altirostris</i>	Fospholipase A2	15/16 (94%)
ISD	7232	M113	HLKTTCSADE KFCYKWFNKI T (Sequencia parcial/2563,9 Da)	Bucandin / 7285 Da	<i>Bungarus candidus</i>	aumenta a liberação pré-sináptica de Ach	16/21 (76%)
	7224	M110	CSDSETC (Sequencia parcial/743,7 Da)	não encontrou similaridade significativa			
Degradação de Edman	7225	M14	LTCKTCSRDT CSDSETCAPG KGICYQ (2771,1 Da)	Frontoxin V / 7162 Da	<i>Micrurus frontalis</i>	bloqueador nAChR da junção neuromuscular	18/26 (89%)
				Long neurotoxin MS4 / 7312 Da	<i>Micrurus surinamensis</i>	Fraco antagonista de nAChR	18/26 (69%)
	7202	M11	LTAKTCSKDT QSDSETCAPG KGICYQ (2751 Da)	Frontoxin V / 7162 Da	<i>Micrurus frontalis</i>	bloqueador nAChR da junção neuromuscular	13/23 (57%)
	7255	M19	LICYVMEGA KMTCPGECNL CECYAV (2831,4 Da)	Three-finger toxin MALT0063C / 6827,02 Da	<i>Micrurus altirostris</i>	não descrita	22/27 (81%)
	7285	M18	LKCYVMEGA CMTCPGECNL CEAYAV (2789,3 Da)	Mipartoxin-1 / 7038 Da	<i>Micrurus mipartitus</i>	antagonista de nAChR da junção neuromuscular	20/26 (81%)
6743	M119	VICYNSQCCQ (1160,3 Da)	não encontrou similaridade significativa				

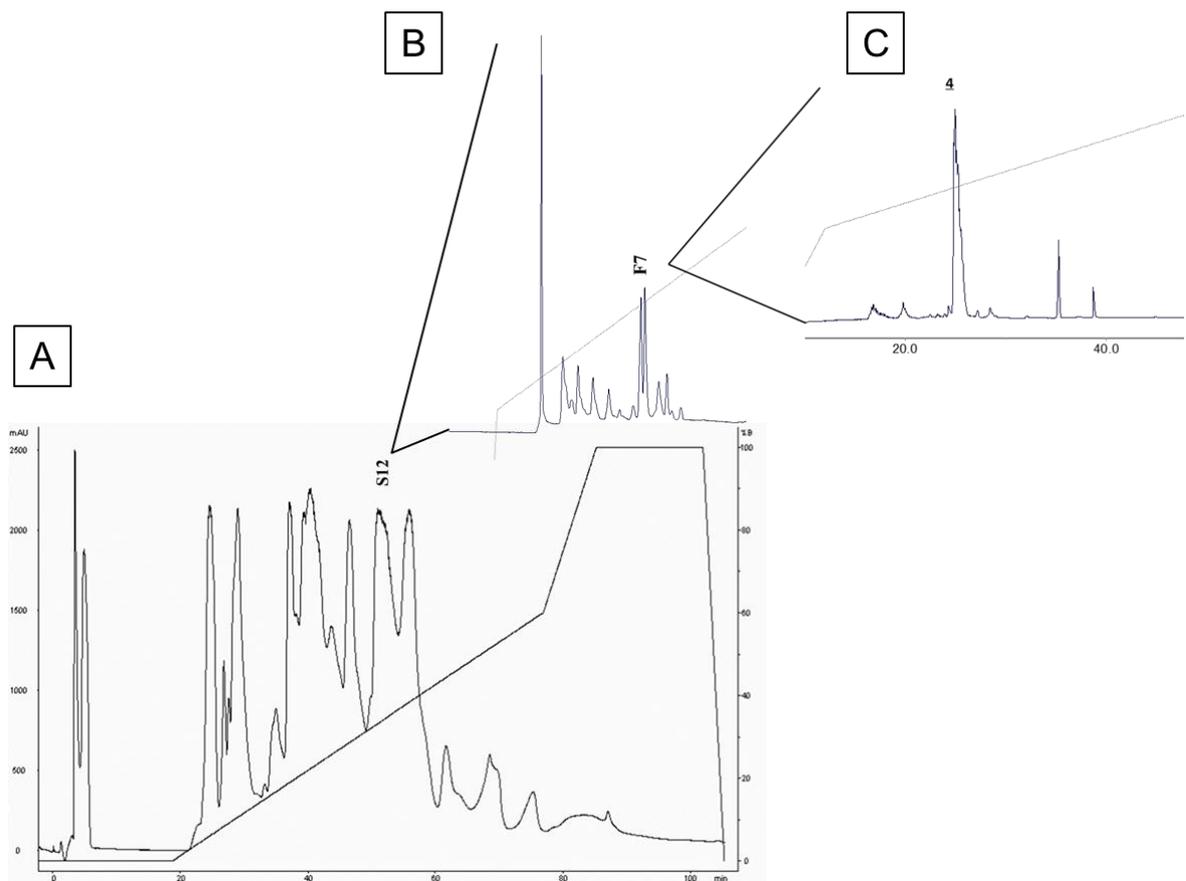


Figura 8 Fracionamento da peçonha da serpente *Micrurus lemniscatus* e obtenção da toxina MI4

A) Cromatografia líquida de troca catiônica, na coluna Mono STM 4.6/100 PE (TricornTM) previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 20 mM pH 5,0 (solução A) na qual 5 mg da peçonha foram aplicados e eluídos em tampão acetato de sódio 20 mM pH 5,0 em 1M de NaCl (solução B), gradiente segmentado (0 a 60% NaCl; 10 mM NaCl/min; fluxo 1 mL/min). A eluição foi monitorada por absorbância, a 214 nm. No eixo x tem-se o tempo e no eixo y tem-se a intensidade da absorbância e a porcentagem de eluição da solução B. **B)** A fração MonoS12 foi submetida à RPC, em coluna analítica SupelcosilTM LC-18 (25 cm x 4.6 mm, 5 µm) 0,1% TFA/tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 v/v (solução A) e eluída em 0,1% TFA/ACN v/v (solução B) gradiente segmentado (20 a 60% de B; 2% de B/min.; fluxo de 1 mL/min.). **C)** A fração 7 foi submetida a uma segunda fase reversa em coluna analítica Phenomenex Kinetex C18 (15 cm x 4.6 mm, 2,6 µm) 0,1% TFA/H₂O Mili-Q® v/v (solução A) e 0,1% TFA/ACN v/v (solução B) gradiente segmentado (15 a 40% de B; 0,5% de B/min.; fluxo de 1 mL/min). A toxina eluída na fração 4 corresponde a amostra MI4.

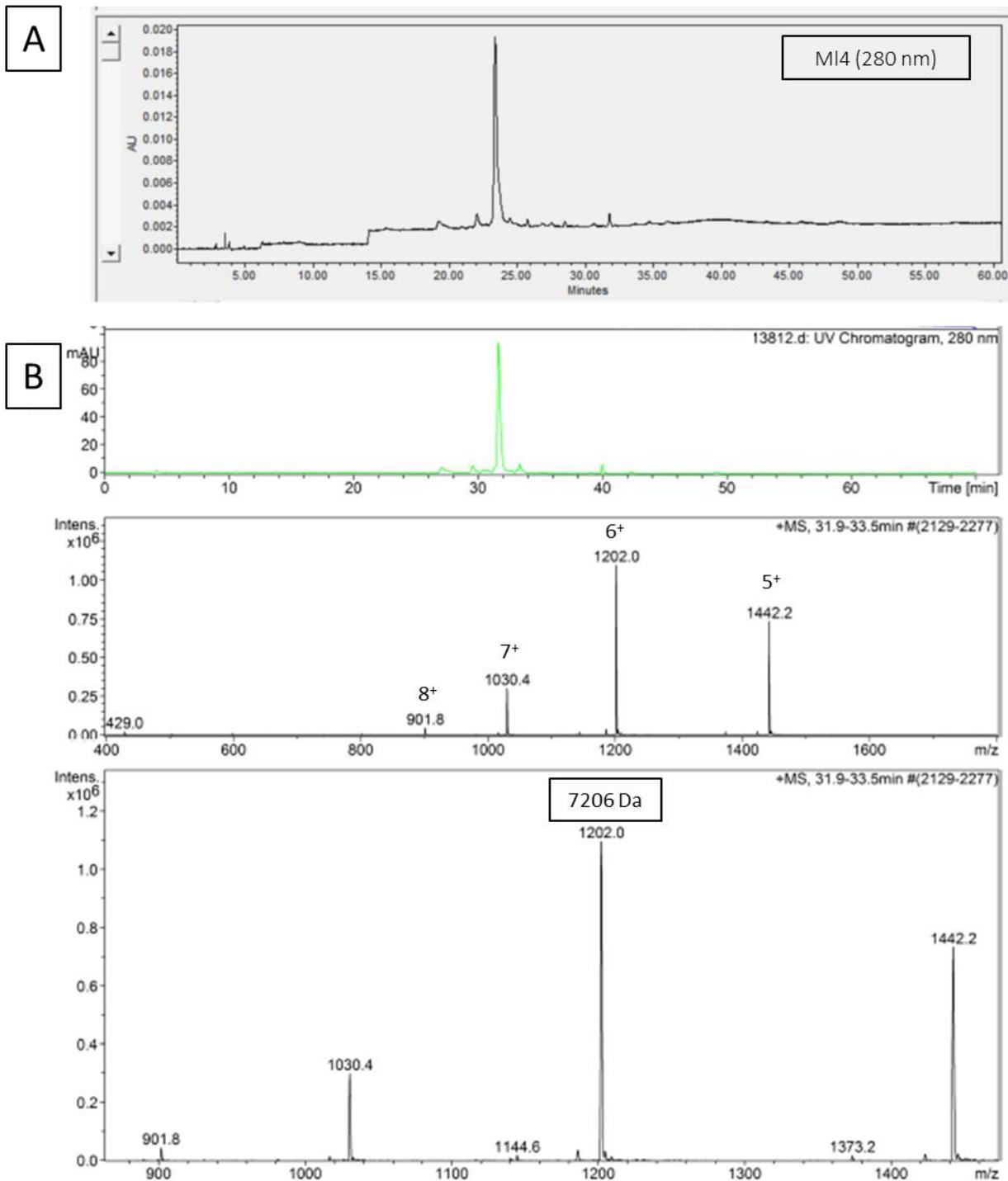


Figura 9 Verificação de pureza e identificação da massa da toxina MI4

Logo após a purificação, **A**) a verificação da pureza foi realizada por cromatografia analítica, RPC, coluna X-Bridge™ peptide BHE C18 (Waters, EUA) (250 x 4,6 mm), 0,1% TFA/H₂O Mili-Q® v/v (solução A) e 0,1% TFA/ACN v/v (solução B) gradiente segmentado (0 a 60% de B; 1% de B/min; fluxo de 1 mL/min) e **B**) por espectrometria de massas utilizando LC-MS (Bruker, Billerica, Massachusetts, EUA). A massa média identificada foi de 7.206 Da.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DA TOXINA M14

Dando continuidade aos objetivos propostos por esse projeto, a toxina M14 foi submetida a ensaios de *binding* para avaliar sua possível atividade e seletividade frente aos subtipos de mAChR hM1 e hM3, nAChR Torpedo ($2\alpha_1\beta_1\delta\gamma$), além da quantificação direta de IP1. Por fim, também foram realizados ensaios de toxicidade celular.

A **Figura 11** representa a ligação do radioligante [^3H]-NMS (em DPM) em membranas de células CHO expressando mAChRh, em experimentos de competição em função da concentração, com este mesmo ligante não marcado (NMS) e com a toxina M14. Observa-se que, para os mAChR testados a toxina agiu de forma seletiva sobre hM3, competindo com o radioligante de forma concentração dependente ($\text{IC}_{50} = 25,9 \text{ nM}$). Entretanto a concentração máxima utilizada, $10 \mu\text{M}$, não foi capaz de deslocar completamente a NMS marcada. A toxina M14 (50 nM) não foi capaz de competir com o radioligante quando este se associou ao receptor hM1, mostrando que ela não interage no mesmo sítio da NMS, para este receptor.

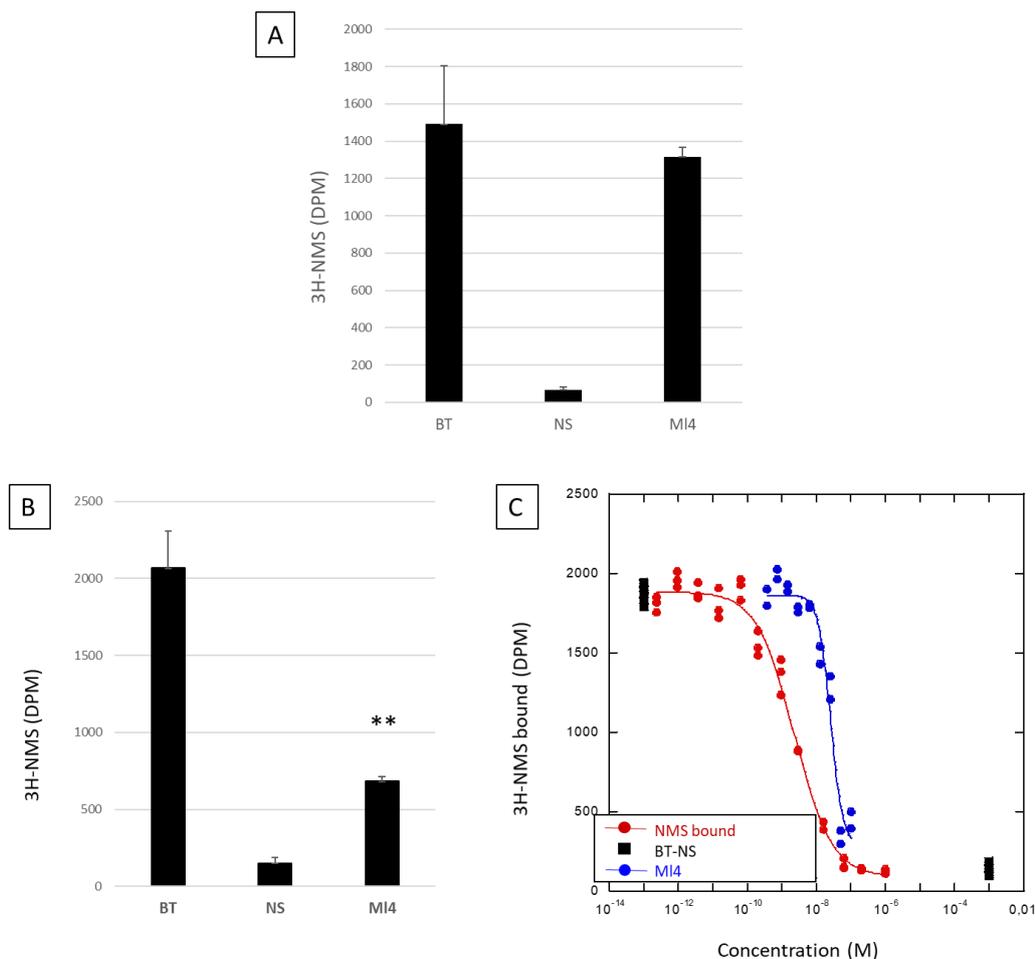


Figura 11 Curvas de competição da toxina MI4 *versus* [3H]N-metilescopolamina, em membranas expressando receptores muscarínicos

Ensaio de competição no equilíbrio (conduzidos à temperatura ambiente e volume final de 100 μ L), foram realizados utilizando 0,1 μ g (hM1) e 20 μ g (hM3) de membranas preparadas a partir de células CHO expressando os subtipos de receptores muscarínicos humanos (hM1 e hM3) e 1 nM [3H]N-metilescopolamina ([3H]-NMS) (*binding* total - BT). Enquanto a ligação não-específica (*binding* não específico - NS) foi mensurada na presença do traçador radioativo e excesso de NMS não marcado (1 mM). A curva NMS (controle positivo) corresponde à curva concentração-resposta de NMS (1 μ M - 20 fM) na presença de [3H]-NMS (1nM). Os resultados são expressos pela taxa específica de ligação [3H]-NMS mensurada na presença ou não da toxina MI4. **A)** Observa-se que MI4 (50 nM), utilizando-se receptores hM1, não foi capaz de competir com [3H]-NMS, mostrando que essa toxina não interage com esse receptor, no sítio de ligação da NMS. **B)** Em receptores hM3, na concentração única de 50 nM, MI4 inibiu a resposta do ligante [3H]-NMS em 67%; **C)** e em curva de competição concentração resposta (100 nM a 0,37 nM) essa inibição foi confirmada (IC₅₀ = 25,9 nM). (Triplícata, n = 2, Test t, p<0,05, p = 0,0014)

Para confirmar a ativação muscarínica hM3 e caracterizar a atividade da MI4 foi realizado o ensaio imunocompetitivo, IP-One Tb® (Cisbio Bioassay) que permite a quantificação direta de IP1 - metabólito estável na presença de LiCl - resultante da degradação de IP3, induzido pela cascata de ativação de GPCRs (Gq). Células CHO expressando estavelmente mAChR hM3 foram tratadas em diferentes condições utilizando MI4, 20 μ M CB (agonista muscarínico) e 12 μ M NMS (antagonista muscarínico). Em nenhuma das concentrações testadas (10 μ M a 3 nM), MI4 promoveu aumento da concentração de IP1 (**Figura 12A**). Para avaliar uma possível atividade agonista, a toxina foi adicionada após a pré-incubação com NMS e nenhuma alteração da concentração de IP1 foi observada. No entanto quando CB foi adicionado após uma pré-incubação com MI4, a liberação de IP1 foi reduzida em 60% quando comparada ao controle (**Figura 12B**). Isso nos leva a inferir uma atividade antagonista da MI4 na concentração de 50 nM.

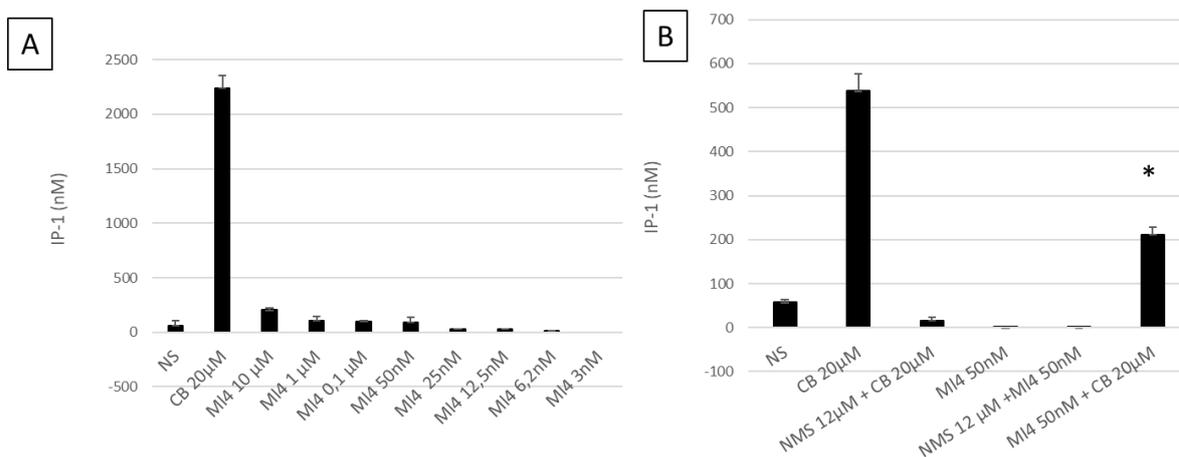


Figura 12 Quantificação da liberação de monofosfato inositol (IP1) mediada pela toxina MI4 sobre receptores muscarínicos humanos hM3 expressos em células CHO

Monofosfato de inositol (IP1) - resultante da degradação de inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3) induzido pela cascata de ativação de GPCRs (Gq) - foi quantificado diretamente em células CHO expressando estavelmente o subtipo de receptor muscarínico humano M3 (hM3), submetidas ao ensaio IP-One Tb® (Cisbio Bioassay, Codolet, França). Carbacol (CB) foi utilizado como controle positivo e as células não estimuladas (NS) como controle negativo. **A**) As diferentes concentrações testadas da toxina MI4 não alteraram a concentração de IP1, assim como o NS. **B**) No entanto, células pré-incubadas com MI4 por 30 min, tratadas com CB, reduziram a liberação de IP1 em 60%, o que nos leva a inferir uma atividade antagonista. N-metilescopolamina (NMS) 12 μ M (240x mais concentrado que a toxina) inibiu completamente CB. (Triplícata, n = 3, Test t, p<0,05, p = 0,0313)

A toxina MI4 também foi testada frente à receptores nicotínicos Torpedo - $2\alpha1\beta1\delta\gamma$ - por ensaio de *binding*, e deslocou completamente o radioligante assim como a α -BgTx em excesso (NS) (**Figura 13**).

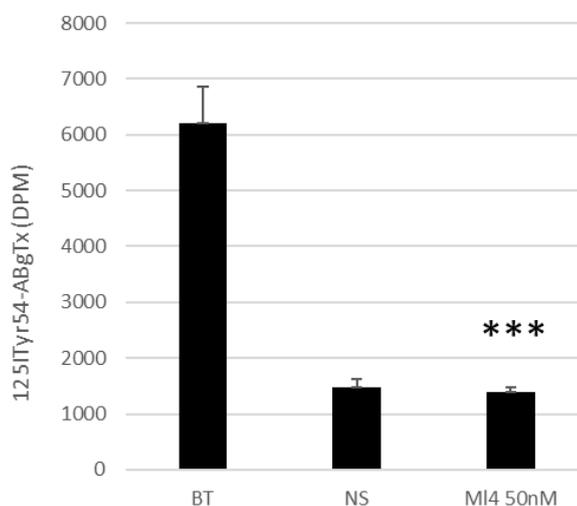


Figura 13 Competição da toxina MI4 versus 125I-Tyr54- α -bungarotoxina em membranas expressando receptores nicotínicos Torpedo - $2\alpha1\beta1\delta\gamma$

Ensaio de competição no equilíbrio (conduzidos à temperatura ambiente e volume final de 100 μ L), foram preparados utilizando 0,05 μ g de membranas preparadas a partir dos eletrócitos de *Torpedo marmorata* (expressando o subtipo nACh $2\alpha1\beta1\delta\gamma$) e 1 nM 125I-Tyr54- α -bungarotoxina (125I-Tyr54- α -BgTx) (*binding* total - BT). Enquanto a ligação não-específica (*binding* não específico - NS) foi mensurada na presença do traçador radioativo e excesso de α -BgTx não marcado (1 mM). Os resultados são expressos pela taxa específica de ligação 125I-Tyr54- α -BgTx mensurada na presença ou não da toxina MI4. Na concentração única de 50 nM de MI4 foi observada a completa inibição do ligante 125I-Tyr54- α -BgTx. (Triplicata, n = 2, Teste t, $p < 0,05$, $p = 0,0006$)

Por fim, para avaliar a citotoxicidade, MI4 (10 μ M) foi submetida ao ensaio com AmarBlue® (**Figura 14**) o qual baseia-se na capacidade das células metabolicamente ativas converterem o reagente em um indicador fluorescente, capaz de ser detectado por colorimetria. Logo, células danificadas e não viáveis têm menor atividade metabólica inata, e geram um sinal proporcionalmente menor. A toxina não reduziu a intensidade de fluorescência, assim como o controle negativo (tampão) quando comparados ao controle positivo, DMSO 0,15%, portanto, não apresenta toxicidade aparente.

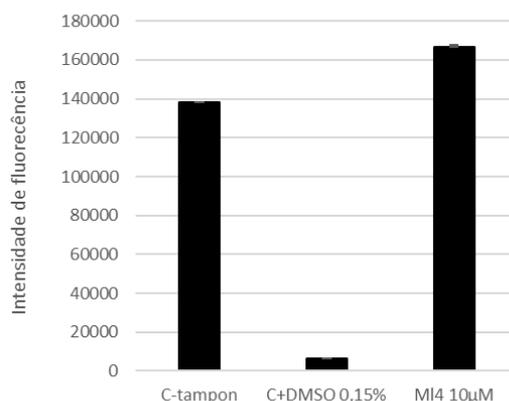


Figura 14 Ensaio de toxicidade celular

No ensaio AlamarBlue®, avaliação metabólica inata, a toxina MI4 (10 µM) não promoveu redução da intensidade de fluorescência, assim como o controle negativo (tampão) quando comparados ao controle positivo, DMSO 0,15%. Portanto, a toxina não apresentou citotoxicidade aparente. (Triplicata, n = 2)

5.3 SÍNTESE QUÍMICA DA TOXINA NATIVA ML4 - MILTX1

Identificada a atividade antagonista muscarínicas M3 e atividade nicotínica $2\alpha 1\beta 1\delta\gamma$ da toxina MI4, o passo seguinte foi sintetizá-la quimicamente e caracterizá-la em detalhes, sem a limitação da quantidade de amostra.

Foi realizada uma síntese química em fase sólida, por estratégia Fmoc, da sequência de 64 resíduos de aminoácidos desta toxina, a saber: LTCKTCPFDTCSDSETCPAGKGICYQKKWDDYKGEMLERGAANCPKMESRHTSLCCRRN CN. A toxina sintética foi nomeada de MiLTx1.

Para síntese 1 os resíduos 25-33 (YQKKWDDYK) foram acoplados por 4x consecutivas, 5 min cada (**Figura 15A**), no entanto essa tentativa de otimização da síntese não foi muito promissora. Os dois picos de intensidade semelhante nos cromatogramas (**Figura 15B**) são indícios da fragmentação interna da toxina sintética. Essa hipótese foi confirmada posteriormente por LC-MS, através do qual identificaram-se duas massas majoritárias correspondentes aos fragmentos 64-25 e 25-1 resíduos de aminoácidos. Dos 72 mg do produto bruto da síntese apenas 4 mg corresponderam à massa da toxina íntegra (**Figura 15D**). A amostra linear foi submetida a lenta oxidação, favorecendo assim, as conformações de mínimo energético, e em teoria, se aproximando do enovelamento da toxina nativa, com as 5 pontes dissulfeto. Após o *folding* a amostra foi novamente purificada por RPC e um pico majoritário foi obtido (**Figura 15C**). Devido ao baixo rendimento, foi proposta uma otimização para a

segunda síntese em que uma maior sequência de resíduos (19-34 / AGKGICYQKKWDDYKG) foi submetida ao acoplamento longo (**Figura 15E**). Dessa forma o rendimento final subiu de 2 para 12%. Ainda foi proposta uma terceira síntese (**Figura 15F**) na qual o ponto de incerteza da extremidade C-term X-NNCN ou X-DNCN, levantada pelos colaboradores belgas, foi avaliado. Essa terceira amostra foi renomeada de MiLTx1 B.

A pureza da toxina MiLTx1 enovelada (após o *folding*) foi verificada mais uma vez por RPC em coluna analítica C18 (**Figura 16A**) e também por LC-MS (**Figura 16B e C**). O perfil do cromatograma apresenta um proeminente pico e tempo de retenção de 27,3 min. Através dos espectros de massas antes (**Figura 16B**) e depois (**Figura 16C**) do *folding*, apresentando respectivamente 7.215,5 e 7.205,6 Da, identificou-se uma redução de 10 Da, o que é coerente com a massa esperada para toxina oxidada, uma vez que para cada ponte dissulfeto formada são perdidos 2H⁺. O resultado obtido por HPLC demonstra alto grau de pureza, no entanto outros íons foram identificados no espectro de massas. Acredita-se que essas impurezas, apesar de ionizarem bem, são pouco representativas na amostra.

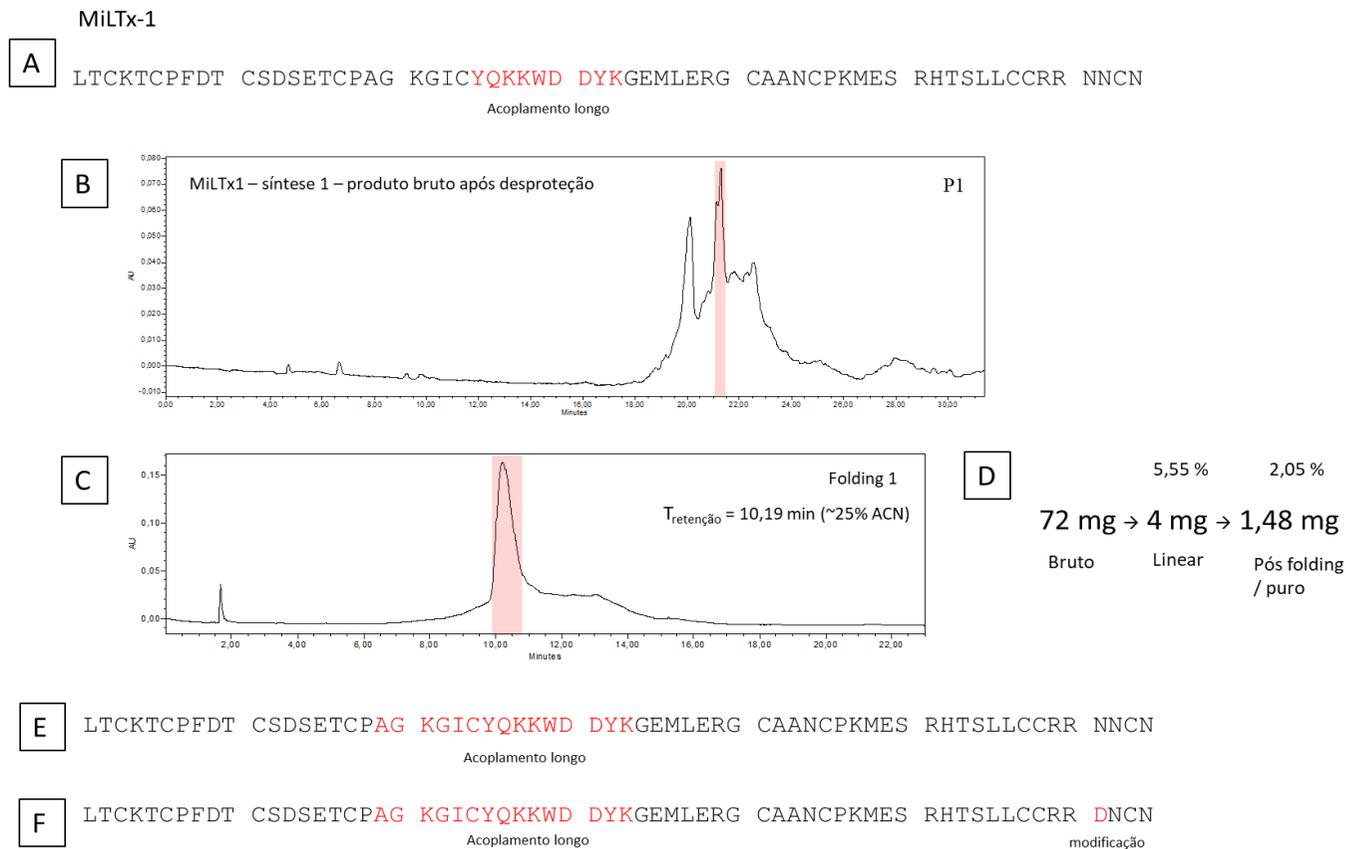


Figura 15 Síntese química da toxina MiLTx1

A) Sequência da toxina MiLTx1 sintetizada quimicamente por estratégia Fmoc. Em destaque sequência submetida a 4 séries de acoplamento. **B)** Purificação do produto bruto após desproteção da resina e dos grupos protetores laterais. **C)** Purificação da toxina enovelada. **D)** Cálculo de rendimento ao longo da síntese. **E)** Sequência da segunda síntese, sendo os resíduos em destaques submetidos 4 séries de acoplamento. **F)** Sequência da terceira síntese, MiLTx1 B, com modificação da extremidade C-terminal, em destaque.

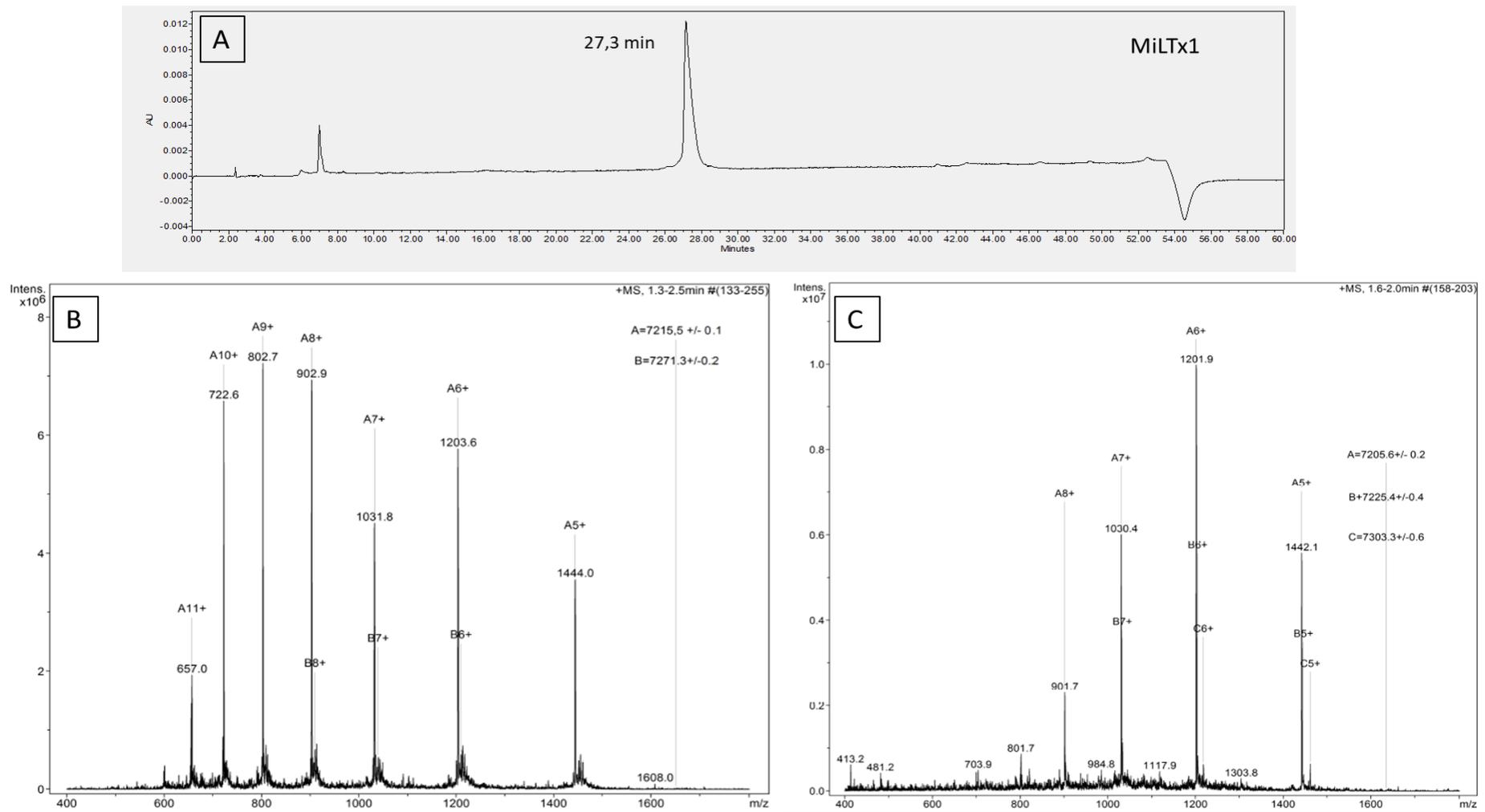


Figura 16 Perfil analítico da toxina sintética MiLTx1

A) Perfil analítico da toxina evidenciando o tempo de retenção de 27,3 min. B) Perfil de massas da toxina antes do *folding*, 7.215 Da e C) após o *folding* 7.205,6 Da, correspondente a massa da toxina oxidada (a cada ponte dissulfeto são perdidos 2H⁺, portanto após oxidação a toxina apresenta 10 Da a menos).

A última caracterização bioquímica realizada foi a espectroscopia de dicroísmo circular (**Figura 17**). Apesar da ausência dessa caracterização para toxina nativa MI4, em nível comparativo, a toxina MiLTx1 apresenta características de folha β , sendo as leituras a 195 nm positivas e a 216 nm negativas, assim como já descrito para outras toxinas 3FTxs.

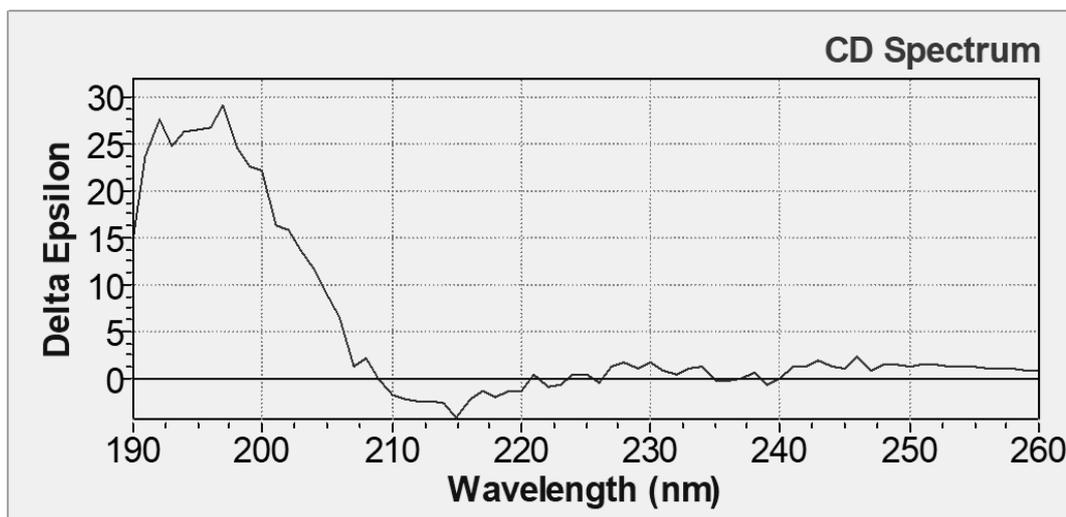


Figura 17 Espectroscopia de dicroísmo circular

As leituras foram obtidas a 20°C, em cubeta de quartzo com 0,1 cm de caminho óptico contendo a toxina MiLTx1 (10 μ M) diluída em água. Os espectros foram registrados em espectropolarímetro J-815 (Jasco, EUA), 190 - 250 nm em três varreduras. A deconvolução foi realizada pelo software CD Deconvolution e os resultados apresentaram leituras positivas a 195 e negativas a 216 nm, padrão característicos de folha β , classicamente descrito para toxinas 3FTxs.

5.4 CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DA TOXINA SINTÉTICA MILTX1

Afim de caracterizar farmacologicamente a versão sintética da toxina MI4, MiLTx1 foi submetida a ensaios de *binding* para avaliar sua atividade e seletividade frente aos subtipos de mAChR (hM1 a hM5) e receptores nicotínicos Torpedo - $2\alpha_1\beta_1\delta\gamma$.

A possível competição de MiLTx1 com [3H]-NMS foi investigada, em membranas expressando estavelmente os subtipos de mAChR hM1, hM2, hM3, hM4 e hM5. Em curva concentração-resposta (10 μ M a 0,1 nM) não foi observada a inibição do ligante [3H]-NMS pela toxina, em nenhum dos 5 subtipos de mAChR (**Figura 18**). Os resultados são expressos pela taxa específica de ligação [3H]-NMS mensurada na presença ou não da toxina MiLTx1.

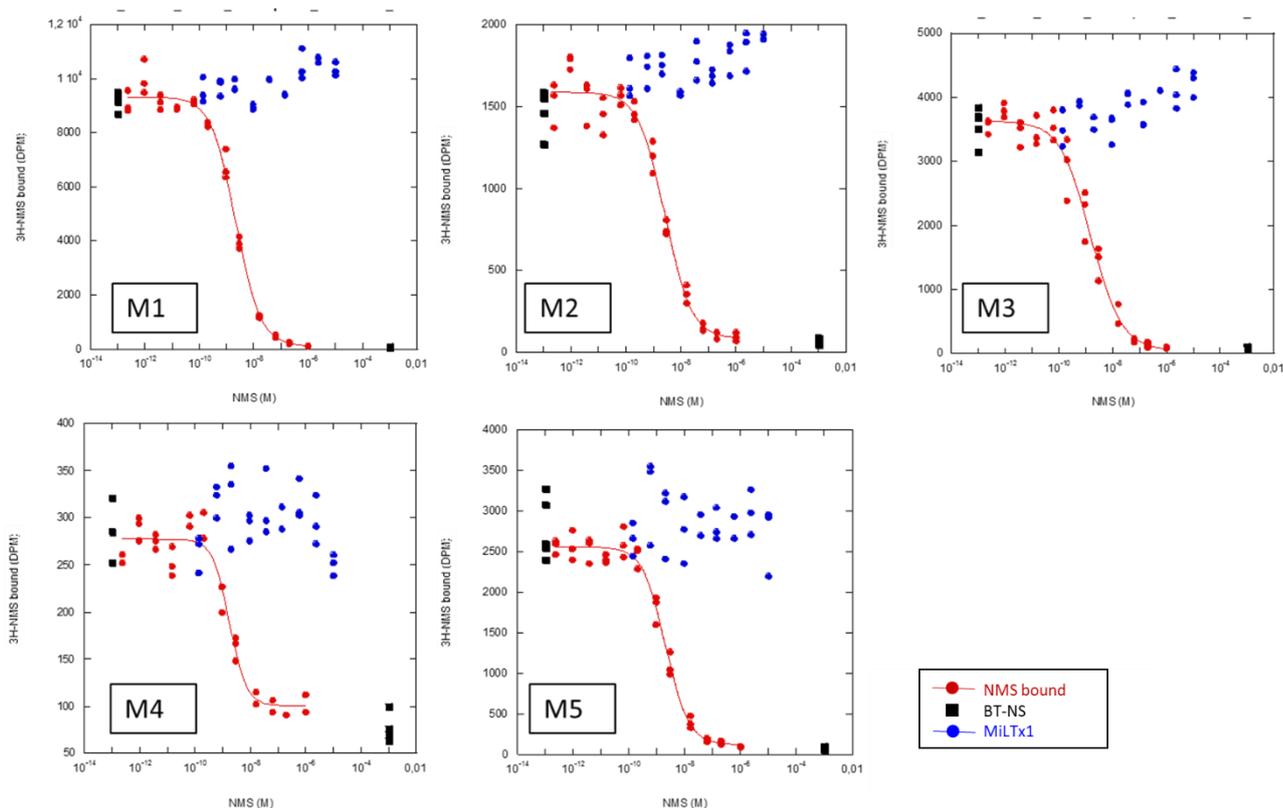


Figura 18 Curvas de competição da toxina MiLTx1 *versus* [3H]N-metilescopolamina, em membranas expressando receptores muscarínicos (mAChR)

Ensaio de competição no equilíbrio (conduzidos à temperatura ambiente e volume final de 100 μ L), foram realizados utilizando 0,1 μ g (hM1) e 20 μ g (hM2-hM5) de membranas preparadas a partir de células CHO expressando mAChR (hM1 a hM5) e 1 nM [3H]N-metilescopolamina ([3H]-NMS) (*binding* total - BT). Enquanto a ligação não-específica (*binding* não específico - NS) foi mensurada na presença do traçador radioativo e excesso de NMS não marcado (1 mM). A curva concentração-resposta de NMS (controle positivo) corresponde à curva a NMS (1 μ M - 20 fM) na presença de [3H]-NMS (1nM). Os resultados são expressos pela taxa específica de ligação [3H]-NMS mensurada na presença ou não da toxina MiLTx1. Em curva concentração-resposta (10 μ M a 0,1 nM) não foi observada competição ao radioligante [3H]-NMS para nenhum dos subtipos de receptores. (Triplicata, n = 2)

Para certificar-se da ausência de atividade muscarínica observada foi realizado o mesmo ensaio imunocompetitivo, IP-One Tb® (Cisbio Bioassay, Codolet, França) utilizado para M14. Células CHO expressando estavelmente mAChR hM3 foram tratadas com MiLTx1 (10 µM) ou pré-incubadas com 12 µM NMS seguido da adição de MiLTx1 (10 µM). Em nenhuma dessas condições houve alteração da concentração de IP1 (**Figura 19**), confirmando a ausência de atividade muscarínica da toxina sintética.

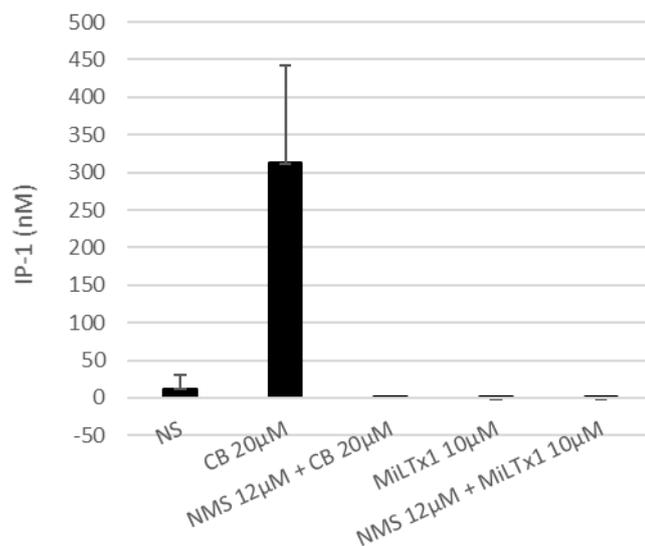


Figura 19 Quantificação de monofosfato inositol (IP1) mediada pela toxina MiLTx1 sobre receptores muscarínicos hM3 expressos em células CHO

Monofosfato de inositol (IP1) - resultante da degradação de inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3) induzido pela cascata de ativação de GPCRs (Gq) - foi quantificado diretamente utilizando-se células CHO expressando estavelmente o subtipo de receptor muscarínico humano M3 (hM3), submetidas ao ensaio IP-One Tb® (Cisbio Bioassay, Codolet, França). Carbacol (CB) foi utilizado como controle positivo e as células não estimuladas (NS) como controle negativo. A toxina MiLTx1 não alterou a concentração de IP1, em nenhuma das condições testadas - quando avaliada individualmente, quando avaliada quanto atividade agonista (NMS + MiLTx1) - assim como o NS. (Triplicata, n = 2)

Quanto ao receptor Torpedo - $2\alpha_1\beta_1\delta\gamma$, MiLTx1 também não foi capaz de deslocar o radioligante, levando a concluir que ela não interage com o sítio de ligação da α -BgTx (**Figura 20**).

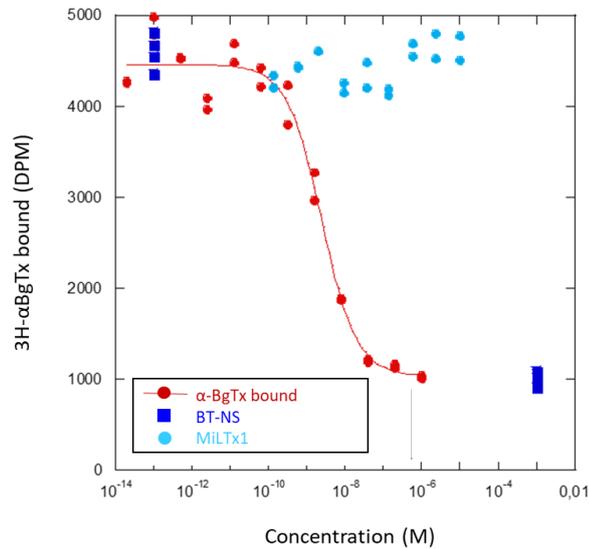


Figura 20 Curvas de competição da toxina MiLTx1 versus 125I-Tyr54- α -bungarotoxina em membranas expressando receptores nicotínicos Torpedo - $2\alpha_1\beta_1\delta\gamma$

Ensaio de competição no equilíbrio (conduzidos à temperatura ambiente e volume final de 100 μ L), foram conduzidos utilizando 0,05 μ g de membranas preparadas a partir dos eletrócitos de *Torpedo marmorata* (expressando o subtipo nACh $2\alpha_1\beta_1\delta\gamma$) e 1 nM 125I-Tyr54- α -bungarotoxina (125I-Tyr54- α -BgTx) (*binding* total - BT). Enquanto a ligação não-específica (*binding* não específico - NS) foi mensurada na presença do traçador radioativo e excesso de α -BgTx não marcado (1 mM). A curva concentração-resposta de α -BgTx (controle positivo) corresponde à α -BgTx (1 μ M - 20 fM) na presença de 125I-Tyr54- α -BgTx (1 nM). Em curva concentração-resposta de MiLTx1 (10 μ M a 0,1 nM) não foi observada competição com o ligante 125I-Tyr54- α -BgTx. Os resultados são expressos pela taxa específica de ligação 125I-Tyr54- α -BgTx mensurada na presença ou não da toxina MiLTx1. (Triplícata, n = 2)

5.5 CO-INJEÇÃO

Diferentemente do esperado a toxina sintética MiLTx1 não apresentou a mesma atividade da toxina nativa MI4. Dessa forma, todos os parâmetros bioquímicos de caracterização do produto de síntese, foram realizados novamente e reavaliados (dados não mostrados) além de uma co-injeção, em sistema HPLC, da toxina nativa e das 3 amostras sintéticas (**Figura 21**). Todas as amostras foram submetidas às mesmas condições e as injeções aconteceram em sequência. MI4 apresentou tempo de retenção de 24,5 min enquanto as toxinas sintéticas apresentaram 27,2 min. Quando co-injetadas as toxinas nativa e sintéticas não coeluíram, levando a concluir que não são idênticas.

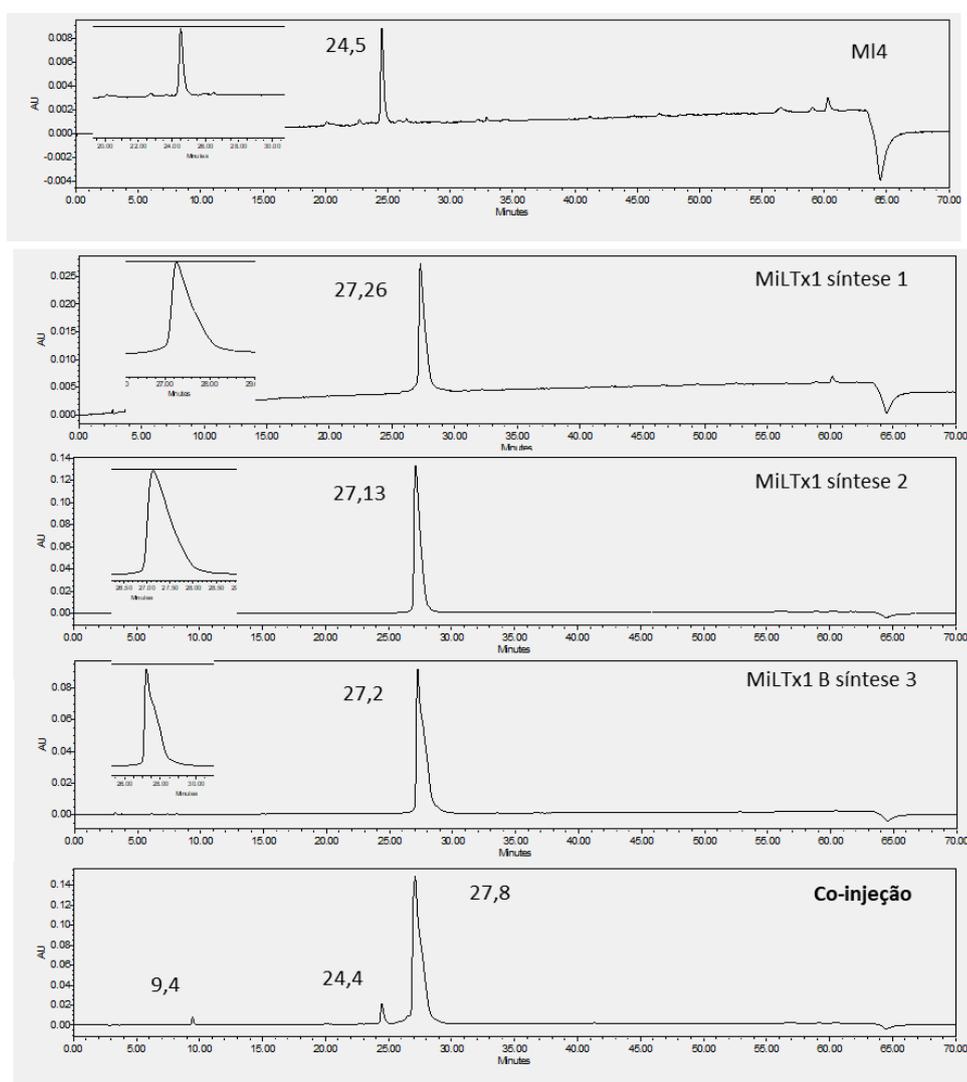


Figura 21 Perfis de eluição das toxinas nativa MI4 e toxinas sintéticas MiLTx1, co-injetadas em sistema HPLC

Foram realizadas cromatografias analíticas sequenciais e sob as mesmas condições - RPC, coluna X-Bridge™ peptide BHE C18 (Waters, EUA) (250 x 4,6 mm), 0,1% TFA/H₂O Mili-Q® v/v (solução A)

e 0,1% TFA/ACN v/v (solução B) gradiente segmentado (0 a 60% de B; 1% de B/min; fluxo de 1 mL/min) - com cada uma das amostras individualmente. A co-injeção aconteceu logo em seguida, e um mix contendo iguais volumes e concentrações semelhantes de cada uma das amostras foi injetado. As três toxinas sintéticas coeluem e apresentam o mesmo tempo de retenção (27,8 min.), o qual diferem da toxina nativa M14 (24,4 min).

5.6 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE TOXINAS NA FRAÇÃO MONOS8

Após a verificação de que as toxinas sintéticas não coeluem com a nativa, apesar de apresentarem a mesma sequência, m/z, padrão de fragmentação e de estruturas secundária, duas hipóteses foram postuladas: a sequência da toxina nativa contém algum resíduo de aminoácido modificado (como por exemplo D-aminoácidos) ou a atividade muscarínicas hM3 e nicotínica Torpedo, mostrada por M14, provém de algum pequeno contaminante na amostra, que não o pico majoritário sequenciado e sintetizado quimicamente.

Como a primeira hipótese é completamente inviável a ser testada já que a toxina M14 possui 64 aminoácidos e conseqüentemente existem milhares de possibilidades e combinações de D e L-aminoácidos, escolhemos testar a fração semi-purificada que deu origem a toxina nativa: MonoS8 (**Figura 22**).

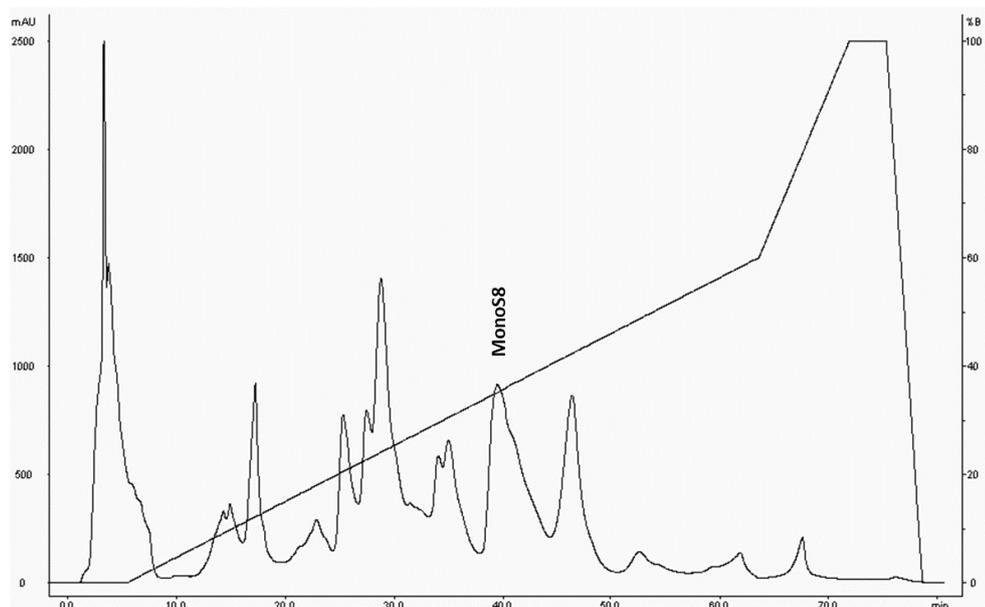


Figura 22 Fracionamento da peçonha da serpente *Micrurus lemniscatus* e obtenção da fração **MonoS8**

Cromatografia líquida de troca catiônica, na coluna Mono S™ 4.6/100 PE (Tricorn™) previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 20 mM pH 5,0 (solução A) na qual 20 mg da peçonha foram aplicados e eluídos em tampão acetato de sódio 20 mM pH 5,0 em 1 M de NaCl (solução B), gradiente segmentado (0 a 60% NaCl; 10 mM NaCl/min; fluxo 1 mL/min). A eluição foi monitorada por absorbância, a 280 nm. No eixo x tem-se o tempo e no eixo y tem-se a intensidade da absorbância e a porcentagem de eluição da solução B. A fração semi-purificada MonoS8 corresponde a fração de interesse.

Seguindo a mesma linha de raciocínio utilizada para a toxina nativa MI4 e sintética MiLTx1, a atividade muscarínica da fração MonoS8 foi investigada. Para tanto foram realizados ensaios de *binding* em membranas expressando estavelmente os subtipos de mAChR hM1 e hM3. A ligação do radioligante (em DPM) em função da concentração de NMS e da MonoS8 foram representadas na **Figura 23**. MonoS8 (estimativa de 25 ng/μL), assim como as toxinas nativas e sintéticas, não foram capazes de deslocar o radioligante do mACh hM1, levando a concluir que MonoS8 não interage no mesmo sítio da NMS (**Figura 23A**). Quanto a hM3 a fração semi-purificada em concentração única (estimativa de 25 μg/mL) (**Figura 23B**) inibiu parcialmente (69%) a resposta do radioligante [3H]-NMS. Em ensaio concentração resposta (estimativa de 20 ng/μL a 0,07 ng/μL) essa inibição foi confirmada (IC50 = 6,8 ng/μL) (**Figura 23C**).

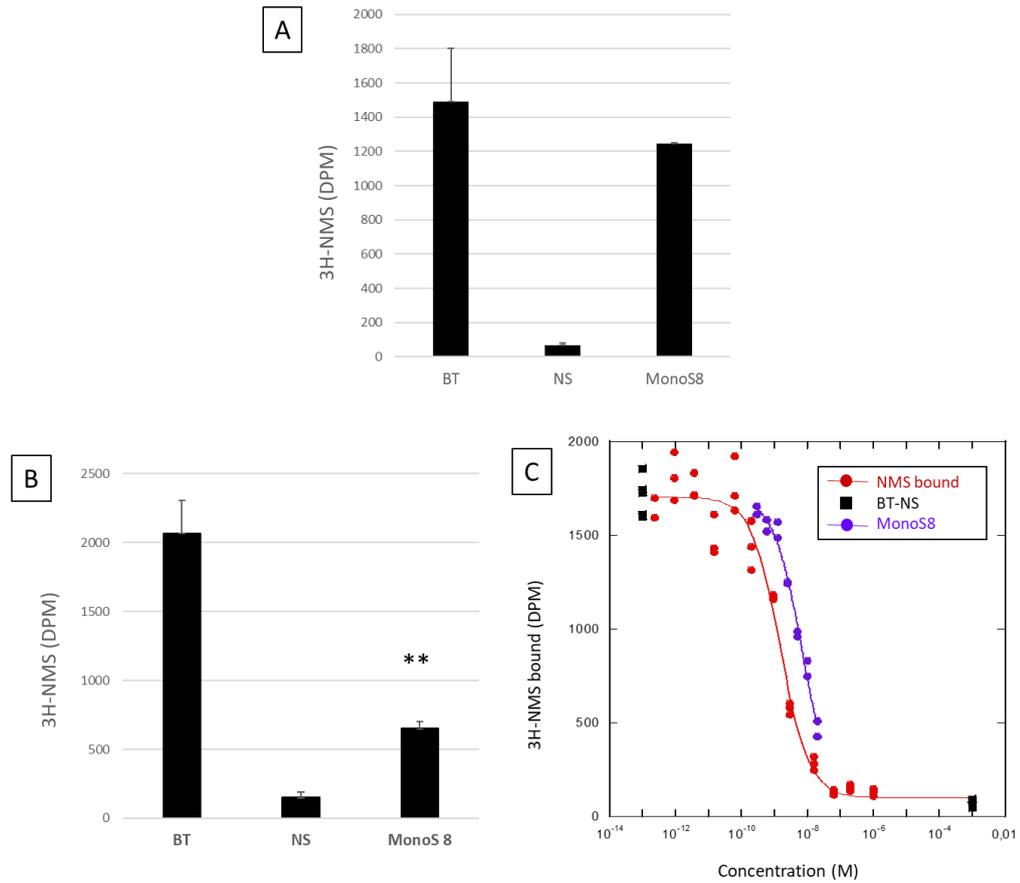


Figura 23 Curvas de competição da fração MonoS8 versus [3H]N-metilescopolamina, em membranas expressando receptores muscarínicos (mAChR)

Ensaio de competição no equilíbrio (conduzidos à temperatura ambiente e volume final de 100 μ L), foram realizados utilizando 0,1 (hM1) e 20 μ g (hM3) de membranas expressando os subtipos de receptores muscarínicos humanos (hM1 e hM3) e 1 nM [3H]N-metilescopolamina ([3H]-NMS) (*binding* total - BT). Enquanto a ligação não-específica (*binding* não específico - NS) foi mensurada na presença do traçador radioativo e excesso de NMS não marcado (1 mM). A curva concentração-resposta de NMS (controle positivo) corresponde à NMS (1 μ M - 20 fM) na presença de [3H]-NMS (1nM). Os resultados foram expressos pela taxa específica de ligação [3H]-NMS mensurada na presença ou não da fração MonoS8. **A)** Observa-se que MonoS8 (estimativa de 25 ng/ μ L), utilizando-se receptores hM1, não foi capaz de competir com [3H]-NMS, mostrando que essa toxina não interage com esse receptor, no sítio de ligação da NMS. **B)** Em receptores hM3, na concentração única (estimativa de 25 ng/ μ L), MonoS8 inibiu a resposta do ligante [3H]-NMS em 69%; **C)** e em curva concentração-resposta (estimativa de 20 ng/ μ L a 0,07 ng/ μ L) essa inibição foi confirmada (IC50 = 6,8 ng/ μ L). (Duplicata, n = 2, Teste t, p<0,05, p = 0,0042)

Também foram realizados os ensaios IP-One Tb® (Cisbio Bioassay) para MonoS8. Células CHO expressando estavelmente mAChR hM3 tratadas com MonoS8 (estimativa de 10 ng/μL a 0,6 ng/μL) apresentaram aumento da liberação de IP1 e esse efeito foi concentração dependente, sendo que para a concentração estimada de 10 ng/μL a liberação de IP1 correspondeu a 274% da liberação promovida pelo controle positivo, CB 20 μM (**Figura 24A**). Para avaliar essa atividade agonista, MonoS8 foi adicionada à placa após a pré-incubação das células com o antagonista NMS 12 μM. A liberação de IP1 foi reduzida em 17% (**Figura 24B**) o que nos leva a inferir uma potente atividade agonista, da fração, na concentração estimada de 10 ng/μL.

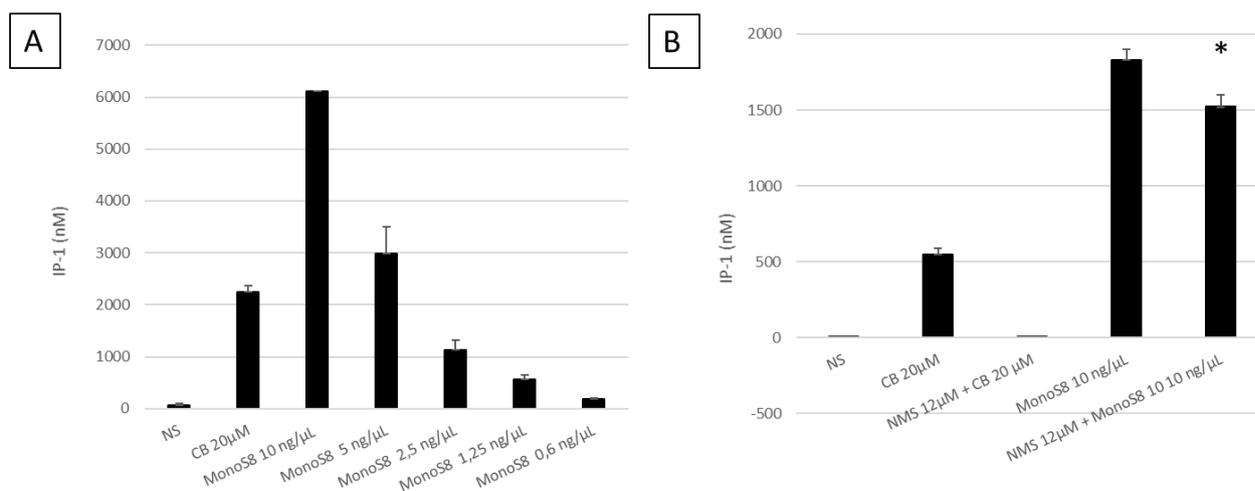


Figura 24 Quantificação da liberação de monofosfato inositol (IP1) mediada pela MonoS8 sobre receptores muscarínicos M3 expressos em células CHO

Monofosfato de inositol (IP1) - resultante da degradação de inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3) induzido pela cascata de ativação de GPCRs (Gq) - foi quantificado diretamente utilizando-se células CHO expressando estavelmente o subtipo de receptor muscarínico humano M3 (hM3), submetidas ao ensaio IP-One Tb® (Cisbio Bioassay). Carbacol (CB) foi utilizado como controle positivo e as células não estimuladas (NS) como controle negativo. **A**) Todas as concentrações testadas (estimativa de 10 ng/μL a 0,6 ng/μL) da fração MonoS8 promoveram aumento da liberação de IP1 de forma concentração dependente. A maior concentração testada, (estimativa de 10 ng/μL), promoveu aproximadamente 3x mais liberação de IP1 que o valor de CB. **B**) Células pré-incubadas com N-metilescopolamina (NMS) 12 μM e tratadas com MonoS8 apresentaram uma pequena redução (17%) da liberação de IP1, confirmando a atividade agonista muscarínica da fração. (Duplicata, n = 2, Teste t, p>0,05, p = 0,04961)

Por fim, para avaliar a possível citotoxicidade, MonoS8 (estimativa de 10 ng/ μ L) foi submetida ao ensaio com AmarBlue® (**Figura 25**). A fração não reduziu a intensidade de fluorescência, assim como o controle negativo (tampão) quando comparados ao controle positivo, DMSO 0,15%. Portanto, MonoS8 não apresentou citotoxicidade aparente.

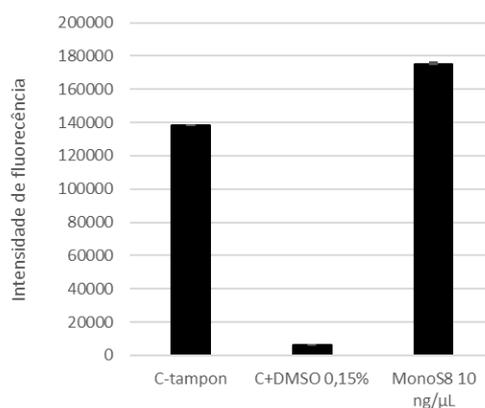


Figura 25 Ensaio de toxicidade celular

No ensaio AlamarBlue®, avaliação metabólica inata, a fração (estimativa de 10 ng/ μ L) não promoveu redução da intensidade de fluorescência, assim como o controle negativo (tampão) quando comparados ao controle positivo, DMSO 0,15%. MonoS8 não apresentou citotoxicidade aparente. (Duplicata, n = 2)

Identificada atividade agonista seletiva da MonoS8 na ordem de ng/ μ L sobre AChR hM3 e ausência de citotoxicidade, a etapa seguinte consistiu em purificar a fração e identificar qual ou quais componentes eram responsáveis pela atividade. Para tanto, todo o material restante, aproximadamente 300 μ g da fração, foi injetado em aparelho HPLC e submetido a uma RPC em coluna C18 analítica (**Figura 26**). Após eluição, MonoS8 foi fracionada em 20 picos / toxinas e todas tiveram suas massas verificadas por LC-MS. No entanto devido à baixa concentração não foi possível visualizar nenhum sinal, tornando inviável a identificação das massas de cada pico.

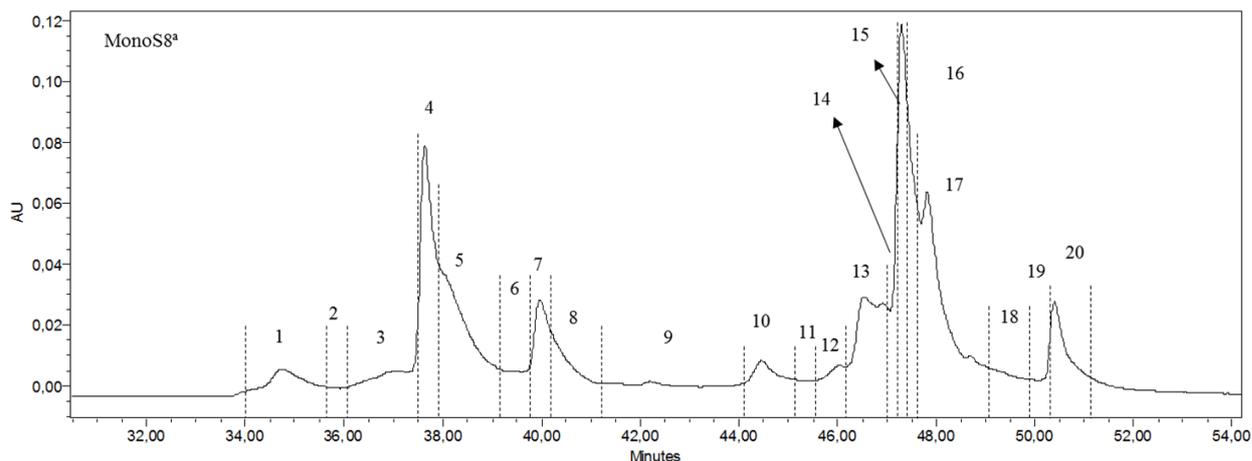


Figura 26 Fracionamento da MonoS8 e obtenção das toxinas puras

A fração semi-purificada (aproximadamente 300 μg) foi submetida à cromatografia de fase reversa, na coluna X-Brigde® peptide BEH C18 (5 μm , 4,6 mm x 250 mm) 0,1% TFA/H₂O Mili-Q® v/v (solução A) e 0,1% TFA/ACN v/v (solução B) gradiente linear (0 a 60% de B; 1% de B/min.; fluxo de 1 mL/min.). A eluição foi monitorada por absorvância, a 214 nm. No eixo x tem-se o volume e no eixo y tem-se a intensidade da absorvância e a porcentagem de eluição da solução B. Foram obtidas 20 picos / toxinas e todas tiveram suas massas verificadas por LC-MS.

Além das massas, a quantificação proteica dos 20 picos / toxinas purificadas a partir da MonoS8 também foi inviável de ser realizada, uma vez que obtivemos poucos μL de cada pico e a prioridade era identificar a(s) toxina(s) correspondente(s) a atividade agonista muscarínica já observada na fração. Devido a essa limitação, os testes de *binding* foram realizados utilizando 10 μL de cada uma das amostras mais abundantes, uma vez que a concentração molar não foi determinada. Foram selecionadas as toxinas correspondentes à parte central dos principais picos (4, 5, 7, 15, 17 e 20) e o experimento foi conduzido como já descrito, utilizando membranas expressando o subtipo de receptor muscarínico humano M3 - hM3 e [3H]-NMS. A toxina MonoS8 7 (correspondente ao pico 7) foi a única que deslocou parcialmente o radioligante (**Figura 27A**). E para confirmar esse resultado, um ensaio com diferentes volumes das toxinas 4, 7, 15 e 20, foi realizado. MonoS8 7 apresentou atividade agonista volume-dependente (15 μL a 5 μL) na qual a maior concentração testada, deslocou o radioligante do seu sítio ativo em 50%, indicando assim um caráter competitivo (**Figura 27B**).

Apesar desses experimentos terem sido realizados apenas em duplicata (n = 1) a atividade competitiva muscarínica M3 em concentrações inferiores a nM foi muito clara. No entanto, a quantidade disponível dessa promissora toxina não foi suficiente para obter a sequência. Com apenas 5 μL , em uma concentração muito baixa, nossos colaboradores do Laboratoire de Spectrometrie de Masse da Université de Liège (Bélgica) identificaram apenas a massa monoisotópica: 6.782,7 Da.

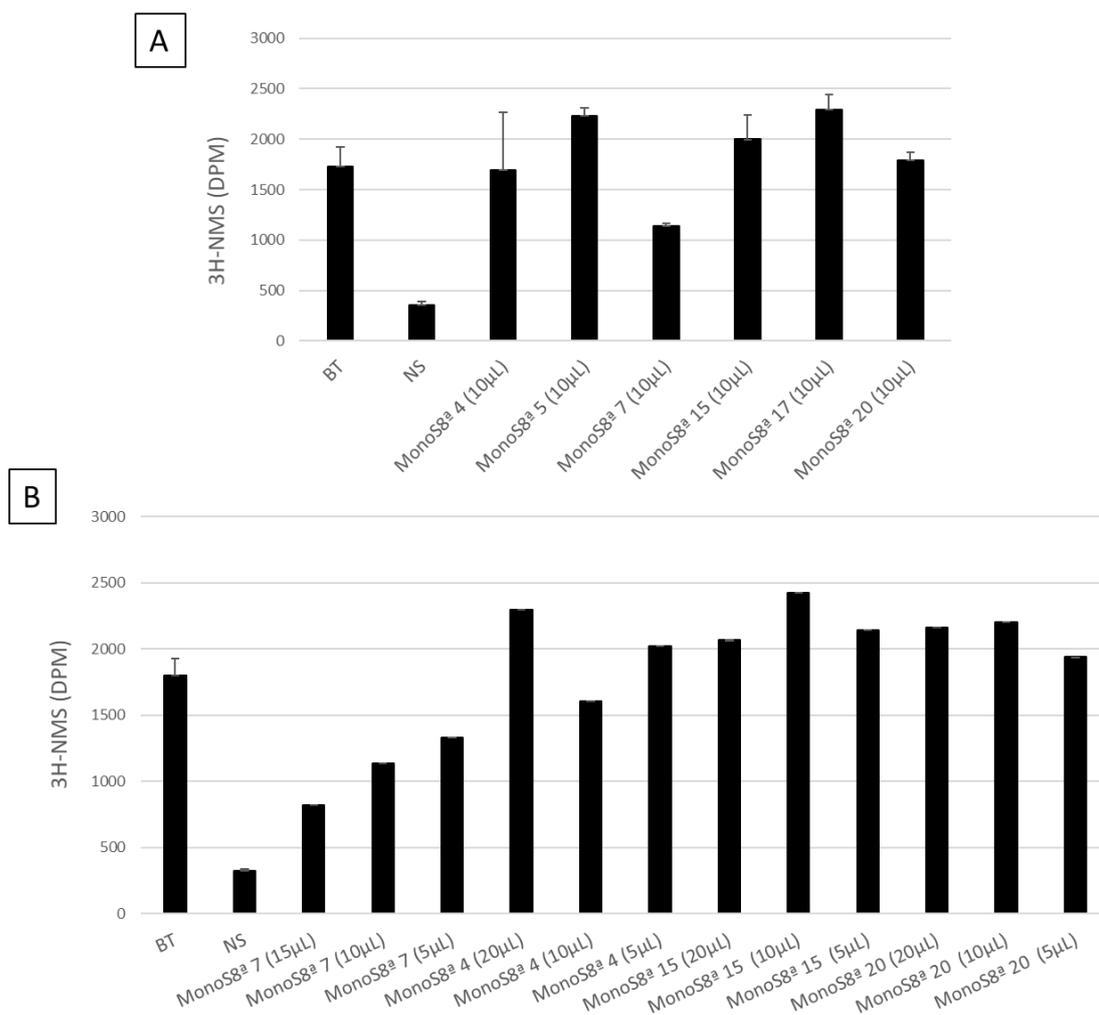


Figura 27 Competição das toxinas isoladas da fração MonoS8 *versus* [3H]N-metilescopolamina, em membranas expressando receptores muscarínicos M3

Ensaio de competição no equilíbrio (conduzidos à temperatura ambiente e volume final de 100 µL), foram realizados utilizando 20 µg de membranas expressando mAChR hM3 e 1 nM [3H]N-metilescopolamina ([3H]-NMS) (*binding* total - BT). Enquanto a ligação não-específica (*binding* não específico - NS) foi mensurada na presença do traçador radioativo e grande excesso de NMS não marcado (1 µM). Os resultados foram expressos pela taxa específica de ligação [3H]-NMS mensurada na presença ou não das toxinas isoladas da fração MonoS8. **A)** Em volume único de 10 µL (as toxinas não apresentaram quantidade suficiente para determinarmos a concentração molar) a toxina MonoS8 7, competiu com o radioligante, inibindo parcialmente a resposta de [3H]-NMS, **B)** e essa resposta foi volume dependente (15 µL a 5 µL). (Duplicata, n = 1)

6 DISCUSSÃO

Um único espécime de serpente pode conter de 50 a 200 componentes tóxicos (Tan *et al.*, 2003) dentre proteínas, enzimas, lipídeos e sais. A peçonha de *Micrurus lemniscatus* é majoritariamente composta por toxinas do tipo 3TFxs e PLA2, respectivamente 79 e 10,6% (Silva, 2013). Apesar da variabilidade de aminoácidos na sequência primária, as 3TFxs apresentam regiões estruturais conservadas, as quais proporcionam o correto dobramento da proteína (Kini e Doley, 2010). Essas características e a grande representatividade das 3FTxs na espécie, somado à pequena disponibilidade da peçonha - devido as dificuldades no processo de extração - torna o isolamento dessas toxinas e obtenção de amostra em quantidades suficientes para os testes, um processo laborioso e longo. Para purificação de grande parte das toxinas elapídicas, isoladas de outras espécies, foram necessárias de 2 a 4 etapas cromatográficas, variando entre trocas catiônicas e gel filtração seguidas de fases reversas (Kuhn *et al.*, 2000; Moreira *et al.*, 2010; Carbajal-Saucedo *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014).

Purificar e identificar uma proteína de massa específica, 7.232 Da, da peçonha de *Micrurus lemniscatus*, em meio a centenas de outras moléculas de massa e características químicas muito próximas, foi uma tarefa árdua. Os problemas de ordem técnica nos cromatógrafos e no espectrômetro de massas, o qual apresentava problemas de resolução no modo linear e consequente inexatidão m/z, também dificultaram a reprodutibilidade do fracionamento. Ao longo dos 20 meses de purificação e caracterização bioquímica, 4 cromatógrafos (ÄKTAexplorer 100 e ETHAN LC do Centro de Biomoléculas, ÄKTA Pure do Laboratório de Biologia Estrutural, ambos da UFMG e ÄKTApurifier do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas da FUNED) e 3 espectrômetros (MALDI-TOF Autoflex III do Centro de Biomoléculas da UFMG e do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas da FUNED, MALDI-TOF Ultraflex III do Núcleo de Análise de Biomoléculas - NuBioMol da Universidade Federal de Viçosa) foram utilizados. Diferentes combinações de estratégias foram testadas, novas colunas adquiridas e a otimização dos processos se deu ao longo do tempo e também com a colaboração do professor Ricardo Mathias Orlando, do Departamento de Química.

Devido a essas inconsistências o objetivo geral inicial que consistia em purificar a toxina MT-M11, cujos estudos iniciaram no meu mestrado tornou-se mais abrangente. Logo, nos propusemos a isolar 3FTxs da peçonha da serpente *Micrurus lemniscatus* com faixa de massa próxima a 7.200 Da, bem como, caracterizá-las bioquímica e farmacologicamente.

A caracterização bioquímica da toxina faz-se necessária para que possamos relacionar estrutura e função. Para tanto é imprescindível a obtenção da estrutura primária, a qual pode ser obtida por diferentes formas (Carbajal-Saucedo *et al.*, 2013; Akondi *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014) sendo a fragmentação por MS/MS a principal estratégia utilizada neste trabalho.

A fragmentação de peptídeos por espectrometria de massas para a posterior análise de sua sequência de aminoácidos é comumente realizada por meio do processo de dissociação induzida por

colisão (*collision induced dissociation* - CID). No entanto, apesar da determinação da sequência de aminoácidos em um peptídeo ser possível por meio do simples cálculo da diferença de massa entre picos vizinhos em uma série de íons, tal trabalho é dificultado devido a uma série de fatores. Dentre os quais podemos citar: o conjunto de íons fragmentos esperados pode não estar presente na íntegra; alguns fragmentos podem sofrer rearranjos internos e subsequente fragmentação; os íons podem estar presentes com diferentes estados de carga e alguns fragmentos podem sofrer rearranjo neutro de hidrogênios durante a fragmentação. Assim, o somatório destes fatores pode induzir a atribuição errada das séries de íons, tornando a interpretação do espectro bastante desafiadora (Cantu *et al.*, 2008).

O número de íons de peptídeos, tratados com tripsina, que forneceram intensidade de sinal suficiente para a obtenção de espectros de MS/MS foi pequeno. Entretanto, a análise de algumas sequências obtidas forneceu alinhamento com proteínas de peçonhas de serpentes. Para a digestão enzimática com uma segunda enzima, Glu-C, foi utilizada uma concentração maior de amostra e assim otimizamos as chances de obtenção de íons de peptídeos. Nos trabalhos de Olamendi-Portugal (2008), Moreira (2010) e seus respectivos colaboradores, foram utilizadas de 3 a 5 enzimas, assim aumentando o número de íons de peptídeos e conseqüentemente a probabilidade de obtenção da sequência completa, por sobreposição desses fragmentos. Devido a limitação da quantidade de toxinas essa multiplicidade de tratamento não foi possível neste trabalho.

Das 19 toxinas purificadas - consideradas amostras diferentes até a resolução da sequência de resíduos de aminoácidos - 8 tiveram parte da sequência elucidada. Para as que apresentaram os mesmos íons, foi realizada uma sobreposição nos alinhamentos contra as bases de dados e sugerimos tratar da mesma toxina. Dessa forma foram apresentadas 4 toxinas parcialmente sequenciadas e com alta homologia a outras 3FTxs elapídicas.

MI4, por motivos já descritos, foi definida como a toxina a ser caracterizada ao longo do trabalho. Completamente sequenciada, a toxina apresentou 75% de identidade com a Frontoxin IV de *Micrurus frontalis* (64 resíduos de aminoácidos, 7.420 Da) toxina a qual reduziu a amplitude dos potenciais *miniature endplate* de rãs. Essa atividade foi tempo e concentração dependente, sugerindo um bloqueio dos nAChR (Moreira *et al.*, 2010). Dessa forma além da atividade muscarínica da toxina MI4, também foi investigada a atividade nicotínica muscular, através dos receptores Torpedo.

A toxina nativa apresentou atividade muscarínica M3 identificada por ensaios de *binding* e confirmada por imunensaio quantitativo de IP1, através do qual foi observado seu efeito antagonista em cultura celular. Além disso, MI4 também apresentou atividade nicotínica muscular assim como a Frontoxin IV (Moreira *et al.*, 2010). No entanto sua versão sintética, MiLTx1, não apresentou nenhum efeito sobre receptores muscarínicos e nicotínicos mesmo em concentração quase 100x maior (10 μ M) que o IC50 em AChR M3 para a toxina nativa (IC50 = 25,9 nM). Com base em um correto sequenciamento, as duas toxinas compartilham da mesma sequência, massa e padrão de fragmentação, no entanto quando co-injetadas em sistema HPLC elas não coeluem. Com uma diferença de 3 min no tempo de eluição pode-se afirmar categoricamente que elas não são idênticas.

Apesar de quase todos os compostos biológicos com centro quiral ocorrerem naturalmente em apenas uma forma estereoisomérica e os aminoácidos nas moléculas proteicas serem sempre L-estereoisômeros, os D-aminoácidos já foram encontrados em peptídeos de *Conus* e de rã, tais como as deltorfinas (análogos de opiáceos) além outros peptídeos de eucariotos, sugerindo a existência de enzimas como a epimerase (Heck *et al.*, 1996; Jimenez *et al.*, 1996; Barba *et al.*, 2009). Com base nos resultados negativos apresentados pela toxina sintética e sua sequência modificada e, tendo conhecimento que já foram descritas toxinas animais com diferentes enantiômeros (D e L) esses argumentos configuram uma hipótese, para a diferença na coeluição das toxinas nativa e sintética. Porém, também não podemos descartar um provável artefato de síntese, a racemização, já que geralmente o enantiômero L é mais hidrofílico, e, portanto, seria eluído mais tardiamente como identificado para as toxinas sintéticas. No entanto, devido ao tamanho da toxina estudada, 64 resíduos, é inviável tentar identificar qual(is) resíduos teriam tais modificações.

Outra hipótese para a ausência de coeluição refere-se ao *folding* da toxina, ou seja, o estabelecimento correto das cinco pontes de dissulfeto para enovelamento clássico de uma 3FTxs. Os resultados do espectropolarímetro de dicroísmo circular indicaram um perfil rico em folhas β típico das toxinas dessa família, mas com esses dados não é possível afirmar que todas as pontes foram estabelecidas corretamente, nem que a toxina sintética apresenta o mesmo perfil que a nativa, já que o ensaio não foi realizado com a M14 devido a escassez de amostra. A ausência de informações estruturais dessas toxinas de *Micrurus* impossibilita novos desdobramentos.

Essas hipóteses justificariam a não coeluição e consequente ausência de atividade. Contudo uma outra dúvida surgiu: a molécula responsável pela atividade da M14 correspondia realmente ao pico principal, o qual foi sequenciado e sintetizado quimicamente? Apesar do pico ser claramente majoritário, pequenas impurezas foram desconsideradas. Para investigar essa hipótese foi realizado um ensaio com a toxina M11 - a qual apresentou o mesmo padrão de fragmentação e consequentemente os mesmos íons que M14 (ver **Anexo 1C**), logo, para os alinhamentos contra as bases de dados considerou-se uma única amostra. M11 foi submetida a uma RPC e o ápice do pico foi coletado, co-injetado com M14 e testado em *binding* sobre AChR M3 (resultados não mostrados). A coeluição foi observada, confirmando se tratarem da mesma molécula, porém nenhuma atividade foi identificada sobre AChR M3.

Logo conclui-se que o pico majoritário da M14 não é o responsável pela atividade colinérgica observada e, por conseguinte não seria esperado encontrar tal atividade na toxina sintética MiLTx1. Todavia as diferenças de coeluição entre as amostras nativa e sintética, ainda permanecem inexploradas devido a limitações experimentais.

Para contornar esses resultados e tentar identificar qual a toxina responsável pela atividade colinérgica já observada, a fração semi-purificada que deu origem a toxina M14 passou então a ser investigada. MonoS8 apresentou atividade nicotínica Torpedo e muscarínica M3, o que já era esperado uma vez que M14 está contida na fração. Porém a resposta muscarínica observada foi de agonismo e não antagonismo, como observado anteriormente para a toxina. Acredita-se que MonoS8 é composta por

toxinas com diferentes atividades, inclusive antagonicas. Após essa constatação a fração foi purificada e dos 20 picos obtidos, os seis mais abundantes e passíveis de teste foram submetidos a verificação da atividade. MonoS8 7 foi o único pico/toxina que deslocou o radioligante e em seguida teve sua atividade concentração resposta confirmada. Não foi possível definir o caráter agonista / antagonista bem como a afinidade e a concentração, já que a quantidade de amostra era mínima. Em uma tentativa esperançosa de sequenciamento, com os 5 µL restante, e continuidade da caracterização dessa molécula, foi possível apenas a identificação da massa monoisotópica: 6.782,7 Da.

De posse dessa única informação e na ausência de qualquer outra amostra e fonte da peçonha bruta, a continuidade do projeto ficou comprometida. A ausência de caracterização transcriptômica da glândula de veneno de *Micrurus lemniscatus* e as limitações a nível de resolução dos espectrômetros de massas disponíveis, aos quais temos acesso, impõem grandes dificuldades no trabalho com peçonhas como essa; com pequena quantidade de material, grande proporção de moléculas muito semelhantes, devido ao alto grau de conservação, além de uma alta complexidade estrutural.

Enfim, o objetivo inicial de caracterização farmacológica não foi alcançado, mas foi possível identificar pela primeira vez, uma toxina agonista muscarínica M3, através da ligação direta ao receptor e de maneira concentração dependente.

7 CONCLUSÃO

Pesquisas realizadas com toxinas nativas de *Micrurus* tem grande potencial, mas ao mesmo tempo muitas limitações. Nesse trabalho foram apresentados resultados da purificação, identificação, caracterização bioquímica e farmacológica de toxinas 3FTxs da peçonha da serpente *Micrurus lemniscatus*. Primeiramente, foram utilizadas abordagens cromatográficas convencionais e atípicas para isolar os componentes com faixa de massa próxima a 7.200 Da. Apesar de apresentarem um padrão de eluição característico para cada coluna, a combinação de métodos conferida por diferentes estratégias demandou uma complexa análise para sobreposição e agrupamento das frações, sendo essas massas passíveis de serem encontradas em várias subfrações eluídas com diferentes % de ACN.

Dezenove toxinas foram isoladas e parcialmente sequenciadas. M14 foi selecionada e melhor caracterizada farmacologicamente, sendo observada antagonismo muscarínico M3 e atividade nicotínica muscular Torpedo.

De posse da sequência completa a toxina foi sintetizada quimicamente (MiLTx1) e avaliada quanto aos mesmos parâmetros e nenhuma atividade foi identificada. Concluímos que apesar da toxina sintética apresentar a sequência majoritária da M14 ela não corresponde a sequência nativa bioativa.

Por último, identificamos na fração mãe - MonoS8, da qual M14 foi isolada - já sabidamente ativa sobre mAChR hM3 e nAChR Torpedo, uma segunda toxina bioativa, mas com atividade concentração dependente sobre receptores muscarínicos M3.

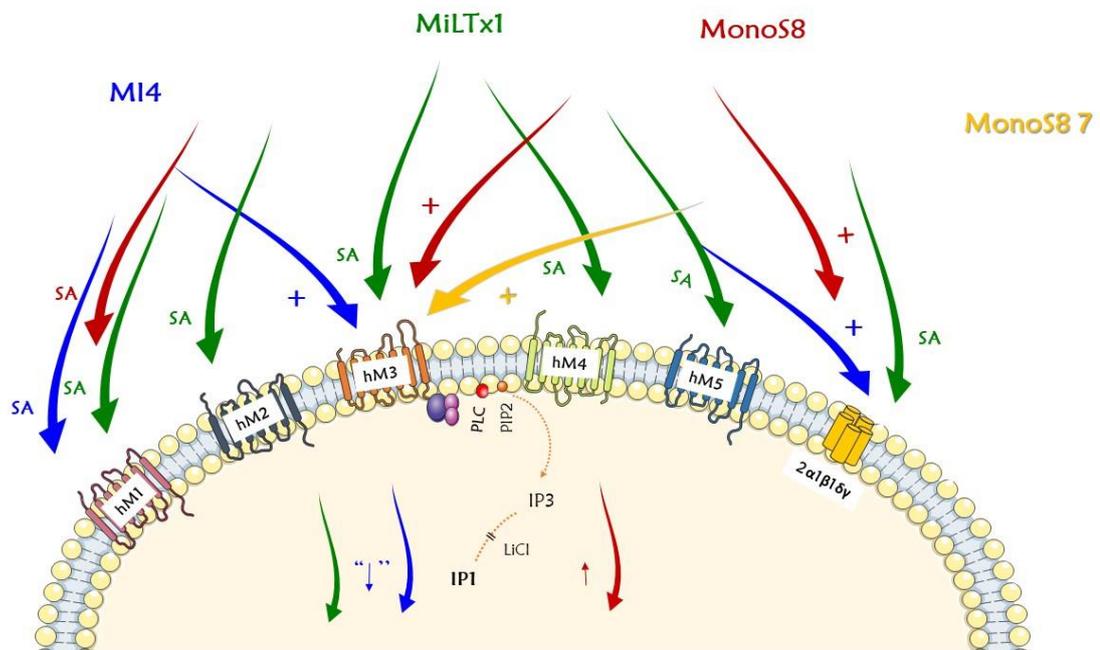


Figura 28 Figura conclusão - capítulo 1

Após isolar 19 toxinas da peçonha da serpente *Micrurus lemniscatus*, M14 foi selecionada, completamente sequenciada e identificada quanto a sua atividade sobre receptores nicotínicos Torpedo 2α1β1δγ e atividade muscarínica M3 (flechas azuis) por experimentos de binding. A atividade antagonista M3 foi identificada indiretamente, através do bloqueio da liberação de IP1 por experimentos imunocompetitivos IP-One Tb®. A versão sintética, MiLTx1 (flechas verdes), não apresentou atividade (SA - sem atividade) sobre nenhum dos receptores testados. A fração mãe - MonoS8 (flechas vermelhas), a qual deu origem M14, apresentou as mesmas atividades da toxina “filha”, no entanto a fração semi-purificada promoveu o aumento de IP1, coerente com a atividade agonista muscarínica M3. Por fim, após purificação da MonoS8 e eluição em 20 toxinas, uma das mais abundantes, MonoS8 7, foi testada em *binding* sobre M3 e competiu de forma concentração dependente, pelo sítio de acetilcolina, com o radioligante utilizado.

8 PESRPECTIVAS

Do porte de mais peçonha bruta, a toxina MonoS8 7 pode ser novamente purificada e então detalhadamente caracterizada, abrindo um leque de opções para as investigações da primeira toxina muscarínica M3, potencialmente agonista, já descrita.

CAPÍTULO 2

A-CONOTOXINAS “*SCAFFOLD*” E A NEUROTRANSMISSÃO COLINÉRGICA

1 INTRODUÇÃO

1.1 BIOLOGIA DE CONES MARINHOS

Conus corresponde a um gênero de gastrópodes marinhos encontrados em ambientes tropicais e subtropicais do Atlântico Leste, Mediterrâneo, Pacífico Oriental, Sul Africano, Atlântico Oeste, Caribe e regiões do Indo Pacífico (Kaas *et al.*, 2010) e são particularmente proeminentes em torno de recifes de corais e outros habitats de águas rasas (Kohn, 1959; Kohn e Nybakken, 1975; Olivera, 2002). Foram descritos pela primeira vez por Linnaeus (1758) na 10ª ed. do *Systema Naturae* e atualmente existem cerca de 700 espécies descritas, as quais são caracterizadas por uma grande variedade de formas, padrões e cores exibidos por suas conchas (**Figura 29**), bem como pelo tamanho - variando entre 1 e 20 cm, sendo que a maior espécie descrita, *Conus prometheus*, possui 30 cm (Rockel *et al.*, 1995). Cada espécie é definida com base em critérios anatômicos, filogenéticos e detalhes da concha.



Figura 29 Diversidade morfológica de *Conus*

Variação de cores, tamanho e formas das conchas do gênero *Conus*. Fonte: adaptado de (Bulaj e Olivera, 2008)

Todas as espécies de *Conus* são carnívoras e utilizam da peçonha para capturar as presas, as quais compreendem, principalmente, vermes, moluscos e peixes. O gênero apresenta um aparelho de veneno altamente especializado (**Figura 30**), onde as células epiteliais que revestem o duto da glândula de veneno são ricas em mRNAs codificadores de conopeptídeos (Hu *et al.*, 2012). Estes mRNAs são traduzidos inicialmente como precursores inativos e submetidos a processamento pós-traducional, antes da secreção da célula, como peptídeos maduros bioativos (Woodward *et al.*, 1990). Os componentes

biologicamente ativos são expelidos pela contração do bulbo venenoso e assim como o dente radial, são deslocados para a probóscide. Os dentes ocos, proporcionam a inoculação da peçonha (Olivera, 2002) e sua morfologia, análoga a um arpão, está intimamente relacionada ao tipo de presa capturada, variando enormemente entre as espécie de *Conus*.

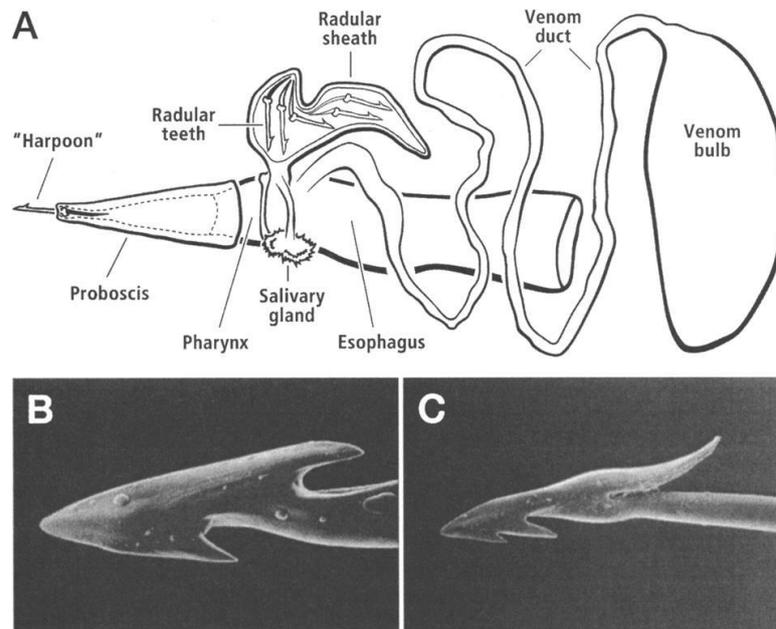


Figura 30 Aparato venenoso de *Conus*

A) Bulbo venenoso (à extrema direita), duto tubular venenoso (tubo fino e longo) e saco radular, no qual os dentes modificados, semelhantes a um arpão, são estocados. Um único dente é posicionado na probóscide (à esquerda). Microscopia eletrônica do dente radular (arpão) das espécies B) de *Conus purpurascens* e C) *Conus obscurus*. Fonte: (Olivera, 2002)

Para impor eficientemente o efeito fisiológico da peçonha sobre as presas, os cones apresentam múltiplas moléculas, “toxinas cabais”, conhecidas por agirem sinergicamente de forma a potencializar o envenenamento (Terlau e Olivera, 2004). Este termo é aplicado para um grupo de conopeptídeos agindo de forma coordenada sobre um alvo fisiológico final e específico. Terlau e colaboradores (1996) definiram a presença de duas “toxinas cabais” diferentes, cujos efeitos são distintos no tempo e espaço. As "cabais relâmpago", causam imediata imobilização da presa; devido a inibição da inativação de canais voltagem-dependente para Na^+ , bem como peptídeos que bloqueiem os canais para K^+ , resultando em uma despolarização maciça de qualquer axônio na proximidade do local de injeção da peçonha, levando ao característico estado tetânico. A segunda, "cabal motora" é alcançado mais lentamente com uma inibição total da transmissão neuromuscular. Inclui peptídeos que inibem canais pré-sinápticos para

Ca²⁺, receptores nicotínicos pós-sinápticos e canais para Na⁺ que estão subjacentes ao potencial de ação muscular. Assim, compatível com uma compensação da lentidão do caracol em seu ambiente e suas limitações no armamento mecânico ofensivo envolvido na captura da presa, esse coquetel químico, de alta diversidade estrutural e funcional, deixa poucas chances para presa fugir.

1.2 COMPOSIÇÃO DA PEÇONHA

Estudos pioneiros nos anos 60 e 70 por Bob Endean (Austrália) e colegas prepararam o caminho para a descoberta de novos compostos, farmacologicamente ativos, dos moluscos marinhos australianos (Hawgood, 2006). Outros pioneiros nas pesquisas com a peçonha de *Conus* foram o químico biofísico Baldomero M. Olivera (*University of Utah*) e a bioquímica Lourdes J. Cruz (*University of the Philippines Diliman*) que no início da década de 70, estudaram especialmente os mecanismos tóxicos de ação da peçonha. Os estudos mais antigos concentraram-se em abordagens tradicionais para a descoberta de conopeptídeos (testes de bioatividade guiado pelo fracionamento, purificação, degradação de Edman e/ou sequenciamento MS/MS) mas graças ao progresso das técnicas - possibilitando investigações transcriptômicas, proteômicas e de bioinformática - os resultados mais recentes realizam uma abordagem integrada que demanda uma menor quantidade de material e menos tempo (Prashanth *et al.*, 2012).

De fato, a peçonha desses moluscos contém uma notável diversidade de substâncias bioativas, na forma de um líquido lácteo esbranquiçado, contendo pequenos grânulos insolúveis (Cruz, Gray, Yoshikami, *et al.*, 1985). Em geral, a peçonha de cada espécie de *Conus* contém de centenas à milhares de compostos ativos (Davis *et al.*, 2009), como proteínas vasoativas (eburnetoxina, tessulatoxina) (Kobayashi *et al.*, 1982; 1983), proteases (AChE, fosfodiesterases, fosfolipases) (Mcintosh *et al.*, 1995) e moléculas orgânicas de baixo peso molecular (homarina, γ -butirobetaina, serotonina, ácido araquidônico) (Nakamura *et al.*, 1982; Mcintosh *et al.*, 1993), contudo, as conotoxinas são as mais estudadas. Isso deve-se à sua diversidade e especificidade, o que possibilita a diferenciação farmacológica de certos tipos/subtipos de receptores de neurotransmissores e de canais iônicos (Cruz, Gray, Yoshikami, *et al.*, 1985; Han, T. *et al.*, 2008; Lewis *et al.*, 2012). A segunda razão baseia-se no fato de que as sequências peptídicas são mais propícias para síntese química em comparação com as de serpentes, escorpiões e aranhas (Gray *et al.*, 1984; Miranda e Alewood, 1999). Além da sequência peptídica linear, a presença de numerosas pontes dissulfeto confere às conotoxinas uma estrutura tridimensional rígida. Essas toxinas são excelentes bases para o estudo das interações ligante-receptor e estrutura-seletividade, além de fornecerem novas alternativas na área terapêutica.

A análise da peçonha de *Conus* revelou um exogenoma complexo. Estima-se que em cada espécie estão presentes 100-200 conopeptídeos únicos e que existam de 50.000 a 100.000 diferentes compostos farmacologicamente ativos presentes de forma conjunta nas peçonhas de todas as espécies de *Conus* (Olivera *et al.*, 1990; Menez *et al.*, 2006; Olivera, 2006), o que corresponde a maior e mais importante farmacopeia de qualquer gênero na natureza.

1.3 NOMENCLATURA DOS CONOPEPTÍDEOS

A convenção em uso para nomear conotoxinas é baseada no NC-IUPHAR (*International Union of Basic and Clinical Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification*) (Sharman *et al.*, 2013). Conforme ilustrado na **Figura 31**, a primeira letra (grega) indica o alvo farmacológico. A próxima, ou duas letras (romana, primeira letra maiúsculas) derivam do nome da espécie a partir da qual a conotoxina foi isolada. Esta letra (ou letras no caso de ambiguidade) é seguido por um número romano, que fornece informações sobre o padrão de cisteínas. Finalmente, uma letra maiúscula indica a ordem de descoberta da conotoxina dentro dessa categoria (espécie + padrão de cisteína). Se o alvo do peptídeo ainda não é determinado, a letra grega é omitida; letras minúsculas são usadas para indicar a espécie, algarismos arábicos para indicar a estrutura, e a ordem de descoberta é indicada por uma letra minúscula (Gray *et al.*, 1988; Walker *et al.*, 1999; Sharman *et al.*, 2013; Akondi *et al.*, 2014)

A nomenclatura de conopeptídeos pobres em pontes dissulfeto é distinta e a maioria foi denominada por combinação da classe, um hífen e uma ou duas letras descrevendo a espécie (por exemplo, conantokin-G de *C. geographus*). Um número é adicionado ao nome quando vários conopeptídeos são encontrados dentro da mesma espécie (por exemplo conolissina-Mt1 de *Conus mustelinus*) (Akondi *et al.*, 2014).

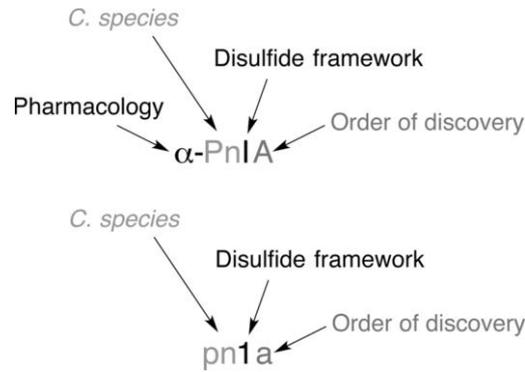


Figura 31 Nomenclatura de conotoxinas

Na parte superior: um exemplo de uma conotoxina com alvo conhecido. A primeira letra em grego indica o alvo farmacológico, α -conotoxina, direcionada aos receptores nicotínicos de acetilcolina. A próxima ou duas letras representam a espécie da qual a toxina foi isolada, neste caso *Conus pennaceus*. Isto é seguido por um número romano, I, fornecendo informação sobre a estrutura (por exemplo, CC-C-C). Finalmente, uma letra maiúscula indica a ordem de descoberta da conotoxina dentro dessa categoria.

Na parte inferior: se o mecanismo de ação da conotoxina ainda não for determinado, a letra grega é omitida, o nome da espécie é escrito em letra minúscula e um número arábico é usado para designar o padrão de cisteínas na estrutura, além de uma letra ser usada para especificar a variante de peptídeo.

Fonte: (Akondi *et al.*, 2014)

1.4 CLASSIFICAÇÃO DOS CONOPEPTÍDEOS

Em geral três alternativas, completamente sobrepostas, são utilizadas para classificar os conopeptídeos (**Figura 32**): 1) "superfamílias de genes", com base na região de sequência sinal da proteína precursora ou seu precursor de ácido nucleico (mRNA) antes da tradução; 2) "padrão de cisteínas" com base no número de cisteínas e no padrão de organização na estrutura primária do peptídeo maduro; 3) "famílias farmacológicas", com base no tipo de receptor, canal iônico ou molécula transportadora, refletindo a especificidade alvo de cada conopeptídeo maduro na membrana das células de órgãos e tecidos, o modo de ação envolvido e a resposta fisiológica (Cruz, Gray, Yoshikami, *et al.*, 1985; Kaas *et al.*, 2010). Essa classificação é dinâmica e pode ser modificada à luz que novas informações tornem-se disponíveis.

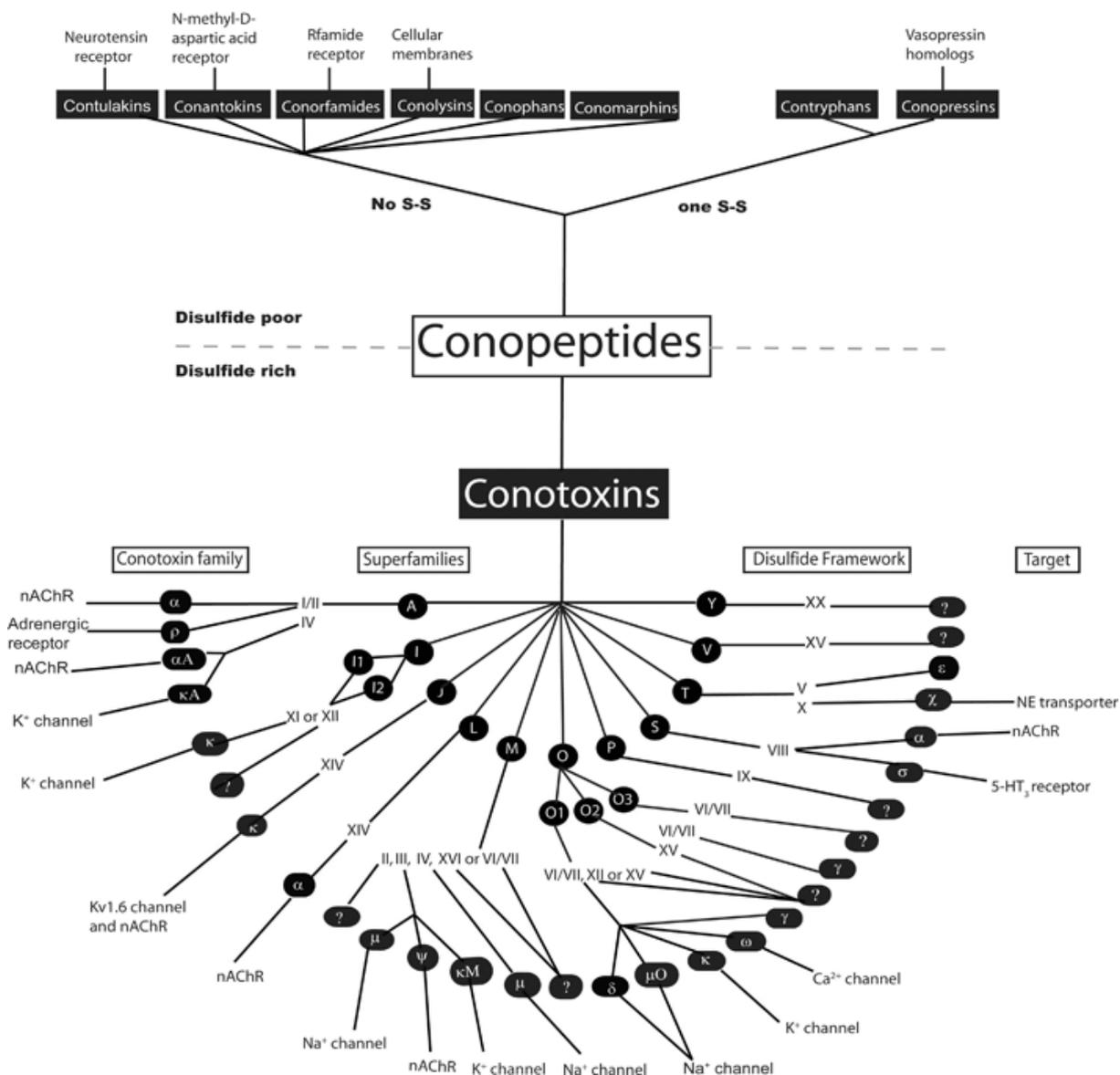


Figura 32 Classificação de conopeptídeos em categorias

Os conopeptídeos pobres em pontes dissulfeto são mostrados acima da linha tracejada enquanto os ricos, conhecidos como conotoxinas, são mostrados abaixo. Elas são classificadas em superfamílias com base na homologia da sequência sinal, seguido pelo padrão de cisteínas e alvo farmacológico. Os alvos não especificados ainda são desconhecidos. NE= Norepinefrina, nAChR= receptor nicotínico de acetilcolina. Fonte: (Halai e Craik, 2009)

1.4.1 Superfamília de genes

As superfamílias de conopeptídeos foram denominadas com base na análise da sequência sinal. Os conopeptídeos são expressos como proteínas precursoras e compreendem uma região sinal, regiões pró-peptídica e uma região peptídica madura, as quais passam por processamento no retículo endoplasmático e no aparelho de Golgi. A organização clássica de um precursor de conopeptídeo é mostrada na **Figura 33**. A sequência sinal é bem conservada, as pró-peptídicas são mais divergentes e a peptídica madura altamente diversificada (Woodward *et al.*, 1990; Yuan *et al.*, 2007), o que corrobora com a alta variabilidade de conopeptídeos.



Figura 33 Organização da proteína precursora de um conopeptídeo

A organização característica do precursor inicial consiste na sequência sinal (ER), seguida da pró-região N-terminal, a sequência peptídica madura e a região pró-terminal na extremidade C-terminal. Durante a maturação da proteína precursora, a sequência sinal e as pró-regiões N- e C-terminais são clivadas resultando no peptídeo ativo. A organização foi examinada utilizando a sequência do precursor SmIVA (P00021). Fonte: <http://conoserver.org/index.php>

A sequência peptídica sinal, que constitui o N-terminal das proteínas precursoras, é caracterizada por uma série de cerca de 20 resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, incluindo frequentemente um ou mais resíduos carregados positivamente, e é responsável por direcionar o peptídeo precursor para a via secretória celular (Robinson e Norton, 2014).

São conhecidos conopeptídeos maduros de 8-86 resíduos de aminoácidos, com uma média de 26 ± 10 resíduos. Durante o processo de maturação, a sequência sinal e as regiões pró-, N e C-terminais (Woodward *et al.*, 1990) são clivadas e alguns aminoácidos podem passar por modificações pós-traducionais (PTMs).

As PTMs correspondem as mudanças químicas ou estruturais que não são codificadas diretamente no gene correspondente a um peptídeo. Embora o papel fisiológico preciso dos PTM nas toxinas de *Conus* não seja bem conhecido, eles proporcionam uma maior diversidade química, que amplia suas características biológicas (Buczek *et al.*, 2005) e fornece modelos importantes para um sofisticado design de ligantes subtipo-específicos (Craig, Bandyopadhyay, *et al.*, 1999).

Tais modificações como por exemplo a hidroxilação da prolina, conversão de glutamato para γ -carboxiglutamato, bromação de triptofano, sulfatação de tirosina e epimerização de L para D-aminoácido (Stanley *et al.*, 1997; Bandyopadhyay *et al.*, 1998; Craig, Bandyopadhyay, *et al.*, 1999; Begley *et al.*, 2000; Bandyopadhyay *et al.*, 2002) ocorrem em uma frequência particularmente alta em conotoxinas. No entanto processamento via clivagem proteolítica, como C-terminal amidado (uma amida substitui a hidroxila na extremidade carboxi) e a formação de ligações dissulfeto, são clássicos PTMs encontrados em quase todos os peptídeos de *Conus* (Buczek *et al.*, 2005). Este último PTM, é um componente integral da estrutura tridimensional de quase todas as classes de peptídeos extracelulares e proteínas. Eles são formadas quando um átomo de enxofre de uma cisteína se liga covalentemente à outro átomo de enxofre a partir de um segundo resíduo de cisteína, localizado numa parte diferente da sequência, contribuindo para estabilidade conformacional e manutenção da atividade biológica (Zhang e Snyder, 1991).

1.4.1.1 Classificação em superfamílias

As sequências sinais mostram pouca homologia entre superfamílias, além dos recursos padrões os quais conferem uma metionina na primeira posição e uma região hidrofóbica central (Kaas *et al.*, 2010). Com um corte de 35% de identidade da sequência sinal, utilizando o ConoServer, a maioria das sequências foram bem agrupadas permitindo definir 26 grupos de superfamílias de genes (**Tabela 7**), as quais compartilham entre si uma similaridade de sequência mais alta. A exceção, é o único membro da superfamília Y que compartilha cerca de 40% de identidade com alguns membros da superfamília M (Kaas *et al.*, 2010; Kaas *et al.*, 2012; Mir *et al.*, 2016).

Tabela 7 Superfamília de genes de conotoxinas

Superfamília de genes	Padrão de cisteínas	Número de proteínas precursoras	Dieta	Sequência consenso do peptídeo sinal
A	I, II, IV, VI/VII, XIV, XXII	288	P, M, V	MGMRRMMFTVFLLVLATTVVSXTS
B1	Pobres em cisteínas	18	P, V	MXLYTYLYLLVPLVTFHLLLGXGT
B2	VIII	2	M, V	MLRLITAAVLVSACLA
B3	XXIV	1	V	METLTLWRASSCLLVLSHSLRLLG
C	Pobres em cisteínas	4	P, V	MXXAYWVMVMMVMXIXAPLSEG
D	XX	28	V	MPKLEMMLLVLLPLXYFDAAGG
E	XXII	1	M	MMTRVFFAMFFLMALTEG
F		2	M, V	MQRGAVLLGVVALLVLWPQAGA
G	XIII	1	V	MSGMGVLLLVLLVMPPLAA
H	VI/VII	10	M	MNTAGRLLLLCLALGVLVFESLG
I1	VI/VII, XI	26	P, V, M	MKLXTFLLXLXLPXXXG
I2	XI, XII, XIV	62	M, V, P	MMFRXTSVXCFLLVIXLNL
I3	VI/VII, XI	9	V, P, M	MKLVLAIVXILMLLSLSTGA
J	XIV	30	V, P, M	MPSVRSVTCCLLWXMLSXXLVTPGSP
K	XXIII	4	V	MIMRMTLTLFVLVVMTAASASG
L	XIV	14	V, P	MXXXVMFVXLXLTMLPTX
M	I, II, III, IV, VI/VII, IX, XIV, XVI	443	M, V, P	MMXKXGVXMLXIXLXLFPLXXXQLDA
N	XV	4	M	MSTLKMMLLLLLLLPXATFDSDG
O1	I, VI/VII, IX, XII, XIV, XVI	575	P, V, M	MKLTVCXIVAVLFLTAXXLXTA
O2	VI/VII, XIV, XV	130	P, M, V	MEKLTILLVAAVLMSTQALXQS
O3	VI/VII	43	P, V, M	MSGLGIMVLTLLLLVFMXTSHQ
P	IX, XIV	12	V	MHXXLXXSAVLXLLXAXNFXXVQ
S	VIII	21	P, M, V	MMXKMGAMFVLLLFVXSSQQ
T	I, V, X, XVI	234	M, V, P	MRCLPVFXILLLIXSAPSVDA
V	XV	2	V	MMPVILLLLSLAIRXXDG
Y	XVII	1	V	MQKATVLLALLLPLSTA

Fonte: adaptado de (Akondi *et al.*, 2014; Mir *et al.*, 2016) e ConoServer

P= piscívoros, M= moluscívoros e V= vermívoros

Em 2012, a classificação da superfamília de genes foi estendida aos conopeptídeos pobres em pontes dissulfeto (Puillandre *et al.*), e as superfamílias de genes B e C foram introduzidas no ConoServer.

As superfamílias O1, M, A e T, como evidenciado pela tabela, são de fato as maiores superfamílias encontradas até a data (Akondi *et al.*, 2014) sendo a A, a mais bem caracterizadas. Logo, neste trabalho destacaremos a superfamília A.

1.4.1.2 Superfamília A

O peptídeo α -GI - composto por 13 resíduos de aminoácidos e duas ligações dissulfeto - foi uma das primeiras conotoxinas a serem isoladas da peçonha de *Conus* (Gray *et al.*, 1981). Ele foi caracterizado como antagonista nAChR, inibindo a neurotransmissão muscular (Mcmanus *et al.*, 1981). Vários anos depois, reconheceu-se que o α -GI fazia parte de um grupo diversificado de conotoxinas que compartilhavam uma sequência peptídica sinal semelhante. Posteriormente esse grupo foi designado como superfamília A (Santos *et al.*, 2004). Como α -GI, a maioria das conotoxinas dessa superfamília são caracterizadas pelo padrão de cisteína de tipo I (CC-C-C, o qual será abordado em mais detalhes a diante), então denominadas α -conotoxinas, e conhecidas por ligarem-se seletivamente à uma série de subtipos de nAChR neuronais e neuromusculares (Robinson e Norton, 2014). Apesar de muitas α -conotoxinas já terem sido caracterizadas em detalhes, demonstrando o valioso papel como sondas farmacológicas nicotínicas, os alvos moleculares das conotoxinas da superfamília A não estão limitados aos canais iônicos. A conotoxina ρ -TIA (*Conus tulipa*) atua sobre o receptor adrenérgico $\alpha 1$, um GPCR (Sharpe *et al.*, 2001). Este peptídeo compartilha a estrutura de cisteína, a conectividade das pontes dissulfeto e o *fold*ing geral das α -conotoxinas da superfamília A, mas difere intensamente na composição de aminoácidos intercisteínas. A superfamília A contém além das α -conotoxinas, outras duas famílias farmacológicas (**Figura 34**): α A-conotoxinas e κ A-conotoxinas (Terlau e Olivera, 2004). Essas duas últimas apresentam o mesmo padrão de cisteínas (CC-C-C-C-C) mas divergem quanto ao alvo, atuando em nAChRs e bloqueio de canais para K⁺, respectivamente (Teichert *et al.*, 2007).

κ A-SIVA	<u>MGMRMMFTVFLLVVLATTVVST</u> PSDRASDGRNAAVHERQKSLVPSVITTCGGYDPGTMCPPCRTCNSCG
κ A-MIVA	<u>MGMRMMFTVFLLVVLATTVVSI</u> PSDRASDGRNAVHERAPELVVTATTNCCGYNPMTICPPCMCTYSCPPKRKPGRRND
κ A-SmIVA	<u>MGMRMMFTVFLLVVLATTVVSI</u> PSDRASDGRNAAVNERQTWLVPSVITTCGGYDPGTMCPCTCMCDNTCKPKPKKSGRRND
α -Mr1.1	<u>MGMRMMFTVFLLVVLATTVVSFT</u> SDRASDRKAAAKDKASDLVAL--TVKGCSSHPACSVNNDPICG
α -AuIB	<u>MFTVFLLVVLATTVVSFT</u> SDRASDRKDA-----SGLIAL--TMKGCSSYPPCFATNPDCGRRR

Figura 34 Comparação entre prepropeptídeos da superfamília A

As conotoxinas compartilham uma sequência sinal idêntica e região pró- aparentemente conservada. O peptídeo sinal está sublinhado e a toxina madura sombreada. κ A-SIVA, *Conus striatus*; κ A-MIVA,

Conus magnus; κ A-SmIVA, *Conus stercusmuscarum*; α -Mr1.1, *Conus marmoreus*; α -AuIB, *Conus aulicus*. Fonte: (Peng *et al.*, 2010)

1.4.2 Padrão de cisteína

Outra forma de classificar os conopeptídeos é através do padrão de cisteínas, uma vez que, são amplamente divididos em dois grandes grupos: conopeptídeos pobres em pontes dissulfeto, com nenhuma ou uma ponte, e ricos, também denominados conotoxinas, os quais possuem duas ou mais pontes dissulfeto. Apesar de redundante, neste trabalho, será feita a distinção entre conopeptídeos e conotoxinas com base no conteúdo e disposição das cisteínas, porém isso não é justificado filogeneticamente (Puillandre *et al.*, 2012).

Os conopeptídeos que não possuem pontes dissulfeto estão organizados em 9 grupos: as *contulakins* (que visam o receptor de neurotensina) (Craig, Norberg, *et al.*, 1999), os *conantokins* (que visam o receptor de ácido N-metil-D-aspartico / NMDA) (Mena *et al.*, 1990), as *conorfamides* (tem como alvo o receptor Rfamide) (Maillo *et al.*, 2002), as *conolysins* (acredita-se que ajam sobre membranas celulares) (Biggs *et al.*, 2007), os *conophans* (alvo desconhecido) (Pisarewicz *et al.*, 2005) e as *conomorphins* (alvo desconhecido) (Han, T. *et al.*, 2008), mostrados na **Figura 32**. O conopeptídeo Y (bloqueia canais para K⁺) (Imperial *et al.*, 2008), a *conoprin* (alvo desconhecido) (Violette *et al.*, 2012) e o *conomap* (alvo desconhecido) (Dutertre *et al.*, 2006), foram identificados posteriormente. Já os peptídeos contendo uma única ponte dissulfeto são classificados como *contryphans* (modulador de canal para K⁺ dependentes de Ca²⁺ intracelular) (Massilia *et al.*, 2003) ou *conopressins* (homólogos da vasopressina) (Cruz *et al.*, 1987).

A **Tabela 8** apresenta 26 estruturas de cisteínas distintas identificadas em conotoxinas (Robinson e Norton, 2014), no entanto é importante ressaltar que essa classificação refere-se aos arranjos característicos de resíduos de cisteína na estrutura primária de uma conotoxina, independentemente da sua conectividade (Kaas *et al.*, 2010; Akondi *et al.*, 2014). Ainda não há uma nomenclatura uniforme para descrever as possibilidades de *foldings* de maneira geral para as conotoxinas (Akondi *et al.*, 2014) mas esse tópico será abordado mais adiante dentro da família farmacológica de interesse desse trabalho.

Tabela 8 Padrão de cisteínas das conotoxinas

A classificação das conotoxinas é definida de acordo com o padrão específico de resíduos de cisteína na sequência peptídica madura. A referência para cada padrão pode ser encontrada no banco de dados ConoServer (<http://www.conoserver.org>). Os traços que separam os resíduos de cisteínas (C) representam o segmento de um ou mais resíduos de aminoácidos. [PO] indica uma posição que poderia ser ocupada por uma prolina (P) ou hidroxiprolina (O). Fonte: (Akondi *et al.*, 2014; Mir *et al.*, 2016)

cysteine framework ^a	cysteine pattern ^b	no. of cysteines	no. of mature proteins	gene superfamilies
I	CC-C-C	4	293	A, M, O1, T
II	CCC-C-C-C	6	3	A, M
III	CC-C-C-CC	6	299	M
IV	CC-C-C-C-C	6	51	A, M
V	CC-CC	4	128	T
VI/VII	C-C-CC-C-C	6	517	H, I1, I3, M, O1, O2, O3
VIII	C-C-C-C-C-C- C-C-C-C	10	11	B2, S
IX	C-C-C-C-C-C	6	29	M, P
X	CC-C-[PO]C	4	11	T
XI	C-C-CC-CC- C-C	8	89	I1, I2, I3
XII	C-C-C-C-CC- C-C	8	49	I2, O1
XIII	C-C-C-CC-C- C-C	8	2	G
XIV	C-C-C-C	4	56	A, I2, J, L, M, O1, O2
XV	C-C-CC-C-C- C-C	8	23	D, N, O2, V
XVI	C-C-CC	4	7	M, T
XVII	C-C-CC-C- CC-C	8	1	Y
XVIII	C-C-CC-CC	6	2	
XIX	C-C-C-CCC- C-C-C-C	10	2	
XX	C-CC-C-CC- C-C-C-C	10	21	D
XXI	CC-C-C-C- CC-C-C-C	10	1	
XXII	C-C-C-C-C-C- C-C	8	8	E
XXIII	C-C-C-CC-C	6	6	K
XXIV	C-CC-C	4	1	B3
XXV	C-C-C-C-CC	6	1	
XXVI	C-C-C-C-CC- CC	8	1	

1.4.3 Famílias farmacológicas

A mudança de um único resíduo de aminoácido nas regiões hipervariáveis pode produzir peptídeos com a mesma estrutura, se o motivo da cisteína for mantido, mas com seletividade finamente diferente para os diferentes subtipos de receptores (Nguyen *et al.*, 2014). Logo, a diversidade da estrutura primária das conotoxinas reflete a diversidade de seus alvos moleculares (Kobayashi *et al.*, 1982; 1983; Gray *et al.*, 1984; Mcintosh *et al.*, 1993; Mcintosh *et al.*, 1995; Miranda e Alewood, 1999; Terlau e Olivera, 2004; Han, T. *et al.*, 2008; Kaas *et al.*, 2008; Kaas *et al.*, 2010; Lewis *et al.*, 2012). Desde a descoberta original da α -conotoxina GI que bloqueia nAChRs muscular (Olivera, 2002) e da μ -conotoxina GIIIA que bloqueia os canais para Na^+ do músculo esquelético (Mcintosh *et al.*, 1999; Terlau e Olivera, 2004), o número de canais iônicos e receptores alvos das conotoxinas continuou a crescer a uma taxa sem precedentes. As conotoxinas individualmente podem se ligar seletivamente a subtipos de canais voltagem-dependentes para Ca^{2+} , Na^+ e K^+ (Kobayashi *et al.*, 1983). Elas também têm como alvo GPCRs, neurotransmissores e transportadores (Biggs *et al.*, 2007; Nam *et al.*, 2009; Robinson e Norton, 2014). Além do espectro de alvos moleculares em expansão, a diversidade de diferentes sítios em um dado alvo molecular também continua a surpreender. Por exemplo, os peptídeos que visam os canais para Na^+ voltagem-dependentes não são apenas bloqueadores de canais (Mcintosh *et al.*, 1999; Han, T. *et al.*, 2008; Imperial *et al.*, 2008), alguns se apresentam como inibidores da inativação (Violette *et al.*, 2012) enquanto outros facilitam a ativação (Dutertre *et al.*, 2006).

A classificação em família farmacológica baseia-se no alvo e no tipo de interação de uma conotoxina (Robinson e Norton, 2014), sendo os 12 principais alvos mostrados na **Tabela 9**.

O repertório de bloqueadores altamente seletivos de subtipos de nAChRs neuronais e musculares também é muito amplo. Há pelo menos uma conotoxina na peçonha de cada espécie de *Conus* que inibe nAChR (Mcintosh *et al.*, 1999; Dutertre *et al.*, 2007). Em geral, sete famílias diferentes de conotoxinas são conhecidas por apresentar os nAChR como alvo: α -conotoxinas, αC -conotoxinas, αD -conotoxinas, ψ -conotoxinas, αS -conotoxinas, αL -conotoxinas e αJ -conotoxinas (Nguyen, 2014).

Tabela 9 Alvos farmacológicos das conotoxinas

Família	Alvo farmacológico	Conotoxina	Referência
α (alpha)	Receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR)	GI	(Gray <i>et al.</i> , 1981)
γ (gamma)	Canais catiônicos voltagem dependente não específicos	PnVIIA, TxVIIIA	(Fainzilber <i>et al.</i> , 1998)
δ (delta)	Canais para Na ⁺ voltagem dependente	TxVIA	(Fainzilber <i>et al.</i> , 1991)
ϵ (epsilon)	Canais para Ca ²⁺ voltagem dependente	TxVA	(Rigby <i>et al.</i> , 1999)
ι (iota)	Canais para Na ⁺ voltagem dependente	RXIA	(Buczek <i>et al.</i> , 2007)
κ (kappa)	Canais para K ⁺ voltagem dependente	PVIIA	(Terlau <i>et al.</i> , 1996)
μ (mu)	Canais para Na ⁺ voltagem dependente	GIIIA	(Cruz, Gray, Olivera, <i>et al.</i> , 1985)
ρ (rho)	Receptor adrenérgico α 1 (GPCR)	TIA	(Sharpe <i>et al.</i> , 2001)
σ (sigma)	Receptor de serotonina (GPCR)	GVIIIA	(England <i>et al.</i> , 1998)
τ (tau)	Receptor de somatostatina	CnVA	(Petrel <i>et al.</i> , 2013)
χ (chi)	Transportador de noradrenalina	MrIA	(Sharpe <i>et al.</i> , 2001)
ω (omega)	Canais para Ca ²⁺ voltagem dependente	GVIA	(Kerr e Yoshikami, 1984)

Dentre essas 12 famílias de diferentes alvos farmacológicos, as α -conotoxinas, antagonistas de nAChR, são as mais numerosas e diversas (**Figura 35**) (Lewis *et al.*, 2012) e compreendem o universo de estudo desse trabalho.

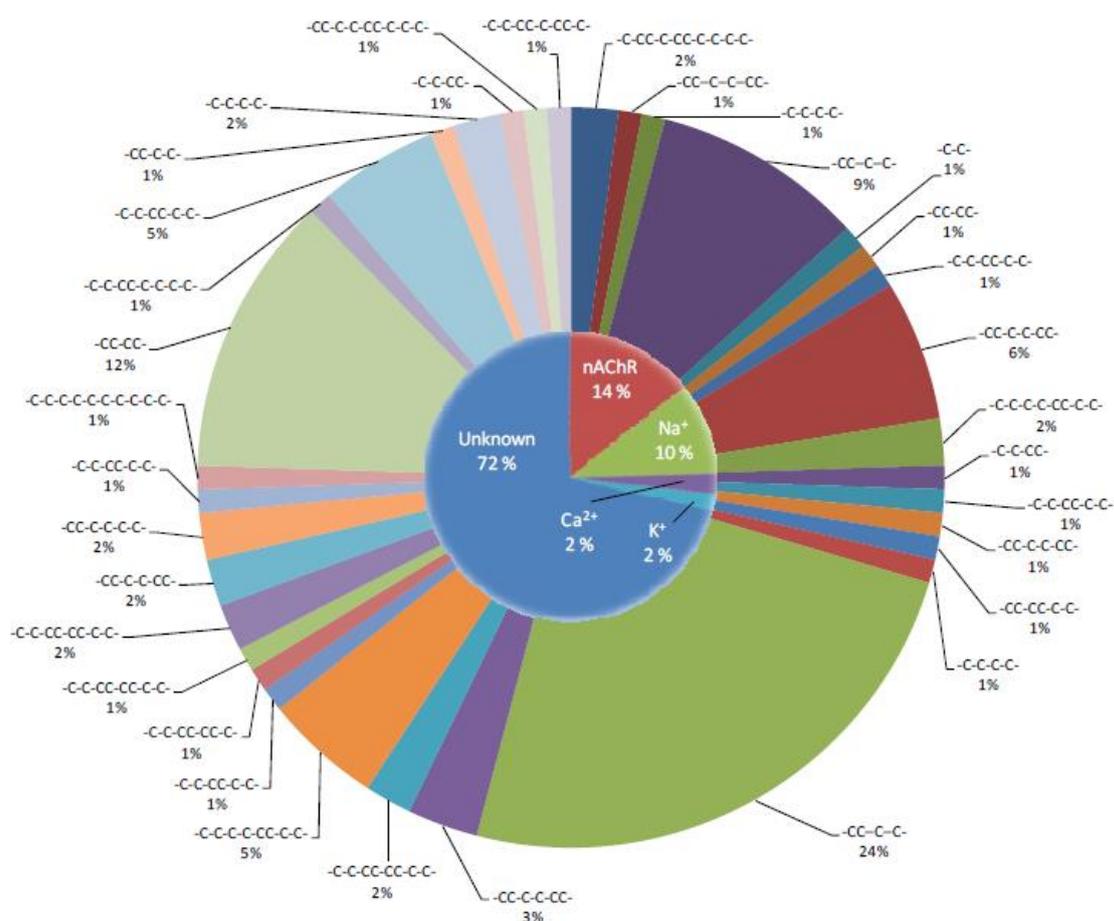


Figura 35 Peptídeos isolados de *Conus*

O gráfico reúne todos os conopeptídeos descritos de 1 de janeiro de 2007 até 31 de agosto de 2011 identificados através do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), da base de dados do PubMed, e obtidos a partir das seguintes palavras chaves: “*Conus* OU cone snail OU conotoxin OU conopeptide”. Eles foram categorizados por seus respectivos alvos (círculo interno) e padrões de cisteínas (círculo externo). Destaque para os nAChR (14%) e para a região verde, 24%, (CC-C-C), que correspondem às α -conotoxinas. Fonte: (Essack *et al.*, 2012)

1.4.3.1 α -conotoxinas

As primeiras toxinas de *Conus* cujas estruturas foram completamente elucidadas foram as α -conotoxinas (Cruz *et al.*, 1978; Gray *et al.*, 1981). Elas interagem com os tipos neuronais e muscular de nAChRs (Dutton e Craik, 2001; Olivera *et al.*, 2008), sendo que na junção neuromuscular trata-se de receptores pós-sinápticos, enquanto o tipo neuronal é encontrado tanto pré quanto pós-sináptico, no sistema nervoso periférico e central (Sargent, 1993). Estes peptídeos, assim como as neurotoxinas de serpentes, inibem especificamente os AChR na junção neuromuscular (Mcmanus *et al.*, 1981; Mcmanus

e Musick, 1985) e também competem com a α -BgTx e o curare pelo mesmo sítio de ligação nos nAChR Torpedo (Mcmanus *et al.*, 1981; Mcmanus e Musick, 1985) de modo a inibi-lo (Mcmanus *et al.*, 1981; Mcmanus e Musick, 1985).

O farmacóforo destas α -conotoxinas tem sido cuidadosamente estudado e é composto de uma região hidrofóbica preservada no “loop” 1 (resíduos de Ser e Pro desempenhando um papel na manutenção da estrutura secundária) a qual determina a interação; e por uma região mais variável, o “loop” 2, tanto em termos do número de resíduos quanto nos tipos de resíduos que contém, sugerindo fortemente ser a região responsável pelas diferenças de seletividade e potência (Dutertre *et al.*, 2005).

As α -conotoxinas podem ser divididas em subfamílias com base no espaçamento dos quatro resíduos de cisteína que definem os dois "loops", CCX_mCX_nC (X_m e X_n representam o número de resíduos entre as cisteínas) (Halai e Craik, 2009). As três principais subclasses são 3/5, 4/3 e 4/7, com 52, 63 e 237 representantes. Por exemplo, conotoxinas GI, ImI e Vc1.1 pertencem a cada uma dessas subclasses, respectivamente. A subclasse 3/5 é conhecida por agir sobre nAChR muscular, enquanto as demais tem como alvo os receptores neuronais (Azam e Mcintosh, 2009). Outras subclasses também já foram identificadas mas apresentam de 1 a 5 representantes (3/6, 4/2, 4/5, 4/8, 5/2 e 5/8), salvo 4/4 e 4/6, com 14 e 15 conotoxinas representantes, respectivamente (Akondi *et al.*, 2014).

Como as α -conotoxinas tem 4 resíduos de cisteína, elas podem potencialmente adotar três conformações quanto a conectividade das pontes dissulfeto: globular (C^I-C^{III} e $C^{II}-C^{IV}$), ribbon (C^I-C^{IV} e $C^{II}-C^{III}$) ou bead (C^I-C^{II} e $C^{III}-C^{IV}$) (Mcintosh *et al.*, 1999; Dutton *et al.*, 2002), como mostrado na **Figura 36**. A conectividade nativa mais abundante para α -conotoxinas é a forma globular (Zhang e Snyder, 1991), mas algumas outras famílias apresentam uma conectividade ribbon nativa. Já a conformação bead não foi vista em nenhuma ocorrência natural, presumivelmente devido à energia desfavorável da ligação dissulfeto (Zhang e Snyder, 1991; Gehrmann *et al.*, 1998).

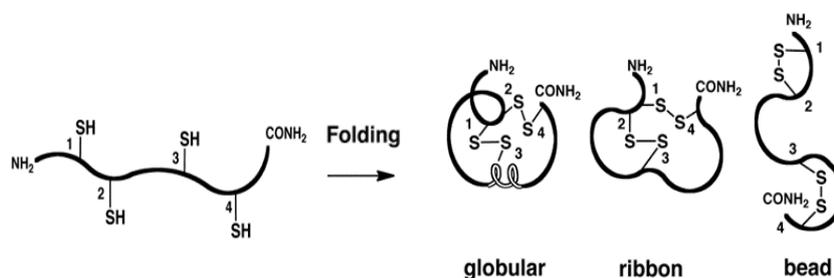


Figura 36 Isômeros estruturais das α -conotoxinas com padrão de cisteínas I

Diagrama esquemático que representa os três possíveis isômeros de ligações dissulfeto das α -conotoxinas com padrão de cisteína I (CC-C-C). Fonte: adaptado de (Akondi *et al.*, 2014)

Uma das dificuldades na caracterização da interação das conotoxinas com seus receptores era a cristalização do complexo. No entanto, a descoberta de uma proteína homóloga ao domínio de ligação do receptor de acetilcolina (AChBP) foi útil como um modelo para nAChRs (Brejc *et al.*, 2001; Smit *et al.*, 2001; Celie *et al.*, 2004; Hansen *et al.*, 2004). Alguns estudos (Mordvintsev *et al.*, 2005; Ulens *et al.*, 2006; Dutertre *et al.*, 2007) delinearam a orientação das conotoxinas ligadas ao receptor e de maneira geral, verificou-se que não houve mudanças conformacionais das conotoxinas em solução para as associadas ao receptor (Halai e Craik, 2009). Isso devido à forte estabilização por suas ligações dissulfeto. Essa é uma descoberta importante e que tem fortes implicações no design de drogas.

1.5 CONOTOXINAS: PRODUTOS NATURAIS COMO FÁRMACOS

Uma consequência da diversidade de conotoxinas é o amplo espectro de alvos moleculares (Lewis, 2004). Apesar de terem como presas vermes, moluscos e peixes, estes peptídeos de *Conus* também atuam em canais iônicos e receptores controlados por ligante de mamíferos, devido ao grau de conservação estrutural dessas proteínas de membrana, em eucariotos superiores. Conotoxinas que visam os nAChR da junção neuromuscular de invertebrados, em vertebrados, elas foram ativas em tecidos relevantes para a algesia (Essack *et al.*, 2012). O padrão de expressão encontrado na junção neuromuscular de invertebrados também está presente nos vertebrados, mas desempenhando funções diferentes. Logo, apesar desta heterogeneidade de alvos, o potencial terapêutico da maioria das conotoxinas é atualmente centrado no tratamento da dor, como potenciais agentes analgésicos para vertebrados (Olivera *et al.*, 1987; Yan *et al.*, 2010).

Por exemplo, canais para Ca^{2+} voltagem dependentes são regulados positivamente em estados de dor crônica e, ω -conotoxinas específicas para esses canais para Ca^{2+} são potentes analgésicos (Malmberg e Yaksh, 1995). Inibidores de canais para Na^+ , e α - e χ -conotoxinas, que visam nAChR e transportador de norepinefrina (NET), respectivamente, também foram atribuídos como agentes analgésicos (Livett *et al.*, 2006). Além disso, Ziconotide (Prialt®; Elan Pharmaceuticals, Inc.) foi a primeira droga farmacêutica derivada de *Conus*, aprovada pelo *United States Food and Drug Administration* (FDA). Ela é um equivalente sintético a SNX-111 ou ω -conotoxina MVIIA encontrada naturalmente na peçonha de *Conus magus* (Olivera *et al.*, 1987) e tem como alvos os canais para Ca^{2+} do tipo N que estão relacionados a analgesia no sistema nervoso e, portanto, vem sendo utilizada no tratamento da dor crônica grave pela administração intratecal em pacientes (Bowersox e Luther, 1998).

Essack e colaboradores (2012) elaboraram uma excelente revisão na qual descreveram vários peptídeos de *Conus*, que vem sendo utilizados como ferramentas de pesquisa em neurociência. As μ -conotoxinas são utilizadas para a imobilização do músculo esquelético sem afetar eventos axonais ou sinápticos devido à sua capacidade de bloquear o canal muscular para Na^+ Nav1.4, mas não os canais Nav1.1-Nav1.3 e Nav1.6-Nav1.9 (presentes no axônio) (Safo *et al.*, 2000; Catterall *et al.*, 2005). As ω -conotoxinas são utilizadas como padrão farmacológico em pesquisa relacionadas a canais para Ca^{2+} voltagem dependentes, bloqueando a liberação do neurotransmissor (Olivera *et al.*, 1994; Ichida *et al.*, 2000). Também foram utilizadas conotoxinas para diagnosticar os canais para Ca^{2+} , alvo da síndrome miastênica Lambert-Eaton (Sher *et al.*, 1989). As aplicações futuras das conotoxinas podem se estender a uma variedade de outras patologias. Os inibidores do canal para Na^+ também já foram relacionados ao tratamentos de acidente vascular cerebral, epilepsia e adicção, as conotoxinas que inibem NET tem aplicações como antidepressivos (Gasior *et al.*, 2007; Daly e Craik, 2009) e outros conopeptídeos já demonstraram efeitos: neuroprotetores ou cardioprotetores (Chen *et al.*, 2010; Shahlaie *et al.*, 2010; Dave e Lahiry, 2012); e um potencial relevante no tratamento do câncer (Dave e Lahiry, 2012) e doenças neuronais (Waxman, 2006; Haydar e Dunlop, 2010).

Uma pesquisa na literatura de patentes mostra que há um grande número das aplicações associadas ao uso de conotoxinas na clínica (**Tabela 10**). Outros conopeptídeos estão sendo testados em ensaios clínicos e pré-clínicos (Essack *et al.*, 2012). CGX-1007 (Conantokin G) isolado de *Conus geographus*, é um antagonista do receptor NMDA selecionado para tratamento potencial de convulsões epiléticas (Barton *et al.*, 2004). CGX1160 (Contulakin-G) isolado da mesma espécie (Craig, Norberg, *et al.*, 1999), é um agonista do receptor de neurotensina subtipo 1 (NTS) utilizado para o tratamento potencial de dor crônica grave (Kern *et al.*, 2007). O CGX-1051, *Conus purpurasens*, é um inibidor do canal para K^+ e pode ser vislumbrado para o tratamento do infarto do miocárdio (Lubbers *et al.*, 2005). Xen2174 (Mr1A), *Conus marmoreus*, é um antagonista de nAChR que está sendo investigado na dor neuropática crônica (Nielsen *et al.*, 2005) e dor pós-cirúrgica (Obata *et al.*, 2005).

Tabela 10 Conopeptídeos como agentes farmacêuticos para tratamento de uma gama de distúrbios neurológicos

Name	Conopeptide	<i>Conus</i> species ^a	Target	Stage	Company ^b	Comment	Reference
ACVI	α -Conotoxin Vc1.1	<i>C. victoriae</i> (<i>m</i>)	Competitive blocker of selected neuronal-type nicotinic ACh receptors	Phase II	Metabolic Pharmaceuticals Ltd, Melbourne, Vic, Australia	Effective against peripheral neuropathic pain in animal models and accelerates functional recovery of injured neurons	Sandall et al. (2003), Livett et al. (2002), Livett et al. (2004), Gayler et al. (2005), Satkunanathan et al. (2005)
	rho- Conotoxin TIA	<i>C. tulipa</i> (<i>p</i>)	Reversible non-competitive inhibitor of α -1 adrenergic receptors	Predinical	Xenome, Ltd., Brisbane, Qld., Australia	Acts as a reversible non-competitive inhibitor of alpha-1 adrenergic receptors	Sharpe et al. (2003b)
AM336	ω -conotoxin CVID	<i>C. catus</i> (<i>p</i>)	Blocks N-type calcium channel, Ca ((v)2.2) calcium channel variant.	Phase II	AMRAD Corp.—under license from University of Queensland	Being developed for neuropathic pain. Reported to have a better therapeutic index than Prialt™	Adams et al. (2003)
SNX-III, C1002, Ziconotide, Prialt™	ω -conotoxin MVIIA	<i>C. magus</i> (<i>p</i>)	N-type calcium channels	Completed Phase III, Approved by FDA 28/12/04 and CHMP 18/11/04 for the treatment of severe, chronic pain in patients who require intrathecal (IT) analgesia.	Elan Corporation (Elan Pharmaceuticals), CA, USA	Significant pain relief to patients in clinical trials.	Bowersox and Luther (1998), Heading (2001), Penn and Paice (2000), Levin et al. (2002), Atanassoff et al. (2000), Jain (2000)

Continuação da Tabela 10

Xen2174	χ -conopeptides (chi-CTX MrIA/B)	<i>C. marmoratus</i> (<i>m</i>)	Acts as reversible noncompetitive inhibitor of the neuronal noradrenaline transporter	Phase I/II	Xenome, Ltd., Brisbane, Qld., Australia	Being developed to "treat certain types of pain, for which there is currently a lack of effective treatment" neuropathic pain.	Sharpe et al. (2003a)
CGX-1160	Contulakin-G	<i>C. geographus</i> (<i>p</i>)	Binds to neurotensin receptor	Phase II	Cognetix Inc, Salt Lake City, USA	Short term management of post-operative pain	Malmberg et al. (2003)
CGX-1007	Conantokin-G	<i>C. geographus</i> (<i>p</i>)	Selective inhibitor of the NMDA receptor (NR2B subtype)	Phase II	Cognetix Inc, Salt Lake City, USA	Potent antinociceptive effects in several models of injury-induced pain. Also, control of seizures in intractable epilepsy	Malmberg et al. (2003)
CGX-	Conantokin-T	<i>C. tulipa</i> (<i>p</i>)	Selective inhibitor of the NMDA receptor (NR2A and NR2B) subtypes	Phase II	Cognetix Inc, Salt Lake City, USA	Potent antinociceptive effects in several models of injury-induced pain	Malmberg et al. (2003)

^aPrey preference for *Conus* species: *p* = piscivorous (fish-hunting); *m* = molluscivorous (mollusc hunting); *v* = vermivorous (worm-hunting). Note: This list does not attempt to be comprehensive. For other examples of *Conus* peptides being investigated for therapeutic potential see the excellent reviews by Alewood et al., 2003; Heading, 2001, 2002; Doggrell, 2004; Grant et al., 2004).

^bWebsites of commercial developers: Elan Corporation <http://www.elan.com> ; Cognetix Inc. <http://www.cognetix.com> ; Xenome Pty Ltd: <http://www.xenome.com> ; Amrad Corp. <http://www.amrad.com.au> ; Univ. of Melbourne: Cone Shell and Conotoxin Homepage <http://grimwade.biochem.unimelb.edu.au/cone/> ; Metabolic Pharmaceuticals Ltd.: <http://www.metabolic.com.au>.

Fonte: (Livett *et al.*, 2006)

Em geral, os peptídeos são considerados como excelentes drogas, com potente afinidade, especificidade, baixa toxicidade, imunogenicidade, facilidade de síntese e armazenamento, mas pobres para uso terapêutico. As conotoxinas potencialmente sofrem com os problemas genéricos encontrados por todos os medicamentos peptídicos, tais como má absorção, susceptibilidade à proteólise, curta meia-vida, além dos obstáculos no desenvolvimento de técnicas de administração minimamente invasivas (Halai e Craik, 2009; Audie e Boyd, 2010).

Para abordar essas limitações, Halai e Craik (2009) se concentraram na re-engenharia de conotoxinas naturais visando a ciclização do esqueleto peptídico, quer seja diretamente pela ligação das extremidades N e C-terminal, ou pela adição de um linker, de forma a não comprometer a atividade biológica. A ciclização apresentou múltiplas vantagens, melhorando a eficiência de ligação, bem como a introdução ou aumento da resistência às proteases (Clark *et al.*, 2005; Lovelace *et al.*, 2006), assim conferindo uma estratégia muito eficaz para uma maior estabilidade e biodisponibilidade das α -conotoxinas, abrindo o caminho para a via oral terapêutica. Outras estratégias incluem modificações como a PEGuilação (Greenwald *et al.*, 2003), o uso de peptidomiméticos e transportadores de peptídeos (Rubio-Aliaga e Daniel, 2002), bem como outras técnicas (Hamman *et al.*, 2005). À luz de mais conhecimento sobre produtos naturais, eventualmente, o número de medicamentos peptídicos no mercado aumentará e os benefícios de sua potência e seletividade poderão ser utilizados para uma nova geração de agentes terapêuticos.

1.6 CONSÓRCIO VENOMICS

O consórcio europeu FP7 HEALTH VENOMICS (2012-2015) baseou-se na observação de que venenos animais constituem uma biblioteca natural de milhões de moléculas que são em grande parte inexploradas e podem ser utilizadas como fonte de drogas potenciais (Gilles e Servent, 2014).

Nos últimos 30 anos de estudo em toxinologia a ideia geral da exploração dos venenos e peçonhas apresentava um lento fluxo de trabalho com fracionamento guiado por bioensaio para identificar novas toxinas com interessantes propriedades funcionais. No entanto, 90% da biodiversidade representada por animais venenosos nunca foi explorada devido à falta de material suficiente (He *et al.*, 2013; Valdez-Velazquez *et al.*, 2013; Vonk *et al.*, 2013; Safavi-Hemami *et al.*, 2014). O objetivo do projeto foi elaborar estratégias "omicas" inovadoras e adaptadas à investigação de uma grande diversidade de venenos. Além de desenvolver um fluxo de trabalho de alto rendimento, integrando abordagens transcriptômicas e proteômicas de ponta, produção maciça de toxinas - recriando *in vitro* parte da biblioteca natural - e realizando testes funcionais aplicados a alvos terapêuticos.

Tal tipo de projeto só pode ser alcançado ao combinar competências e conhecimentos acadêmicos (CEA, Université de Liège, University of KU e Université de Marseille) e industriais (VenomeTech, Sistemas Genómicos, NZYTech, Zealand Pharma, Vitamib) de diversos países como França, Bélgica, Espanha, Portugal, Dinamarca e Austrália.

VENOMICS foi separado em duas partes, uma fase de pesquisa e desenvolvimento dedicada a construção e otimização de tecnologias de ponta em transcriptoma, proteoma e produção de toxinas, seguido de uma segunda fase de demonstração, focado na elaboração de um banco de dados - nomeado como aplicação Mambaz - de grandes sequências e de peptídeos, prontos para serem testados.

As duas partes, foram por sua vez, subdivididas em 4 passos principais.

O primeiro passo foi a obtenção dos animais, extração da peçonha e obtenção da glândula de veneno. No total, VENOMICS analisou amostras de 203 espécies animais (de pequenos insetos a lagartos enormes) de todo o mundo, através de expedições científicas (Guiana Francesa, Ilha de Mayotte, Polinésia) e colaborações e relações comerciais particularmente eficientes (AlphaBiotoxine, Bélgica). Além de serpentes, escorpiões, aranhas e cones, os animais em análise incluíram peixes, uma espécie venenosa de lagartixa que nunca havia sido estudada antes, um polvo, diferentes insetos, incluindo abelhas, *bumble-bees*, vespas, e espécimes do gênero de artrópode Scolopendra.

O segundo passo foi a geração do banco de dados de sequências. O veneno foi enviado para a equipe de proteômica e a glândula de veneno, da qual extraiu-se o RNA, para a equipe responsável pelo sequenciamento transcriptômico de novo. Para realizar as análises transcriptômicas, duas tecnologias, 454 Roche e Illumina, foram comparadas. Ambas equipes trabalharam em paralelo com o mesmo animal e os resultados obtidos foram enviados à equipe de integração, que examinou os dados de ambos os grupos para validar as sequências de peptídeos que atendiam aos critérios estruturais definidos pelos especialistas em toxinologia, integrantes do consórcio. Isso permitiu a criação da Mambaz - banco de dados exclusivo e confidencial - com 100 a 200 sequências por animal. Em quatro anos, VENOMICS conseguiu gerar o maior banco de dados existente, com 25.000 sequências validadas. Até agora, havia dois grandes bancos de dados de toxinas: Conoserver, um banco de dados de aproximadamente 6.255 toxinas isoladas de *Conus* e Aracnoserver, com cerca de 1.544 toxinas de aranha (dados de novembro/2017).

Para o terceiro passo foram escolhidas duas estratégias complementares para sua produção. A primeira foi a elaboração de protocolo específico para síntese química e *foldig* particularmente adaptados para peptídeos com menos de 40 resíduos, que permitiram a produção de 1.000 toxinas, prontas para serem testadas. A segunda estratégia foi a expressão recombinante. Após a avaliação comparativa da maioria dos protocolos na literatura, para a produção de toxina em *Escherichia coli*, e em conjunto com a empresa NZYTech (Lisboa), foi desenvolvido um novo e original protocolo que permitiu a produção, purificação e caracterização de 4.000 toxinas recombinantes de 35 a 120 resíduos em 6 meses. A maioria das etapas envolvidas foram automatizadas na robótica, o que explica em parte o aumento da velocidade de 100x em comparação com a rotina tradicional de um laboratório

especializado no estudo de toxinas recombinantes. Além disso, ao contrário da maioria dos protocolos publicados, com este processo, as toxinas são oxidadas e funcionais já após a purificação das culturas de *E. coli*, o que diminui drasticamente o tempo de produção.

Finalmente, o quarto passo consistiu na identificação e caracterização em termos de afinidade, seletividade, estrutura e função das 4.000 toxinas produzidas *in vitro*. Aquelas que mostraram/mostram as melhores propriedades foram/serão desafiadas em modelos das doenças específicas, como doenças auto-imunes, inflamatórias, diabetes, alergias ou obesidade.

A história da farmacologia já viu exemplos de drogas à base de venenos aprovadas e usadas na terapêutica, por exemplo Prialt® e o Byetta® mas VENOMICS estabeleceu as bases para o desenvolvimento contínuo desses tipos de terapia.

Em conclusão, o consórcio VENOMICS pode ser visto como um projeto que promoveu uma dupla ruptura na toxinologia (Gilles e Servent, 2014). A primeira diz respeito ao desenvolvimento de tecnologias de ponta adaptada a qualquer animal peçonhento/venenoso, qualquer que seja seu tamanho, focado na reprodução *in vitro* de venenos em um banco sintético compatível com uma triagem de alto rendimento. O segundo avanço, seria a peçonha já não ser mais considerada uma mistura de toxinas altamente tóxicas para as presas, mas como um processo natural de fonte de peptídeos biologicamente ativos. Esses peptídeos podem ser utilizados como ferramentas inestimáveis para investigar vários processos fisiológicos, além de servirem como novas bio-drogas com alvos moleculares conhecidos e envolvidos em patologias com necessidades terapêuticas ainda não atendidas no mercado.

No trabalho em questão, os recursos da aplicação Mambaz, construída pelo consórcio VENOMICS foi utilizado para identificação e caracterização de potenciais novas α -conotoxinas.

2 JUSTIFICATIVA

Na bioprospecção tradicional, em que organismos são coletados, as amostras processadas e selecionadas de acordo com a atividade farmacológicas de interesse, uma grande limitação é a quantidade do material necessário para pesquisar e caracterizar essas moléculas. Na prática, a capacidade de purificar com sucesso um composto bioativo a partir de um extrato bruto, é limitada às espécies que possam ser mantidas em cativeiro ou a compostos presente em altas concentrações e em organismos relativamente grandes. A maioria das espécies animais venenosas, de interesse para a pesquisa, que detem compostos biologicamente ativos, são pequenas e relativamente raras. Além do mais, muitos dos compostos produzidos por tais espécies, para interagir com outros animais no ambiente, estão presentes apenas em órgãos especializados, e em circunstância de interação biótica específica.

É amplamente difundido que venenos animais constituem importantes ferramentas farmacológicas devido a sua potência, alta especificidade e capacidade de discriminar entre isoformas de alvos moleculares estreitamente relacionadas e podem também contribuir para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Essas características já resultaram no desenvolvimento direto de agentes terapêuticos.

Para o gênero *Conus* essa realidade não é diferente. Apesar de mais de quatro décadas de pesquisa com conotoxinas, apenas algumas centenas de componentes foram estrutural e funcionalmente caracterizados. Existem mais de 100.000 conotoxinas distribuídas em aproximadamente 700 espécies (Daly e Craik, 2009), contudo, apenas 8.474 sequências foram depositadas no *Universal Protein Resource* (UniProt, 26 de outubro de 2017).

As α -conotoxinas, que interagem com os canais iônicos dos nAChR, corresponde a família de genes mais expressa nos dutos de veneno de *Conus* (Santos *et al.*, 2004). Esta família possui uma enorme fonte de ligantes subtipo-específicos, já caracterizados, para os diferentes nAChR (Olivera *et al.*, 2008).

Esses receptores participam em uma ampla gama de processos fisiológicos, incluindo a função cognitiva, recompensa, atividade motora, analgesia, percepção de som e função imune; além de estarem envolvidos em condições patológicas como a doença de Alzheimer, Doença de Parkinson, algumas formas de epilepsia, depressão, autismo e esquizofrenia (Gotti *et al.*, 2006), para as quais os medicamentos usuais podem ter efeitos secundários indesejáveis (Dickinson, 2003). A falta de ligantes subtipo-específicos e o fato de que muitas células neuronais expressem múltiplos subtipos, inicialmente dificultou a identificação dos diferentes nAChR nativos, mas o aumento do conhecimento da composição e dos papéis de cada subtipo é de interesse considerável para o desenvolvimento de novos ligantes clinicamente úteis (Dutton e Craik, 2001; Gotti *et al.*, 2006; Daly e Craik, 2009).

A partir de 2000, com o desenvolvimento e avanço de novas tecnologias, uma abordagem integrada (proteômica, transcriptômica e bioinformática) permitiu a descoberta de numerosos peptídeos ativos a partir de cones marinhos. Desde então, o interesse nessas peçonhas continua a crescer porque têm grandes possibilidades na terapêutica em seres humanos. Atualmente esse contexto é investigado por um grande número de laboratórios em todo o mundo, incluindo o *Laboratoire de Toxinologie Moléculaire et Biotechnologies* (CEA-Saclay).

Embora o foco, neste trabalho, tenha sido necessariamente em uma única família de conopeptídeos, as α -conotoxinas, uma característica importante para a descoberta de novos ligantes subtipo-específicos tem sido exploração ampla da biodiversidade. Nessa linha de raciocínio e de posse dos recursos do ambicioso projeto - Consórcio europeu FP7 VENOMICS - que reúne laboratórios públicos e empresas de biotecnologia com habilidades complementares e tecnologias em proteômica, transcriptômica e produção de peptídeo de alto rendimento (Dutertre, 2014) foi possível desenvolver este trabalho.

O direcionamento para este novo sub-projeto foi estimulado considerando-se a impossibilidade de obtenção de um novo *pool* da peçonha de *Micrurus*, para a continuidade do projeto apresentado no

capítulo 1, bem como pela busca por novos ligantes nicotínicos, visando concluir os estudos realizados durante o doutorado sanduíche. Além disso essa investigação, permitiu maior abrangência e aprofundamento da tese e o conhecimento e utilização de novas estratégias científicas.

3 OBJETIVOS

Prospecção de sequências originais de conotoxinas selecionadas a partir da aplicação Mambaz do consórcio VENOMICS, síntese e caracterização farmacológica sobre o sistema colinérgico.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Identificar conopeptídeos, com o padrão de cisteínas característico de α -conotoxinas, depositados na aplicação Mambaz do consórcio VENOMICS;
- ✓ Selecionar as conotoxinas com base na originalidade intrinsecamente relacionada à espécie, subfamília ainda não descrita e baixa similaridade frente as sequências depositadas em bancos de dados;
- ✓ Sintetizar quimicamente, por estratégia Fmoc, as conotoxinas selecionadas;
- ✓ Induzir o *folding* (enovelamento) e a correta formação das pontes dissulfeto, purificar e verificar por espectrometria de massas as conotoxinas selecionadas;
- ✓ Expressar as subunidades de receptores nicotínicos neuronais importantes para a construção dos receptores funcionais $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$ e $\alpha 7$ -5HT₃;
- ✓ Avaliar a atividade farmacológica das conotoxinas frente aos receptores adrenérgicos $\alpha 1$ expressos transientemente em células HEK-293, aos mAChR hM1 transfectados em células CHO, aos receptores nicotínicos neuronais $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 7$ -5HT₃ expressos transientemente em células tsA-201, e muscular Torpedo - $2\alpha 1\beta 1\delta\gamma$ purificados a partir do órgão elétrico de *Torpedo marmorata*, utilizando sondas fluorescentes (tecnologia HTRF®) ou sondas radioativas, por ensaios de *binding*;
- ✓ Registrar a força contrátil promovida pelas conotoxinas em preparações neuromuscular em de hemidiafragma de ratos;

- ✓ Caracterizar, ao menos parcialmente, a interação e alguns aspectos funcionais das conotoxinas com o receptor Torpedo - $2\alpha 1\beta 1\delta\gamma$ microtransplantado e incorporado em ovócitos de *Xenopus laevis*,

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 QUÍMICOS, TOXINAS, RADIOLIGANTES E FLUORÓFOROS

Acetonitrila (ACN), ácido tricloroacético (TFA), α -ciano-4-hidroxicinâmico, ácido 2,5-diidroxibenzóico, ácido sinapínico, 1,5-diaminonaftaleno, SEQUA-BRENE /Polybrene, N-metilpirrolidona (NMP), N-metilmorfolina (NMM), diclorometano (DCM), piperidina, anisol, tioanisol, triisopropilsilano (TIPS), resina Wang - LL, ditioneitol (DTT), guanidina, Tris, ácido etileno-diaminotetra-acético (EDTA), glutationa em sua forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), dimetilsulfóxido (DMSO), N-metilescopolamina (NMS), metanossulfonato de etila-3-amino benzoato, tricaína e todos os outros químicos foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA) ou de outras fontes padrão. Peptide Calibration Standard (Bruker Daltonics, Billerica, Massachusetts, EUA). NucleoBond® Xtra Maxi (MACHEREY-NAGEL, Bethlehem, Pensilvânia, EUA). Lumi4®-Terbium, telenzepina D2 Tag-lite®, L0040RED (Cisbio Bioassay, Codolet, França). Metil-caconitina (MLA) foi adquirido da Latoxan. Gibco F-12 Nutrient Mix GlutaMax™, DMEM, penicilina, estreptomicina e afotericina B, canamicina, Opti-MEM™, GlutaMAX, phenol red, lipofectamina, BODIPY® FL prazosin, meio socle, meio LB e todos os reagentes para cultura celular foram adquiridos da Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, EUA). Aminoácidos com grupamento Fmoc, 22-(6-cloro-1-Hbenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilamina hexafluorofosfato (HCTU) foram adquiridos da Activotec (Cambridge, Reino Unido). $[^{125}\text{I}]\text{Tyr}54\text{-}\alpha\text{-bungarotoxina}$ ($[^{125}\text{I}]\alpha\text{-BgTx}$) (90 Ci/mmol) foi adquirido da Amersham Biosciences (Little Chalfont, Reino Unido). N-metil-[^3H]-escopolamina ($[^3\text{H}]\text{-NMS}$) (84 Ci/mmol), [^3H]-epibatidina (55 Ci/mmol), MicroScint-0 e polietilenoimina (PEI) foram adquiridos da PerkinElmer (Waltham, Massachusetts, EUA).

4.1.2 ANIMAIS E MATERIAIS BIOLÓGICOS

Fêmeas adultas *Xenopus laevis* foram obtidas do *Centre de Ressources Biologiques Xenopus* - CNRS (Université de Rennes 1, Rennes, França). Raias vivas *Torpedo marmorata* foram compradas do *Service Modèles Biologiques* da Estação Biológica de Roscoff (Roscoff, França), e ratas fêmeas adultas foram obtidas do biotério do CNRS. As experiências foram realizadas de acordo com orientações da Comunidade Europeia para o Tratamento de Animais de Laboratório, com o edital oficial apresentado pelo Ministério da Agricultura da França e as recomendações da Declaração de Helsinski. Os protocolos foram aprovados pelo Departamento de Direção de Proteção Animal e pelo Comitê de Cuidados e Uso de Animais do CNRS.

Alguns cDNAs, que codificam AChR, utilizados nesse estudo nos foram gentilmente cedidos. Jean-Pierre Changeux (Instituto Pasteur, Paris, França) cedeu a quimera de $\alpha 7$ /galinha-5-HT₃/rato; Ortrud K. Steinlein (Institute of Human Genetics, Bonn, Alemanha) cedeu as subunidades humanas $\alpha 4$ e $\beta 2$. O cDNA $\alpha 3$ humano foi adquirido da Clinisciences (Nanterre, França) e para $\beta 4$ a construção foi desenvolvida previamente pela Dra. Muriel Alamar (CEA-Saclay, Gif-sur-Yvette, France).

As membranas de eletrócitos de *Torpedo*, expressando nAChRs subtipo $2\alpha 1\beta 1\delta\gamma$ (taxa de expressão ~40% do conteúdo de proteína da membrana) foram purificadas a partir do órgão elétrico de *Torpedo marmorata* como descrito anteriormente (Hill *et al.*, 1991; Araoz *et al.*, 2012).

As células de ovário de hamster chinês (CHO) expressando de forma estável os mAChR hM1 foram gentilmente fornecidas pelo Prof. Pierre-Olivier Couraud (Institut Cochin de Génétique Moléculaire, Paris, França).

As células tsA-201 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), HEK-293 (ATCC® CRL-1573™), as membranas de células CHO expressando mAChR M1 (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, EUA) e a cepa *E. coli* C2987 (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, EUA) foram adquiridas comercialmente.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DAS SEQUÊNCIAS

Utilizando a aplicação Mambaz (<http://margaux/redmine/projects/mambaz/wiki/Specifications>), expedida a partir do consórcio europeu VENOMICS, a pesquisa baseou-se no padrão de cisteínas característico de α -conotoxinas (CC-X_m-C-X_n-C) no qual X_m representa o número de resíduos de aminoácidos entre a segunda e terceira cisteína e

X_n o número entre a terceira e quarta cisteína. Para uma busca abrangente pelas subfamílias de α -conotoxinas, o X_m e o X_n foram substituídos respectivamente por 1/1, seguido de novas pesquisas 1/2, 1/3 até 1/10; 2/1, 2/2 até 2/10 e assim por diante até 8/10. Os resultados encontrados foram agrupados em subfamílias e a busca por similaridade foi realizada contra outras sequências, já depositadas em bancos de dados abrangentes e específicos para a família Conidae, além de uma verificação em relação às espécies de origem dessas sequências. Foram investigadas informações gerais sobre cada espécie e respectivas sequências já depositadas, independente do alvo farmacológico. Para tanto foram utilizadas as ferramentas: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta/>, <http://www.conoserver.org/>, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> e <http://www.ebi.ac.uk/ebisearch/overview.ebi>.

As sequências foram pré-selecionadas com base em sua originalidade intrinsecamente relacionada à espécie, subfamília de conopeptídeos e baixa similaridade frente às sequências depositadas em bancos de dados. Todas as sequências pré-selecionadas foram reinseridas na aplicação Mambaz para verificação das redundâncias e de possíveis fragmentos críticos contidos em sequências maiores, de espécies diferentes ou não.

Por fim, com o auxílio da ferramenta ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>), as sequências selecionadas foram identificadas quanto aos seus parâmetros físico-químicos como peso molecular, pI teórico, composição de aminoácidos, composição atômica, coeficiente de extinção molar, meia-vida estimada, índice de instabilidade, índice alifático e hidrofobicidade.

4.2.2 SÍNTESE QUÍMICA

As sínteses químicas em fase sólida foram realizadas de acordo com a metodologia proposta por (Merrifield, 1963) em sintetizador automático Prelude Protein Technologies (Gyros Protein Technologies, Uppsala, Suécia).

Foi empregada como suporte sólido a resina ChemMatrix® Rink Amide, para os peptídeos amidados, e Wang - LL (baixa carga) funcionalizada com o último aminoácido (C-terminal), para os peptídeos não amidados. Deu-se sequência ao método assim como já descrita no item 4.12 do Capítulo 1 deste manuscrito.

4.2.2.1 *Folding* e caracterização

Após cuidadosa padronização, os peptídeos sintéticos purificados foram divididos em três grupos e submetidos a diferentes condições em uma concentração de 0,1 mg/mL do peptídeo e incubados à temperatura ambiente por 24-48 h.

O grupo azul, correspondente às sequências curtas e que não apresentam resíduos de metionina, foi incubado em solução 0,1 M de bicarbonato de amônia (NH_4HCO_3) e 20% de dimetilsulfóxido (DMSO); enquanto o grupo laranja, correspondente à todas as sequências que apresentam resíduos de metionina, foi incubado na presença de 0,1 M de NH_4HCO_3 , 1 mM de glutatona em sua forma reduzida (GSH) e 0,5 mM em sua forma oxidada (GSSG). As sequências longas e que não continham resíduos de metionina, foram reunidas no grupo verde e incubadas em solução 0,1 M de NH_4HCO_3 , 20% DMSO, 1 mM de GSH e 0,5 mM GSSG.

Após a acidificação com 20% TFA e total degasificação em sonicador, a purificação dos peptídeos “*refolded*” foi realizada por HPLC, RPC, coluna X-Bridge™ BHE C18-300-5 semi-preparativa (Waters, EUA) (250 x 10 mm), 0,1% TFA/ H_2O Mili-Q® v/v (solução A) e 0,1% TFA/ACN v/v (solução B) gradiente segmentado (0 a 50% de B; 0,3% de B/min.; fluxo de 4 mL/min.). A verificação da pureza foi realizada por cromatografia analítica, RPC, coluna X-Bridge™ peptide BHE C18 (Waters, EUA) (250 x 4,6 mm), 0,1% TFA/ H_2O Mili-Q® v/v (solução A) e 0,1% TFA/ACN v/v (solução B) gradiente segmentado (0 a 60% de B; 1% de B/min.; fluxo de 1 mL/min) e por espectrometria de massas utilizando ESI-MS (Bruker, Billerica, Massachusetts, EUA).

4.2.3 QUANTIFICAÇÃO DO CONTEÚDO PROTEICO

A estimativa da concentração proteica procedeu-se como já descrito no item 4.6 do Capítulo 1 desta tese.

Para os peptídeos que não continham aminoácidos aromáticos a concentração foi estimada pela composição de aminoácidos a qual consiste de uma hidrólise ácida total seguida da separação e dosagem dos aminoácidos, comparada aos padrões, por técnicas cromatográficas (White *et al.*, 1986). A amostra foi liofilizada e colocada em tubos de vidro adaptados ao sistema PicoTag (Waters Associates, Milford, MA) e depois hidrolisada em fase gasosa de HCl 6N na presença de fenol cristalizado durante 17 h a 110 °C. A amostra hidrolisada foi então dissolvida em 100 μl de H_2O Mili-Q® (contendo pelo menos 200 pmol de cada aminoácido) e depois analisada e quantificada através de derivatização de ninhidrina utilizando um analisador de aminoácidos TAC JLC-500 / V (JEOL, Tóquio, Japão). A calibração com soluções de aminoácidos padrão foi realizada no início de cada ensaio.

4.2.4 EXPRESSÃO DE NACHR EM CÉLULAS DE RIM EMBRIONÁRIO HUMANO (HEK)

Todo o processo de construção das membranas contendo as diferentes configurações para os receptores nicotínicos neuronais foi realizado de acordo com a metodologia já descrita (Eisele *et al.*, 1993; Servent *et al.*, 1997). Os cDNAs foram inseridos no vetor de expressão para mamíferos pcDNATM3.1(+) utilizando Hind III e EcoR I como enzimas de restrição.

4.2.4.1 Bactéria e condições de cultivo

A cepa quimio-competente de *E. coli* (C2987) NEB® 5-alpha para transformação de alta eficiência (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, EUA) foi crescida em meio LB com adição de ampicilina (100 µg/mL), a 37 °C, como preconizado pelo fabricante.

4.2.4.2 Transformação bacteriana

O plasmídeo (100 pg de pcDNA3.1+) foi adicionado às células de *E. coli* e submetidos à choque térmico, alterando rapidamente a temperatura de 0 para 42 °C. O meio Socle foi adicionado e as células foram pré-incubadas por 90 min a 37 °C e em seguida transferidas para garrafas contendo meio LB com adição de ampicilina (100 µg/mL), onde permaneceram sob agitação por 24 h a 37 °C.

4.2.4.3 Purificação do DNA plasmidial

O DNA plasmidial de cada subunidade dos receptores nicotínicos neuronais foi purificado por uma coluna de troca aniônica utilizando o kit NucleoBond® Xtra Maxi (MACHEREY-NAGEL, Bethlehem, Pensilvânia, EUA) e seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, as bactérias foram centrifugadas e o precipitado foi resuspendido e lisado. A solução neutralizada foi eluída em coluna previamente equilibrada e o DNA foi então precipitado em isopropanol seguido de centrifugação e lavagem em etanol. Após secagem, o pellet foi solubilizado em 5 mM Tris-HCl pH 8,5 e quantificado por espectrofotometria (260 nm / 280 nm) em placa para pequenos volumes LVis, espectrofotômetro CLARIOstar ambos da BMG LABTECH (Waltham, Massachusetts, EUA).

4.2.4.4 Transfecção em células tsA-201

Células de rim embrionário humano, tsA-201, foram crescidas em condições padrão (37 °C, atmosfera de 5% de CO₂) em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) com alta concentração de glicose e GlutaMax™, suplementado com 10% de F-12, 10% de soro fetal bovino, 100 unid/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina e 0,25 µg/mL afotericina B. Todos os reagentes foram adquiridos da Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, EUA).

Os cDNA que codificam as subunidades $\alpha 3$, $\alpha 4$ e $\beta 2$, $\beta 4$ humanas e a quimera $\alpha 7$ -5HT₃ foram transfectados de forma transitória em células tsA-201 por precipitação com fosfato de cálcio, utilizando 1,75 µg da subunidade α e 5,25 µg de cDNAs da β (relação 1:3 p/p) ou 15 µg de cDNA $\alpha 7$ -5-HT3 para cada 10⁷ células por placa de petri, como descrito por Servent e colaboradores (1997).

Células em garrafas com 90% de confluência foram desprendidas, individualizadas (tampão Versen, composto por PBS + 5 mM EDTA) e plaqueadas em meio de cultura, um dia antes da transfecção. A solução de precipitação - composta de 450 µL água, 500 µL BBS 2X, 50 µL CaCl₂ e as devidas proporções de cada subunidade do receptor nicotínico (como descrito na **Tabela 11**) - foi gotejada nas placas, contendo meio de cultura sem soro fetal bovino, seguido de incubação a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Após 24 h o meio foi trocado e as células transfectadas com $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$ e $\alpha 4\beta 2$ foram incubadas por mais 24 h a 30 °C enquanto as transfectadas com $\alpha 7$ foram incubadas a 37 °C.

Tabela 11 Proporção de DNA utilizado para transfecção dos diferentes subtipos de receptores nicotínicos neuronais em células de rim embrionário humano (tsA-201)

Receptores	Concentração de DNA (µg/subunidade/placa)				
	$\alpha 3$	$\alpha 4$	$\alpha 7$	$\beta 2$	$\beta 4$
$\alpha 3\beta 2$	1,75			5,25	
$\alpha 3\beta 4$	1,75				5,25
$\alpha 4\beta 2$		1,75		5,25	
$\alpha 7$			15		

4.2.4.5 Recuperação das células

Ao final da transfecção as células foram desprendidas da placa com ajuda do tampão Versen e tração mecânica. As placas foram lavadas com PBS, e as células em suspensão coletadas e centrifugadas a 1200 g por 3 min, a 4 °C. Esse processo foi repetido por quatro vezes. O pellet foi resuspenso em

PBS / BSA 0,1% (1 mL/placa) e alíquotas de 600 μ L foram congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -20 °C.

4.2.5 PREPARAÇÃO DE MEMBRANAS TORPEDO

Os estoques de membranas utilizados foram preparados assim como já descrito no item 4.7.2 do Capítulo 1 desta tese.

4.2.6 BINDING: ENSAIOS DE COMPETIÇÃO UTILIZANDO TRAÇADORES RADIOATIVOS

Ensaio de competição no equilíbrio, foram realizados utilizando traçadores radioativos em membranas celulares dos eletrócitos, células tsA-201 ou células CHO expressando os receptores de interesse. O radioligante foi utilizado em uma concentração próxima ao K_d e as preparações de membranas em uma concentração ótima, determinada previamente para cada lote e teste de ligação específico.

4.2.6.1 Ensaio de competição em membranas expressando receptores nicotínicos neuronais: $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$ e $\alpha 7$ -5HT₃

Para as membranas preparadas a partir de células tsA-201 expressando os subtipos de receptores nicotínicos $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$, foi utilizado o radioligante [3H]-epibatidina enquanto para $\alpha 7$ -5HT₃, foi utilizado o radioligante iodado 125I-Tyr54- α -bungarotoxina (125I-Tyr54- α -BgTx).

Ensaio de competição, utilizando trítio como traçador radioativo, em placa 96 poços, foram preparados utilizando 0,7-1 μ g ($\alpha 3\beta 4$ e $\alpha 4\beta 2$), 3-5 μ g ($\alpha 3\beta 2$), 7 μ g ($\alpha 7$ -5HT₃) de membrana e 1,7 nM [3H]-epibatidina em 100 μ L de solução de reação, conduzidos à temperatura ambiente e em tampão 10 mM fosfato de sódio, 135 mM NaCl, 2,5 mM KCl pH 7,4, 0,1% PBS-BSA, pH 7,6. BT foi mensurada na presença de [3H]-epibatidina (1,7 nM) enquanto NS foi mensurada na presença do traçador radioativo e excesso de epibatidina não marcada (500 nM). Os testes iniciais foram realizados com os peptídeos a 10 μ M e aqueles que apresentaram alguma atividade foram submetidos à uma curva concentração-resposta (50 μ M - 0,8 nM). A curva concentração-resposta de epibatidina (controle positivo) corresponde a epibatidina (1 μ M - 15 pM) na presença do traçador radioativo. A conotoxina M2 (1 μ M - 15 pM) também foi utilizada como controle positivo.

Para os ensaios com $\alpha 7$ -5HT₃, foi utilizado um radioligante a partir de iodo, 125I-Tyr54- α -BgTx na concentração de 1 nM e o ligante não marcado metil-caconitina (MLA) a 1 μ M. A curva concentração-resposta de MLA (controle positivo) corresponde à MLA (1 μ M - 1 pM) na presença 125I-Tyr54- α -BgTx (1 nM). Todos os outros procedimentos e condições foram os mesmos utilizados para o trítio. Após 3h (tempo para atingir o equilíbrio), a incubação foi encerrada por filtração com PBS (1x) a 4 °C, em sistema Cell Harvesters (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, EUA), em microplaca UniFilter-96 GF/B (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, EUA) saturada previamente com 0,5% PEI.

4.2.6.2 Ensaios de competição em membranas expressando receptor nicotínico muscular: Torpedo - 2 α 1 β 1 δ γ

O método foi desenvolvido conforme descrito no item 4.8.2 do Capítulo 1 desta tese.

4.2.6.3 Ensaios de competição em membranas expressando receptor muscarínico (m AChR M1)

O método foi desenvolvido conforme descrito no item 4.8.1 do Capítulo 1 desta tese.

4.2.6.4 Quantificação do traçador radioativo e análise dos dados

O método foi desenvolvido conforme descrito no item 4.8.3 do Capítulo 1 desta tese.

4.2.7 BINDING: ENSAIOS DE COMPETIÇÃO UTILIZANDO SONDAS FLUORESCENTES

O Tag-lite® (Cisbio) é uma plataforma celular não radioativa que permite a investigação da ligação de moléculas pequenas ou ligação de anticorpos aos receptores de superfície celular. Ela combina as tecnologias HTRF® com SNAP-tag®, ambas da Cisbio.

4.2.7.1 Tecnologia HTRF®

Homogeneous Time Resolved Fluorescence (HTRF®) combina Transferência de Energia de Ressonância de Förster, também chamada de *Fluorescence Resonance Energy Transfer Technology* (FRET) com *Time resolved Measurement* (TR) (**Figura 5**). A técnica, baseada na transferência de

energia entre dois fluoróforo - doador e acceptor - é constituída de tal forma que o comprimento de onda de emissão do doador corresponde ao de excitação do acceptor. Dessa forma é possível estudar a interação entre duas moléculas próximas, cada uma associada a um dos fluoróforo (Degorce *et al.*, 2009).

4.2.7.2 Tecnologia SNAP-tag®

SNAP é uma pequena etiqueta de fusão expressa de forma combinada à proteína de superfície celular de interesse (GPCR). As células são marcadas com o substrato específico conjugado ao fluoróforo HTRF® Lumi4®-Terbium o qual interage de forma covalente resultando na SNAP-tag®. Após incubação com agonista / antagonista conjugado a um outro fluoróforo, cujo comprimento de onda de excitação corresponde ao de emissão do acceptor Lumi4®-Tb, ensaios de competição com a molécula teste podem ser realizados (**Figura 37**).

I - Plasmídeo codificador do receptor de interesse fundido a SNAP

O plasmídeo pSNAP-M1 Tag-lite® (referenciado pelo NCBI como NM_000738.2) foi adquirido comercialmente da Cisbio e detalhes da construção podem ser encontrados no site da empresa. Ele codifica a marcação SNAP fundida ao receptor muscarínicos humano M1 (hAChRm1) diretamente a jusante de um promotor CMV (promotor de citomegalovírus com alta expressão constitutiva). SNAP-tag® foi expressa na extremidade N-terminal do receptor.

O plasmídeo que codifica a marcação SNAP fundida ao receptor humano adrenérgico $\alpha 1$ foi construído e expresso transientemente em células HEK-293 as quais nos foram gentilmente cedidas pelo Dr. Philippe Robin.

II - Transfecção e expressão dos receptores-SNAP

Células HEK-293, utilizadas para transfecção transiente, foram crescidas e manipuladas segundo indicações do fabricante (Cisbio). As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com penicilina / estreptomicina, 2 mM HEPES e MEM 1X, a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂. Todos os reagentes foram adquiridos da Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, EUA).

Garrafas com 70-80% de confluência foram incubadas com o mix de transfecção (Opti-MEM™ suplementado com GlutaMAX, phenol red, lipofectamina e plasmídeo) nas proporções descritas pelo fabricante, por 20 min a 37 °C. As células foram lavadas e novamente incubadas com o mix de transfecção diluído em meio de cultura, por 24 h a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂.

III - Marcação dos receptores-SNAP com Lumi4-Terbium (-tag®)

Células HEK-293, expressando transientemente o AChR hM1-SNAP ou o receptor adrenérgico $\alpha 1$ -SNAP, foram marcadas com substrato específico conjugado a um fluoróforo HTRF® resultando na Tag-lite® SNAP-lumi4®-Tb. O processo foi realizado de acordo com o protocolo e reagentes indicados pelo fabricante (Cisbio).

As garrafas com 75% de confluência tiveram seu meio de cultura removido e substituído pela solução de marcação (100 nM Tag-lite® SNAP®-Lumi4®-Tb diluído em tampão Tag-lite®) como preconizado pelo fabricante, e incubadas por 1 h a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Para remoção da tag® Lumi4-Tb livre, as células foram gentilmente lavadas com tampão Tag-lite® por quatro vezes e dissociadas por métodos não enzimáticos seguido de centrifugação a 1200 g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet solubilizado em tampão Tag-lite®. O número de células foi estimado e diferentes concentrações plaqueadas. A placa 384 poços foi levada ao leitor de placas CLARIOstar (BMG LABTECH, Waltham, Massachusetts, EUA) e a absorbância foi lida a 620 nm. Como controle negativo foram utilizadas células HEK-293-SNAP não marcadas com lumi4®-tb.

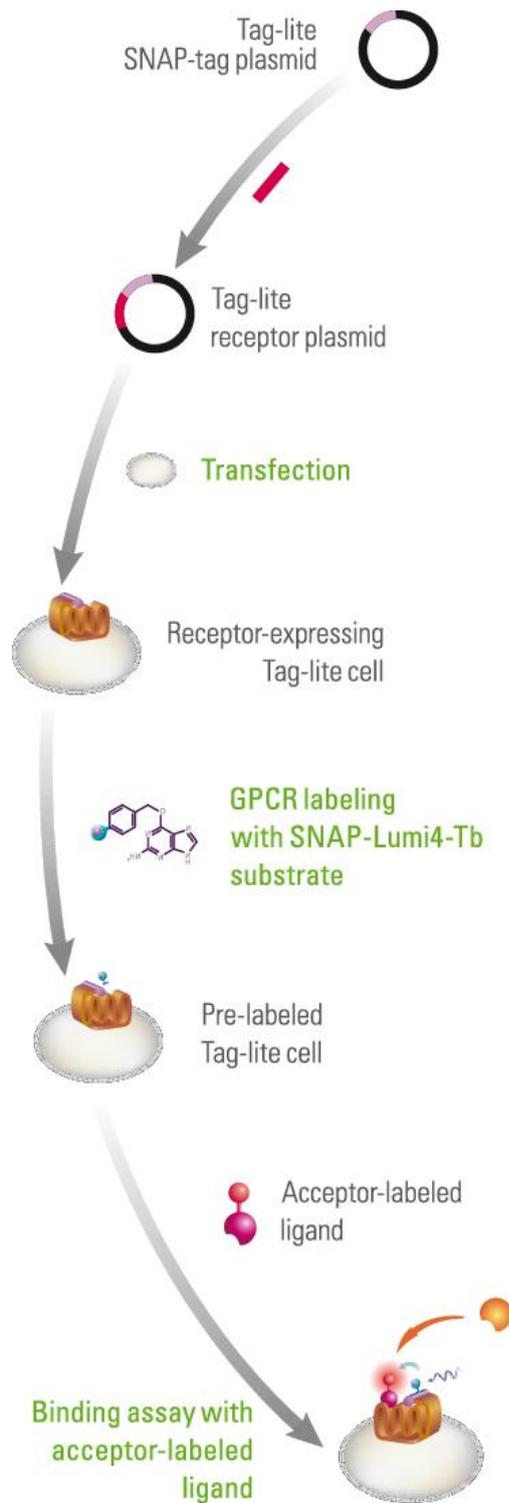


Figura 37 Fluxo de trabalho da plataforma Tag-lite® (Cisbio) para construção do receptor-SNAP-lumi4®-Tb e ensaios de competição com sondas fluorescentes

Tem-se a construção do plasmídeo que codifica a proteína de superfície celular de interesse fundida com uma etiqueta SNAP. As células transfectadas expressam a proteína de superfície celular marcada, que interage covalentemente com substratos específicos conjugados ao fluoróforo HTRF®. Após realização

de ensaios de ligação biomolecular com um ligante específico marcado com fluoróforo, as células são incubadas com a molécula teste para avaliação da competição. Esse parâmetro é mensurado pelo sinal gerado através da transferência de energia de ressonância fluorescente entre o doador e uma molécula aceptora. (Fonte: <<http://www.cisbio.com/usa/drug-discovery/tag-lite-technology>>, acesso em 16 de agosto de 2017)

4.2.7.3 Ensaios de competição em membranas expressando receptores muscarínicos hM1-SNAP-tag® e adrenérgicos α 1-SNAP-tag®, conjugados com o fluoróforo HTRF correspondente

Células HEK-293-SNAP-tag-lumi4®-Tb, foram preparadas em tampão Tag-lite® (Cisbio Bioassays, Codolet, França) plaqueadas em uma densidade de 20.000 células / poço em microplaca 384 poços (Greiner-Bio) em 20 μ L de solução de reação. As células foram tratadas com 10 μ M de peptídeo e 25 nM de telenzepina D2 Tag-lite®, L0040RED (Cisbio Bioassays, Codolet, França), ou 25 nM de BODIPY® FL prazosin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) respectivamente, antagonista muscarínicos e antagonista adrenérgico α 1 conjugados a fluoróforo HTRF® correspondente. Para o controle negativo foi incubado apenas células e tampão enquanto que para o controle positivo foi adicionado os respectivos antagonistas convencionais.

A placa foi incubada à temperatura ambiente e protegida da luz, por 30 min. Todos os pontos foram realizados em triplicatas. A placa foi levada ao leitor de placas CLARIOstar (BMG LABTECH, Waltham, Massachusetts, EUA) e a relação 665 nm / 620 nm (para hAChRm1-tag-lumi4®-Tb) ou 520 nm / 620 nm (para adrenérgico α 1-tag-lumi4®-Tb) foi determinada e normalizada como indicado pelo fabricante.

4.2.8 REGISTRO DA FORÇA CONTRÁTIL DE PREPARAÇÕES NEUROMUSCULARES DE RATAS

4.2.8.1 Eutanásia e dissecação

Ratas anestesiadas com isoflurano foram eutanasiadas por deslocamento cervical e imediatamente exsanguinadas pela secção dos vasos cervicais sendo em seguida submetidos a uma incisão abdominal na qual o externo foi exposto. A caixa torácica foi removida, imersa em placa contendo solução Krebs-Ringer (154 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, 11 mM D-glucose, pH 7,4 ajustado com NaOH) continuamente perfundida com O₂, e o diafragma, através do hiato esofágico, foi segmentado em dois.

4.2.8.2 Registro da força contrátil

O hemidiafragma de ratas foi depositado em uma cuba contendo 4 mL de solução Krebs-Ringer continuamente perfundida com O_2 . A preparação foi fixada por pequenas agulhas ao fundo da cuba de experimentação e para medida da tensão mecânica ela foi conectada por um fio de sutura à um transdutor de força isométrico FT03 (Grass Instruments, West Warwick, EUA). O nervo frênico foi fixado ao eletrodo de estimulação, e conectado à unidade de isolamento de um estimulador (Grass Instruments, modelo S-44), por uma pipeta de sucção, a qual permite a estimulação indireta do músculo através de seu nervo motor (**Figura 38**).

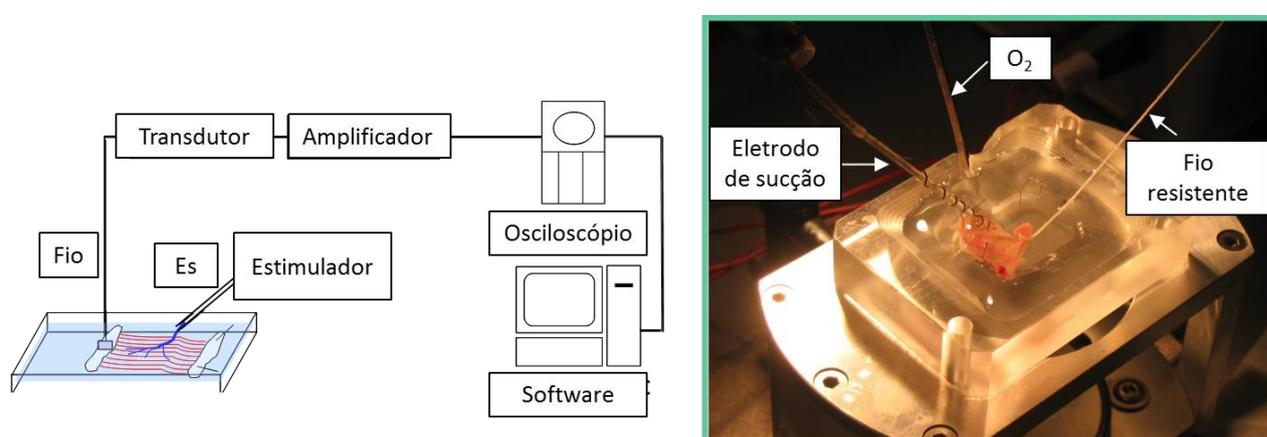


Figura 38 Ilustração do sistema utilizado para registrar a contração do músculo

Es: eletrodo de sucção utilizado na estimulação do nervo (em azul) que enerva as fibras musculares (em vermelho). Na foto vê-se a cuba com a preparação de hemidiafragma. Fonte: imagens cedidas pela Dra. Muriel Amar, Laboratoire de Toxinologie Moléculaire et Biotechnologies.

Após período de estabilização e verificação da viabilidade da preparação, foi retirado 1 mL de solução da cuba e imediatamente substituído por igual volume de peptídeo ($[]_f = 1 \mu M$) diluído em solução Krebs-Ringer seguido de 15 min de incubação. O peptídeo foi adicionado novamente, concentração cumulativa ($[]_f = 2 \mu M$). Após 15 min de registro a preparação foi lavada e a solução completamente substituída. O período de 30 min foi estabelecido para reestabilização e retomada da tensão de repouso, seguido do teste de uma segunda conotoxina, sendo o hemidiafragma substituído quando após esse tempo a tensão de repouso não fosse alcançada.

Para as amostras P014704, P014710, P020581 foram realizadas uma única incubação a $10 \mu M$ e para P021839, $5 \mu M$.

O protocolo utilizado para obter uma resposta contrátil simples consistiu da estimulação elétrica retangular ao nervo frênico de 6 V de intensidade e 150 μ s de duração a uma frequência de 0,1 Hz. A estimulação elétrica resultou na contração muscular que por sua vez promoveu a tensão do fio. O sinal propagado pelo transdutor de força isométrica, foi amplificado, coletado e digitalizado com o auxílio de um computador equipado com uma placa de interface Digidata-1322A A / D (Axon Instrumentos, Union City, Califórnia). A aquisição e análise dos dados foram executados com o programa WinWCP V3.9.6, gentilmente fornecido pelo Dr. John Dempster (Universidade de Strathclyde, Escócia). Os experimentos foram realizados a 20-22 °C. O sinal, que corresponde à força contrátil do músculo, foi expresso em unidades de força (Newtons).

4.2.9 EFEITO NA CORRENTE RESIDUAL DE ACETILCOLINA DE NACHR TORPEDO MICROTRANSPLANTADOS EM OVÓCITOS DE *XENOPUS*

4.2.9.1 Extração de ovócitos de *Xenopus*

As fêmeas de *Xenopus laevis* foram anestesiadas por imersão em banho de metanossulfato de etil-3-aminobenzoato (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) a 0,1% durante cerca de 20 min. Em seguida, uma incisão foi realizada na área ilíaca e os aglomerados de ovócitos recuperados em meio livre de cálcio contendo: 88 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1 mM MgCl₂ e 5 mM HEPES, pH 7,6 e 1 mg/mL de colagenase tipo II (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). Após 10 min de incubação a 22 °C com agitação constante, os lóbulos ovarianos foram extensamente lavados com solução de OR2 seguida de solução de Barth (concentração em mM: 88 NaCl, 1 KCl, 0,41 CaCl₂, 0,82 MgSO₄, 2,5 NaHCO₃, 0,33 CaNO₃, 7,5 HEPES, pH 7,6). Os ovócitos foram cultivados em placas de Petri contendo 10 mL de Barth suplementado com canamicina 0,1 mg/mL (Araoz *et al.*, 2015).

A desfoliculação foi realizada pela remoção da membrana da gema, células foliculares e teca. Este passo é essencial para estudar as propriedades eletrofisiológicas dos nAChRs expressas no ovócito de *X. laevis*.

4.2.9.2 Microtransplantação dos nAChR Torpedo em ovócitos de *Xenopus*

Os ovócitos no estágios V-VI foram manualmente desfoliculados e a microtransplantação dos nAChR Torpedo (Miledi *et al.*, 2006) consistiu em uma microinjeção da suspensão de membrana (50 nl em uma concentração de 3,5 mg/ml de mRNA) no citoplasma de ovócito, utilizando um controlador Nanoliter2010 Micro4 montado em um microscópio. Os ovócitos foram mantidos a 18 °C e os registros eletrofisiológicos realizados 1-3 dias depois.

4.2.9.3 Registros eletrofisiológicos

As correntes evocadas por ACh foram registradas com uma tensão padrão, dois microeletrodos e um pequeno amplificador digital TEVC integrado ao HiClamp® (Multichannelsystems, Alemanha), permitindo impor o potencial desejado (-60 mV). O aparelho compreende duas plataformas para microplacas de 96 poços: a primeira microplaca contém os ovócitos de *X. laevis* com o nAChR Torpedo, incorporado na membrana. A segunda microplaca contém ACh e as moléculas a serem testadas. Um ovócito é coletado de um dos poços da placa de ovócitos e depositado em uma pequena cesta de prata que inclui o eletrodo de referência e que serve para transferir o ovócito para a estação de lavagem, a microplaca teste ou microplaca de ovócitos. A cesta, uma vez carregada com um ovócito, é colocada na estação de lavagem. O ovócito é empalado por dois eletrodos preenchidos com KCl 3M e em seguida transferido para a placa teste na qual é executado um protocolo de perfusão pré-determinado. Ao final, o ovócito retorna à estação de lavagem sendo em seguida descartado no seu poço de origem.

Os registros foram realizados em 200 µL/poço de solução Ringer modificada contendo 100 mM NaCl, 2,8 mM KCl, 0,3 mM BaCl₂ e 5 mM HEPES pH 7,4, em que a substituição de CaCl₂ por BaCl₂ previne a ativação secundária de correntes de Cl⁻ dependentes de Ca²⁺ (Sands *et al.*, 1993). Os ovócitos foram perfundidos com ACh e com as conotoxinas. O perfil de perfusão foi o seguinte: um ovócito foi perfundido 3x com ACh (100 µM) por 15 s com um intervalo de 3 min entre as aplicações sucessivas de ACh para garantir a recuperação da dessensibilização do receptor. Após 3 min de lavagem, o mesmo ovócito foi perfundido durante 45 s com uma dada concentração da conotoxina seguido imediatamente pela perfusão de uma mistura de ACh contendo a mesma concentração da amostra, por 15 s. O procedimento se repetiu, com mesmo ovócito, para uma segunda concentração. Vários ovócitos foram utilizados para obter as curvas concentração-resposta.

Os dados foram adquiridos pelo Software HiClamp e as curvas de inibição de concentração foram analisadas como anteriormente detalhadas (Bourne *et al.*, 2010).

5 RESULTADOS

5.1 Seleção das sequências de conotoxinas

Na busca por peptídeos, com padrão de cisteínas característico das α -conotoxinas (CC-C-C), utilizando a aplicação Mambaz - desenvolvida pelo *Seventh Framework Program* (FP7 HEALTH) do consórcio VENOMICS - encontramos 4.832 sequências diferentes e duplamente confirmadas (proteoma e transcriptoma da glândula de veneno), as quais foram organizadas em subfamílias de acordo com o número de resíduos intercisteínas - entre a segunda-terceira (X_m) e terceira-quarta (X_n) cisteína. Cada resultado foi analisado e após a primeira triagem, um total de 580 sequências e 22 padrões de cisteínas diferentes foram selecionados e investigados quanto a espécie (todas as informações já publicadas) e a homologia de sequência (contra bancos de dados proteômicos). Com auxílio do Conoserver e da própria Mambaz as sequências redundantes foram eliminadas e as sequências mais originais e subfamílias menos caracterizadas, ou seja, com alto grau de inovação, foram selecionadas. Ao final foram escolhidas 18 sequências (**Tabela 12**) que compreendem 16 potenciais subfamílias de α -conotoxinas de 8 espécies diferentes, sendo 14 do gênero *Conus* (apesar disso, neste trabalho, utilizaremos o termo conotoxinas para nos referir a todas as sequências que foram selecionadas a partir de um padrão de cisteínas, clássico do gênero *Conus*). Das sequências selecionadas 9 apresentam entre 11-15 resíduos de aminoácidos, 7, entre 16-20 e apenas 2 contém mais de 20, sendo 23 o número de resíduos de aminoácidos correspondente a sequência mais longa. As sequências são relativamente pequenas e 89% apresentam massa menor que 2.000 Da. Quanto as modificações pós-traducionais, entre as 18 sequências, 7 são amidadas.

Tabela 12 Sequências com padrão de cisteínas característico das α -conotoxinas (CC-C-C) selecionadas à partir da plataforma Mambaz

Referência	Classificação	Espécie	Sequência	Número de resíduos	Padrão de cisteínas	Amidadas	Massa média	
							Linear	Enovelada
P010378*	tx4/7	<i>Conus arenatus</i>	MHPLHCCHIPPCWKLHKDHCRKV	23	CC-C-C	*	2834,487	2830,4554
P010389	tx3/2	<i>Conus miliaris</i>	CCGWPCIPCHD	11	CC-C-C		1233,4828	1229,4512
P010404	tx4/3	<i>Conus miliaris</i>	GRARCCYELLCRYTCS	16	CC-C-C		1897,2582	1893,2266
P010405*	tx3/1	<i>Conus miliaris</i>	DECCTDPCVCI	11	CC-C-C	*	1199,4163	1195,3847
P010416*	tx3/2	<i>Conus miliaris</i>	ETGCCFPYCYPCG	13	CC-C-C	*	1441,6963	1437,6647
P010454*	tx4/4	<i>Conus miliaris</i>	EGCCSIPLCWGENC	14	CC-C-C	*	1512,7758	1508,7442
P014694	tx3/4	<i>Conus litoglyphus</i>	CCSDNCYKGVCLA	13	CC-C-C		1378,6386	1374,607
P014696*	tx5/4	<i>Conus miliaris</i>	CCNVAMTCVHSYC	13	CC-C-C	*	1432,7567	1428,7251
P014697*	tx2/7	<i>Conus miliaris</i>	CCNVCVPSAMGKCA	14	CC-C-C	*	1384,7561	1380,7245
P014698	tx2/3	<i>Conus canonicus</i>	KCCWPCTGACKYDMA	15	CC-C-C		1680,0511	1676,0195
P014699*	tx3/7	<i>Conus canonicus</i>	CCSWDVCDHDGSDSCS	16	CC-C-C	*	1745,8264	1741,7948
P014700	tx4/5	<i>Conus canonicus</i>	CCSWDHDCVDGDTCGM	16	CC-C-C		1746,9222	1742,8906
P014704	tx5/5	<i>Conus canonicus</i>	CCSWDHDCVSDGECGM	16	CC-C-C		1746,9222	1742,8906
P014710	tx2/8	<i>Conus litoglyphus</i>	QCCYQCPPGFKGKFCQFKLRPP	22	CC-C-C		2576,1335	2572,1019
P020581	tx4/2	<i>Lasiadora parahybana</i>	YKQACCGFKMVCPLPA	18	CC-C-C		1919,4123	1915,3807
P021812	tx2/3	<i>Phoneutria pertyi</i>	CCEFCNFGLENNL	14	CC-C-C		1608,8617	1604,8301
P021839	tx4/6	<i>Phoneutria pertyi</i>	RGCCSIPFCSAVNYYCG	17	CC-C-C		1843,1629	1839,1313
P024936	tx5/3	<i>Wunderpus photogenicus</i>	DRPGCCFIDIFCSTSC	16	CC-C-C		1767,062	1763,0304

5.2 Síntese química das sequências de conotoxinas selecionadas

As sequências foram organizadas em três grupos, em função do número de resíduos de aminoácidos, e sintetizadas quimicamente, seguido das etapas de desproteção, purificação e *fold*ing.

P024936 apresentou problemas na síntese, os quais foram identificados por cromatografia após a clivagem da resina e desproteção das cadeias laterais. Para todas as outras sequências a síntese foi bem sucedida, com rendimento variando de 3 a 30 mg.

A etapa de *fold*ing foi inicialmente realizada como já estabelecido no laboratório - solução de Tris-HCl, EDTA, ACN e a dupla oxi-redutora GSH/GSSG. Diferentemente do esperado, para mais de 80% das amostras as sequências não se estruturaram estavelmente. Uma revisão bibliográfica foi realizada com enfoque para sequências atípicas e novas estratégias foram propostas. Para o segundo ensaio de *fold*ing as 17 amostras foram separadas em três grupos: 1) azul; pequenas sequências sem resíduos de metionina; 2) laranja, sequências com resíduos de metionina e 3) verde, sequências longas. A sequência P021812 precipitou em solução e foi desconsiderada para análises posteriores. Das 16 amostras restantes, 7 apresentaram três picos bem distintos os quais continham mesma massa, 3 apresentaram dois picos relativamente de mesma intensidade e outras 6 apresentaram apenas um pico majoritário nas cromatografias de purificação após o *fold*ing. No **Anexo 2** é possível identificar esses detalhes e as respectivas proporções de cada pico (importante ressaltar que não identificamos a qual isoforma cada pico corresponde, e que as proporções foram estabelecidas macroscopicamente e atribuídas de acordo com a eluição). Cada sequência e seus respectivos espectros foi analisada individualmente e os picos selecionados para quantificação e testes.

Para as amostras P010378*, P014696* e P020581 foram selecionados dois picos para os testes posteriores, enquanto para as outras 13, apenas um pico foi selecionado; isso porque várias α -cotoxinas apresentam, em equilíbrio, no mínimo 2 dos 3 isômeros possíveis. Dessa forma, para algumas amostras foram testadas as formas *globular* e *ribbon*, descritas como as mais abundantes.

No entanto entre as 16 sequências, 2 não apresentam resíduos de aminoácidos aromáticos e suas quantificações proteicas serão realizadas futuramente através da análise da composição de aminoácidos. Portanto, 17 amostras - correspondendo a 14 sequências diferentes - foram submetidas aos testes farmacológicos (**Tabela 13**).

Tabela 13 Conotoxinas submetidas aos testes farmacológicos

Referência		Classificação	Sequência	Massa
P010378*	A	tx4/7	MHPLHCCHIPPCWKLHKDHCRKV	2830,5
	B			
P010389		tx3/2	CCGWPCIPCHD	1229,5
P010404		tx4/3	GRARCCYELLCRYTCS	1893,2
P010416*		tx3/2	ETGCCFPYCPCG	1437,7
P010454*		tx4/4	EGCCSIPLCWGENC	1508,7
P014694		tx3/4	CCSDNCYKGVCLA	1374,6
P014696*	A	tx5/4	CCNVAMTCVHSYC	1428,7
	B			
P014698		tx2/3	KCCWPCTGACKYDMA	1676,0
P014699*		tx3/7	CCSWDVCDHDGSDCS	1741,8
P014700		tx4/5	CCSWDHDCVDGDTCGM	1742,9
P014704		tx5/5	CCSWDHDCVSDGECGM	1742,9
P014710		tx2/8	QCCYQCPPGFKGKFCQFKLRPP	2572,1
P020581	A	tx4/2	YKQACCGFKMCPGLPA	1915,4
	B			
P021839		tx4/6	RGCCSIPFCSAVNYCG	1839,1

* sinaliza as sequências amidadas

5.3 Atividade farmacológica das conotoxinas

Em paralelo ao contexto bioquímico de síntese, foram preparadas as construções de nAChR neuronais desde os processos de transformação bacteriana, purificação do cDNA, transfecção e recuperação de células. Além de todas as padronizações para os experimentos de *binding*.

A caracterização da atividade dos peptídeos foi realizada através de ensaios fluorimétricos de competição em receptor adrenérgico $\alpha 1$, mAChR hM1, ensaios de *binding* em nAChR neuronais ($\alpha 3\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$ e $\alpha 7$ -5HT₃) e muscular (Torpedo - $2\alpha 1\beta 1\delta\gamma$), em preparações da junção neuromuscular e efeito residual nas correntes de ACh em ovócitos com receptor Torpedo incorporado.

5.3.1 Investigação da possível atividade adrenérgica $\alpha 1$ em ensaios de *binding* utilizando sondas fluorescentes

A atividade adrenérgica foi avaliada por ensaios de competição não radioativa, plataforma Tag-lite®, a qual permitiu a investigação da ligação das conotoxinas ao receptor de interesse conjugado com fluoróforo HTRF®.

Os peptídeos foram testados em concentrações únicas de 10 μ M em células HEK-293 expressando transientemente $\alpha 1$ -tag conjugado ao fluoróforo lumi4®-Tb. O sinal final não foi alterado para nenhuma amostra, ou seja, os peptídeos não competiram com o Bodipy-prazosin® (derivado do antagonista de alta afinidade ao receptor $\alpha 1$) pelo sítio ortostérico do receptor adrenérgico (**Figura 39**).

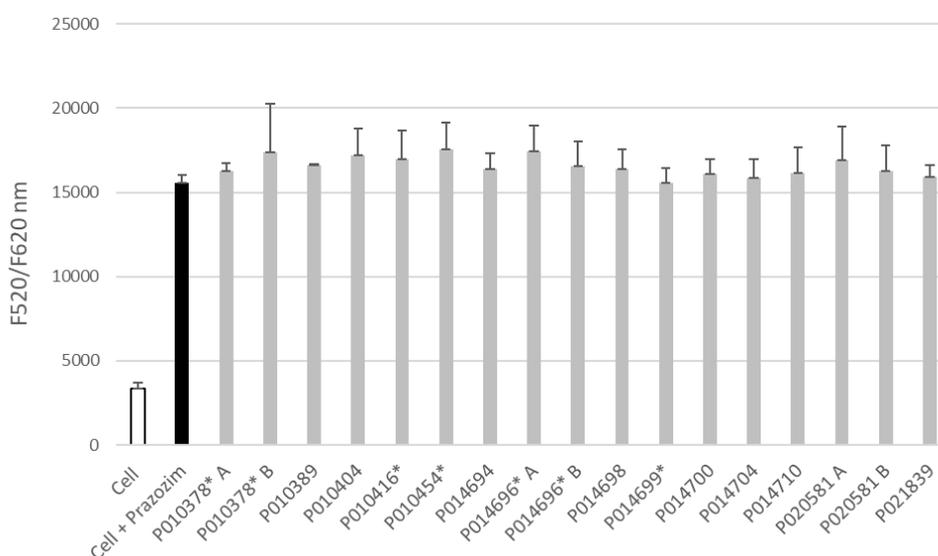


Figura 39 Competição das conotoxinas *versus* o antagonista Bodipy-prazosin® em células HEK-293 expressando receptores adrenérgica $\alpha 1$

O ensaio corresponde a excitação do receptor adrenérgico $\alpha 1$ -tag-lumi4®-Tb à 620, sua emissão à 520 nm e consequente transferência de energia de ressonância fluorescente, para a molécula aceptora, Bodipy-prazosin® (derivado do antagonista de alta afinidade ao receptor $\alpha 1$), resultando em sua excitação. A fluorescência detectada nas células HEK-293 é proporcional à extensão da formação do produto, interação direta entre receptor adrenérgico $\alpha 1$ e Bodipy-prazosin®. A intensidade de fluorescência não foi alterada na presença das conotoxinas, portanto, nenhuma amostra compete pelo mesmo sítio que o Bodipy-prazosin®, no receptor. O controle negativo consistiu da incubação de células e tampão, enquanto que para o controle positivo, foi adicionado apenas o antagonista fluorescente. Os dados normalizados foram expressos em função da fluorescência resultante dos comprimentos de onda de excitação (520 nm / 620 nm). (Triplícatas, n = 2).

5.3.2 Investigação da possível atividade muscarínica M1 em ensaios de *binding* utilizando sondas fluorescentes e radioativas

Para avaliar a atividade muscarínica foram realizados ensaios de competição não radioativa, plataforma Tag-lite® e radioativa, através de *binding*.

A atividade colinérgica M1, avaliada por HTRF® foi realizada em células HEK-293 expressando transientemente hAChRm1-tag conjugado ao fluoróforo lumi4®-Tb. Os ensaios foram realizados com os 17 peptídeos (10 µM) na presença de telenzepina D2 vermelho-fluorescente (derivado do antagonista mAChR M1) e os resultados avaliados em 5 e 30 min (**Figura 40A e B**, respectivamente). Nesse intervalo de 25 min a intensidade de fluorescência triplicou revelando que a interação ainda não tinha atingido o equilíbrio. O isômero P010378* B foi a única conotoxina que reduziu a fluorescência, assim como a atropina, adicionada aos 15 min e utilizada como controle positivo para interação com o receptor. O teste foi repetido para as duas isoformas dessa sequência utilizando os mesmos tempos de análise, 5 (**Figura 40C**) e 30 min (**Figura 40D**) e os resultados corroboraram com os primeiros achados. No entanto ambas as conformações de P010378* a 10 µM, deslocaram completamente a telenzepina D2. Para confirmar essa atividade foi realizada uma cinética de interação na qual avaliou-se ao longo de 30 min se os isômeros reduziam a interação da sonda fluorescente ao receptor por competição do mesmo sítio (**Figura 40E**). Contradizendo os resultados anteriores, nenhuma das duas conformações de P010378* competiu com a telenzepina D2.

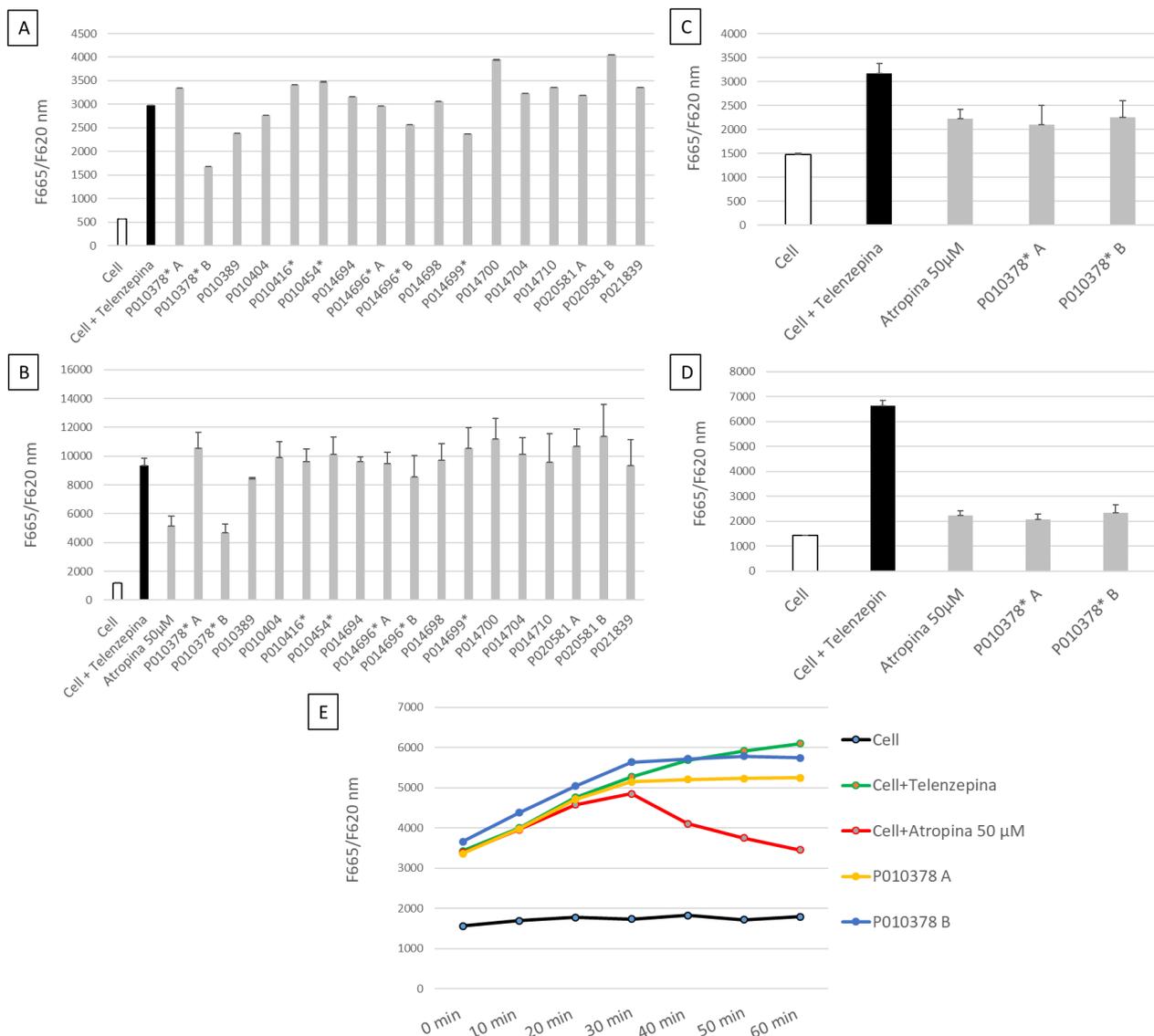


Figura 40 Competição das conotoxinas *versus* o antagonista telenzepina D2 em células HEK-293 expressando receptores muscarínicos M1

Células HEK-293 expressando transientemente hAChRm1-tag conjugado ao fluoróforo lumi4®-Tb foram incubadas com 25 nM de telenzepina D2 Tag-lite® e a interação direta foi avaliada por fluorescência (relação 665 nm / 620 nm) devido a transferência de energia de ressonância fluorescente (princípios da tecnologia HTRF®). **A)** Após 5 min da adição de 10 µM das conotoxinas a intensidade de fluorescência foi alterada apenas para a amostra P010378* B, única capaz de deslocar a telenzepina D2 do receptor. **B)** Aos 30 min, com as interações em equilíbrio, a redução da fluorescência provocada por um dos isômeros de P010378* atingiu 50%, assim como o deslocamento promovido pelo antagonista atropina (adicionado aos 15 min de incubação). **C)** As duas conformações desses peptídeos foram avaliadas em 5 e **D)** 30 min, no equilíbrio, e ambas competiram com a sonda fluorescente deslocando-a completamente do mAChR M1, assim como a atropina (50 µM). **E)** No entanto, na

avaliação cinética, após adição das conotoxinas (a 30 min), nenhuma amostra competiu com a telenzepina D2 pelo sítio no receptor, como o controle positivo. (Triplícatas, n = 1).

A **Figura 41** corresponde aos ensaios de *binding* sobre mAChR hM1 para as 17 conotoxinas. Não foi observada competição ao radioligante, ou seja, nenhuma amostra foi capaz de deslocar [3H]-NMS, levando a concluir que eles não interagem no mesmo sítio.

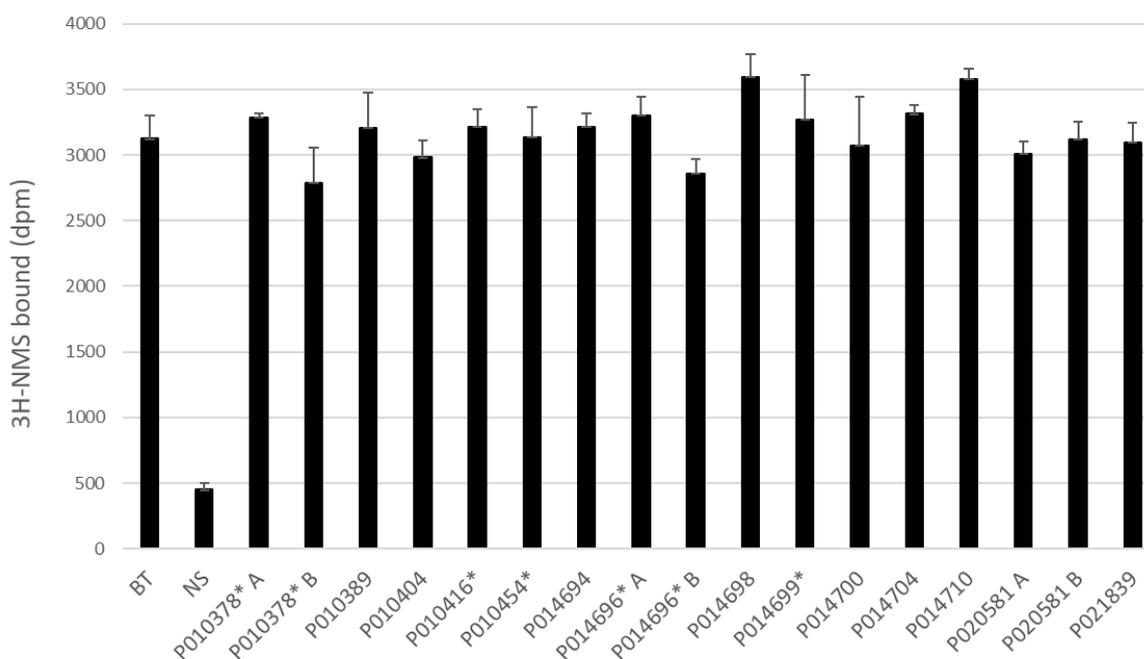


Figura 41 Competição das conotoxinas *versus* [3H]N-metilescopolamina em membranas expressando receptores muscarínicos M1 (mAChR)

Ensaio de competição no equilíbrio (conduzidos à temperatura ambiente e volume final de 100 μ L), foram realizados utilizando 0,1 μ g de membranas preparadas a partir de células CHO expressando mAChR hM1 e 1 nM [3H]N-metilescopolamina ([3H]-NMS) (*binding* total - BT). Enquanto a ligação não-específica (*binding* não específico - NS) foi mensurada na presença do traçador radioativo e excesso de NMS não marcado (1 mM). Os resultados foram expressos pela taxa específica de ligação [3H]-NMS mensurada na presença ou não dos conopeptídeos. Nenhuma das amostras (10 μ M) foi capaz de inibir a ligação do radioligante NMS sobre receptores hM1. (Triplícatas, n = 2)

5.3.3 Investigação da possível atividade nicotínica neuronal $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$ e $\alpha 7$ -5HT₃ em ensaios de *binding*

As construções dos receptores nicotínicos neuronais $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$ e a quimera $\alpha 7$ -5HT₃, foram utilizadas devido a capacidade de serem funcionalmente expressas na linhagem celular tsA-201 e constituem excelentes modelos para os testes de especificidade de vários ligantes. As conotoxinas foram avaliadas, no equilíbrio em experimentos de *binding*, a 10 μ M, e das 17 amostras testadas apenas P010378* B e P010389 competiram com o radioligante. P010378* B deslocou [3H]-epibatidina frente aos receptores $\alpha 3\beta 2$ e $\alpha 3\beta 4$, sendo que para este último o efeito foi menos pronunciado. Já P010389 se mostrou seletiva para $\alpha 3\beta 2$ deslocando em 85% o radioligante. Nenhuma das conotoxinas testadas interagiu diretamente com os receptores $\alpha 4\beta 2$ e $\alpha 7$ -5HT₃ uma vez que não foram capazes de inibir a resposta da [3H]-epibatidina e 125I-Tyr54- α -BgTx ao receptor (**Figura 42**).

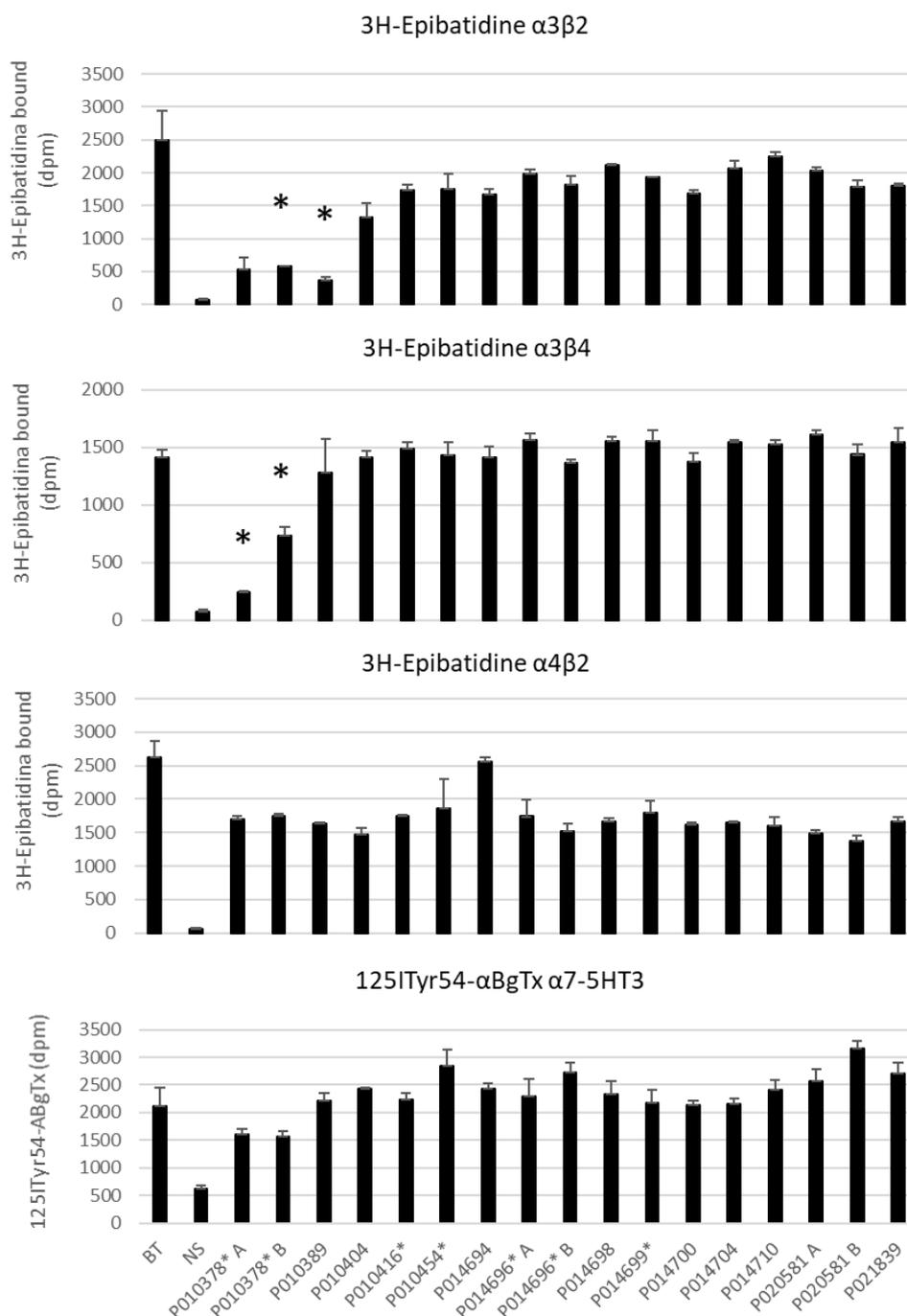


Figura 42 Competição das conotoxinas *versus* [3H]-epibatidina ou 125I-Tyr54-α-BgTx em membranas expressando receptores nicotínicos neuronais

Ensaio de competição no equilíbrio (conduzidos à temperatura ambiente e volume final de 100 μL), foram realizados utilizando 1 μg (α3β4 e α4β2), 5 μg (α3β2), 7 μg (α7-5HT₃) de membranas preparadas a partir de células tsA-201 expressando os subtipos de receptores nicotínicos neuronais e 1,7 nM [3H]-epibatidina (*binding* total - BT). Enquanto a ligação não-específica (*binding* não específico - NS) foi mensurada na presença do traçador radioativo e excesso de epibatidina não marcada (500 nM). Para os ensaios com a quimera α7-5HT₃, foi utilizado um radioligante iodado, 125I-Tyr54-α-BgTx na

concentração de 1 nM e o ligante não marcado metil-caconitina (MLA) a 1 μ M. Os resultados são expressos pela taxa específica de ligação mensurada na presença ou não dos peptídeos. Os experimentos, para cada um desses receptores, avaliaram a interação das 17 conotoxinas de interesse, na concentração de 10 μ M. O isômero P010378*B e a conotoxina P010389 deslocaram em 80% a ligação do radioligante [3H]-epibatidina ao receptor $\alpha 3\beta 2$, enquanto para o receptor $\alpha 3\beta 4$ a inibição parcial foi identificada somente para P010378* e de maneira diferencial para os isômeros A e B, correspondendo a 83 e 48% respectivamente. Já para o receptor $\alpha 4\beta 2$ e $\alpha 7$ -5HT₃ nenhuma das conotoxinas foi capaz de inibir a interação do radioligante ao receptor. (Triplicata, n = 3, Teste t, p<0,05, $\alpha 3\beta 2$ P010378*B, p = 0,365; P010389, p = 0,450; $\alpha 3\beta 4$ P010378*A, p = 0,0132; P010378*B, p = 0,0173)

Para confirmar a atividade nicotínica identificada nos experimentos de *binding* a 10 μ M, foram realizadas curvas concentração-resposta dos conopeptídeos P010378* A e B e P010389 frente aos receptores $\alpha 3\beta 2$ (**Figura 43A**), $\alpha 3\beta 4$ (**Figura 43B**) e $\alpha 4\beta 2$ (**Figura 43C**) e, todavia, nenhuma das concentrações utilizadas (50 μ M a 0,8 nM), para as três amostras, competiu com [3H]-epibatidina pelo mesmo sítio do receptor. Confirmando a viabilidade do ensaio, a conotoxina M2 (referência Mambaz: P0066) com atividade conhecida sobre $\alpha 3\beta 2$, deslocou o radioligante de maneira concentração dependente (**Figura 43D**).

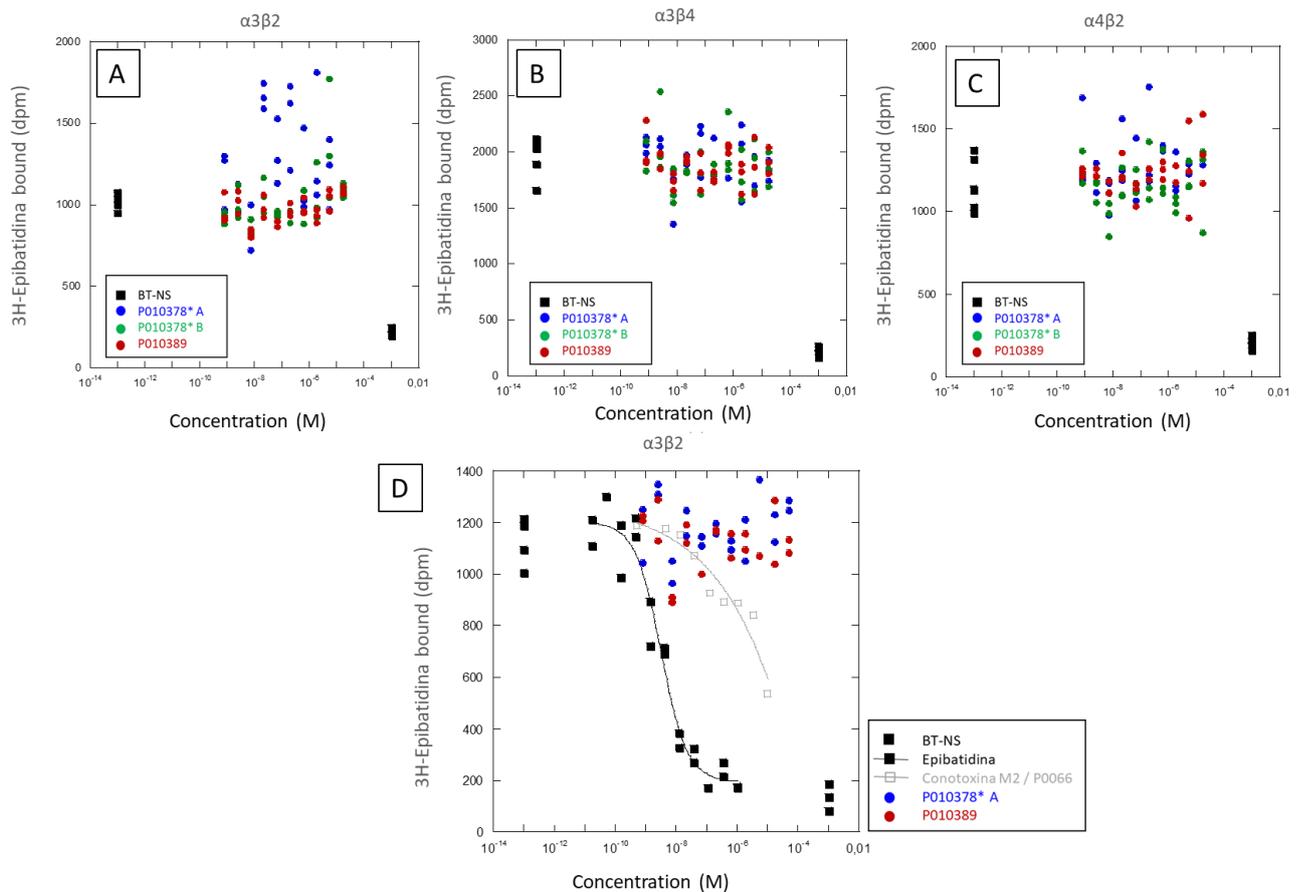


Figura 43 Curvas de competição das conotoxinas P010378* A, B e P010389 *versus* [3H]-epibatidina em membranas expressando receptores nicotínicos neuronais $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$

Ensaio de competição no equilíbrio (conduzidos à temperatura ambiente e volume final de 100 μ L), foram realizados utilizando 1 μ g ($\alpha 3\beta 4$), 0,7 μ g ($\alpha 4\beta 2$), 3 μ g ($\alpha 3\beta 2$) de membranas preparadas a partir de células tsA-201 expressando os subtipos de receptores nicotínicos neuronais e 1,7 nM [3H]-epibatidina (*binding* total - BT). Enquanto a ligação não-específica (*binding* não específico - NS) foi mensurada na presença do traçador radioativo e excesso de epibatidina não marcada (1 mM). A curva concentração-resposta de epibatidina (controle positivo) corresponde a epibatidina (1 μ M - 15 pM) na presença do respectivo traçador radioativo. Os resultados são expressos pela taxa específica de ligação mensurada na presença ou não dos peptídeos. **A, B e C)** Nenhuma das conotoxinas testadas em concentração-resposta (50 μ M a 0,8 nM) competiu com o radioligante [3H]-epibatidina pelo mesmo sítio dos receptores $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$ (Triplicata, n = 2). **D)** Para o receptor $\alpha 3\beta 2$ também foi utilizada a conotoxina M2, como controle positivo. Nenhuma das conotoxinas testadas foi capaz de inibir a resposta do ligante [3H]-epibatidina ao receptor (Duplicata, n = 2).

5.3.5 Investigação da possível atividade das conotoxinas sobre preparações neuromusculares em modelo de hemidiafragma de rata

À procura de uma resposta macroscópica que direcionasse algum mecanismo de ação dessas conotoxinas com sequências atípicas, realizamos o registro mecânico da força contrátil de preparações neuromusculares de ratos utilizando hemidiafragma. A resposta contrátil simples foi verificada através da estimulação elétrica retangular no nervo frênico.

Cada uma das conotoxinas foi testada individualmente, na preparação estável, na concentração final de 2 μ M, com exceção de P014704, P014710, P020581 A e B, P021839 as quais foram testadas a 10 μ M para investigar / confirmar a atividade nicotínica muscular, via Torpedo, identificada previamente por ensaios de *binding*, utilizando essa concentração (dados não mostrados, n = 1 e com grande desvio).

As conotoxinas P010378* A e P010404 potencializaram a contração em 10 e 25%, respectivamente, enquanto P014710 e os isômeros de P020581 inibiram a contração. A inibição máxima foi promovida por P020581 B, 42% contra 36% do seu isômero, apresentando uma pequena diferença de potência (**Figura 44**).

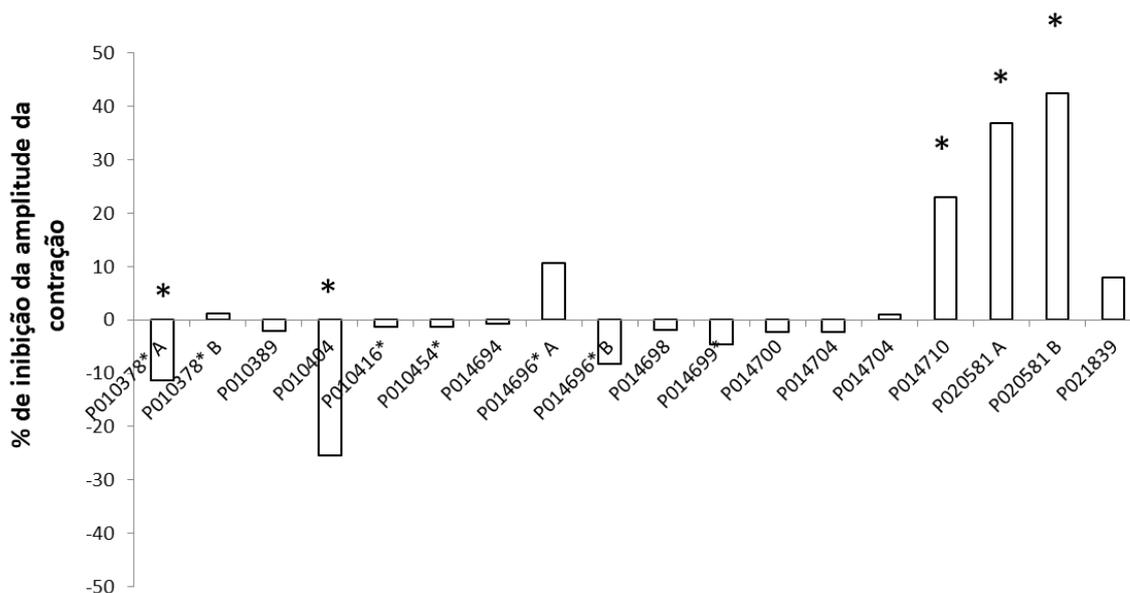


Figura 44 Inibição da amplitude de contração promovida pelas conotoxinas em preparações neuromusculares em modelo de hemidiafragma de rato

Resposta contrátil do hemidiafragma à estimulação elétrica retangular ao nervo frênico (6 V, 150 μ s e 0,1 Hz). O hemidiafragma foi perfundido e mantido em equilíbrio, sobre tensão constante, por 30 min. As conotoxinas foram testadas individualmente, na preparação estável, em concentrações de 2 μ M (correspondente as 12 primeiras amostras) ou 10 μ M (as 5 últimas amostras). As toxinas P010378* A e P010404 potencializaram a contração enquanto as toxinas P014710, P020581 A e B inibiram a contração da preparação. (*) indicam a diferença estatística entre a amplitude de contração antes e depois da adição dos conopeptídeos. (n =1)

5.3.5 Investigação da possível atividade nicotínica Torpedo - $2\alpha 1\beta 1\delta\gamma$ em ensaios de *binding*

A atividade das conotoxinas nos experimentos *ex vivo* na junção neuromuscular, foi melhor investigada em membranas expressando nAChRs subtipo $2\alpha 1\beta 1\delta\gamma$ e purificadas a partir do órgão elétrico de *Torpedo marmorata*, utilizadas para ensaios de *binding*, no equilíbrio.

Em curva concentração-resposta (50 μ M a 0,8 nM) apenas P010378* A competiu com o radioligante 125I-Tyr54- α -BgTx (IC₅₀ = 10,6 μ M), porém a concentração máxima utilizada não foi capaz de deslocá-lo completamente (**Figura 45**). Os resultados sugerem que os isômeros estruturais de P010378* A e B (dados não mostrados) apresentam uma seletividade diferencial frente aos receptores Torpedo.

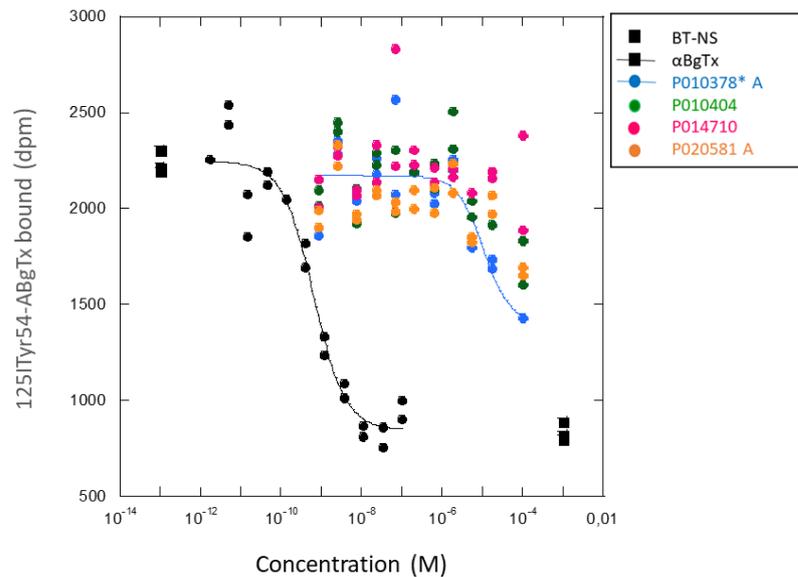


Figura 45 Curva de competição das conotoxinas *versus* 125I-Tyr54- α -bungarotoxina em membranas expressando receptores nicotínicos Torpedo - 2 α 1 β 1 δ γ

Ensaio de competição no equilíbrio (conduzidos à temperatura ambiente e volume final de 100 μ L), foram realizados utilizando 0,05 μ g de membranas preparadas a partir dos eletrócitos de *Torpedo marmorata* (ricos no subtipo nACh 2 α 1 β 1 δ γ) e 1 nM 125I-Tyr54- α -bungarotoxina (125I-Tyr54- α -BgTx) (*binding* total - BT). Enquanto a ligação não-específica (*binding* não específico - NS) foi mensurada na presença do traçador radioativo e excesso de α -BgTx não marcado (1 mM). A curva concentração-resposta de α -BgTx (controle positivo) corresponde à α -BgTx (1 μ M - 20 fM) na presença de 125I-Tyr54- α -BgTx (1 nM). Os resultados são expressos pela taxa específica de ligação 125I-Tyr54- α -BgTx mensurada na presença ou não das conotoxinas. Em curva concentração-resposta (50 μ M - 0,8 nM) foi observada a competição com o ligante 125I-Tyr54- α -BgTx pelo mesmo sítio do receptor, apenas para P010378* A (IC₅₀ = 10,6 μ M). (Duplicata, n = 2)

5.3.6 Investigação do possível efeito nas correntes residuais de ACh de receptores nicotínicos Torpedo - 2 α 1 β 1 δ γ , incorporados em ovócitos de *Xenopus laevis*

Receptores Torpedo - 2 α 1 β 1 δ γ - microtransplantados e incorporados à membrana de ovócitos de *Xenopus* foram incubados com diferentes conotoxinas e submetidos ao HiClamp® automatizado, permitindo caracterizar a atividade nicotínica muscular.

P010404 inibiu a corrente residual de maneira concentração dependente e seu efeito foi reversível (**Figura 46 A**). P014710 além de inibir a corrente residual de maneira concentração dependente reduziu significativamente o tempo de abertura do canal, sendo percebido pela redução de

área no registro da corrente (figura não mostrada). Seu efeito não foi reversível (**Figura 46 B**). P020581 A inibiu a corrente residual de maneira concentração dependente e à 10 μM inibiu completamente. Seu efeito foi reversível (**Figura 46 C**). P020581 B, o estereoisômero, à 10 μM não inibiu completamente a corrente residual, e foi irreversível (**Figura 46 D**).

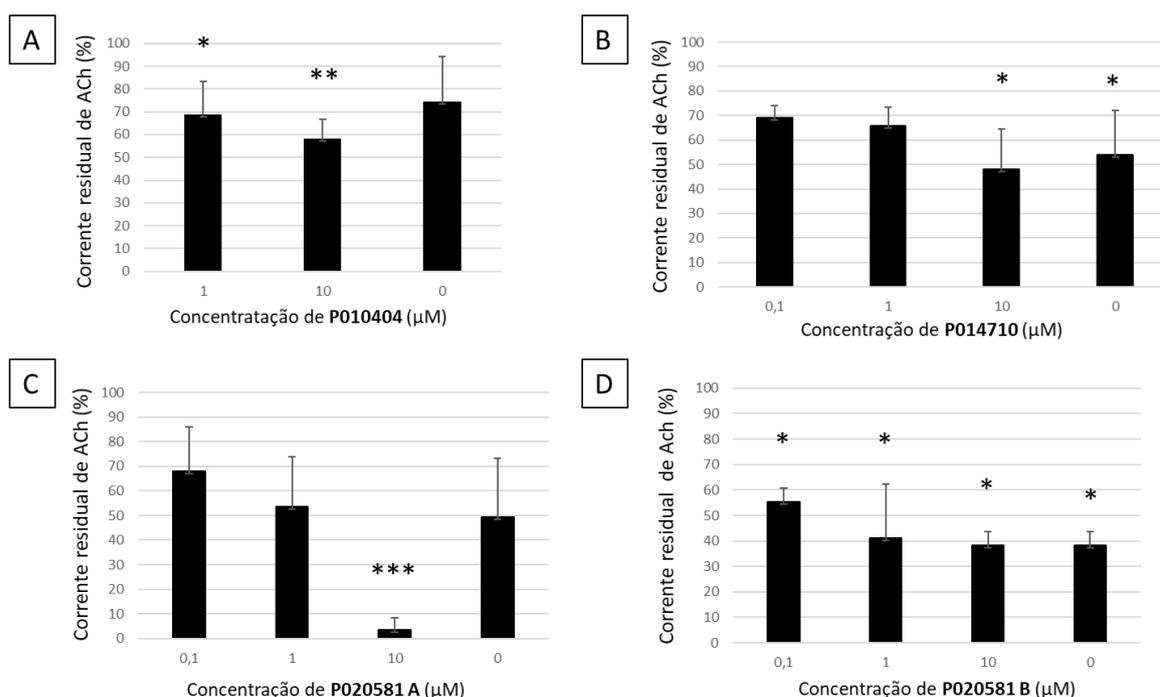


Figura 46 Avaliação do possível efeito nas correntes residuais de ACh de receptores nicotínicos Torpedo - $2\alpha 1\beta 1\delta\gamma$, em HiClamp, para as conotoxinas P010404, P014710 e P020581

Receptores Torpedo - $2\alpha 1\beta 1\delta\gamma$ - microtransplantados e incorporados à membrana de ovócitos de *Xenopus* foram submetidos a registros eletrofisiológicos sob potencial de -60 mV. Foram registradas as correntes relativas à acetilcolina (ACh) para as conotoxinas **A**) P010404, que inibiu a corrente nas concentrações de 1 e 10 μM ; **B**) P014710, a qual inibiu a corrente apenas na concentração de 10 μM e apresentou efeito irreversível; **C**) P020581 A inibiu completamente a corrente a 10 μM , apresentando efeito reversível, e por último, seu estereoisômero **D**) P020581 B, inibiu a corrente em todas as concentrações testadas e foi irreversível. (Duplicata, n = 3, Teste t, $p < 0,05$: P010404 $p = 0,0461$; $0,0073$; $0,0887$ respectivamente para as concentrações 1, 10 e 0 μM / P014710 $p = 0,0148$; $0,0080$ $0,0011$ $0,0029$ respectivamente para as concentrações 0,1, 1, 10 e 0 μM / P020581 A $p = 0,0929$; $0,0586$; $0,0009$; $0,0670$ respectivamente para as concentrações 0,1, 1, 10 e 0 μM / P020581 B $p = 0,0231$; $0,0179$; $0,0051$; $0,0742$ respectivamente para as concentrações 0,1, 1, 10 e 0 μM). Nota: a reversibilidade foi avaliada após lavagem do ovócito e pode ser identificada na concentração 0 μM (zero).

Para avaliar a atividade diferencial entre os dois isômeros da conotoxina P020581, foi construída uma curva concentração resposta (10 nM, 100 nM, 500 nM, 1 µM, 5 µM, 10 µM, 50 µM, 100 µM) e os valores de IC50 encontrados foram 18,8 µM e 12,5 µM, respectivamente para P020581 A e B (**Figura 47**). Não houve diferença estatística entre a atividade dos estereoisômeros.

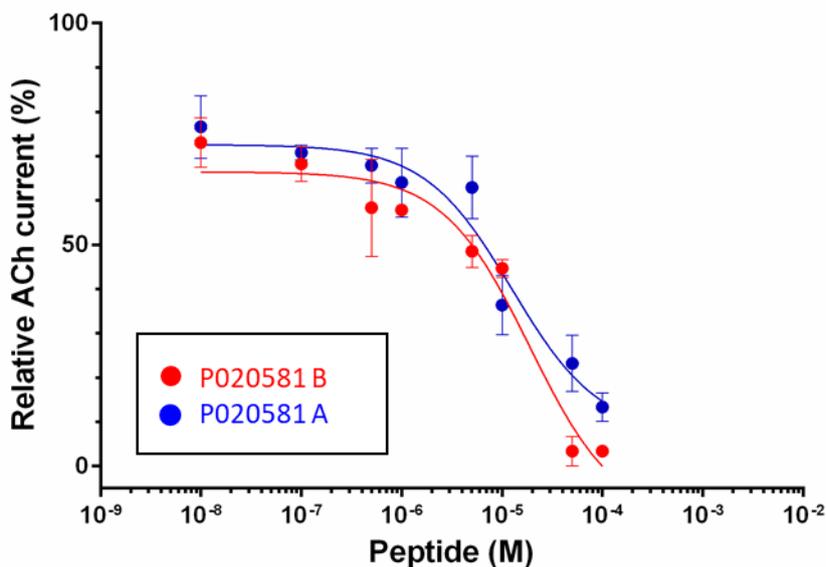


Figura 47 Avaliação do possível efeito nas correntes residuais de ACh de receptores nicotínicos Torpedo - $2\alpha 1\beta 1\delta\gamma$, em HiClamp, para para os isômeros P020581

Receptores Torpedo - $2\alpha 1\beta 1\delta\gamma$ - microtransplantados e incorporados à membrana de ovócitos de *Xenopus* foram submetidos a registros eletrofisiológicos sob potencial de -60 mV. Foram registradas as correntes relativas à acetilcolina (ACh) e os dois isômeros P020581 competiram com a ACh de maneira concentração dependente ($IC_{50_{P020581 A}} = 18,8 \mu M$ e $IC_{50_{P020581 B}} = 12,5 \mu M$). (Duplicata, n de no mínimo 5 ovócitos para cada concentração)

6 DISCUSSÃO

Apesar da grande quantidade de compostos bioativos presentes na peçonha de *Conus*, apenas 2% dos conopeptídeos foram estudados até o fim da última década, a maioria a partir da peçonha de cones piscívoros (Kaas *et al.*, 2010). Algumas espécies moluscívoras como *Conus textile* e *Conus marmoreus* também foram bem investigadas nos níveis transcriptômicos e proteômicos (Han, Y. *et al.*, 2008; Akondi *et al.*, 2014; Lebbe *et al.*, 2014). A determinação das estruturas de conotoxinas tem desempenhado, e continuará a desempenhar, um papel vital na compreensão da função e potencial terapêutico dessas moléculas (Daly e Craik, 2009).

Para investigar melhor essa diversidade excepcional de sequências, a utilização da maior base de dados existente, a aplicação Mambaz, foi de vital importância. Em geral, a hipervariabilidade das conotoxinas maduras está localizada nas regiões intercisteínas (Halai e Craik, 2009) e esse projeto foi desenvolvido com foco em explorar novas subfamílias de potenciais α -conotoxinas, ou seja, que apresentem variabilidade no número de resíduos entre uma cisteína e outra.

Foram encontradas 16 potenciais subfamílias (2/3, 2/7, 2/8, 3/1, 3/2, 3/4, 3/7, 4/2, 4/3, 4/4, 4/5, 4/6, 4/7, 5/3, 5/4, 5/5) sendo que apenas 6 delas já tinham sido descritas anteriormente (4/2, 4/3, 4/4, 4/5, 4/6, 4/7) (Dutton e Craik, 2001; Azam e Mcintosh, 2009; Halai e Craik, 2009) abrindo um enorme leque de possibilidades. As 18 sequências foram selecionadas com base no padrão de cisteínas I (CC-C-C), predominantemente encontrado nas α -conotoxinas da superfamília A. Portanto todas as amostras apresentam 2 pontes dissulfeto como modificações pós-traducionais, mas contradizendo Buczeck e colaboradores (2005), apenas 7 sequências apresentam o C-terminal amidado. Corroborando com a descrição da literatura (Dutton e Craik, 2001), 80% das conotoxinas selecionadas estão dentro da faixa média de números de resíduos de aminoácidos - entre 12 e 19 - sendo que duas estão abaixo e outras duas acima dessa média. O achado mais curioso foi que dentre as amostras selecionadas, com base em todos os critérios apresentados na metodologia, 4 sequências não pertencem ao gênero *Conus*, e dentre essas, apenas uma é um organismo marinho. Os peptídeos selecionados compreendem 4 espécies de cones - vermívoros e moluscívoros - 1 polvo e 3 espécies de aranhas. Apesar do estranhamento inicial, as sequências foram sintetizadas quimicamente, e a exceção de uma, todas apresentaram bom rendimento.

Na ausência da maquinaria de *fold*ing celular, as pequenas proteínas se dobram espontaneamente aos seus estados nativos sob condições adequadas, o que implica que a maioria das informações necessárias para atingir a estrutura tridimensional de uma proteína está contida dentro da sua sequência de aminoácidos (Daggett e Fersht, 2003; Onuchic e Wolynes, 2004). Essa informação nos leva a extrapolar que sequências atípicas podem apresentar *fold*ing atípicos, como identificado para mais de 80% das conotoxinas selecionadas. A cinética do *fold*ing oxidativo *in vitro* é afetada por vários parâmetros. Entre eles, a natureza do tampão (pH e força iônica) e o potencial redox, tendo este, fortes

influências. O pH 8,5 é descrito como o mais eficiente para recuperação de proteínas nativas, já os agentes redox requerem concentrações otimizadas para um *fold*ing oxidativo eficaz. Eles influenciam na cinética de duas maneiras: agentes oxidativos, como a glutatona oxidada (GSSG), funcionam como oxidases, acelerando a formação da ligação dissulfeto e levando a um rápido acúmulo do intermediário predominante totalmente oxidado. Agentes redutores, como a glutatona reduzida (GSH), funcionam como redutases, promovendo redução das pontes dissulfeto e reorganização adicional dos isômeros totalmente oxidados para a estrutura nativa (Arolas *et al.*, 2006). Alterando as concentrações desses reagentes, o *fold*ing pode ser completado em segundos ou dias, como é o caso da hirudina: peptídeo que exibe propriedades anticoagulantes e que é rico em cisteínas (Chatrenet e Chang, 1993; Chang, 1994).

Wu e colaboradores (2013) testaram para a α -conotoxina TxIB (4/7) uma variedade de condições, totalizando 54 tipos de soluções de *fold*ing oxidativo, envolvendo diferentes tampões, reagentes redox, pH, temperatura, co-solventes e tempos de reação. Ele obteve rendimento de 100 a 4% de isômeros globulares, logo, 0 a 96% de isômeros ribbons, apenas variando essas condições. Nossas condições de trabalho foram muito semelhantes às condições em que o grupo obteve 100% de isômeros globulares, no entanto para 7 das 16 amostras (P021812 precipitou em solução e foi desconsiderada) submetidas ao *fold*ing oxidativo, foram claramente identificados 3 picos, outras 3 amostras apresentaram dois picos relativamente de mesma intensidade e as últimas 6 amostras apresentaram apenas um pico majoritário (detalhes no **Anexo 2**). Importante ressaltar que não foi identificada a qual isoforma cada pico corresponde, e que as proporções foram estabelecidas macroscopicamente e designadas de acordo com a eluição. Atribui-se esses resultados dispare e muito diferentes do que já foi encontrado na literatura, às sequências atípicas desses peptídeos, encontradas pela primeira vez.

Para minimizar a diversidade de sequências entre as amostras ao longo do *fold*ing oxidativo, os peptídeos foram organizados em 3 grupos com base no número de resíduos e na presença ou não de metionina. Sabe-se que a metionina interage com resíduos aromáticos, como o triptofano e a tirosina, contribuindo para a estabilidade da molécula e que quando oxidada, essas interações são fortalecidas e a conformação nativa pode ser perturbada (Lewis *et al.*, 2016). No entanto, mesmo tomando os devidos cuidados o *fold*ing oxidativo não apresentou diferenças, logo encontramos amostras com 1, 2 ou 3 picos.

Frente a esse impasse, para algumas sequências, os dois isômeros mais abundantes, globular e ribbon, foram submetidos a ensaios farmacológicos.

Com o mesmo padrão de cisteínas, as conotoxinas da superfamília A, se apresentam como α ou ρ , com atividade sobre sistema colinérgico nicotínico ou adrenérgico, respectivamente (Halai e Craik, 2009; Akondi *et al.*, 2014). Porém, nenhuma das conotoxinas testadas apresentaram atividade adrenérgica $\alpha 1$.

Apesar de não encontrar nada na literatura relacionando atividade colinérgica, desencadeada por conotoxinas, à receptores muscarínicos, nós decidimos realizar um teste piloto sobre mAChR hM1. Inicialmente os resultados foram surpreendentes e o isômero B da conotoxina P010378* se equiparou ao controle positivo, reduzindo a fluorescência emitida devido a competição direta com antagonista

marcado. O experimento foi repetido para ambos os isômeros da toxina em questão, e neste momento, em equilíbrio, ambas as conformações apresentaram atividade. Suspeitando de um falso positivo, devido a atividade contraditória do isômero A, uma cinética foi realizada (**Figura 40**) e a ausência de interação, dos dois isômeros, confirmada através da investigação ao longo do tempo. Embora os ensaios tag-lite® sejam muito robustos e sensíveis, não é tão raro encontrar falsos positivos, o que é facilmente contornado utilizando um n experimental maior (em nosso piloto o n experimental foi de 1, em triplicatas). Por outro lado, ele consiste em um ensaio de alto custo e dispendioso pois envolve a transformação em bactérias - para obtenção do receptor modificado em quantidade suficiente, transfecção nas células de interesse e posterior tratamento com sonda fluorescente HTRF®. Dessa forma, a confirmação da ausência de atividade muscarínica M1, foi realizada por *binding* utilizando sondas radioativas.

Para os receptores nicotínicos neuronais $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$ e a quimera $\alpha 7-5HT_3$, nenhuma atividade competitiva foi identificada através de testes de *binding*, utilizando radioligante. No entanto é importante ressaltar que existe uma diversidade enorme de subtipos de nAChR neuronais uma vez que eles podem ser codificados por 9 subtipos α ($\alpha 2-\alpha 10$) e 3 β ($\beta 2-4$) organizado-se de maneira homomérica (com subunidades exclusivamente α) ou heteromérica (subunidades α e β) (Gotti *et al.*, 2006; Olivera *et al.*, 2008). A montagem de diferentes pentâmeros forma uma variedade complexa de subtipos nAChR com diferentes propriedades farmacológicas e biofísicas (Lebbe *et al.*, 2014). Neste trabalho, foram avaliadas 4 configurações já bem estabelecidas e expressas no laboratório, para as quais as conotoxinas não demonstraram atividade, no entanto, nada impede que alguma dessas conotoxinas possa ser ativa em outro(s) subtipo(s) de nAChR neuronais.

Verificada a ausência de atividade em receptores adrenérgicos, mAChR hM1 e nAChR neuronais, um outro ensaio foi realizado de forma a direcionar melhor os alvos farmacológicos a serem avaliados.

A transmissão neuromuscular (TNM), um exemplo de sinapse química, foi examinada em preparações neuromusculares de hemidiafragma de ratas. Em primeira instância, fármacos que modificam a TNM podem ser subdivididos em dois grupos, ou seja, bloqueadores e facilitadores da transmissão, e estes podem atuar de maneira pré ou pós-sináptica. A interferência pode acontecer em diferentes níveis do sistema colinérgico, como por exemplo: na síntese de ACh (hemicolínicos, que bloqueiam o transporte e receptação de colina pela terminação nervosa), na estocagem (β -bungarotoxina, de *Bungarus multicinctus* e toxinas do gênero de aranhas *Lactrodectus*, promovendo a fusão das vesículas sinápticas com a membrana axonal em “avalanche”), na liberação de ACh (toxina botulínica, de *Clostridium botulinum*; PLA2; magnésio e algumas classes de antibióticos), além de interferências em nível pós-sináptico como bloqueadores pós-juncionais despolarizantes (como o decametônio e a succinilcolina) ou competitivos (alcaloides do curare¹ e seus derivados semi-sintéticos,

¹ Curare é um termo genérico aplicado a vários extratos brutos de vegetais do gênero *Chondrodendron* e *Strychnos*. A *d-tubocurarina*, isolada de *C. tomentosum*, é um dos alcaloides mais conhecidos.

além de compostos sintéticos como a galamina). Por outro lado, a resposta identificada também pode ser resultado de uma lesão muscular (Oliveira e Gallacci, 1990).

Através dos experimentos realizados neste trabalho, não é possível inferir se a atividade das toxinas ativas tem origem pré ou pós-sináptica. Quatro sequências alteraram a amplitude da contração nas preparações neuromusculares, sendo que 2 inibiram e outras 2 potencializaram. P014710 assim como os isômeros de P020581, inibiram a contração. A inibição máxima foi promovida por P020581 B, 42% contra 36% do seu isômero, apresentando uma pequena diferença de potência. A descrição clássica sempre foi de α -conotoxinas bloqueando a junção neuromuscular (Mcmanus *et al.*, 1981; Mcmanus e Musick, 1985), no entanto P010378* A e P010404, configuram as primeiras conotoxinas que apresentam atividade oposta, ao bloqueio da junção muscular, ou seja, potencializando a contração em 10 e 25%, respectivamente.

Investigando em mais detalhes se essa atividade sobre o hemidiafragma teria relação direta com o receptor nicotínico muscular, foram realizados ensaios de *binding* em membranas expressando Torpedo ($2\alpha 1\beta 1\delta\gamma$), e apenas P010378* A deslocou o radioligante de maneira concentração dependente ($IC_{50} = 10,6 \mu M$).

Em nível molecular, as técnicas eletrofisiológicas que permitem o estudo de canais nicotínicos unitários, demonstram que a principal atividade dos antagonistas competitivos é a de diminuir a frequência de abertura dos canais nicotínicos, mas não sua condutância e o seu tempo médio de abertura (Oliveira e Gallacci, 1990).

Logo, em paralelo aos ensaios de *binding*, os receptores Torpedos microtransplantados e incorporados às membranas de ovócitos de *Xenopus* foram submetidos a avaliação do efeito na corrente residual de ACh, em HiClamp®.

P010404 inibiu a corrente residual de maneira concentração dependente. P014710, além de inibir a corrente residual, reduziu significativamente o tempo de abertura do canal, sendo percebido pela redução de área no registro da corrente, o que configura um indício para toxinas bloqueadoras de poro. Mais concentrações precisam ser testadas e 3-4 ovócitos é um n experimental muito baixo. No entanto, os testes mais recentes (conduzidos pelo colaborador Romulo Araoz, CEA-Saclay) mostraram que o HiClamp® apresenta limitações para a elaboração de protocolos com variação de voltagem imposta. Logo, para conclusão dessa investigação o ideal seria utilizar o patch clamp manual, e consequentemente, alterar o volume final de incubação de 250 μL para 30 mL. Para tanto, faz-se necessário, uma nova síntese química, ficando assim, como perspectivas para este trabalho. P010378* A ainda está em fase de testes e também fica como perspectivas. P020581 A inibiu completamente a corrente residual, enquanto seu estereoisômero inibiu em média 50%. Em uma investigação mais detalhada, em curva concentração resposta e utilizando um n experimental maior, não foi identificada diferença de atividade entre os isômeros estruturais P020581, mas ambos competiram com a ACh de maneira concentração dependente.

Dentre as 18 amostras iniciais, 21 potenciais α -conotoxinas foram apresentadas neste trabalho (3 conotoxinas foram desdobradas em seus 2 respectivos estereoisômeros), sendo que para 5 foram identificadas, apesar de não completamente caracterizadas, uma atividade nicotínica muscular. Restam ainda 16 conotoxinas para identificar e caracterizar uma possível interação com outras configurações de receptores nicotínicos neuronais, como alvo farmacológico.

7 CONCLUSÃO

Utilizando-se dos recursos da aplicação Mambaz, e das abordagens transcriptômicas e proteômicas, foram selecionadas 18 sequências α -conotoxinas, com base no padrão clássico de cisteínas, CC_C_C. Dentre essas amostras identificamos 16 potenciais subfamílias de α -conotoxinas distribuídas em 6 espécies animais. Após síntese química e folding, 3 amostras se desdobraram em isômeros estruturais, A e B.

Para caracterização farmacológica, 17 amostras foram utilizadas. Nenhuma delas apresentou atividade adrenérgica α_1 , muscarínica M1, nicotínica neuronal - $\alpha_3\beta_2$, $\alpha_3\beta_4$, $\alpha_4\beta_2$ e a quimera α_7 -5HT₃. Em sequência, foi avaliada a atividade das conotoxinas sobre as preparações neuromusculares de hemidiafragma de ratas, na qual 2 peptídeos potencializaram e outros 2 inibiram a contração. Dentre esses peptídeos ativos, avaliou-se a atividade de receptores nicotínicos musculares Torpedo, em *binding* e o possível efeito sobre as correntes residuais de ACh. Apenas P010378* competiu de maneira concentração dependente com o radioligante, enquanto paralelamente, ambos isômeros de P020581 reduziram a corrente residual de ACh, de maneira também concentração dependente, em ovócitos de *Xenopus* incorporados com $2\alpha_1\beta_1\delta\gamma$.

Muitos detalhes ainda precisam ser explorados, mas este estudo de prospecção abre um enorme espaço de investigação para descobertas de α -conotoxinas, de novas subfamílias, com diferentes perfis de seletividade e interação aos receptores nicotínicos.

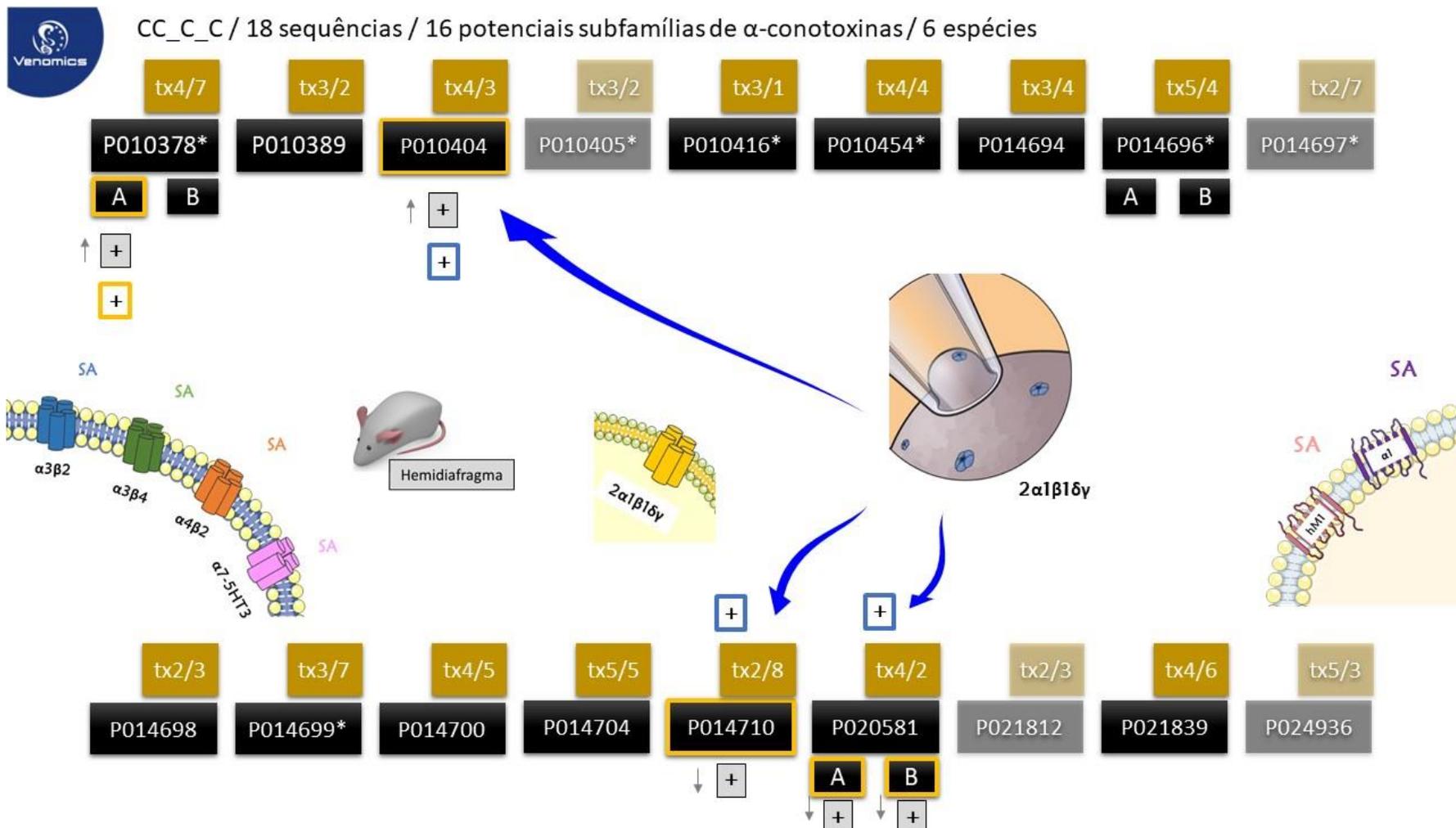


Figura 48 Figura conclusão - Capítulo 2

A partir da aplicação Mambaz, consórcio VENOMICS, foram selecionadas 18 sequências - incluindo 16 potenciais subfamílias, distribuídas em 6 espécies animais - de α -conotoxinas, com base no padrão clássico de cisteínas, CC_C_C. Elas foram sintetizadas quimicamente e após *folding*, 3 amostras se desdobraram

em isômeros estruturais, A e B, totalizando 21 amostras. Quatro amostras (sombreadas) não foram avaliadas quanto ao perfil farmacológico por precipitarem na solução tampão de *foldin* (P021812) ou devido a ausência de resíduos aromáticos para quantificação proteica imediata (P010405*, P014697 e P024936). Para a caracterização farmacológica, 17 amostras foram utilizadas e não apresentaram atividade (SA - sem atividade) adrenérgica α_1 , muscarínica M1 e nem nicotínica neuronal - $\alpha_3\beta_2$, $\alpha_3\beta_4$, $\alpha_4\beta_2$ e a quimera α_7 -5HT₃ (membranas ilustradas no canto direito e canto esquerdo da figura). Em sequência, foi avaliada a atividade das conotoxinas sobre preparações neuromusculares de hemidiafragma de ratos, na qual 2 peptídeos potencializaram a contração e outros 2 a inibiram (pequenos quadrados cinza, com sinal de positivo). Dentre esses peptídeos ativos avaliou-se suas possíveis atividades sobre receptores nicotínicos musculares Torpedo, em *binding* (amostras destacadas com contorno amarelo) e eletrofisiologia (amostras indicadas pelas setas azuis), sendo que apenas P010378* apresentou atividade competitiva com o radioligante (pequeno quadrado amarelo, com sinal de positivo), enquanto paralelamente, foi verificado que todas conotoxinas testadas em HiClamp, perturbaram a corrente residual de acetilcolina (pequeno quadrado azul, com sinal de positivo), em ovócitos de *Xenopus* incorporados com receptores nicotínicos Torpedo $2\alpha_1\beta_1\delta\gamma$.

8 PERSPECTIVAS

Como perspectivas para esse trabalho, podem ser desdobradas diferentes linhas de estudos, plenamente factíveis e dentre essas cito algumas possibilidades relativamente imediatas:

- Resintetizar quimicamente o peptídeo P024936 e realizar toda caracterização farmacológica;
- Avaliar novas soluções de *fold*ing para P021812 seguida da caracterização farmacológica;
- Procurar por novas configurações de receptores nicotínicos neuronais passíveis de expressão *in vitro*, como por exemplo, $\alpha 9\alpha 10$, para testes de seletividade das toxinas para as quais não foi encontrado um alvo;
- Caracterização eletrofisiológica detalhada das conotoxinas P10378*, P010404, P014710.

CONCLUSÃO GERAL

Para o público em geral, animais venenosos muitas vezes evocam repulsão ou até mesmo incontrolável medo, mas eles também fascinam pela dimensão quase mística. Para nós, pesquisadores, eles representam uma fonte inesgotável de moléculas originais e ferramentas moleculares que auxiliam o entendimento do papel dos principais receptores fisiológicos. Além disso, a percepção de que muitas dessas moléculas oriundas de peçonhas possuem potencial terapêutico único, tornam muito mais atraente e instigante os investimentos do meio científico e farmacêutico para o desenvolvimento de novas drogas.

Os estudos apresentados neste manuscrito foram realizados com o objetivo de isolar, caracterizar quimicamente e determinar o alvo molecular de peptídeos de peçonhas da família Elapidae e do gênero *Conus* que tem como alvo farmacológico o sistema colinérgico.

Como primeiro passo, foi desenvolvido, por um lado, os métodos de fracionamento da peçonha, da serpente *Micrurus lemniscatus*, e por outro lado, a caracterização bioquímica de algumas toxinas dessa peçonha, seguida da síntese química e testes biológicos a fim de identificar a afinidade e seletividade frente aos receptores colinérgicos.

Como segundo passo, foi utilizada uma abordagem de bioinformática aproveitando as informações proteômicas e transcriptômicas contidas na base de dados Mambaz. A síntese química permitiu reproduzir *in vitro*, parte da biodiversidade de *Conus*, ainda pouco explorada, e comprovar a complexidade e multiplicidade de alvos farmacológicos dessas potenciais α -conotoxinas.

Finalmente, apesar de não caracterizar completamente os alvos moleculares das toxinas estudadas, foi demonstrada a atividade agônista muscarínica e potencialização da contração de preparações neuromusculares - até então não descritas na literatura - através de diferentes técnicas de ponta.

Este trabalho também proporcionou uma valiosa e única experiência, tendo como substrato a biodiversidade, fonte quase inesgotável de moléculas bioativas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEM, A. et al. TOXINS FROM THE VENOM OF THE GREEN MAMBA DENDROASPIS-ANGUSTICEPS THAT INHIBIT THE BINDING OF QUINUCLIDINYL BENZILATE TO MUSCARINIC ACETYLCHOLINE-RECEPTORS. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 968, n. 3, p. 340-345, MAR 11 1988 1988. ISSN 0006-3002.

ADEM, A.; KARLSSON, E. Muscarinic receptor subtype selective toxins. **Life Sciences**, v. 60, n. 13-14, p. 1069-1076, FEB 21 1997 1997. ISSN 0024-3205.

AKONDI, K. B. et al. Discovery, Synthesis, and Structure Activity Relationships of Conotoxins. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 11, p. 5815-5847, Jun 2014. ISSN 0009-2665. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000337336500007 >.

ALEXANDER, S. et al. THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2015/16: G protein-coupled receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 24, p. 5744-5869, DEC 2015 2015. ISSN 0007-1188.

_____. THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2015/16: Ligand-gated ion channels. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 24, p. 5870-5903, DEC 2015 2015. ISSN 0007-1188.

ALEXANDER, S. P. et al. **THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2017/18: Ligand-gated ion channels**: British Journal of Pharmacology. 174: S130–S159 p. 2017.

AMBLARD, M. et al. Methods and Protocols of modern solid phase peptide synthesis. **Molecular Biotechnology**, v. 33, n. 3, p. 239-254, JUL 2006 2006. ISSN 1073-6085.

ANTIL-DELBEKE, S. et al. Molecular determinants by which a long chain toxin from snake venom interacts with the neuronal alpha 7-nicotinic acetylcholine receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 38, p. 29594-29601, SEP 22 2000 2000. ISSN 0021-9258.

ARAOZ, R. et al. The Neurotoxic Effect of 13,19-Didesmethyl and 13-Desmethyl Spirolide C Phycotoxins Is Mainly Mediated by Nicotinic Rather Than Muscarinic Acetylcholine Receptors. **Toxicological Sciences**, v. 147, n. 1, p. 156-167, SEP 2015 2015. ISSN 1096-6080.

_____. Coupling the Torpedo Microplate-Receptor Binding Assay with Mass Spectrometry to Detect Cyclic Imine Neurotoxins. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 23, p. 10445-10453, DEC 4 2012 2012. ISSN 0003-2700.

ARCE-BEJARANO, R.; LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J. Intravascular hemolysis induced by the venom of the Eastern coral snake, *Micrurus fulvius*, in a mouse model: Identification of directly hemolytic phospholipases A(2). **Toxicon**, v. 90, p. 26-35, NOV 2014 2014. ISSN 0041-0101.

AROLAS, J. et al. Folding of small disulfide-rich proteins: clarifying the puzzle. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 31, n. 5, p. 292-301, MAY 2006 2006. ISSN 0968-0004.

AUDIE, J.; BOYD, C. The Synergistic Use of Computation, Chemistry and Biology to Discover Novel Peptide-Based Drugs: The Time is Right. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, n. 5, p. 567-582, Feb 2010. ISSN 1381-6128. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000274032400008 >.

AZAM, L.; MCINTOSH, J. Alpha-conotoxins as pharmacological probes of nicotinic acetylcholine receptors. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 30, n. 6, p. 771-783, JUN 2009 2009. ISSN 1671-4083.

BANDYOPADHYAY, P. et al. Conantokin-G precursor and its role in gamma-carboxylation by a vitamin K-dependent carboxylase from a Conus snail. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 10, p. 5447-5450, MAR 6 1998 1998. ISSN 0021-9258.

_____. gamma-glutamyl carboxylation: An extracellular posttranslational modification that antedates the divergence of molluscs, arthropods, and chordates. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 3, p. 1264-1269, FEB 5 2002 2002. ISSN 0027-8424.

BANERJEE, Y. et al. Hemextin AB complex, a unique anticoagulant protein complex from Hemachatus haemachatus (African Ringhals cobra) venom that inhibits clot initiation and factor VIIa activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 52, p. 42601-42611, DEC 30 2005 2005. ISSN 0021-9258.

BARBA, M. et al. Cupryphans, metal-binding, redox-active, redesigned conopeptides. **Protein Science**, v. 18, n. 3, p. 559-568, MAR 2009 2009. ISSN 0961-8368.

BARROS, A. et al. LOCAL-EFFECTS INDUCED BY VENOMS FROM 5 SPECIES OF GENUS MICRURUS SP (CORAL SNAKES). **Toxicon**, v. 32, n. 4, p. 445-452, APR 1994 1994. ISSN 0041-0101.

BARTON, M.; WHITE, H.; WILCOX, K. The effect of CGX-1007 and CI-1041, novel NMDA receptor antagonists, on NMDA receptor-mediated EPSCs. **Epilepsy Research**, v. 59, n. 1, p. 13-24, MAR 2004 2004. ISSN 0920-1211.

BEGLEY, G. et al. A conserved motif within the vitamin K-dependent carboxylase gene is widely distributed across animal phyla. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 46, p. 36245-36249, NOV 17 2000 2000. ISSN 0021-9258.

BEYCHOK, S. CIRCULAR DICHROSIM OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES. **Science**, v. 154, n. 3754, p. 1288-&, 1966 1966. ISSN 0036-8075.

BIGGS, J. et al. Conolysin-mt: A Conus peptide that disrupts cellular membranes. **Biochemistry**, v. 46, n. 44, p. 12586-12593, NOV 6 2007 2007. ISSN 0006-2960.

BLANCHET, G. et al. Polypharmacology profiles and phylogenetic analysis of three-finger toxins from mamba venom: Case of aminergic toxins. **Biochimie**, v. 103, p. 109-117, AUG 2014 2014. ISSN 0300-9084.

BONNER, T. THE MOLECULAR-BASIS OF MUSCARINIC RECEPTOR DIVERSITY. **Trends in Neurosciences**, v. 12, n. 4, p. 148-151, APR 1989 1989. ISSN 0166-2236.

BOURNE, Y. et al. Structural determinants in phycotoxins and AChBP conferring high affinity binding and nicotinic AChR antagonism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 13, p. 6076-6081, MAR 30 2010 2010. ISSN 0027-8424.

BOWERSOX, S.; LUTHER, R. Pharmacotherapeutic potential of omega-conotoxin MVIIA (SNX-111), an N-type neuronal calcium channel blocker found in the venom of Conus magus. **Toxicon**, v. 36, n. 11, p. 1651-1658, NOV 1998 1998. ISSN 0041-0101.

BRADLEY, K. Muscarinic toxins from the green mamba. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 85, n. 2, p. 87-109, FEB 2000 2000. ISSN 0163-7258.

BRAHMA, R. et al. Venom gland transcriptomics for identifying, cataloging, and characterizing venom proteins in snakes. **Toxicon**, v. 93, p. 1-10, JAN 2015 2015. ISSN 0041-0101.

BRAZIL, O. CORAL SNAKE-VENOMS - MODE OF ACTION AND PATHOPHYSIOLOGY OF EXPERIMENTAL ENVENOMATION. **Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo**, v. 29, n. 3, p. 119-126, MAY-JUN 1987 1987. ISSN 0036-4665.

BREJC, K. et al. Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. **Nature**, v. 411, n. 6835, p. 269-276, MAY 17 2001 2001. ISSN 0028-0836.

BRUNTON, L. L., CHABNER, BRUCEKNOLLMAN, BJÖRN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman**. 12. Mc Graw Hill, 2012. 2112 ISBN 9788580551167.

BUCARETCHI, F. et al. Coral snake bites (*Micrurus* spp.) in Brazil: a review of literature reports. **Clinical Toxicology**, v. 54, n. 3, p. 222-234, MAR 15 2016 2016. ISSN 1556-3650.

BUCZEK, O.; BULAJ, G.; OLIVERA, B. Conotoxins and the posttranslational modification of secreted gene products. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, n. 24, p. 3067-3079, DEC 2005 2005. ISSN 1420-682X.

BUCZEK, O. et al. Structure and sodium channel activity of an excitatory I-1-superfamily conotoxin. **Biochemistry**, v. 46, n. 35, p. 9929-9940, SEP 4 2007 2007. ISSN 0006-2960.

BULAJ, G.; OLIVERA, B. Folding of conotoxins: Formation of the native disulfide bridges during chemical synthesis and biosynthesis of *Conus* peptides. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, n. 1, p. 141-155, JAN 2008 2008. ISSN 1523-0864.

CALVETE, J. Snake venomomics: From the inventory of toxins to biology. **Toxicon**, v. 75, p. 44-62, DEC 1 2013 2013. ISSN 0041-0101.

CALVETE, J.; MARCINKIEWICZ, C.; SANZ, L. Snake venomomics of *Bitis gabonica gabonica*. Protein family composition, subunit organization of venom toxins, and characterization of dimeric disintegrins bitisgabonin-1 and bitisgabonin-2. **Journal of Proteome Research**, v. 6, n. 1, p. 326-336, JAN 5 2007 2007. ISSN 1535-3893.

CAMPOY, F. et al. Cholinergic system and cell proliferation. **Chemico-Biological Interactions**, v. 259, p. 257-265, NOV 25 2016 2016. ISSN 0009-2797.

CANTU, M. et al. Peptide sequencing using mass spectrometry: A practical guide. **Quimica Nova**, v. 31, n. 3, p. 669-U99, 2008 2008. ISSN 0100-4042.

CARBAJAL-SAUCEDO, A. et al. Isolation, characterization, cloning and expression of an alpha-neurotoxin from the venom of the Mexican coral snake *Micrurus laticollaris* (Squamata: Elapidae). **Toxicon**, v. 66, p. 64-74, MAY 2013 2013. ISSN 0041-0101.

CATTERALL, W.; GOLDIN, A.; WAXMAN, S. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. **Pharmacological Reviews**, v. 57, n. 4, p. 397-409, DEC 2005 2005. ISSN 0031-6997.

CAULFIELD, M.; BIRDSALL, N. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 50, n. 2, p. 279-290, JUN 1998 1998. ISSN 0031-6997.

CECCHINI, A. et al. Biological and enzymatic activities of *Micrurus* sp (Coral) snake venoms. **Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology**, v. 140, n. 1, p. 125-134, JAN 2005 2005. ISSN 1095-6433.

CELIE, P. et al. Nicotine and carbamylcholine binding to nicotinic acetylcholine receptors as studied in AChBP crystal structures. **Neuron**, v. 41, n. 6, p. 907-914, MAR 25 2004 2004. ISSN 0896-6273.

CHANG, J. CONTROLLING THE SPEED OF HIRUDIN FOLDING. **Biochemical Journal**, v. 300, p. 643-650, JUN 15 1994 1994. ISSN 0264-6021.

CHANGEUX, J. Nicotine addiction and nicotinic receptors: lessons from genetically modified mice. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, n. 6, p. 389-401, JUN 2010 2010. ISSN 1471-003X.

CHATRENET, B.; CHANG, J. THE DISULFIDE FOLDING PATHWAY OF HIRUDIN ELUCIDATED BY STOP GO FOLDING EXPERIMENTS. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 28, p. 20988-20996, OCT 5 1993 1993. ISSN 0021-9258.

CHEN, P. et al. Biochemical Characterization of kappa M-R111J, a Kv1.2 Channel Blocker EVALUATION OF CARDIOPROTECTIVE EFFECTS OF kappa M-CONOTOXINS. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 20, p. 14882-14889, MAY 14 2010 2010. ISSN 0021-9258.

CHIARI, A. et al. Sex differences in cholinergic analgesia I - A supplemental nicotinic mechanism in normal females. **Anesthesiology**, v. 91, n. 5, p. 1447-1454, NOV 1999 1999. ISSN 0003-3022.

CHICHEPORTICHE, R. et al. **Structure-function relationship in the binding of snake neurotoxins to the torpedo membrane receptor. Biochemistry.** . . 1975.

CHUNG, C. et al. Muscarinic toxin-like proteins from Taiwan banded krait (*Bungarus multicinctus*) venom: Purification, characterization and gene organization. **Biological Chemistry**, v. 383, n. 9, p. 1397-1406, SEP 2002 2002. ISSN 1431-6730.

CISCOTTO, P. et al. Venomic analysis and evaluation of antivenom cross-reactivity of South American *Micrurus* species. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 9, p. 1810-1825, AUG 24 2011 2011. ISSN 1874-3919.

CLARK, R. et al. Engineering stable peptide toxins by means of backbone cyclization: Stabilization of the alpha-conotoxin MII. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 39, p. 13767-13772, SEP 27 2005 2005. ISSN 0027-8424.

CORRINGER, P.; LE NOVERE, N.; CHANGEUX, J. Nicotinic receptors at the amino acid level. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 40, p. 431-458, 2000 2000. ISSN 0362-1642.

CRAIG, A.; BANDYOPADHYAY, P.; OLIVERA, B. Post-translationally modified neuropeptides from *Conus* venoms. **European Journal of Biochemistry**, v. 264, n. 2, p. 271-275, SEP 1999 1999. ISSN 0014-2956.

CRAIG, A. et al. Contulakin-G, an O-glycosylated invertebrate neurotensin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 20, p. 13752-13759, MAY 14 1999 1999. ISSN 0021-9258.

CROSLAND, R. EFFECT OF CHLOROQUINE ON TOXICITY IN MICE OF THE VENOM AND NEUROTOXINS FROM THE SNAKE BUNGARUS-MULTICINCTUS. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 246, n. 3, p. 992-995, SEP 1988 1988. ISSN 0022-3565.

CRUZ, L. et al. INVERTEBRATE VASOPRESSIN OXYTOCIN HOMOLOGS - CHARACTERIZATION OF PEPTIDES FROM *CONUS-GEOGRAPHUS* AND *CONUS-STRIATUS* VENOMS. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 33, p. 15821-15824, NOV 25 1987 1987. ISSN 0021-9258.

CRUZ, L.; GRAY, W.; OLIVERA, B. PURIFICATION AND PROPERTIES OF A MYOTOXIN FROM CONUS-GEOGRAPHUS VENOM. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 190, n. 2, p. 539-548, 1978 1978. ISSN 0003-9861.

CRUZ, L. et al. CONUS-GEOGRAPHUS TOXINS THAT DISCRIMINATE BETWEEN NEURONAL AND MUSCLE SODIUM-CHANNELS. **Journal of Biological Chemistry**, v. 260, n. 16, p. 9280-9288, 1985 1985. ISSN 0021-9258.

_____. CONUS VENOMS - A RICH SOURCE OF NEUROACTIVE PEPTIDES. **Journal of Toxicology-Toxin Reviews**, v. 4, n. 2, p. 107-132, 1985 1985. ISSN 0731-3837.

CUSHMAN, D.; ONDETTI, M. HISTORY OF THE DESIGN OF CAPTOPRIL AND RELATED INHIBITORS OF ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME. **Hypertension**, v. 17, n. 4, p. 589-592, APR 1991 1991. ISSN 0194-911X.

DA SILVA, D. et al. Characterization of a new muscarinic toxin from the venom of the Brazilian coral snake *Micrurus lemniscatus* in rat hippocampus. **Life Sciences**, v. 89, n. 25-26, p. 931-938, DEC 19 2011 2011. ISSN 0024-3205.

DAGGETT, V.; FERSHT, A. Is there a unifying mechanism for protein folding? **Trends in Biochemical Sciences**, v. 28, n. 1, p. 18-25, JAN 2003 2003. ISSN 0968-0004.

DALY, N.; CRAIK, D. Structural Studies of Conotoxins. **Iubmb Life**, v. 61, n. 2, p. 144-150, FEB 2009 2009. ISSN 1521-6543.

DATASUS, M. D. S. ACIDENTE POR ANIMAIS PEÇONHENTOS - Notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net. 2015. Disponível em: < <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/animaisp/bases/animaisbrnet.def> >.

DAVE, K.; LAHIRY, A. Conotoxins: Review and Docking Studies to determine potentials of Conotoxin as an Anticancer Drug Molecule. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 8, p. 845-851, APR 2012 2012. ISSN 1568-0266.

DAVIS, J.; JONES, A.; LEWIS, R. Remarkable inter- and intra-species complexity of conotoxins revealed by LC/MS. **Peptides**, v. 30, n. 7, p. 1222-1227, JUL 2009 2009. ISSN 0196-9781.

DE ROODT AR ; LAGO NR ; RP, S. **Myotoxicity and nephrotoxicity by *Micrurus* venoms in experimental envenomation.** *Toxicon*. 59 2012.

DEGORCE, F. et al. HTRF: A Technology Tailored for Drug Discovery – A Review of Theoretical Aspects and Recent Applications. **Current Chemical Genomics**, v. 3, p. 22-32, 2009 May 28 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2802762/> >.

DEWEILLE, J. et al. CALCISEPTINE, A PEPTIDE ISOLATED FROM BLACK MAMBA VENOM, IS A SPECIFIC BLOCKER OF THE L-TYPE CALCIUM-CHANNEL. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 6, p. 2437-2440, MAR 1991 1991. ISSN 0027-8424.

DIOCHOT, S. et al. Black mamba venom peptides target acid-sensing ion channels to abolish pain. **Nature**, v. 490, n. 7421, p. 552+, OCT 25 2012 2012. ISSN 0028-0836.

DUCANCEL, F. et al. AMINO-ACID-SEQUENCE OF A MUSCARINIC TOXIN DEDUCED FROM THE CDNA NUCLEOTIDE-SEQUENCE. **Toxicon**, v. 29, n. 4-5, p. 516-520, 1991 1991. ISSN 0041-0101.

DUFTON, M.; HIDER, R. STRUCTURE AND PHARMACOLOGY OF ELAPID CYTOTOXINS. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 36, n. 1, p. 1-&, 1988 1988. ISSN 0163-7258.

DUTERTRE, S. Venomics in medicinal chemistry Foreword. **Future Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 15, p. 1609-1610, 2014. ISSN 1756-8919. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000346694500001 >.

DUTERTRE, S. et al. Isolation and characterisation of conomap-Vt, a D-amino acid containing excitatory peptide from the venom of a vermivorous cone snail. **Febs Letters**, v. 580, n. 16, p. 3860-3866, JUL 10 2006 2006. ISSN 0014-5793.

DUTERTRE, S.; NICKE, A.; LEWIS, R. beta 2 subunit contribution to 4/7 alpha-conotoxin binding to the nicotinic acetylcholine receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 34, p. 30460-30468, AUG 26 2005 2005. ISSN 0021-9258.

DUTERTRE, S. et al. AChBP-targeted alpha-conotoxin correlates distinct binding orientations with nAChR subtype selectivity. **Embo Journal**, v. 26, n. 16, p. 3858-3867, AUG 22 2007 2007. ISSN 0261-4189.

DUTTON, J. et al. A new level of conotoxin diversity, a non-native disulfide bond connectivity in alpha-conotoxin AuIB reduces structural definition but increases biological activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 50, p. 48849-48857, DEC 13 2002 2002. ISSN 0021-9258.

DUTTON, J.; CRAIK, D. alpha-conotoxins: Nicotinic acetylcholine receptor antagonists as pharmacological tools and potential drug leads. **Current Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 327-344, MAR 2001 2001. ISSN 0929-8673.

EGLIN, R. M. **Muscarinic Receptor Subtype Pharmacology and Physiology**: Progress in Medical Chemistry. 43: 105-136 p. 2005.

EISELE, J. et al. CHIMERIC NICOTINIC SEROTONERGIC RECEPTOR COMBINES DISTINCT LIGAND-BINDING AND CHANNEL SPECIFICITIES. **Nature**, v. 366, n. 6454, p. 479-483, DEC 2 1993 1993. ISSN 0028-0836.

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-&, 1987 1987. ISSN 0163-7258.

_____. Structure-function relationship of postsynaptic neurotoxins from snake venoms. In: HARVEY, A. L. (Ed.). **Harvey, A.L.**: Pergamon Press 1991. p.165–222.

ENGLAND, L. et al. Inactivation of a serotonin-gated ion channel by a polypeptide toxin from marine snails. **Science**, v. 281, n. 5376, p. 575-578, JUL 24 1998 1998. ISSN 0036-8075.

ESSACK, M.; BAJIC, V.; ARCHER, J. Conotoxins that Confer Therapeutic Possibilities. **Marine Drugs**, v. 10, n. 6, p. 1244-1265, JUN 2012 2012. ISSN 1660-3397.

FAINZILBER, M. et al. MOLLUSK-SPECIFIC TOXINS FROM THE VENOM OF CONUS-TEXTILE-NEOVICARIUS. **European Journal of Biochemistry**, v. 202, n. 2, p. 589-595, DEC 5 1991 1991. ISSN 0014-2956.

_____. gamma-conotoxin-PnVIIA, a gamma-carboxyglutamate-containing peptide agonist of neuronal pacemaker cation currents. **Biochemistry**, v. 37, n. 6, p. 1470-1477, FEB 10 1998 1998. ISSN 0006-2960.

FERNANDEZ, J. et al. Venomic and Antivenomic Analyses of the Central American Coral Snake, *Micrurus nigrocinctus* (Elapidae). **Journal of Proteome Research**, v. 10, n. 4, p. 1816-1827, APR 2011 2011. ISSN 1535-3893.

FERREIRA, S. A BRADYKININ-POTENTIATING FACTOR (BPF) PRESENT IN VENOM OF BOTHROPS JARARACA. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 24, n. 1, p. 163-&, 1965 1965. ISSN 0007-1188.

FRANCIS, B. et al. Toxins isolated from the venom of the Brazilian coral snake (*Micrurus frontalis frontalis*) include hemorrhagic type phospholipases A(2) and postsynaptic neurotoxins. **Toxicon**, v. 35, n. 8, p. 1193-1203, AUG 1997 1997. ISSN 0041-0101.

FRUCHART-GAILLARD, C. et al. Engineering of Three-Finger Fold Toxins Creates Ligands with Original Pharmacological Profiles for Muscarinic and Adrenergic Receptors. **Plos One**, v. 7, n. 6, JUN 14 2012 2012. ISSN 1932-6203.

_____. How three-finger-fold toxins interact with various cholinergic receptors. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 30, n. 1-2, p. 7-8, 2006 2006. ISSN 0895-8696.

FRY, B. et al. Evolution of an arsenal. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 7, n. 2, p. 215-246, FEB 2008 2008. ISSN 1535-9476.

GASIOR, M.; WHITE, N.; ROGAWSKI, M. Prolonged attenuation of amygdala-kindled seizure measures in rats by convection-enhanced delivery of the n-type calcium channel antagonists omega-conotoxin GVIA and omega-conotoxin MVIIA. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 323, n. 2, p. 458-468, NOV 2007 2007. ISSN 0022-3565.

GEHRMANN, J.; ALEWOOD, P.; CRAIK, D. Structure determination of the three disulfide bond isomers of alpha-conotoxin GI: A model for the role of disulfide bonds in structural stability. **Journal of Molecular Biology**, v. 278, n. 2, p. 401-415, MAY 1 1998 1998. ISSN 0022-2836.

GILLES, N.; SERVENT, D. The European FP7 Venomics Project. **Future Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 15, p. 1611-1612, 2014 2014. ISSN 1756-8919.

GOTTI, C. et al. Structural and functional diversity of native brain neuronal nicotinic receptors. **Biochemical Pharmacology**, v. 78, n. 7, p. 703-711, OCT 1 2009 2009. ISSN 0006-2952.

GOTTI, C.; ZOLI, M.; CLEMENTI, F. Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 27, n. 9, p. 482-491, SEP 2006 2006. ISSN 0165-6147.

GRAY, W. et al. PEPTIDE TOXINS FROM CONUS-GEOGRAPHUS VENOM. **Journal of Biological Chemistry**, v. 256, n. 10, p. 4734-4740, 1981 1981. ISSN 0021-9258.

_____. CONTOXIN GI - DISULFIDE BRIDGES, SYNTHESIS, AND PREPARATION OF IODINATED DERIVATIVES. **Biochemistry**, v. 23, n. 12, p. 2796-2802, 1984 1984. ISSN 0006-2960.

GRAY, W.; OLIVERA, B.; CRUZ, L. PEPTIDE TOXINS FROM VENOMOUS CONUS SNAILS. **Annual Review of Biochemistry**, v. 57, p. 665-700, 1988 1988. ISSN 0066-4154.

GREENWALD, R. et al. Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, n. 2, p. 217-250, FEB 10 2003 2003. ISSN 0169-409X.

GRUTTER, T.; CHANGEUX, J. Nicotinic receptors in wonderland. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 26, n. 8, p. 459-463, AUG 2001 2001. ISSN 0968-0004.

GUTIERREZ, J. et al. EXPERIMENTAL MYONECROSIS INDUCED BY THE VENOMS OF SOUTH-AMERICAN MICRURUS (CORAL SNAKES). **Toxicon**, v. 30, n. 10, p. 1299-1302, OCT 1992 1992. ISSN 0041-0101.

GUTMAN, Y.; LAZAROVICI, P. **Toxins and Signal Transduction**. The Netherland by Harwood Academic Publishers, 1997.

HALAI, R.; CRAIK, D. Conotoxins: natural product drug leads. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 4, p. 526-536, 2009 2009. ISSN 0265-0568.

HAMMAN, J.; ENSLIN, G.; KOTZE, A. Oral delivery of peptide drugs - Barriers and developments. **Biodrugs**, v. 19, n. 3, p. 165-177, 2005 2005. ISSN 1173-8804.

HAN, T. et al. Conus venoms - A rich source of peptide-based therapeutics. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, n. 24, p. 2462-2479, AUG 2008 2008. ISSN 1381-6128.

HAN, Y. et al. Purification and structural characterization of a D-amino acid-containing conopeptide, conomarphin, from *Conus marmoreus*. **Febs Journal**, v. 275, n. 9, p. 1976-1987, MAY 2008 2008. ISSN 1742-464X.

HANSEN, S. et al. Structural and ligand recognition characteristics of an acetylcholine-binding protein from *Aplysia californica*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 23, p. 24197-24202, JUN 4 2004 2004. ISSN 0021-9258.

HARVEY, A. Twenty years of dendrotoxins. **Toxicon**, v. 39, n. 1, p. 15-26, JAN 2001 2001. ISSN 0041-0101.

HARVEY, A. et al. Effects of muscarinic toxins MT1 and MT2 from green mamba on different muscarinic cholinergic receptors. **Neurochemical Research**, v. 27, n. 11, p. 1543-1554, NOV 2002 2002. ISSN 0364-3190.

HAWGOOD, B. The marine biologist - Bob Endean. **Toxicon**, v. 48, n. 7, p. 768-779, DEC 1 2006 2006. ISSN 0041-0101.

HAYDAR, S.; DUNLOP, J. Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors - Targets for the Development of Drugs to Treat Cognitive Impairment Associated with Schizophrenia and Alzheimer's Disease. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 2, p. 144-152, FEB 2010 2010. ISSN 1568-0266.

HE, Q. et al. The Venom Gland Transcriptome of *Latrodectus tredecimguttatus* Revealed by Deep Sequencing and cDNA Library Analysis. **Plos One**, v. 8, n. 11, NOV 28 2013 2013. ISSN 1932-6203.

HECK, S. et al. Posttranslational amino acid epimerization: Enzyme-catalyzed isomerization of amino acid residues in peptide chains. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 9, p. 4036-4039, APR 30 1996 1996. ISSN 0027-8424.

HILL, J.; NGHIEM, H.; CHANGEUX, J. SERINE-SPECIFIC PHOSPHORYLATION OF NICOTINIC RECEPTOR ASSOCIATED 43K-PROTEIN. **Biochemistry**, v. 30, n. 22, p. 5579-5585, JUN 4 1991 1991. ISSN 0006-2960.

HU, H. et al. Elucidation of the molecular envenomation strategy of the cone snail *Conus geographus* through transcriptome sequencing of its venom duct. **Bmc Genomics**, v. 13, JUN 28 2012 2012. ISSN 1471-2164.

ICHIDA, S. et al. Characteristics of the inhibitory effect of calmodulin on specific [I-125]omega-conotoxin GVIA binding to crude membranes from chick brain. **Neurochemical Research**, v. 25, n. 12, p. 1629-1635, DEC 2000 2000. ISSN 0364-3190.

IMPERIAL, J. et al. Tyrosine-rich conopeptides affect voltage-gated K⁺ channels. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 34, p. 23026-23032, AUG 22 2008 2008. ISSN 0021-9258.

ISHII, M.; KURACHI, Y. Muscarinic acetylcholine receptors. **Current Pharmaceutical Design**, v. 12, n. 28, p. 3573-3581, 2006 2006. ISSN 1381-6128.

JERUSALINSKY, D. et al. A PEPTIDE MUSCARINIC TOXIN FROM THE GREEN MAMBA VENOM SHOWS AGONIST-LIKE ACTION IN AN INHIBITORY AVOIDANCE-LEARNING TASK. **European Journal of Pharmacology**, v. 240, n. 1, p. 103-105, AUG 10 1993 1993. ISSN 0014-2999.

JERUSALINSKY, D.; HARVEY, A. TOXINS FROM MAMBA VENOMS - SMALL PROTEINS WITH SELECTIVITIES FOR DIFFERENT SUBTYPES OF MUSCARINIC ACETYLCHOLINE-RECEPTORS. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 15, n. 11, p. 424-430, NOV 1994 1994. ISSN 0165-6147.

JERUSALINSKY, D. et al. Muscarinic toxins: novel pharmacological tools for the muscarinic cholinergic system. **Toxicon**, v. 38, n. 6, p. 747-761, JUN 2000 2000. ISSN 0041-0101.

_____. MUSCARINIC TOXINS FROM THE VENOM OF DENDROASPIS SNAKES WITH AGONIST-LIKE ACTIONS. **Toxicon**, v. 33, n. 4, p. 389-397, APR 1995 1995. ISSN 0041-0101.

JIANG, M.; HAGGBLAD, J.; HEILBRONN, E. ISOLATION AND PHARMACOLOGICAL CHARACTERIZATION OF A NEW ALPHA-NEUROTOXIN (ALPHA-AGTX) FROM VENOM OF THE VIPER AGKISTRODON-HALYS (PALLAS). **Toxicon**, v. 25, n. 9, p. 1019-1022, 1987 1987. ISSN 0041-0101.

JIMENEZ, E. et al. Contryphan is a D-tryptophan-containing Conus peptide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 45, p. 28002-28005, NOV 8 1996 1996. ISSN 0021-9258.

JOLKKONEN, M. et al. MUSCARINIC TOXINS FROM THE BLACK MAMBA DENDROASPIS-POLYLEPIS. **European Journal of Biochemistry**, v. 234, n. 2, p. 579-585, DEC 1 1995 1995. ISSN 0014-2956.

JOUBERT, F. THE AMINO-ACID SEQUENCE OF PROTEIN CM-3 FROM DENDROASPIS-POLYLEPIS-POLYLEPIS (BLACK MAMBA) VENOM. **International Journal of Biochemistry**, v. 17, n. 6, p. 695-699, 1985 1985. ISSN 0020-711X.

KAAS, Q.; WESTERMANN, J. C.; CRAIK, D. J. Conopeptide characterization and classifications: An analysis using ConoServer. **Toxicon**, v. 55, n. 8, p. 1491-1509, Jul 2010. ISSN 0041-0101. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000278674400009 >.

KAAS, Q. et al. ConoServer, a database for conopeptide sequences and structures. **Bioinformatics**, v. 24, n. 3, p. 445-446, Feb 2008. ISSN 1367-4803. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000252903700027 >.

_____. ConoServer: updated content, knowledge, and discovery tools in the conopeptide database. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. D1, p. D325-D330, Jan 2012. ISSN 0305-1048. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000298601300048 >.

KARLIN, A. Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3, n. 2, p. 102-114, FEB 2002 2002. ISSN 1471-0048.

KARLSSON, E. **Snake Venoms**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1979.

KARLSSON, E. et al. Snake toxins with high selectivity for subtypes of muscarinic acetylcholine receptors. **Biochimie**, v. 82, n. 9-10, p. 793-806, SEP-OCT 2000 2000. ISSN 0300-9084.

KERN, S. et al. The pharmacokinetics of the conopeptide Contulakin-G (CGX-1160) after intrathecal administration: An analysis of data from studies in beagles. **Anesthesia and Analgesia**, v. 104, n. 6, p. 1514-1520, JUN 2007 2007. ISSN 0003-2999.

KERR, L.; YOSHIKAMI, D. A VENOM PEPTIDE WITH A NOVEL PRESYNAPTIC BLOCKING ACTION. **Nature**, v. 308, n. 5956, p. 282-284, 1984 1984. ISSN 0028-0836.

KESSLER, P. et al. The three-finger toxin fold: a multifunctional structural scaffold able to modulate cholinergic functions. **Journal of Neurochemistry**, v. 142, p. 7-18, AUG 2017 2017. ISSN 0022-3042.

KING, G. Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 11, n. 11, p. 1469-1484, NOV 2011 2011. ISSN 1471-2598.

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, SEP 2002 2002. ISSN 0305-1870.

KINI, R.; DOLEY, R. Structure, function and evolution of three-finger toxins: Mini proteins with multiple targets. **Toxicon**, v. 56, n. 6, p. 855-867, NOV 2010 2010. ISSN 0041-0101.

KOBAYASHI, J. et al. ISOLATION OF EBURNETOXIN, A VASOACTIVE SUBSTANCE FROM THE CONUS-EBURNEUS VENOM. **Life Sciences**, v. 31, n. 11, p. 1085-1091, 1982 1982. ISSN 0024-3205.

_____. TESSULATOXIN, THE VASOACTIVE PROTEIN FROM THE VENOM OF THE MARINE SNAIL CONUS-TESSULATUS. **Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology**, v. 74, n. 3, p. 381-384, 1983 1983. ISSN 0305-0491.

KOHN, A. THE ECOLOGY OF CONUS IN HAWAII. **Ecological Monographs**, v. 29, n. 1, p. 47-90, 1959 1959. ISSN 0012-9615.

KOHN, A.; NYBAKKEN, J. ECOLOGY OF CONUS ON EASTERN INDIAN-OCEAN FRINGING REEFS - DIVERSITY OF SPECIES AND RESOURCE UTILIZATION. **Marine Biology**, v. 29, n. 3, p. 211-234, 1975 1975. ISSN 0025-3162.

KORDIS, D.; GUBENEK, F. Adaptive evolution of animal toxin multigene families. **Gene**, v. 261, n. 1, p. 43-52, DEC 30 2000 2000. ISSN 0378-1119.

KRIEGER, F. et al. Fluorescent agonists for the torpedo nicotinic acetylcholine receptor. **Chembiochem**, v. 9, n. 7, p. 1146-1153, MAY 5 2008 2008. ISSN 1439-4227.

KUHN, P. et al. The atomic resolution structure of bucandin, a novel toxin isolated from the Malayan krait, determined by direct methods (vol D56, pg 1401, 2000). **Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography**, v. 56, p. 1702-1702, DEC 2000 2000. ISSN 0907-4449.

KUKHTINA, V. et al. Muscarinic toxin-like proteins from cobra venom. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 23, p. 6784-6789, DEC 2000 2000. ISSN 0014-2956.

- LAHIANI, A.; YAVIN, E.; LAZAROVICI, P. The Molecular Basis of Toxins' Interactions with Intracellular Signaling via Discrete Portals. **Toxins**, v. 9, n. 3, MAR 2017 2017. ISSN 2072-6651.
- LANGMEAD, C.; WATSON, J.; REAVILL, C. Muscarinic acetylcholine receptors as CNS drug targets. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 117, n. 2, p. 232-243, FEB 2008 2008. ISSN 0163-7258.
- LAURIDSEN, L. et al. Toxicovenomics and antivenom profiling of the Eastern green mamba snake (*Dendroaspis angusticeps*). **Journal of Proteomics**, v. 136, p. 248-261, MAY 16 2016 2016. ISSN 1874-3919.
- LEBBE, E. K. M. et al. Conotoxins Targeting Nicotinic Acetylcholine Receptors: An Overview. **Marine Drugs**, v. 12, n. 5, p. 2970-3004, May 2014. ISSN 1660-3397. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000337160500035 >.
- LEE, C. CHEMISTRY AND PHARMACOLOGY OF POLYPEPTIDE TOXINS IN SNAKE-VENOMS. **Annual Review of Pharmacology**, v. 12, p. 265-, 1972 1972.
- LEWIS, A. et al. Oxidation increases the strength of the methionine-aromatic interaction. **Nature Chemical Biology**, v. 12, n. 10, p. 860-, OCT 2016 2016. ISSN 1552-4450.
- LEWIS, R. et al. Conus Venom Peptide Pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 64, n. 2, p. 259-298, APR 2012 2012. ISSN 0031-6997.
- LIVETT, B. et al. Therapeutic applications of conotoxins that target the neuronal nicotinic acetylcholine receptor. **Toxicon**, v. 48, n. 7, p. 810-829, DEC 1 2006 2006. ISSN 0041-0101.
- LOMONTE, B. et al. Venom of the Coral Snake *Micrurus clarki*: Proteomic Profile, Toxicity, Immunological Cross-Neutralization, and Characterization of a Three-Finger Toxin. **Toxins**, v. 8, n. 5, MAY 2016 2016. ISSN 2072-6651.
- LOVELACE, E. et al. Cyclic MrIA: A stable and potent cyclic conotoxin with a novel topological fold that targets the norepinephrine transporter. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 22, p. 6561-6568, NOV 2 2006 2006. ISSN 0022-2623.
- LOWRY, O. et al. PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951 1951. ISSN 0021-9258.
- LUBBERS, N. et al. Postischemic administration of CGX-1051, a peptide from cone snail venom, reduces infarct size in both rat and dog models of myocardial ischemia and reperfusion. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 46, n. 2, p. 141-146, AUG 2005 2005. ISSN 0160-2446.
- MACHADO, A. et al. Chemical and enzymatic peptide syntheses: Basic aspects and applications. **Quimica Nova**, v. 27, n. 5, p. 781-789, SEP-OCT 2004 2004. ISSN 0100-4042.
- MAIGA, A. et al. Crystallization of recombinant green mamba rho-Da1a toxin during a lyophilization procedure and its structure determination. **Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 69, p. 704-709, JUN 2013 2013. ISSN 1744-3091.
- MAILLO, M. et al. Conorfamide, a Conus venom peptide belonging to the RFamide family of neuropeptides. **Toxicon**, v. 40, n. 4, p. 401-407, APR 2002 2002. ISSN 0041-0101.
- MASSILIA, G. et al. Contryphan-Vn: a modulator of Ca²⁺-dependent K⁺ channels. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 303, n. 1, p. 238-246, MAR 28 2003 2003. ISSN 0006-291X.

MCDOWELL, R. et al. MAMBIN, A POTENT GLYCOPROTEIN-IIB-III A ANTAGONIST AND PLATELET-AGGREGATION INHIBITOR STRUCTURALLY RELATED TO THE SHORT NEUROTOXINS. **Biochemistry**, v. 31, n. 20, p. 4766-4772, MAY 26 1992 1992. ISSN 0006-2960.

MCINTOSH, J. et al. PRESENCE OF SEROTONIN IN THE VENOM OF CONUS-IMPERIALIS. **Toxicon**, v. 31, n. 12, p. 1561-1566, DEC 1993 1993. ISSN 0041-0101.

_____. CONODIPINE-M, A NOVEL PHOSPHOLIPASE-A(2) ISOLATED FROM THE VENOM OF THE MARINE SNAIL CONUS-MAGUS. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 8, p. 3518-3526, FEB 24 1995 1995. ISSN 0021-9258.

MCINTOSH, J.; SANTOS, A.; OLIVERA, B. Conus peptides targeted to specific nicotinic acetylcholine receptor subtypes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 68, p. 59-88, 1999 1999. ISSN 0066-4154.

MCMANUS, O.; MUSICK, J. POSTSYNAPTIC BLOCK OF FROG NEUROMUSCULAR-TRANSMISSION BY CONOTOXIN GI. **Journal of Neuroscience**, v. 5, n. 1, p. 110-116, 1985 1985. ISSN 0270-6474.

MCMANUS, O.; MUSICK, J.; GONZALEZ, C. PEPTIDES ISOLATED FROM THE VENOM OF CONUS-GEOGRAPHUS BLOCK NEUROMUSCULAR-TRANSMISSION. **Neuroscience Letters**, v. 25, n. 1, p. 57-62, 1981 1981. ISSN 0304-3940.

MELGAREJO, A. R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: (Ed.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: SARVIER, 2003a. p.33-61.

_____. **Serpentes peçonhentas do Brasil. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo SARVIER: 33-61 p. 2003b.

MELROY-GREIF, W.; STITZEL, J.; EHRINGER, M. Nicotinic acetylcholine receptors: upregulation, age-related effects and associations with drug use. **Genes Brain and Behavior**, v. 15, n. 1, p. 89-107, JAN 2016 2016. ISSN 1601-1848.

MENA, E. et al. CONANTOKIN-G - A NOVEL PEPTIDE ANTAGONIST TO THE N-METHYL-D-ASPARTIC ACID (NMDA) RECEPTOR. **Neuroscience Letters**, v. 118, n. 2, p. 241-244, OCT 16 1990 1990. ISSN 0304-3940.

MENEZ, A. Functional architectures of animal toxins: A clue to drug design? **Toxicon**, v. 36, n. 11, p. 1557-1572, NOV 1998 1998. ISSN 0041-0101.

MENEZ, A.; STOCKLIN, R.; MEBS, D. 'Venomics' or: The venomous systems genome project. **Toxicon**, v. 47, n. 3, p. 255-259, MAR 2006 2006. ISSN 0041-0101.

MERRIFIELD, R. B. SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS .1. SYNTHESIS OF A TETRAPEPTIDE. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 14, p. 2149-&, 1963. ISSN 0002-7863. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A19633101B00025 >.

MILEDI, R.; PALMA, E.; EUSEBI, F. **Microtransplantation of Neurotransmitter Receptors From Cells to Xenopus Oocyte Membranes**. *Methods in Molecular Biology*, 2006. 9.

MIR, R. et al. Conotoxins: Structure, Therapeutic Potential and Pharmacological Applications. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, n. 5, p. 582-589, 2016. ISSN 1381-6128. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000372071200009 >.

MIRANDA, L.; ALEWOOD, P. Accelerated chemical synthesis of peptides and small proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 4, p. 1181-1186, FEB 16 1999 1999. ISSN 0027-8424.

MORDVINTSEV, D. et al. A model for short alpha-neurotoxin bound to nicotinic acetylcholine receptor from *Torpedo californica*: Comparison with long-chain alpha-neurotoxins and alpha-conotoxins. **Computational Biology and Chemistry**, v. 29, n. 6, p. 398-411, DEC 2005 2005. ISSN 1476-9271.

MOREIRA, K. 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, AUG 1 2010 2010. ISSN 0041-0101.

NAIMUDDIN, M. et al. Directed evolution of a three-finger neurotoxin by using cDNA display yields antagonists as well as agonists of interleukin-6 receptor signaling. **Molecular Brain**, v. 4, JAN 7 2011 2011. ISSN 1756-6606.

NAKAMURA, H. et al. THE OCCURRENCE OF ARACHIDONIC-ACID IN THE VENOM DUCT OF THE MARINE SNAIL CONUS-TEXTILE. **Experientia**, v. 38, n. 8, p. 897-897, 1982 1982. ISSN 0014-4754.

NAM, H. et al. Multiple genes elucidate the evolution of venomous snail-hunting *Conus* species. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 53, n. 3, p. 645-652, DEC 2009 2009. ISSN 1055-7903.

NASER, P. V.; KUNER, R. **Molecular, cellular and circuit basis of cholinergic modulation of pain: Neuroscience** 2017.

NGUYEN, B. **Etude et analyse de conopeptides de venins issus de cônes malacophages du Vietnam** 2014. 188 (PhD). Ecole Doctorale Sciences de la Nature et de l'Homme, MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE

NGUYEN, B. et al. Isolation, purification and functional characterization of alpha-BnIA from *Conus bandanus* venom. **Toxicon**, v. 91, p. 155-163, DEC 1 2014 2014. ISSN 0041-0101.

NIELSEN, C. et al. Anti-allodynic efficacy of the chi-conopeptide, Xen2174, in rats with neuropathic pain. **Pain**, v. 118, n. 1-2, p. 112-124, NOV 2005 2005. ISSN 0304-3959.

NIRTHANAN, S.; GWEE, M. Three-finger alpha-neurotoxins and the nicotinic acetylcholine receptor, forty years on. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 94, n. 1, p. 1-17, JAN 2004 2004. ISSN 1347-8613.

OBATA, H.; CONKLIN, D.; EISENACH, J. Spinal noradrenaline transporter inhibition by reboxetine and Xen2174 reduces tactile hypersensitivity after surgery in rats. **Pain**, v. 113, n. 3, p. 271-276, FEB 2005 2005. ISSN 0304-3959.

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. 1919-1932, MAY 2008 2008. ISSN 1615-9853.

OLIVEIRA, A. C.; GALLACCI, M. **Transmissao Neuromuscular Esqueletica. Aspectos Morfologicos Fisiologicos e Farmacologicos. MIASTENIA GRAVE**. ASSIS, J. L. D. São Paulo: SARVIER. 1: 121-159 p. 1990.

OLIVERA, B. *Conus* venom peptides: Reflections from the biology of clades and species. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 33, p. 25-47, 2002 2002. ISSN 0066-4162.

_____. Conus peptides: Biodiversity-based discovery and exogenomics. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 42, p. 31173-31177, OCT 20 2006 2006. ISSN 0021-9258.

OLIVERA, B. et al. NEURONAL CALCIUM-CHANNEL ANTAGONISTS - DISCRIMINATION BETWEEN CALCIUM-CHANNEL SUBTYPES USING OMEGA-CONOTOXIN FROM CONUS-MAGUS VENOM. **Biochemistry**, v. 26, n. 8, p. 2086-2090, APR 21 1987 1987. ISSN 0006-2960.

_____. CALCIUM-CHANNEL DIVERSITY AND NEUROTRANSMITTER RELEASE - THE OMEGA-CONOTOXINS AND OMEGA-AGATOXINS. **Annual Review of Biochemistry**, v. 63, p. 823-867, 1994 1994. ISSN 0066-4154.

_____. Subtype-selective conopeptides targeted to nicotinic receptors - Concerted discovery and biomedical applications. **Channels**, v. 2, n. 2, p. 143-152, MAR-APR 2008 2008. ISSN 1933-6950.

_____. DIVERSITY OF CONUS NEUROPEPTIDES. **Science**, v. 249, n. 4966, p. 257-263, JUL 20 1990 1990. ISSN 0036-8075.

ONUCHIC, J.; WOLYNES, P. Theory of protein folding. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 14, n. 1, p. 70-75, FEB 2004 2004. ISSN 0959-440X.

OPIE, L.; KOWOLIK, H. THE DISCOVERY OF CAPTOPRIL - FROM LARGE ANIMALS TO SMALL MOLECULES. **Cardiovascular Research**, v. 30, n. 1, p. 18-25, JUL 1995 1995. ISSN 0008-6363.

PAHARI, S.; MACKESSY, S.; KINI, R. 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, DEC 20 2007 2007. ISSN 1471-2199.

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. 29030-29041, SEP 29 2006 2006. ISSN 0021-9258.

PENG, C. et al. A new subfamily of conotoxins belonging to the A-superfamily. **Peptides**, v. 31, n. 11, p. 2009-2016, NOV 2010 2010. ISSN 0196-9781.

PETREL, C. et al. Identification, structural and pharmacological characterization of tau-CnVA, a conopeptide that selectively interacts with somatostatin sst(3) receptor. **Biochemical Pharmacology**, v. 85, n. 11, p. 1663-1671, JUN 1 2013 2013. ISSN 0006-2952.

PISAREWICZ, K. et al. Polypeptide chains containing D-gamma-hydroxyvaline. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 17, p. 6207-6215, MAY 4 2005 2005. ISSN 0002-7863.

POLZTEJERA, G.; SCHMIDT, J.; KARTEN, H. AUTORADIOGRAPHIC LOCALIZATION OF ALPHA-BUNGAROTOXIN-BINDING SITES IN CENTRAL NERVOUS-SYSTEM. **Nature**, v. 258, n. 5533, p. 349-351, 1975 1975. ISSN 0028-0836.

POTTER, L. Snake toxins that bind specifically to individual subtypes of muscarinic receptors. **Life Sciences**, v. 68, n. 22-23, p. 2541-2547, APR 27 2001 2001. ISSN 0024-3205.

PRADO, M.; MARCHOT, P.; SILMAN, I. Preface : Cholinergic Mechanisms. **Journal of Neurochemistry**, v. 142, p. 3-6, AUG 2017 2017. ISSN 0022-3042.

PRASHANTH, J.; LEWIS, R.; DUTERTRE, S. Towards an integrated venomomics approach for accelerated conopeptide discovery. **Toxicon**, v. 60, n. 4, p. 470-477, SEP 15 2012 2012. ISSN 0041-0101.

PULLANDRE, N. et al. Molecular Phylogeny, Classification and Evolution of Conopeptides. **Journal of Molecular Evolution**, v. 74, n. 5-6, p. 297-309, JUN 2012 2012. ISSN 0022-2844.

RAJAGOPALAN, N. et al. beta-Cardiotoxin: a new three-finger toxin from *Ophiophagus hannah* (king cobra) venom with beta-blocker activity. **Faseb Journal**, v. 21, n. 13, p. 3685-3695, NOV 2007 2007. ISSN 0892-6638.

RIGBY, A. et al. A conotoxin from *Conus textile* with unusual posttranslational modifications reduces presynaptic Ca²⁺ influx. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 10, p. 5758-5763, MAY 11 1999 1999. ISSN 0027-8424.

RIVERA-TORRES, I. et al. Discovery and characterisation of a novel toxin from *Dendroaspis angusticeps*, named Tx7335, that activates the potassium channel KcsA. **Scientific Reports**, v. 6, APR 5 2016 2016. ISSN 2045-2322.

ROBINSON, S. D.; NORTON, R. S. Conotoxin Gene Superfamilies. **Marine Drugs**, v. 12, n. 12, p. 6058-6101, Dec 2014. ISSN 1660-3397. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000346796500021 >.

ROCKEL et al. **Manual of the Living Conidae: Volume 1: Indo-Pacific Region**. Verlag Christa Hemmen, 1995. ISBN 3-925919-09-0.

RODRIGUEZ-DIAZ, R. et al. Alpha cells secrete acetylcholine as a non-neuronal paracrine signal priming beta cell function in humans. **Nature Medicine**, v. 17, n. 7, p. 888-U258, JUL 2011 2011. ISSN 1078-8956.

ROSAS-BALLINA, M. et al. Acetylcholine-Synthesizing T Cells Relay Neural Signals in a Vagus Nerve Circuit. **Science**, v. 334, n. 6052, p. 98-101, OCT 7 2011 2011. ISSN 0036-8075.

ROSSO, J. et al. MmTX1 and MmTX2 from Coral Snake Venom Potently Modulate GABA(A) Receptor Activity. **Biophysical Journal**, v. 108, n. 2, p. 434A-434A, JAN 27 2015 2015. ISSN 0006-3495.

ROY, A. et al. Cardiac acetylcholine inhibits ventricular remodeling and dysfunction under pathologic conditions. **Faseb Journal**, v. 30, n. 2, p. 688-701, FEB 2016 2016. ISSN 0892-6638.

_____. CARDIOMYOCYTE- SECRETED ACETYLCHOLINE IS REQUIRED FOR MAINTENANCE OF HOMEOSTASIS IN THE HEART. **Cardiology**, v. 125, p. 129-129, 2013 2013. ISSN 0008-6312.

RUBIO-ALIAGA, I.; DANIEL, H. Mammalian peptide transporters as targets for drug delivery. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 23, n. 9, p. 434-440, SEP 2002 2002. ISSN 0165-6147.

SAFAVI-HEMAMI, H. et al. Combined Proteomic and Transcriptomic Interrogation of the Venom Gland of *Conus geographus* Uncovers Novel Components and Functional Compartmentalization*. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 13, n. 4, p. 938-953, APR 2014 2014. ISSN 1535-9476.

SAFO, P. et al. Distinction among neuronal subtypes of voltage-activated sodium channels by mu-conotoxin PIIIA. **Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 1, p. 76-80, JAN 1 2000 2000. ISSN 0270-6474.

SANDS, S.; COSTA, A.; PATRICK, J. BARIUM PERMEABILITY OF NEURONAL NICOTINIC RECEPTOR-ALPHA-7 EXPRESSED IN XENOPUS-OOCYTES. **Biophysical Journal**, v. 65, n. 6, p. 2614-2621, DEC 1993 1993. ISSN 0006-3495.

SANTOS, A. D. et al. The A-superfamily of conotoxins - Structural and functional divergence. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 17, p. 17596-17606, Apr 2004. ISSN 0021-9258. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000220870400088 >.

SANZ, L. et al. Venomic Analysis of the Poorly Studied Desert Coral Snake, *Micrurus tschudii tschudii*, Supports the 3FTx/PLA(2) Dichotomy across *Micrurus* Venoms. **Toxins**, v. 8, n. 6, JUN 2016 2016. ISSN 2072-6651.

SARGENT, P. THE DIVERSITY OF NEURONAL NICOTINIC ACETYLCHOLINE-RECEPTORS. **Annual Review of Neuroscience**, v. 16, p. 403-443, 1993 1993. ISSN 0147-006X.

SAZIMA, I.; ABE, A. S. **Habits of five Brazilian snakes with coral-snake pattern including a summary of defensive tactics**: Studies on Neotropical Fauna and Environment. 26: 159-164 p. 1991.

SCARR, E. Muscarinic Receptors: Their Roles in Disorders of the Central Nervous System and Potential as Therapeutic Targets. **Cns Neuroscience & Therapeutics**, v. 18, n. 5, p. 369-379, 2012 2012. ISSN 1755-5930.

SERVENT, D. et al. Molecular characterization of the specificity of interactions of various neurotoxins on two distinct nicotinic acetylcholine receptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 393, n. 1-3, p. 197-204, MAR 30 2000 2000. ISSN 0014-2999.

_____. Muscarinic toxins. **Toxicon**, v. 58, n. 6-7, p. 455-463, NOV 2011 2011. ISSN 0041-0101.

SERVENT, D.; FRUCHART-GAILLARD, C. Muscarinic toxins: tools for the study of the pharmacological and functional properties of muscarinic receptors. **Journal of Neurochemistry**, v. 109, n. 5, p. 1193-1202, JUN 2009 2009. ISSN 0022-3042.

SERVENT, D.; MENEZ, A. Snake neurotoxins that interact with nicotinic acetylcholine receptors. In: EJ, M. (Ed.). **Handbook of neurotoxicology** Humana Press, v.2, 2001. p.594. ISBN 1592591655, 9781592591657.

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. 24279-24286, SEP 26 1997 1997. ISSN 0021-9258.

SHAHLAIE, K. et al. Neuroprotective Effects of Selective N-Type VGCC Blockade on Stretch-Injury-Induced Calcium Dynamics in Cortical Neurons. **Journal of Neurotrauma**, v. 27, n. 1, p. 175-187, JAN 2010 2010. ISSN 0897-7151.

SHARMAN, J. et al. IUPHAR-DB: updated database content and new features. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D1083-D1088, JAN 2013 2013. ISSN 0305-1048.

SHARPE, I. et al. Two new classes of conopeptides inhibit the alpha 1-adrenoceptor and noradrenaline transporter. **Nature Neuroscience**, v. 4, n. 9, p. 902-907, SEP 2001 2001. ISSN 1097-6256.

SHER, E. et al. SPECIFICITY OF CALCIUM-CHANNEL AUTOANTIBODIES IN LAMBERT-EATON MYASTHENIC SYNDROME. **Lancet**, v. 2, n. 8664, p. 640-643, SEP 16 1989 1989. ISSN 0140-6736.

SILVA, M. C. **Investigação da atividade muscarínica do veneno da serpente *Micrurus lemniscatus* (Linnaeus, 1758) em óleo isolado de cobraia.** 2013. 120 (Dissertação (Mestrado)). Departamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade Federal de Minas Gerais, Biblioteca.

SLOWINSKI, J. A PHYLOGENETIC ANALYSIS OF THE NEW-WORLD CORAL SNAKES (ELAPIDAE, LEPTOMICRURUS, MICRUROIDES, AND MICRURUS) BASED ON ALLOZYMIC AND MORPHOLOGICAL CHARACTERS. **Journal of Herpetology**, v. 29, n. 3, p. 325-338, SEP 1995 1995. ISSN 0022-1511.

SMIT, A. et al. A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission. **Nature**, v. 411, n. 6835, p. 261-268, MAY 17 2001 2001. ISSN 0028-0836.

STANLEY, T. et al. Identification of a vitamin K-dependent carboxylase in the venom duct of a *Conus* snail. **Febs Letters**, v. 407, n. 1, p. 85-88, APR 21 1997 1997. ISSN 0014-5793.

STROUD, R.; MCCARTHY, M.; SHUSTER, M. NICOTINIC ACETYLCHOLINE-RECEPTOR SUPERFAMILY OF LIGAND-GATED ION CHANNELS. **Biochemistry**, v. 29, n. 50, p. 11009-11023, DEC 18 1990 1990. ISSN 0006-2960.

SUNAGAR, K. et al. Three-Fingered RAVERS: Rapid Accumulation of Variations in Exposed Residues of Snake Venom Toxins. **Toxins**, v. 5, n. 11, p. 2172-2208, NOV 2013 2013. ISSN 2072-6651.

TALY, A. et al. Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, n. 9, p. 733-750, SEP 2009 2009. ISSN 1474-1776.

TAN, P. T. J.; KHAN, A. M.; BRUSIC, V. **Bioinformatics for venom and toxin sciences: BRIEFINGS IN BIOINFORMATICS. VOL 4.:** 53-62 p. 2003.

TANAKA, G. 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, MAR 2010 2010. ISSN 1935-2735.

TEICHERT, R. et al. Discovery and characterization of the short kappa A-conotoxins: A novel subfamily of excitatory conotoxins. **Toxicon**, v. 49, n. 3, p. 318-328, MAR 1 2007 2007. ISSN 0041-0101.

TERLAU, H.; OLIVERA, B. *Conus* venoms: A rich source of novel ion channel-targeted peptides. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 1, p. 41-68, JAN 2004 2004. ISSN 0031-9333.

TERLAU, H. et al. Strategy for rapid immobilization of prey by a fish-hunting marine snail. **Nature**, v. 381, n. 6578, p. 148-151, MAY 9 1996 1996. ISSN 0028-0836.

THAYER, A. IMPROVING PEPTIDES. **Chemical & Engineering News**, v. 89, n. 22, p. 13-+, MAY 30 2011 2011. ISSN 0009-2347.

TSETLIN, V. Snake venom alpha-neurotoxins and other 'three-finger' proteins. **European Journal of Biochemistry**, v. 264, n. 2, p. 281-286, SEP 1999 1999. ISSN 0014-2956.

ULENS, C. et al. Structural determinants of selective alpha-conotoxin binding to a nicotinic acetylcholine receptor homolog AChBP. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 10, p. 3615-3620, MAR 7 2006 2006. ISSN 0027-8424.

UTKIN, Y. Three-finger toxins, a deadly weapon of elapid venom - Milestones of discovery. **Toxicon**, v. 62, p. 50-55, FEB 2013 2013. ISSN 0041-0101.

VALDEZ-VELAZQUEZ, L. et al. Mass Fingerprinting of the Venom and Transcriptome of Venom Gland of Scorpion *Centruroides tecomanus*. **Plos One**, v. 8, n. 6, JUN 20 2013 2013. ISSN 1932-6203.

VENTURA, A. L. M. et al. **Cholinergic system: revisiting receptors, regulation and the relationship with Alzheimer disease, schizophrenia, epilepsy and smoking**. São Paulo: Rev. psiquiatr. clín. 37 2010.

VIOLETTE, A. et al. Large-scale discovery of conopeptides and conoproteins in the injectable venom of a fish-hunting cone snail using a combined proteomic and transcriptomic approach. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 17, p. 5215-5225, SEP 18 2012 2012. ISSN 1874-3919.

VITT, L. The venomous reptiles of the western hemisphere. **Science**, v. 305, n. 5681, p. 182-182, JUL 9 2004 2004. ISSN 0036-8075.

VONK, F. et al. The king cobra genome reveals dynamic gene evolution and adaptation in the snake venom system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 51, p. 20651-20656, DEC 17 2013 2013. ISSN 0027-8424.

WALKER, C. S. et al. The T-superfamily of conotoxins. (vol 274, pg 30664, 1999). **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 50, p. 36030-36030, Dec 1999. ISSN 0021-9258. Disponível em: <Go to ISI>://WOS:000084187900107 >.

WANG, C. et al. Isolation and Structural and Pharmacological Characterization of alpha-Elapitoxin-Dpp2d, an Amidated Three Finger Toxin from Black Mamba Venom. **Biochemistry**, v. 53, n. 23, p. 3758-3766, JUN 17 2014 2014. ISSN 0006-2960.

WAXMAN, S. Axonal conduction and injury in multiple sclerosis: the role of sodium channels. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 12, p. 932-941, DEC 2006 2006. ISSN 1471-003X.

WESS, J. Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice: Novel phenotypes and clinical implications. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 44, p. 423-450, 2004 2004. ISSN 0362-1642.

WESS, J.; EGLIN, R.; GAUTAM, D. Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. 9, p. 721-733, SEP 2007 2007. ISSN 1474-1776.

WESSLER, I.; KIRKPATRICK, C. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. **British Journal of Pharmacology**, v. 154, n. 8, p. 1558-1571, AUG 2008 2008. ISSN 0007-1188.

_____. Non-neuronal acetylcholine involved in reproduction in mammals and honeybees. **Journal of Neurochemistry**, v. 142, p. 144-150, AUG 2017 2017. ISSN 0022-3042.

WESTFALL, T. C.; WESTFALL, D. P. Neurotransmission: The autonomic and somatic motor nervous system. In: BRUNTON, L.; CHABNER, B., et al (Ed.). **Goodman and Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics** 12th: McGraw Hill Professional 2011.

WHITE, J.; HART, R.; FRY, J. AN EVALUATION OF THE WATERS PICO-TAG SYSTEM FOR THE AMINO-ACID-ANALYSIS OF FOOD MATERIALS. **Journal of Automatic Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 170-177, OCT-DEC 1986 1986. ISSN 0142-0453.

WOODWARD, S. et al. CONSTANT AND HYPERVARIABLE REGIONS IN CONOTOXIN PROPEPTIDES. **Embo Journal**, v. 9, n. 4, p. 1015-1020, APR 1990 1990. ISSN 0261-4189.

WU, P. et al. Non-cytotoxic cobra cardiotoxin A5 binds to alpha v beta 3 integrin and inhibits bone resorption - Identification of cardiotoxins as non-RGD integrin-binding proteins of the Ly-6 family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 12, p. 7937-7945, MAR 24 2006 2006. ISSN 0021-9258.

WU, X. et al. Optimal Cleavage and Oxidative Folding of alpha-Conotoxin TxIB as a Therapeutic Candidate Peptide. **Marine Drugs**, v. 11, n. 9, p. 3537-3553, SEP 2013 2013. ISSN 1660-3397.

YAN, L. et al. Spinal antinociception of synthetic omega-conotoxin SO-3, a selective N-type neuronal voltage-sensitive calcium channel blocker, and its effects on morphine analgesia in chemical stimulus tests in rodent. **European Journal of Pharmacology**, v. 636, n. 1-3, p. 73-81, JUN 25 2010 2010. ISSN 0014-2999.

YUAN, D. et al. From the identification of gene organization of alpha conotoxins to the cloning of novel toxins. **Toxicon**, v. 49, n. 8, p. 1135-1149, JUN 15 2007 2007. ISSN 0041-0101.

ZHANG, R.; SNYDER, G. FACTORS GOVERNING SELECTIVE FORMATION OF SPECIFIC DISULFIDES IN SYNTHETIC VARIANTS OF ALPHA-CONOTOXIN. **Biochemistry**, v. 30, n. 47, p. 11343-11348, NOV 26 1991 1991. ISSN 0006-2960.

Apêndice

- Publicações :

The three-finger toxin fold: a multifunctional structural scaffold able to modulate cholinergic functions, Pascal Kessler, Pascale Marchot, Marcela Silva, Denis Servent

Journal of Neurochemistry

21 March 2017

DOI: 10.1111/jnc.13975

- Colaboradores :

Algumas técnicas / experimentos foram desenvolvidos em colaboração e/ou supervisão direta do pesquisador(a) citado abaixo.

- *In Source Decay (ISD)*

Dr. Daniel Moreira dos Santos, realizado no Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, da Fundação Ezequiel Dias - FUNED (Belo Horizonte, MG, Brasil), coordenado pela Dra. Márcia Helena Borges

- Digestão enzimática e sequenciamento “de novo”

Dr. Marcelo Porto Bemquerer, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - CENARGEN (Brasília, DF, Brasil)

- Degradação de Edman

Analista Jaqueline Leal dos Santos e Dra. Márcia Helena Borges, Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, da Fundação Ezequiel Dias - FUNED (Belo Horizonte, MG, Brasil)

- Preparação dos estoques de membranas de *Torpedo marmorata*

Dr. Romulo Araoz, Laboratoire de Toxinologie Moléculaire et Biotechnologies, Le Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives (CEA - Saclay), Paris - França

- *Binding*: ensaios de competição utilizando sondas radioativas

Supervisão inicial da Dra. Justyna Cioleke, Laboratoire de Toxinologie Moléculaire et Biotechnologies, Le Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives (CEA - Saclay), Paris - França

- Quantificação de monofosfato de inositol (IP1)

Supervisão inicial do Dr. Philippe Robin, Laboratoire de Toxinologie Moléculaire et Biotechnologies, Le Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives (CEA - Saclay), Paris - França

- Síntese química

Dr. Gilles Mourier, Laboratoire de Toxinologie Moléculaire et Biotechnologies, Le Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives (CEA - Saclay), Paris - França

- Experimentos de transformação e transfecção celular

Dra. Muriel Amar, Laboratoire de Toxinologie Moléculaire et Biotechnologies, Le Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives (CEA - Saclay), Paris - França

- Expressão de nAChR em células HEK

Dr. Philippe Robin, Laboratoire de Toxinologie Moléculaire et Biotechnologies, Le Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives (CEA - Saclay), Paris - França

- Binding: ensaios de competição utilizando sondas fluorescentes

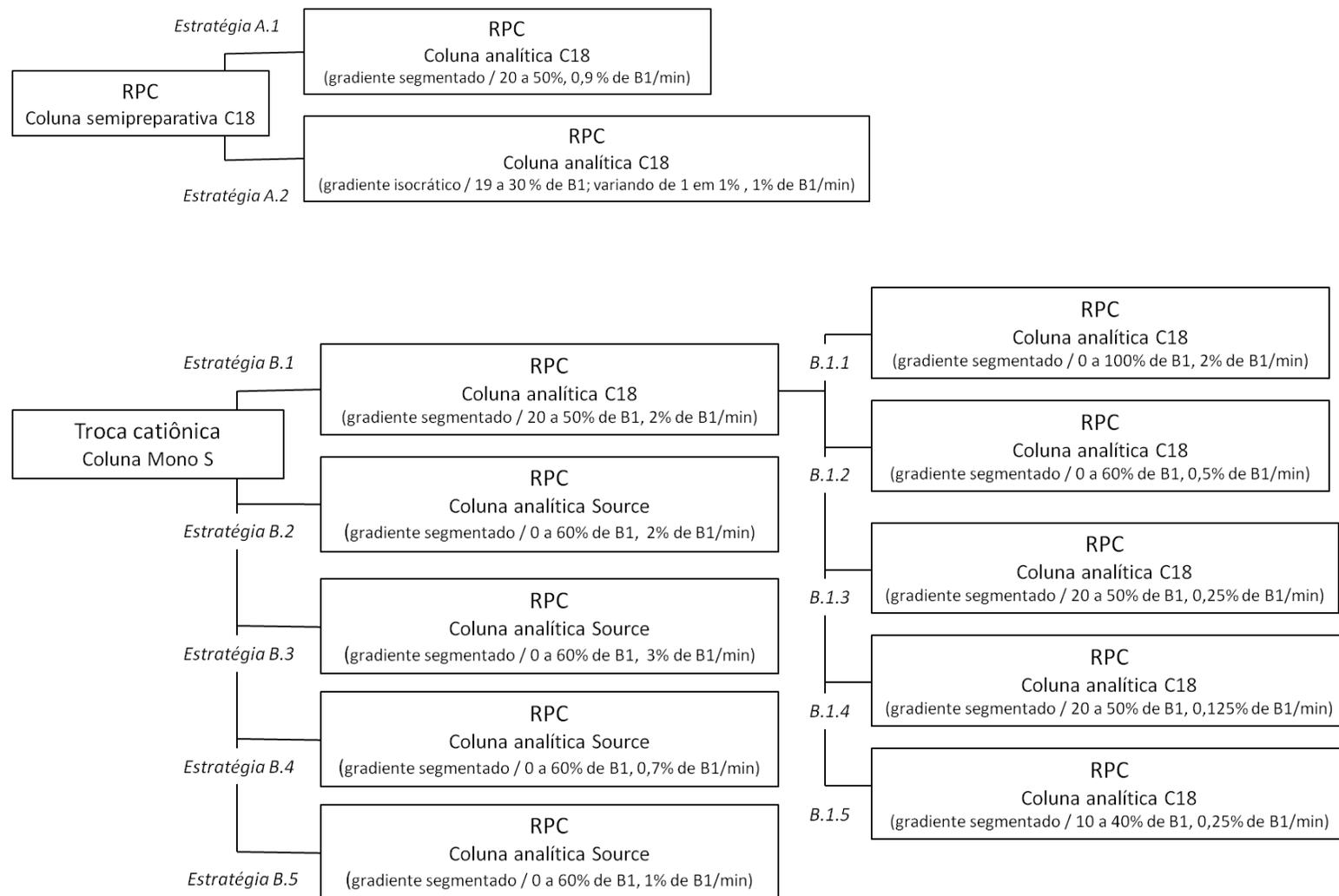
Dr. Philippe Robin, Laboratoire de Toxinologie Moléculaire et Biotechnologies, Le Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives (CEA - Saclay), Paris - França

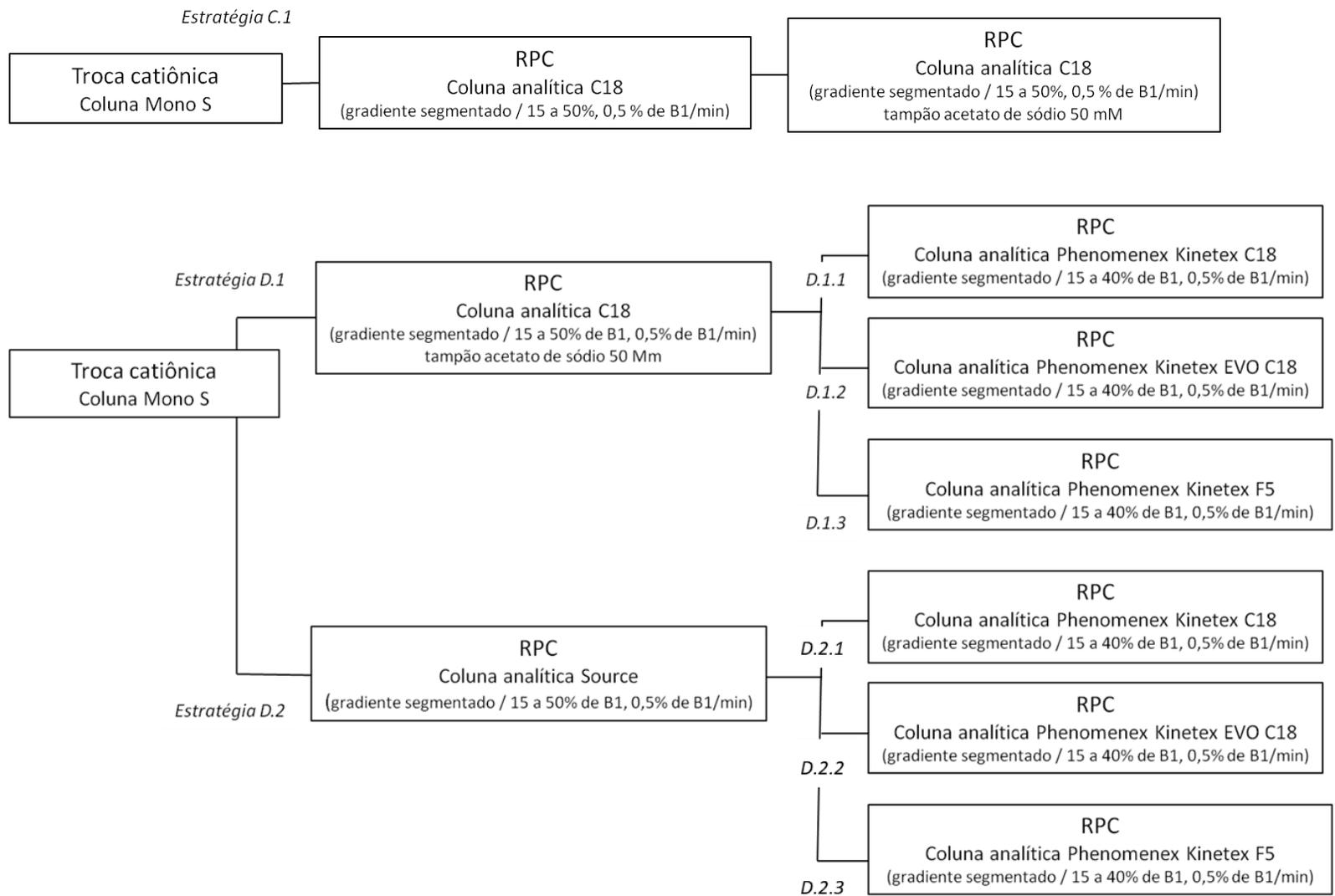
- Obtenção dos ovócitos de *Xenopus*, microtransplantação e experimentos no HiClamp

Dr. Romulo Araoz, Laboratoire de Toxinologie Moléculaire et Biotechnologies, Le Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives (CEA - Saclay), Paris - França

Anexo 1A

Fluxograma das estratégias de purificação da peçonha da serpente *Micrurus lemniscatus*





Longneurotoxin MS2 - *Micrurus surinamensis*

```
Longneurotoxin MS2      LTCHTCPYNTCANSETCPAGKNICYQKKWEEHQGERIERRCVANCPKLGSNDKSLLCCRRDDCN
M11 N-terminal          LTAKTCSKDTQSDSETCAPGKGKCYQ-----
M14 N-terminal          LTCKTCSRDTCS DSETCAPGKGICYQ-----
M110 743,7              -----CSDSETC-----
M11, M14 2720           -----WNGKGLCYQKKWDDYKGTSGKE-----
M11, M110, M14 2777,2  -----TCPAGKGLCYQKKWDDYQGELME-----
M110 1666,7             -----MLERGCAANCPQME-----
M14 1380                 -----CKANCPQMESR-----
M14 1046                 -----HTSLLCCR-----

Inferência              LTCKTCS-DTCS DSETC--GKGICYQKKWDDYQGE--ER-C-ANCPQMES---SLLCCR
***.*. .*.***** **.******...** ** * ****.* * *****
```

Longneurotoxin MS4 - *Micrurus surinamensis*

```
Longneurotoxin MS4      LTCKTCPFNTCANSETCPAGKNICYQKKWEEHRGERIERRCVANCPKLGSNDKSLLCCRR
M11 N-terminal          LTAKTCSKDTQSDSETCAPGKGKCYQ-----
M14 N-terminal          LTCKTCSRDTCS DSETCAPGKGICYQ-----
M110 743,7              -----CSDSETC-----
M11, M110, M14 2777,2  -----TCPAGKGLCYQKKWDDYQGELME-----
M11, M14 2720           -----WNGKGLCYQKKWDDYKGTSGKE-----
M110 1666,7             -----MLERGCAANCPQME-----
M14 1380                 -----CKANCPQMESR-----
M14 1046                 -----HTSLLCCR-----

Inferência              LTCKTCS-DTCS DSETC--GKGICYQKKWDDY-GE--ER-C-ANCPQMES---SLLCCR
*****. .*.***** **.******...** ** * ****.* * *****
```

Longneurotoxin MS5 - *Micrurus surinamensis*

```
Longneurotoxin MS5      LTCHTCPYNTCANSETCPAGKNICYQKKWEEHRGERIERSCVANCP EFESH TSLLCCTTANCD
M11 N-terminal          LTAKTCSKDTQSDSETCAPGKGKCYQ-----
M14 N-terminal          LTCKTCSRDTCS DSETCAPGKGICYQ-----
M110 743,7              -----CSDSETC-----
M11, M110, M14 2777,2  -----TCPAGKGLCYQKKWDDYQGELME-----
M11, M14 2720           -----WNGKGLCYQKKWDDYKGTSGKE-----
M110 1666,7             -----MLERGCAANCPQME-----
M14 1380                 -----CKANCPQMESR-----
M14 1046                 -----HTSLLCCR-----

Inferência              LTCKTCS-DTCS DSETC--GKGICYQKKWDDY-GE--ER-C-ANCPQMES-HTSLLCCR
***. *.*****.*** **.******...*. ** * ****.* * *****
```

```
Inferência FRO IV       LTCKTCS-DTCS DSETCA-GKGICYQKKWDDYK GEM-E-GC-ANCPQMES-HTSLLCCR-----
*****. .*.***.* *.******.*. ** * * ***** *****
Inferência FRO V        LTCKTCS-DTCS DSETCA-GKGICYQKKWDDYQGE--ER-C-ANCPQMES--TSLCCR-----
***.*. .*.***** **.******...** ** * ****.* * *****
Inferência MS2          LTCKTCS-DTCS DSETC--GKGICYQKKWDDYQGE--ER-C-ANCPQMES---SLLCCR-----
***.*. .*.***** **.******...** ** * ****.* * *****
Inferência MS4          LTCKTCS-DTCS DSETC--GKGICYQKKWDDY-GE--ER-C-ANCPQMES---SLLCCR-----
*****. .*.***.* *.******.*. ** * * ****.* * *****
Inferência MS5          LTCKTCS-DTCS DSETC--GKGICYQKKWDDY-GE--ER-C-ANCPQMES-HTSLLCCR-----
***. *.*****.*** **.******...*. ** * ****.* * *****

M14                      LTCKTCPFDTCS DSETCPAGK GICYQKKWDDYK GEMLERGCAANCPK MESRHTSLLCCRRNNCN
```

Negrito: resíduos idênticos à toxina alinhada

Melhor alinhamento: Inferência FrontoxinIV 53/64 (83%)

Alinhamentos M19

```

MALT0063C      LICYVSEYGAKMTCPEGKTLCEKYAVPL-MQGHFYFAWRCTSTCKAGAYNICCSTDLCNKIP
Mipartoxin-1  LKCYVSREGKTQTCPEGEKLCCEKYAVSYFHDGRWRRYRECTSACHRGPYNVCCSTDLCNK--
FrontoxinII   LICYVSKDGETATCPGQ-KCEKYAVSASHTGHWFYMYDCTSTCHIGPYNVCCSTDLCNR--
* ****. * . *** *: ***** *: : : : ***:*: * **:*****:
    
```

```

>M19 N-terminal
LICVSMEGAKMTCPEGCNLCECYAV
>M18 N-terminal
LKCYVSMEGACMTCPEGCNLCEAYAV
>M18, M19 2491
GHYNVCCSTDLCNHN
>M18, M19 2531
GGLYPVCCSTDLCNHLT
    
```

MALT0063C - *Micrurus altirostris*

```

MALT0063C      LICYVSEYGAkMTCPEGkTLCEkYAVPLMQGHFYFAWRCTSTCKAGAYNICCSTDLCNKIP
M19 N-terminal  LICYVSMEGAKMTCPEGCNLCECYAV-----
M18 N-terminal  LKCYVSMEGACMTCPEGCNLCEAYAV-----
M18, M19 2491  -----GHYNVCCSTDLCNHN-
M18, M19 2531  -----GGLYPVCCSTDLCNHLT

Inferência     LICYVSMEGAKMTCPEGCNLCE-YAV-----G-YNVCCSTDLCNH-T
*****.*****.*** **          * **.******.
    
```

Mipartoxin-1 - *Micrurus mipartitus*

```

Mipartoxin-1   LKCYVSREGKTQTCPEGEKLCCEKYAVSYFHDGRWRRYRECTSACHRGPYNVCCSTDLCNK--
M19 N-terminal  LICYVSMEGAKMTCPEGCNLCECYAV-----
M18 N-terminal  LKCYVSMEGACMTCPEGCNLCEAYAV-----
M18, M19 2491  -----GHYNVCCSTDLCNHN-
M18, M19 2531  -----GGLYPVCCSTDLCNHLT

Inferência     LKCYVSMEGA-MTCPEGCNLCE-YAV-----G-YNVCCSTDLCNH-T
*****.**.****.*** **          *_******.
    
```

FrontoxinII - *Micrurus frontalis*

```

FrontoxinII    LICYVSKDGETATCPGQKCEKYAVSASHTGHWFYMYDCTSTCHIGPYNVCCSTDLCNR--
M19 N-terminal  LICYVSMEGAKMTCPEGCNLCECYAV-----
M18 N-terminal  LKCYVSMEGACMTCPEGCNLCEAYAV-----
M18, M19 2491  -----GHYNVCCSTDLCNHN-
M18, M19 2531  -----GGLYPVCCSTDLCNHLT

Inferência     LICYVSMEGA-MTCPEGCLLCE-YAV-----G-YNVCCSTDLCNH-T
*****.*.***.*.....          *_******.
    
```

```

Inferência MALT0063C  LICYVSMEGAKMTCPEGCNLCE-YAV-----G-YNVCCSTDLCNH-T
*****.*****.*** **          * **.******.
Inferência Mipartoxin-1  LKCYVSMEGA-MTCPEGCNLCE-YAV-----G-YNVCCSTDLCNH-T
*****.**.****.*** **          *_******.
Inferência FrontoxinII  LICYVSMEGA-MTCPEGCLLCE-YAV-----G-YNVCCSTDLCNH-T
*****.*.***.*.....          *_******.
    
```

Negrito: resíduos idênticos à toxina alinhada

Melhor alinhamento: Inferência **MALT0063C** 38/61 (62%)

Alinhamentos M119

MICYNQSSQPPTTKTCSEGGQCYKKTWSDHRGTISERGCACPNVKPGVKISCCSSDKCNG

>M119 2147,7
 GQCYKKTWRDHRGTLLLE
 >M119 2259,6
 MLCYNQSSQPPTKTCSE

Short neurotoxin D1 - *Micrurus pyrrhocryptus*

ShortneurotoxinD1 MICYNQSSQPPTTKTCSEGGQCYKKTWSDHRGTISERGCACPNVKPGVKISCCSSDKCNG
 M119 2259,6 MLCYNQSSQPPTK-TCSE-----
 M119 2147,7 -----GQCYKKTWRDHRGTLLLE-----

Inferência MICYNQSSQPPT--TCSEGGQCYKKTW-DHRGTI-E
 * .***** ***** ***** . *

Inferência Short neurotoxin D1: 33/60 (55%)

Alinhamentos M113

MECYRCGVSGCHLKITCSAEETFCYKWLNKISNERWLGCAKTCTEIDTWNVYNKCCTTNLCNT

>M114 2243,9
 RCGVSGCHLKTGCSDDDE
 >M113 2563,9
 HLKTTCSADEKFCYKWFNKIT

Bucandin - *Bungarus candidus*

Bucandin MECYRCGVSGCHLKITCSAEETFCYKWLNKISNERWLGCAKTCTEIDTWNVYNKCCTTNLCNT
 M114 2243,9 ----RCGVSGCHLKTGCSDDDE-----
 M113 2563,9 -----HLKTTCSADEKFCYKWFNKIT-----

Inferência ----RCGVSGCHLKTTCSEADE-FCYKW-NKI-
 ***** .***** . ***** ***

Inferência Bucandin: 25/63 (40%)

Anexo 2

Conus arenatus

Filipinas, 35-67 mm,
vermívoro



<http://biology.burke.washington.edu/conus/index.php>

Conus litoglyphus

Leste da Índia, 40-75 mm



<http://biology.burke.washington.edu/conus/index.php>

Conus miliaris

Tahiti, 22-43 mm,
vermívoro



<http://www.nmr-pics.nl/>

Conus canonicus

Ilhas Maldivas, 35-70 mm,
moluscívoro



<http://biology.burke.washington.edu/conus/index.php>

Lasiadora parahybana

Caranguejeira-rosa-
salmão-brasileira



[http://s53.photobucket.com/
user/wraithspirit/media/DSCF
0002-3.jpg.html](http://s53.photobucket.com/user/wraithspirit/media/DSCF0002-3.jpg.html)

Phoneutria pertyi



[http://arachnoboards.com/gal
lery/phoneutria-pertyi.11553/
/](http://arachnoboards.com/gallery/phoneutria-pertyi.11553/)

Wunderpus photogenicus



[http://liquidlifephotography.c
om/2011-week-14/
/](http://liquidlifephotography.com/2011-week-14/)

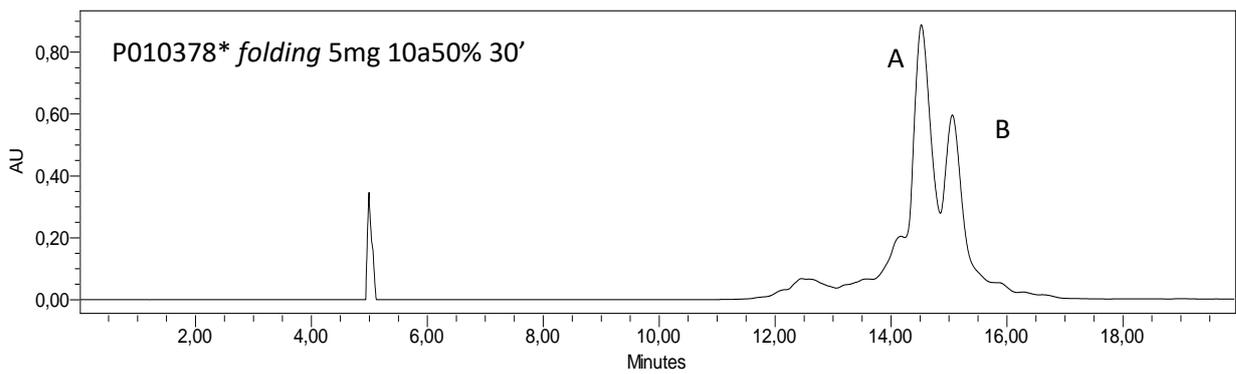
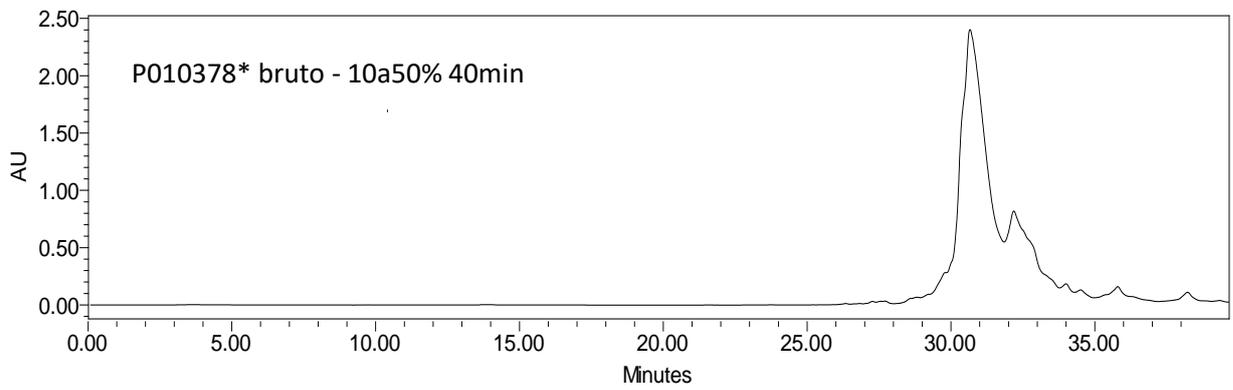
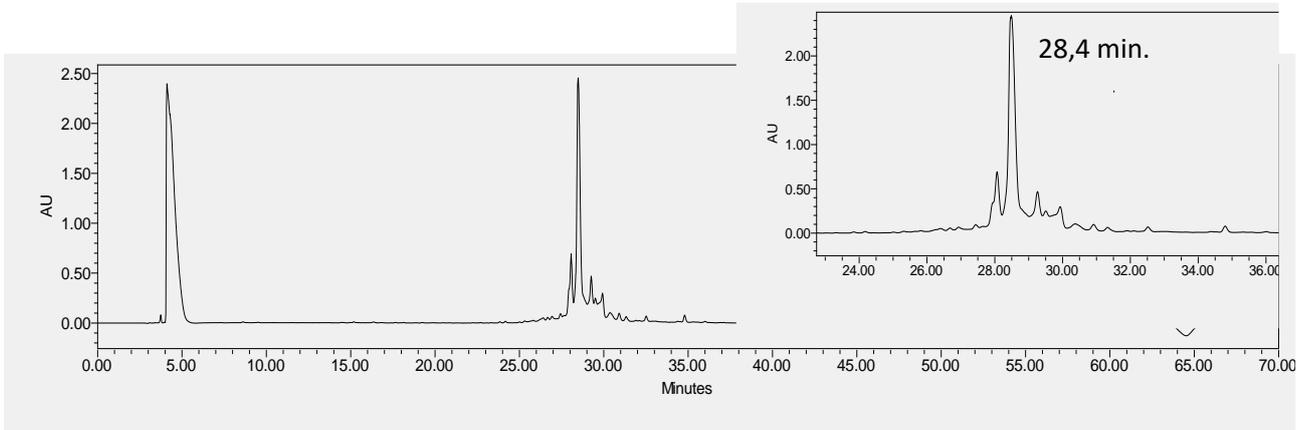
Referência	Classificação	Espécie	Sequência	Número de resíduos	% folding (proporção entre os picos eluídos)
P010378*	tx4/7	<i>Conus arenatus</i>	MHPLHCCHIPPCWKLHKDHCRKV	23	70 / 30 / 0
P010389	tx3/2	<i>Conus miliaris</i>	CCGWPCIPCHD	11	80 / 10 / 10
P010404	tx4/3	<i>Conus miliaris</i>	GRARCCYELLCRYTCS	16	90 / 5 / 5
P010405*	tx3/1	<i>Conus miliaris</i>	DECCTDPCVCI	11	60 / não determinado
P010416*	tx3/2	<i>Conus miliaris</i>	ETGCCFPYCPCG	13	45 / 55 / 0
P010454*	tx4/4	<i>Conus miliaris</i>	EGCCSIPLCWGENC	14	45 / 55 / 0
P014694	tx3/4	<i>Conus litoglyphus</i>	CCSDNCYKGVCLA	13	20 / 30 / 50
P014696*	tx5/4	<i>Conus miliaris</i>	CCNVAMTCVHSYC	13	50 / 50
P014697*	tx2/7	<i>Conus miliaris</i>	CCNVCVPSAMGKCA	14	20 / 80
P014698	tx2/3	<i>Conus canonicus</i>	KCCWPCTGACKYDMA	15	60 / 10 (muitas impurezas)
P014699*	tx3/7	<i>Conus canonicus</i>	CCSWDVCDHDGSDSCS	16	30 / 20 / 50
P014700	tx4/5	<i>Conus canonicus</i>	CCSWDHDCVDGDTGGM	16	75 / 25
P014704	tx5/5	<i>Conus canonicus</i>	CCSWDHDCVSDGECGM	16	50 / 30 / 20
P014710	tx2/8	<i>Conus litoglyphus</i>	QCCYQCPPGFKGKFCQFKLRPP	22	35 / 35 / 30
P020581	tx4/2	<i>Lasiodora parahybana</i>	YKQACCGFKMVCVPLPA	18	45 / 45 / 10
P021812	tx2/3	<i>Phoneutria pertyi</i>	CCEFCNFGLENNL	14	60 / 40
P021839	tx4/6	<i>Phoneutria pertyi</i>	RGCCSIPFCSAVNYCG	17	30 / 20 / 50
P024936	tx5/3	<i>Wunderpus photogenicus</i>	DRPGCCFIDIFCSTSC	16	-

1 pico majoritário (6 amostras)	2 picos relativamente homogêneos (3 amostras)	3 picos (7 amostras)
---------------------------------	---	----------------------

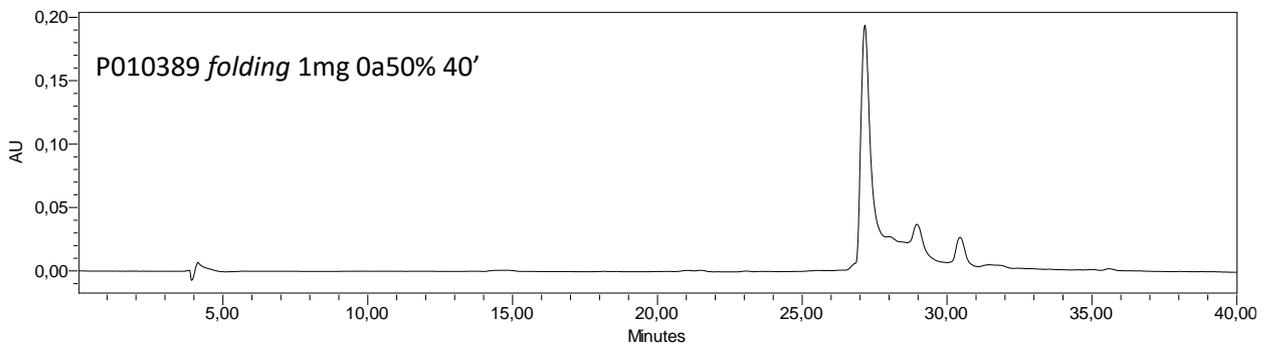
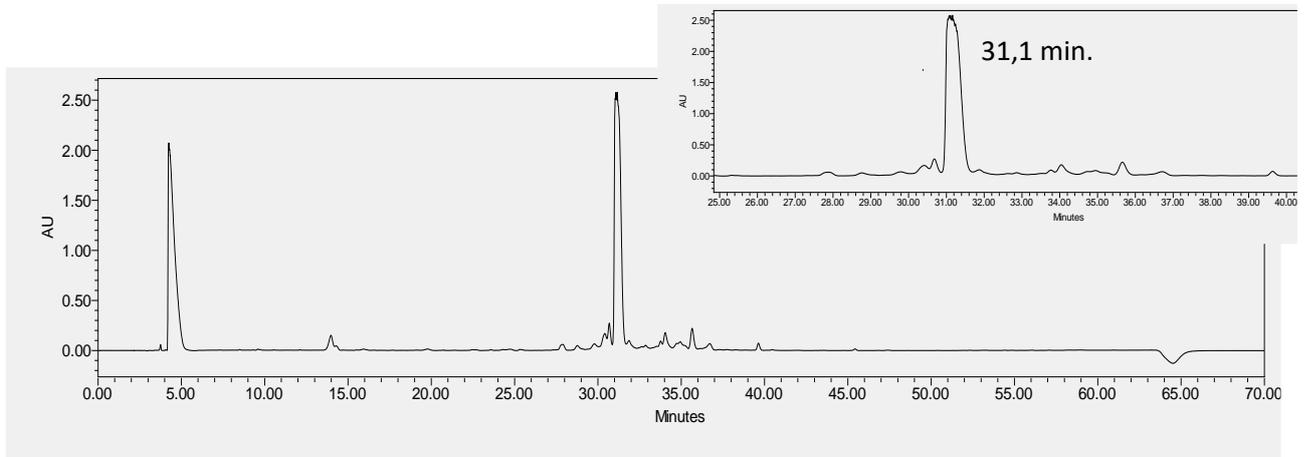
Negrito: metionina
vermelho: conotoxinas não testadas farmacologicamente

Síntese química, *folding* e purificação dos conopeptídeos

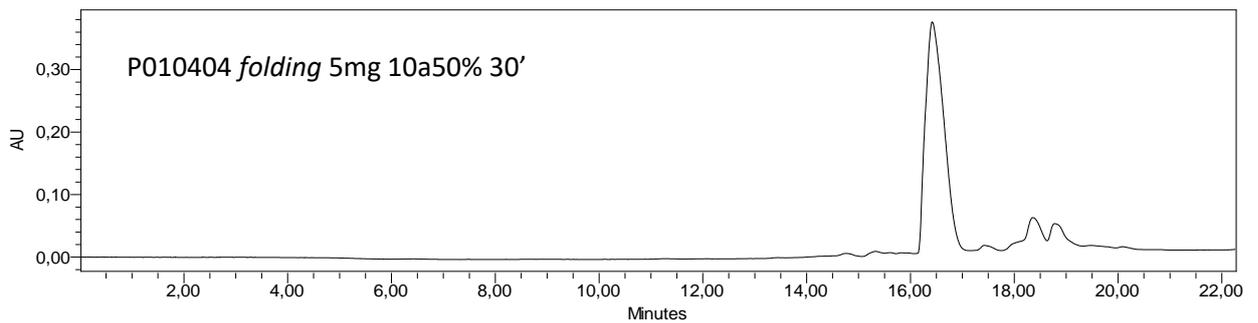
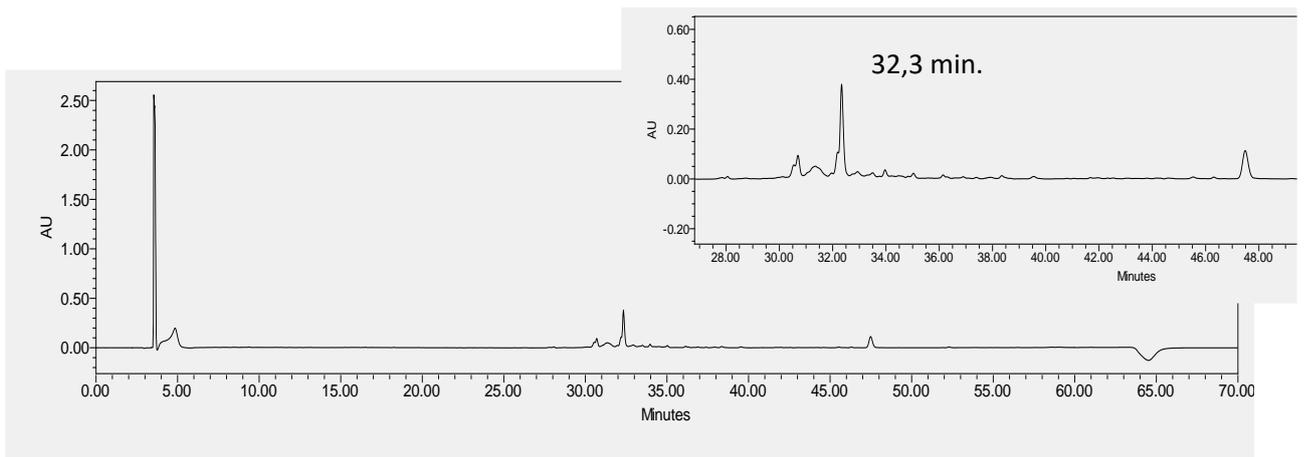
P010378* – MHPLHCCHIPPCWKLHKDHCRKV *Conus arenatus*



P010389 – CCGWPCIPCHD *Conus miliaris*

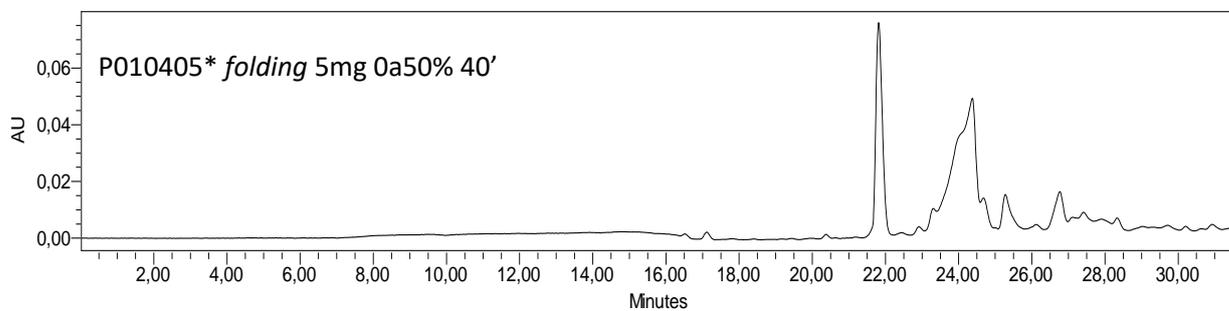
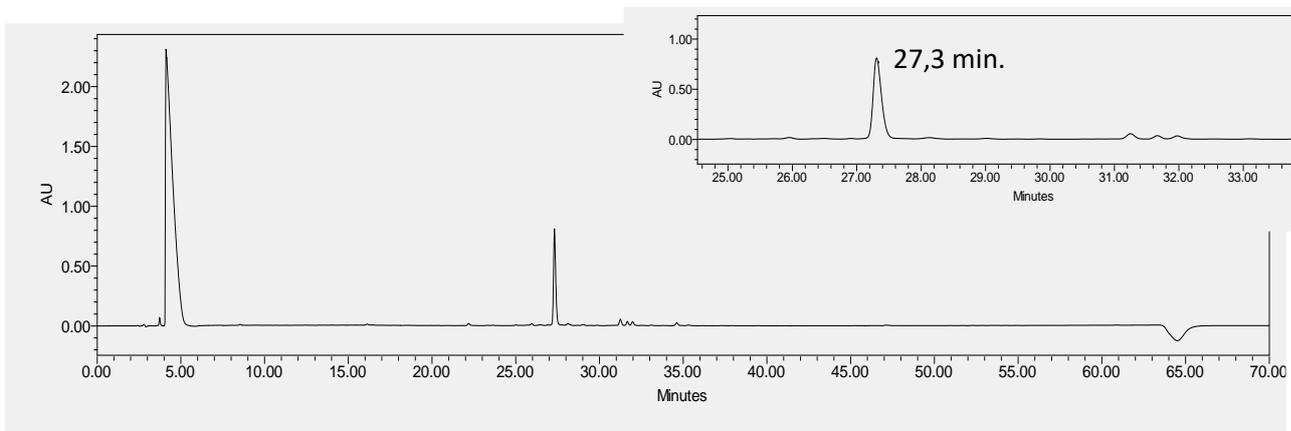


P010404 – GRARCCYELLCRYTCS *Conus miliaris*

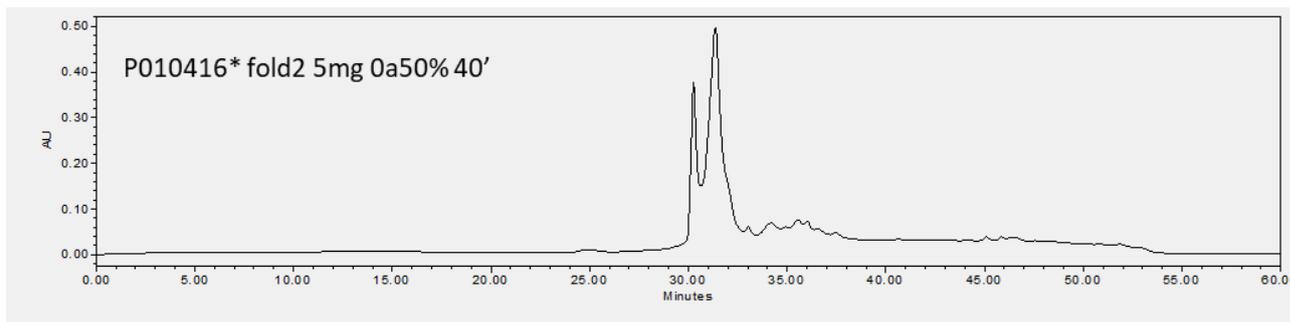
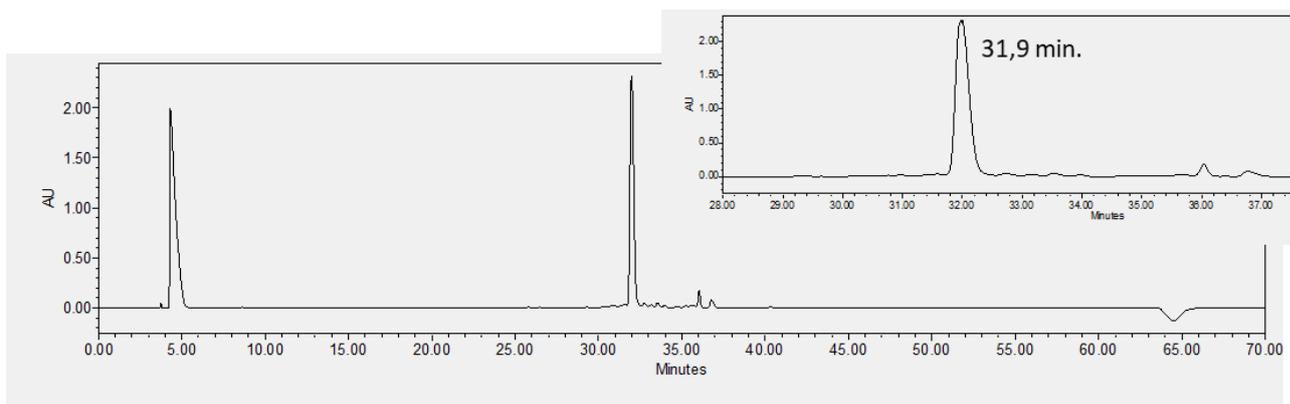


P010405* – DECCTDPCVCI *Conus miliaris*

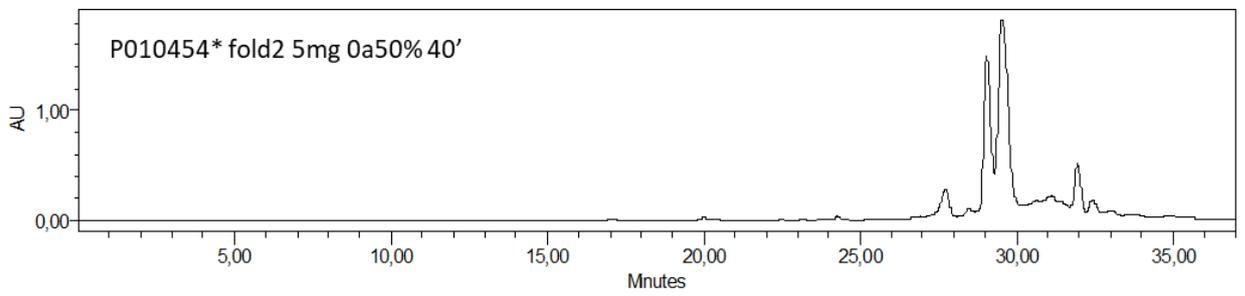
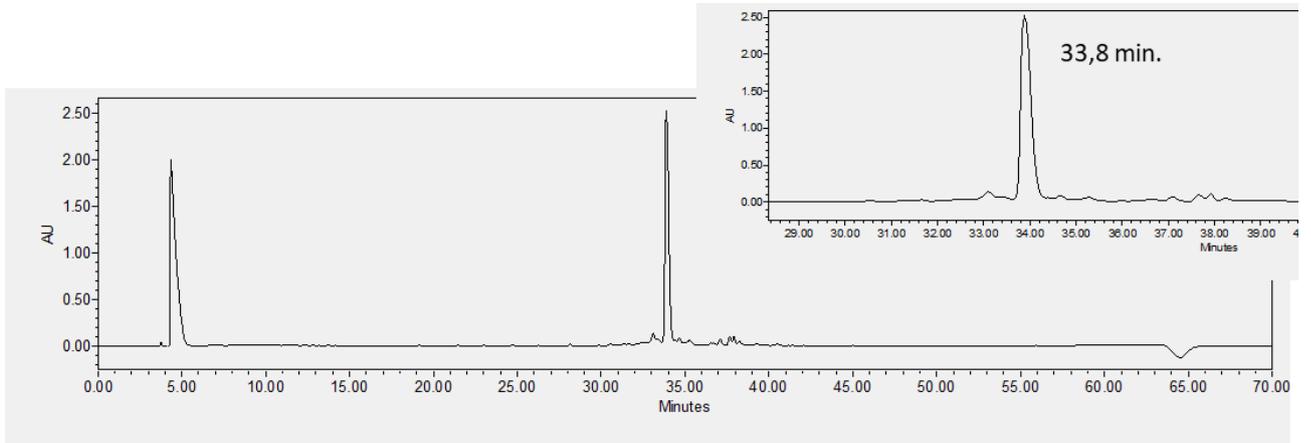
(sequência sem resíduos aromáticos)



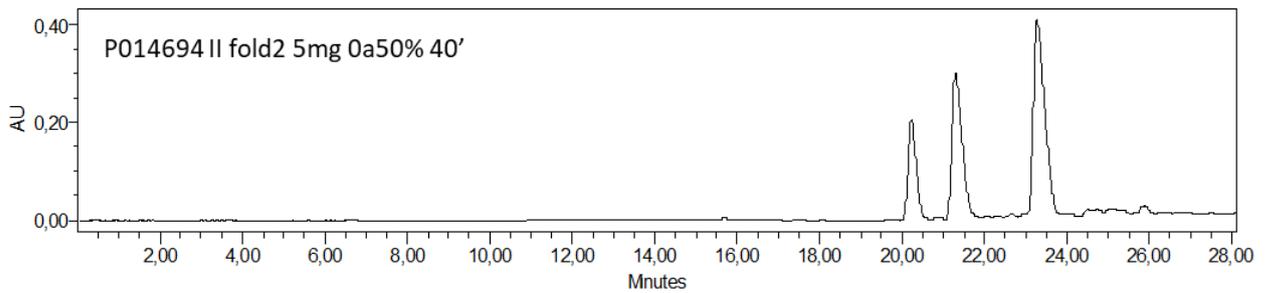
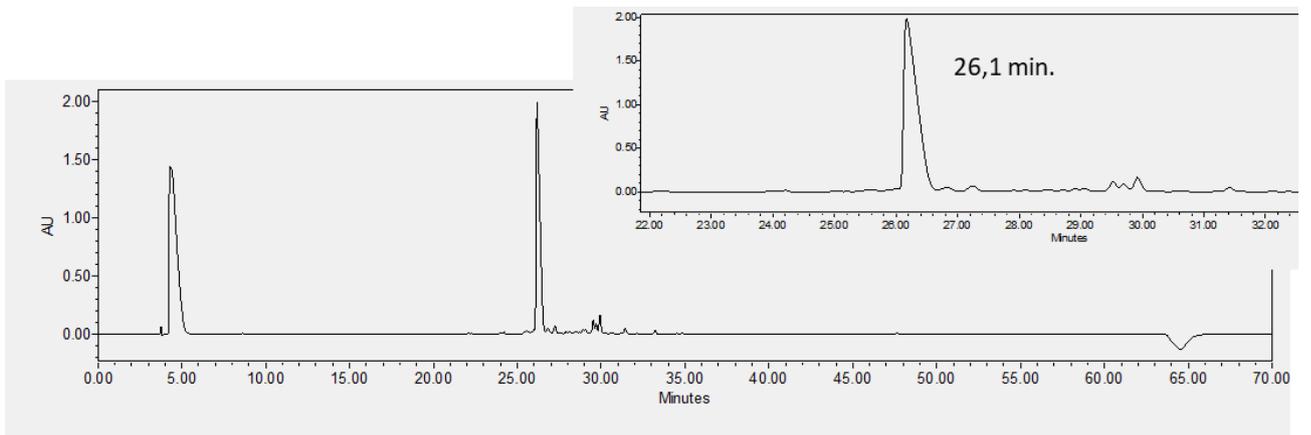
P010416* - ETGCCFPYCYPCG *Conus miliaris*



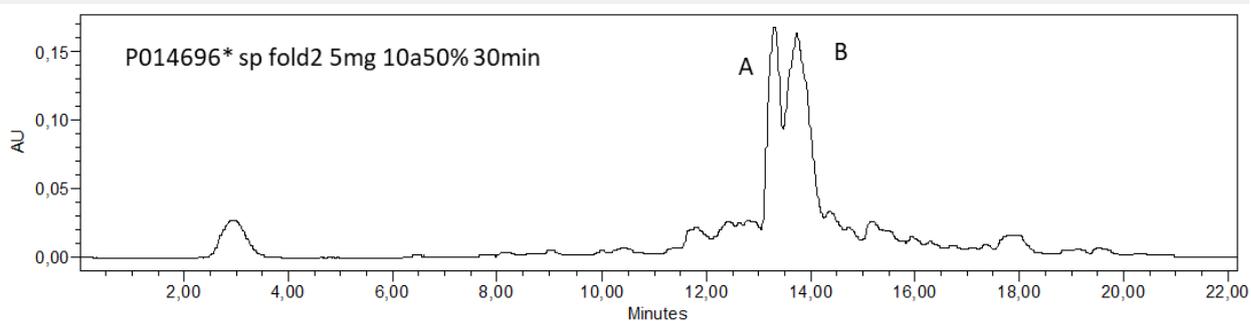
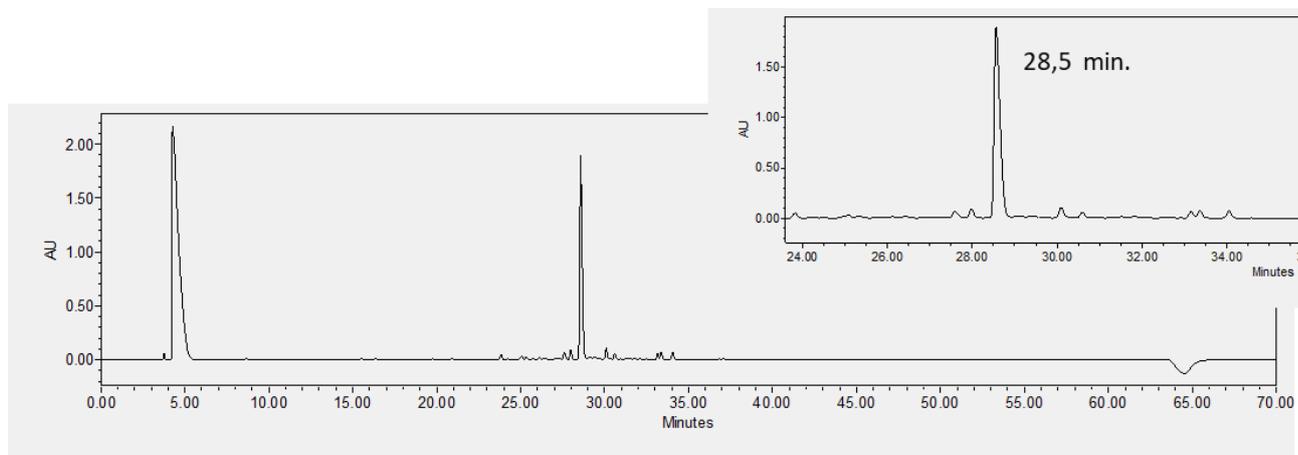
P010454* – EGCCSIPLCWGENC *Conus miliaris*



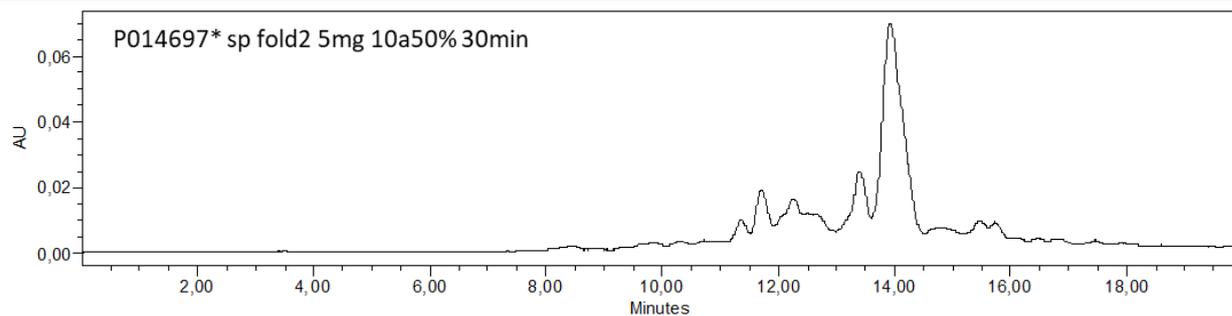
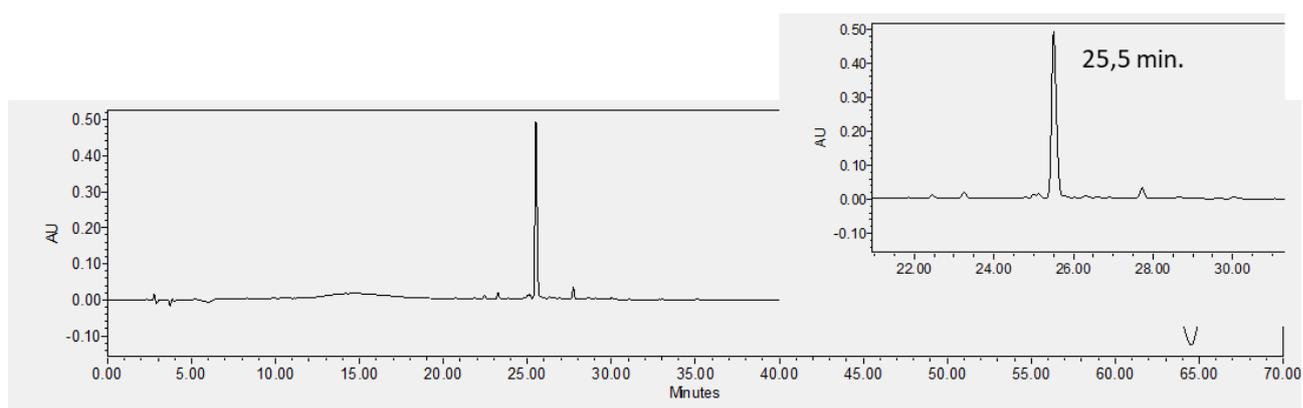
P014694 – CCSDNCYKGVCLA *Conus litoglyphus*



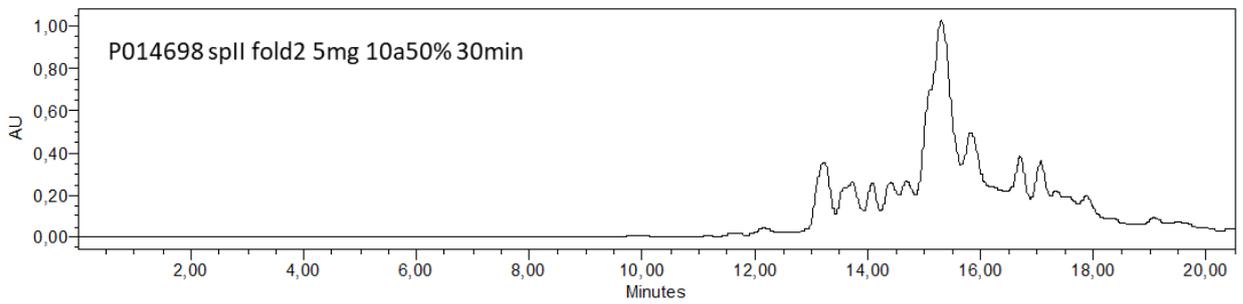
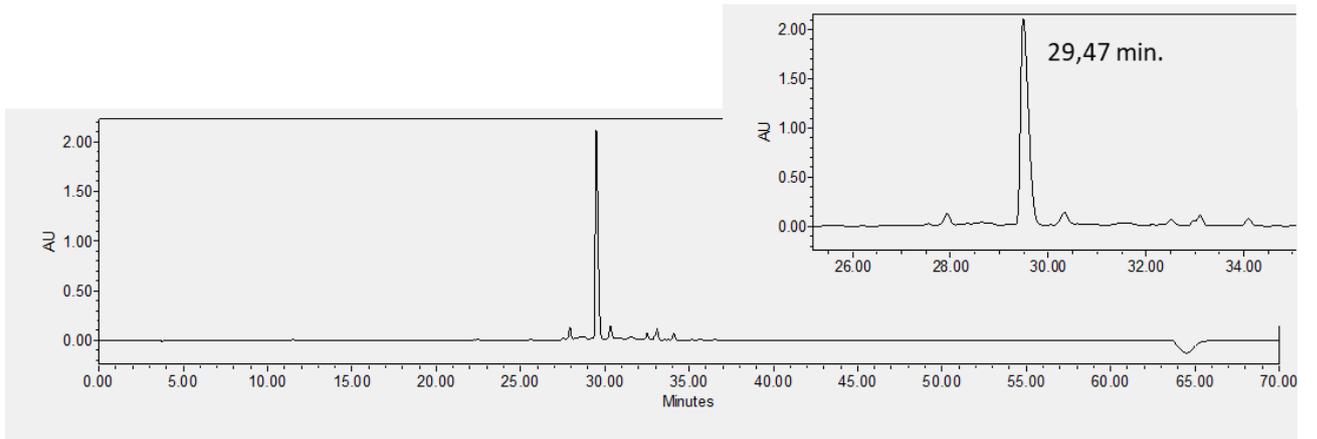
P014696* – CCNVAMTCVHSYC *Conus miliaris*



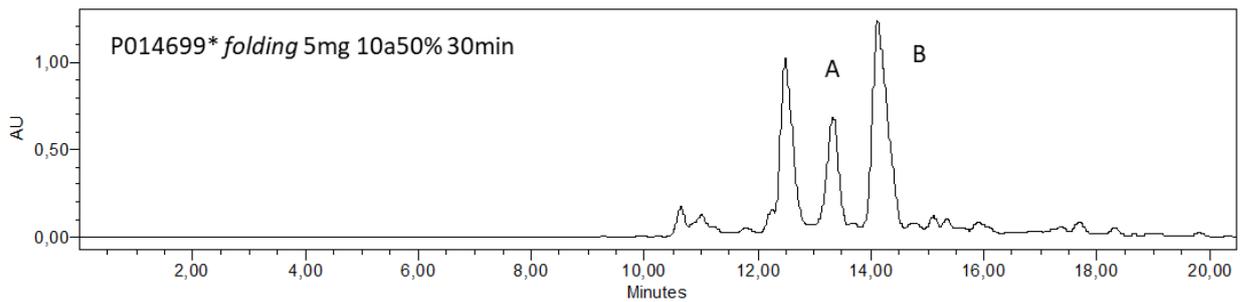
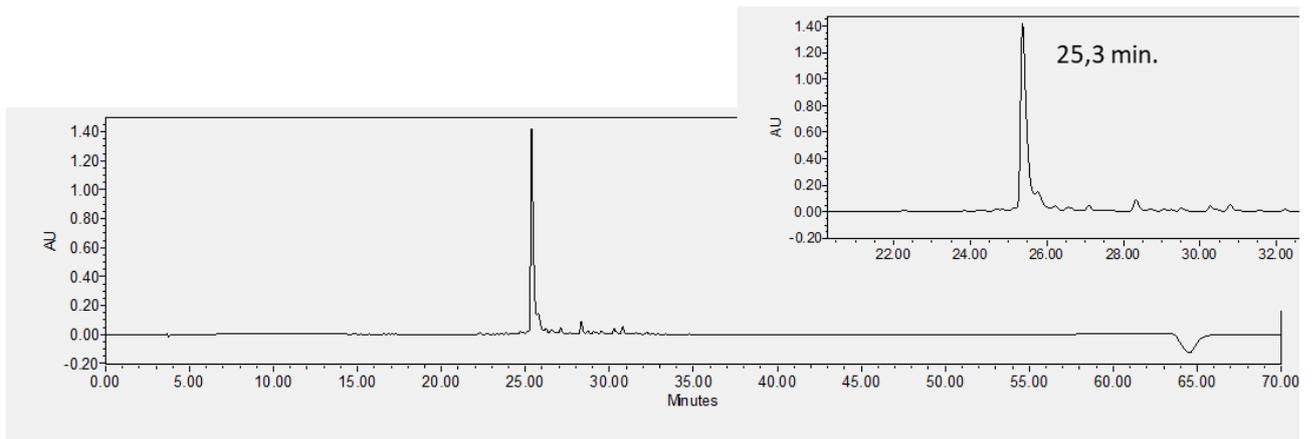
P014697* – CCNVCVPSAMGKCA *Conus miliaris* (sequência sem resíduos aromáticos)



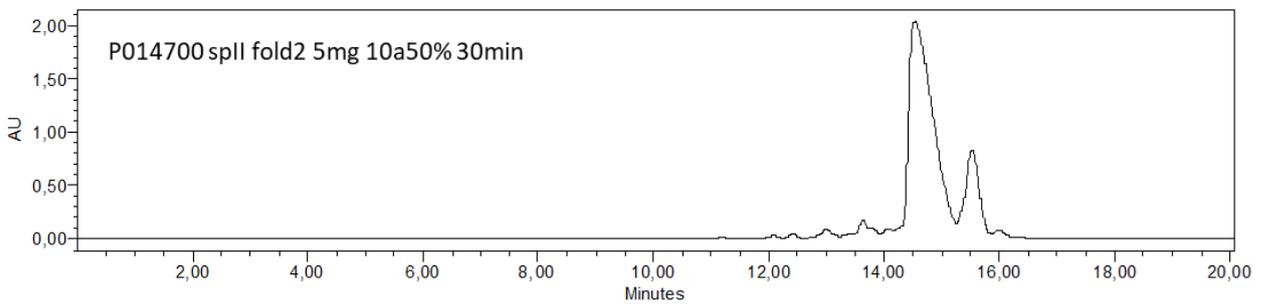
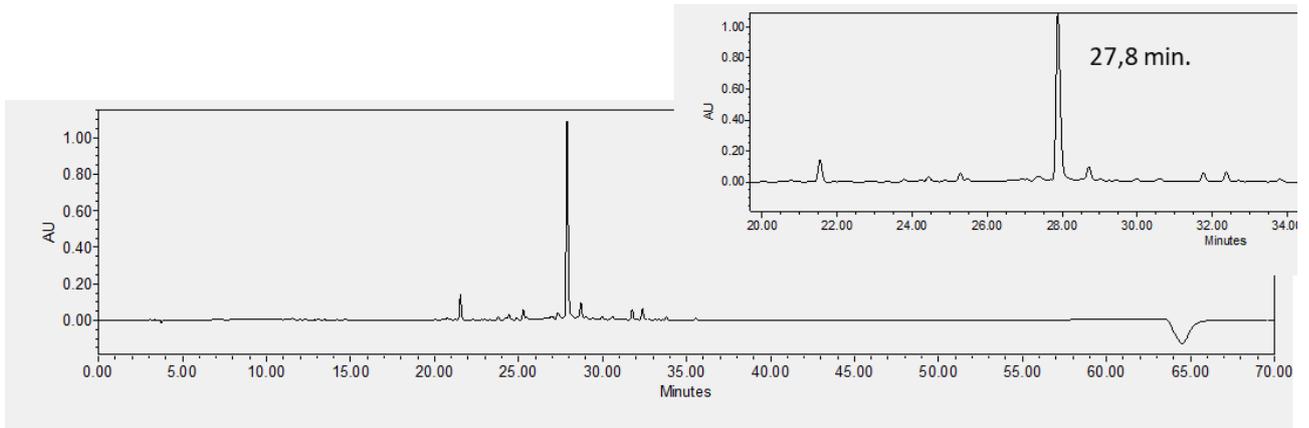
P014698 – KCCWPCTGACKYDMA *Conus canonicus*



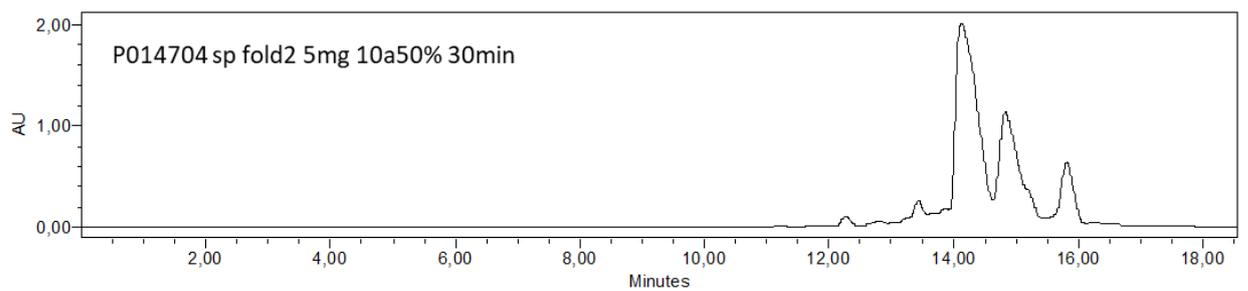
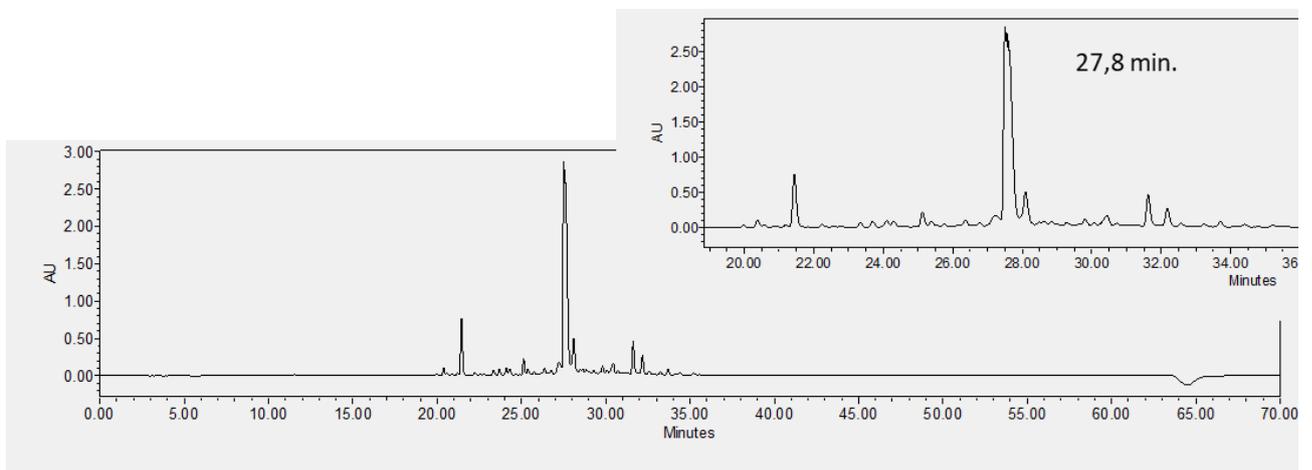
P014699* – CCSWDVCDHDGSDCS *Conus canonicus*



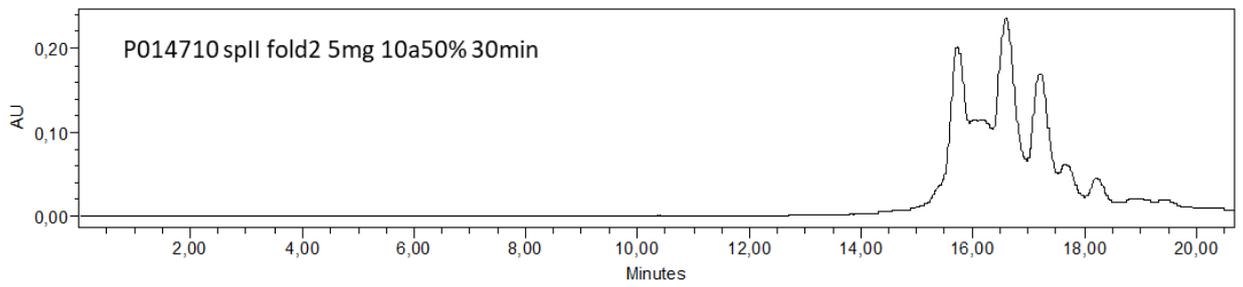
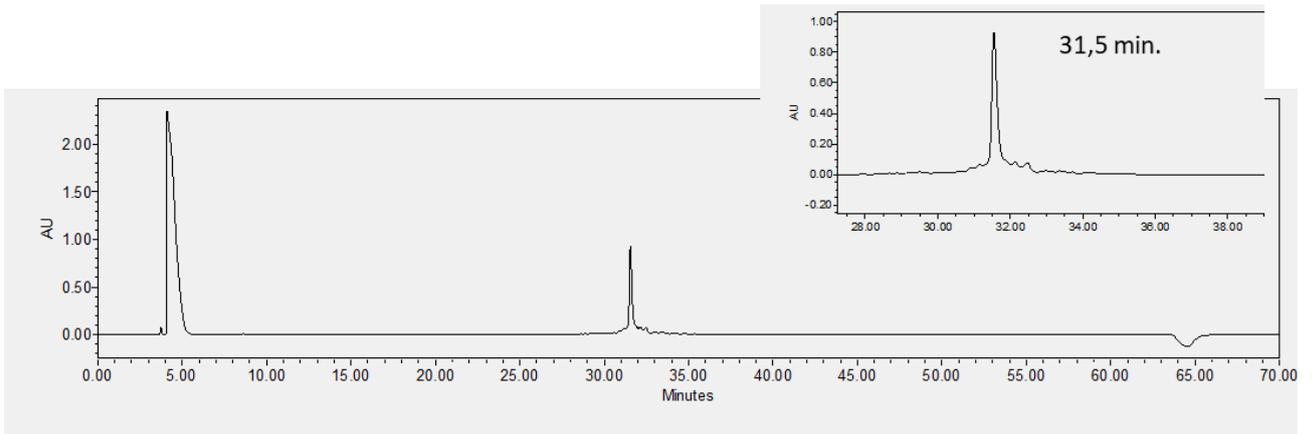
P014700 – CCSWDHDCVDGDTCGM *Conus canonicus*



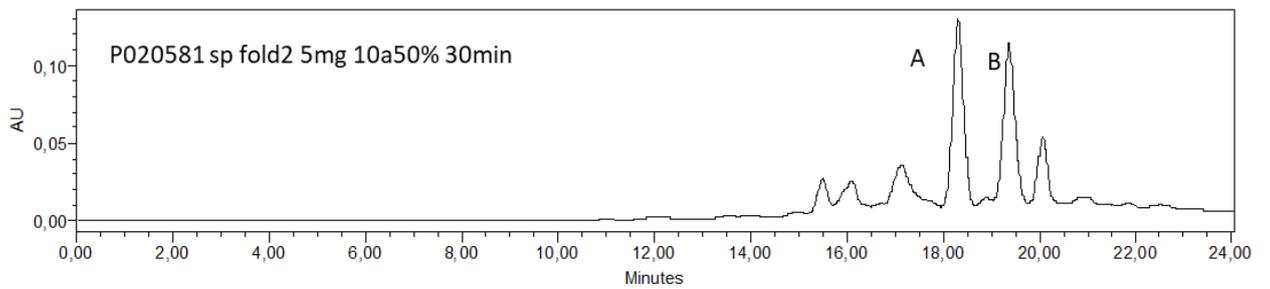
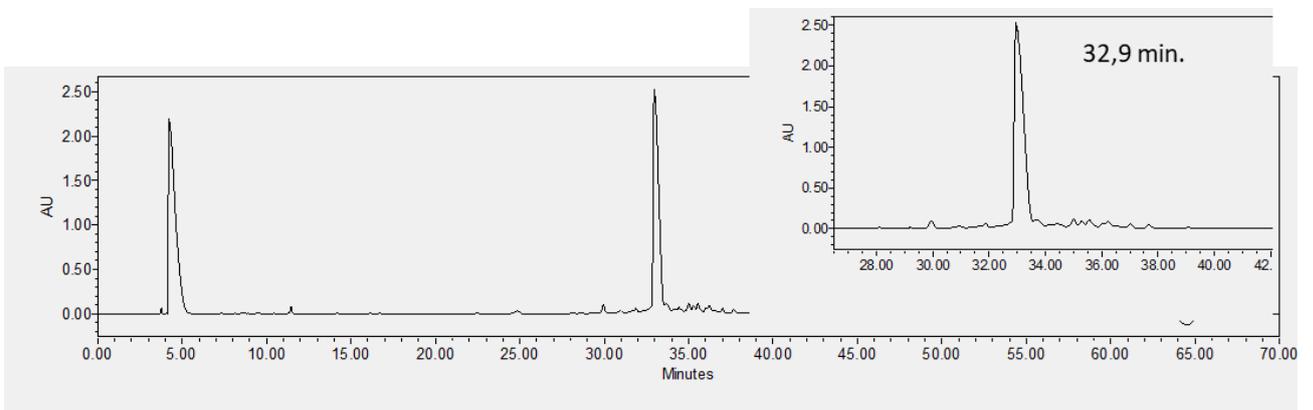
P014704 – CCSWDHDCVSDGECGM *Conus canonicus*



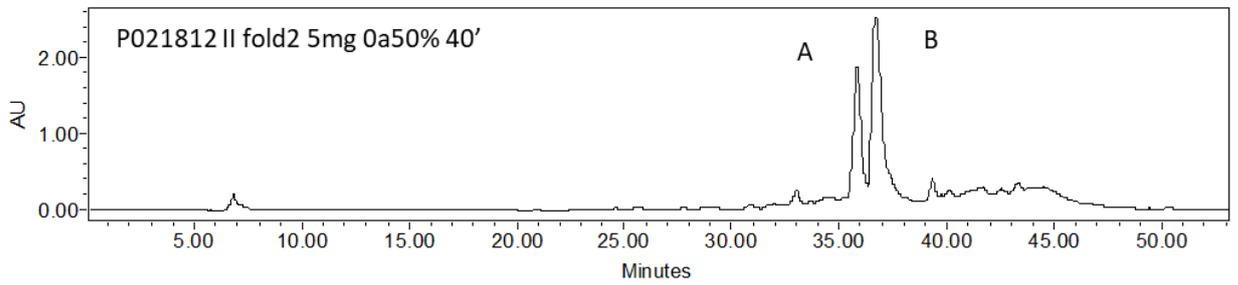
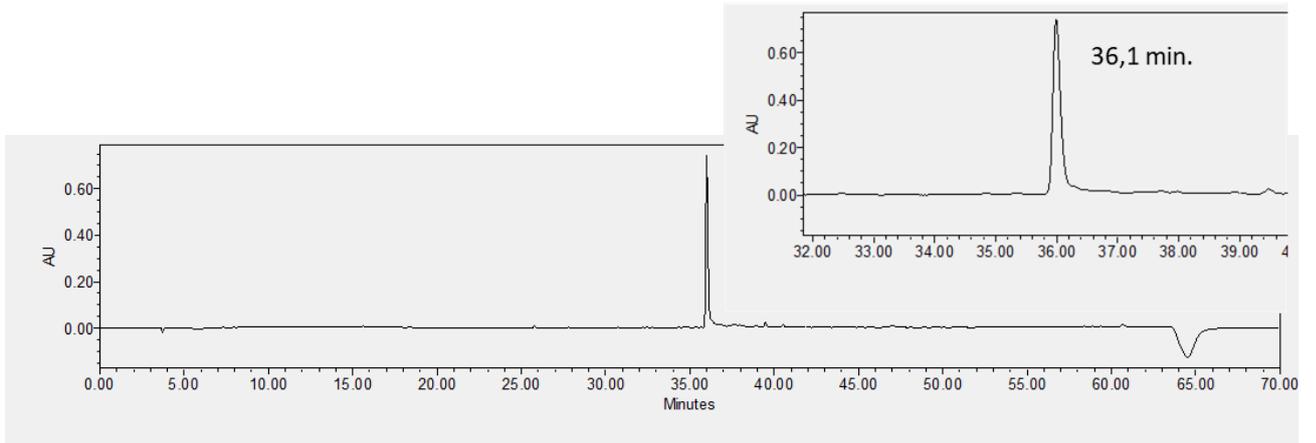
P014710 – QCCYQCPPGFKGKFCQFKLRPP *Conus litoglyphus*



P020581 – YKQACCGFKMVCVPCGLPA *Lasiodora parahybana*



P021812 – CCEFCNFGCLENNL *Phoneutria pertyi* (sequência sem resíduos aromáticos)



P021839 – RGCCSIPFCSAVNYYCG *Phoneutria pertyi*

