



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Aline Ropelli Silva

**Identificação de biomoléculas no veneno de serpente
Bothrops jararacussu com alta afinidade para
receptores de serotonina 5-HT_{2c}**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Junior

**Botucatu
(2016)**

Aline Ropelli Silva

Identificação de biomoléculas no veneno de
serpente *Bothrops jararacussu* com alta afinidade
para receptores de serotonina 5-HT_{2c}

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutora em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Junior

Botucatu
(2016)

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Silva, Aline Ropelli.

Identificação de uma biomolécula de serpente de *Bothrops jararacussu* com afinidade para receptores de serotonina 5-HT_{2C} / Aline Ropelli Silva. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Rui Seabra Ferreira Junior
Capes: 20801017

1. Serotonina. 2. *Bothrops*. 3. Serpente - Veneno. 4. Proteínas G. 5. Receptores adrenérgicos.

Palavras-chave: *Bothrops jararacussu*; GPCR; Serotonina; Serpente; Veneno.

Nome do Autor: Aline Ropelli Silva

Título: Identificação de biomoléculas no veneno de serpente *Bothrops jararacussu* com alta afinidade para receptores de serotonina 5-HT_{2c}

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Junior

Orientador

Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem – Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP e Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos – CEVAP

Profa. Dra. Lucilene Delazari dos Santos

Membro

Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem – Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP e Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos – CEVAP

Prof. Dr. André Sampaio Pupo

Membro

Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências – Botucatu, São Paulo. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”

Prof. Dr. José Carlos Cogo

Membro

Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento – São José dos Campos, São Paulo, Universidade do Vale do Paraíba.

Profa. Dra. Nanci Nascimento

Membro

Centro de Biotecnologia – São Paulo, São Paulo - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.

Data da defesa: 29 de junho de 2016.

“Não deixe a maldade do mundo tirar a doçura da sua alma”.

Autor desconhecido.

*Aos meus pais, pelo suporte incondicional.
À minha avó Alice (in memoriam), pelo exemplo de vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade concedida e por todo suporte que me deu em forma de mestres, amigos e família. Tua mão me sustentou até aqui.

Ao Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Junior, meu orientador, pela oportunidade dentro do CEVAP e fora do país, sou eternamente grata. Agradeço também toda ajuda, orientação, atenção e paciência.

A Profª. Drª. Lucilene Delazari dos Santos, pela co-orientação, pelo auxílio, pela compreensão, pela orientação dentro e fora do CEVAP e pela paciência.

Ao Prof. Dr. Benedito Barraviera, pelos conselhos e orientações, por ser um exemplo de dedicação e persistência profissional, e por carregar o CEVAP com tanto empenho proporcionando esta experiência.

Agradeço aos técnicos Airton Lourenço Junior (in memoriam), Luciana Curtolo de Barros e Elenize Jamas por toda ajuda, auxílio e cuidado na hora de transferir o conhecimento.

À Banca Examinadora pela disponibilidade e atenção.

Ao Prof. Dr. Denis Servent, colaborador internacional, e Nicolas Gilles, técnico, ambos pertencentes ao CEA – França, pela oportunidade de estagiar por 3 meses, conhecer uma nova rotina e vivenciar essa experiência única.

A Letícia Araújo Cunha e Jéssika de Oliveira Francisco pela eficiência, paciência, a prontidão em ajudar e pelos horários de almoço.

Aos funcionários do CEVAP: Juliana, Selma, Wendel, Granieri, Marcos, Sheila, Sandra, Marília, Pâmela, Marli e Sérgio pelo trabalho tão bem feito que faz parte do bom funcionamento do CEVAP.

A Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida tornando possível a realização deste trabalho.

Aos funcionários da Pós-Graduação: Janete, Bruna Quirino Jorgetto, Solange Sako Cagliari, Regina Célia Spadin e Diego C. B. de Oliveira pelo socorro, por sempre ajudar da melhor maneira (im) possível e pela prontidão exemplar. Muito Obrigada.

Agradeço a todos do Departamento de Doenças Tropicais, que fizeram parte dessa caminhada. As meninas da MI pelo suporte, risadas e amizade em congressos, eventos e almoços na UNIPEX.

Agradeço a todos que fizeram e fazem parte do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP) por compartilharem toda rotina, pelos conselhos, pela prontidão em ajudar, por tornar a rotina menos maçante e por proporcionarem uma amizade fora do ambiente de trabalho. Vou levar o melhor de cada um de vocês comigo, agradeço a todos, em especial, Airton, Luciana, Elenize, Patricia Orsi, Juliana Simon, Dani Fossato, Bel, Pricisila, Patricia Rocha, Denis, Aristóteles, Tauane, Claudia, Josias, Andre, Leonardo, Camila, Natalia, Leticia Dragone, Leticia Pontes, Mauricio, Fauto, Clara, Rafael, Vivian, Lucas, Gustavo, Laudiceia, Lidiane, Paty Lima. Vocês fazem parte dessa caminhada. Obrigada pelo apoio em forma de amizade, conselhos, ajuda acadêmica, risadas e os inúmeros coffees e lanches da tarde

Agradeço as minhas grandes amigas Patricia Rocha, Leticia Dragone, Bel e Pri, pela amizade que com certeza levarei pelo resto da vida. Amizade iniciada no CEVAP mas que foi levada para fora. Por todo apoio, conversas, conselhos, por acalmarem meus ânimos em momentos de tensão e pelas infinitas risadas.

Agradeço em especial meus pais, Valter e Sônia, pelo exemplo de dedicação e por sonharem este sonho comigo. Por se anularem tantas vezes em nome da minha educação. Agradeço os valores que me ensinaram que são minha essência e pela liberdade concedida que ajudou a me encontrar como pessoa. Por proporcionarem apoio financeiro e emocional durante todo esse processo. Por entenderem minha ausência de casa por mais de 8 anos. Sinto pelos almoços de domingo que perdi, pelas festas de aniversário que não estive, pelas noites fora de casa, por não estar lá para cuidar quando um de vocês esteve doente. Obrigada por serem meu porto seguro, sei que posso navegar o mais longe que for, mas meu lar é onde vocês estão. Amo Vocês.

Agradeço em especial, a minha maior saudade, a minha avó, Alice Gallani Ropelli (in memoriam), pelos ensinamentos, pelos valores e pelos conselhos e por ser o exemplo de mulher que sempre esteve tão à frente do seu tempo. Espero ter herdado todo seu entusiasmo e doçura de coração. A senhora faz uma falta absurda vó, como eu gostaria que a senhora estivesse aqui, pois se cheguei aqui foi graças aos seus incentivos. Amo você.

Agradeço ao Alan dos Passos Tamborim, pela parceira em tempo integral, mesmo com a distância esteve tão presente em forma de afeto, risadas, segurança, me deu serenidade em momentos de loucura, apoio e carinho nesta última etapa tão difícil e

agradeço também a compreensão pela minha ausência. Obrigada por tudo. Você faz parte desta tese, pois também faz parte de mim.

Agradeço aos meus amigos de longa data, Alzira Limeira, Lulis Ferradura, Marisa Gomes da Costa, Mifa Boboleto, Deusa Maria Barretos, Dre da Baixada, Crau Natascha, Daniboy Italia, Coruja do Dada, Jow jow do Ibis, e Mariana Z. Obrigada por sempre me receberem de braços abertos quando retornava para casa. Obrigada por compreenderem minha ausência e me presentear com uma amizade tão verdadeira e honesta. Obrigado pelas férias, viagens, risadas, churrascos e conselhos.

Agradeço aos meus amigos de Botucatu, amigos que fiz fora do ambiente de trabalho e me agradeceram com sua amizade, compreensão, brincadeiras, risadas e por tornar essa caminha mais leve. Minhas famílias botucatuenses, família Visconde 766 e família Crossfit Cuesta, vocês com certeza foram minha válvula de escape nos momentos mais tensos. Obrigado por me acolherem de maneira tão calorosa e me presentear com a amizade de vocês.

Aos que não mencionei diretamente, fica aqui meu agradecimento. Todos que passaram por minha vida neste período fazem parte deste processo também. Obrigada!

RESUMO

Venenos animais representam misturas complexas de substâncias bioativas como proteínas e peptídeos com as mais diversas funções farmacológicas, bioquímicas e fisiológicas. A elucidação dos mecanismos de ação dessas moléculas pode proporcionar o desenvolvimento de fármacos mais específicos e/ou ferramentas biológicas. Diante disso, torna-se indispensável o seu conhecimento estrutural e bioquímico, principalmente aqueles que interagem com receptores responsáveis por intermediarem a maioria dos processos celulares, ora inibindo e/ou ativando diversos tipos de respostas biológicas. Recentemente, diversos estudos têm evidenciado que proteínas e peptídeos tornam-se importantes ferramentas nos estudos da neurotransmissão e/ou junção neuromuscular e para elucidação de mecanismos farmacológicos e bioquímicos. Além disso, biomoléculas podem interagir com uma importante classe de receptores acoplados de proteínas G, as quais constituem uma das importantes famílias conhecidas de receptores identificados em vertebrados atuantes em várias vias de sinalizações celulares. A serotonina, 5-Hidroxitriptamina (5-HT), é um dos mensageiros químicos mais estudados e liga-se a receptores específicos, e está ligado a diferentes efeitos no corpo humano. Amplamente encontrados no sistema nervoso central estão envolvidos a processos como êmese, apetite, humor, memória, respiração, cognição e outras funções. Os estudos desses receptores tornam-se de importância terapêutica, visto que aproximadamente 50% dos fármacos desenvolvidos atualmente atuam sobre esses receptores, além de auxiliar na elucidação de mecanismos e vias que estão relacionados a esses receptores e doenças neurodegenerativas, cardíacas, monogênicas e oncogênicas. Toxinas ativas em GPCRs tem sido descritas em venenos de caracóis marinhos e serpentes. O objetivo do nosso trabalho foi a identificação de biomoléculas presentes no veneno de *Bothrops jararacussu* com afinidade para GPCRs. Identificação e caracterização feita aplicando estratégia de proteômica, utilizando cromatografia líquida de alta resolução por fase reversa (HPLC-RP), a elucidação de suas estruturas primárias espectrometria de massas e sequenciamento por química degradativa de Edman. Toxinas animais possuem como alvos receptores acoplados a proteína G; entretanto há poucos estudos relacionados a esses receptores e toxinas de serpentes do gênero *Bothrops*. Desta forma, o estudo desses peptídeos em venenos animais representa um campo promissor para desenvolvimento de novos fármacos, auxiliando na compreensão de mecanismos de ação e das vias de sinalização de diversas doenças.

Palavras-chave: *Bothrops jararacussu*; GPCR; Serotonina; Serpente; Veneno

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNOMOS

³H – Trítio

¹⁴C – Carbono

5-HT - Hidroxitriptamina

μL - Microlitros

Ach – Acetilcolina

ACN - Acetonitrila

DL – Dose letal

ESI-TOF-MS/MS - Espectrometria de massas

GTP – Guanina trifosfato

GDP- Guanina difosfato

GPCR – G protein-coupled receptor (receptor acoplado a proteína G)

HPLC – Cromatografia Líquida de alta Eficiência

Mg – Miligramas

ML – Mililitros

MTx – Toxina Muscarínica

SDS – PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Parassimpático

TFA - Ácido trifluoroacético

TM –transmembrane (transmembrana)

TSH – Hormônio estimulante da Tireóide

WTx – Weak toxin (toxina fraca)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVOS.....	24
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1	Veneno.....	25
3.2	Aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética em Experimentação Animal.....	25
3.3	Isolamento e Purificação.....	25
3.3.1	Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (HPLC-RP).....	25
3.3.2	Análise Eletroforética SDS-PAGE.....	26
3.3.3	Ultrafiltração.....	27
3.3.4	Quantificação de proteínas e peptídeos	28
3.3.5	Digestão de proteínas in gel.....	28
3.3.6	Sequenciamento peptídico por Espectrometria de Massas	29
3.3.7	Análise dos dados de Espectrometria de Massas.....	30
3.4	Análise de ligações	30
4	RESULTADOS.....	32
4.1.1	Cromatografia Líquida – Fase Reversa.....	32
4.1.2	Análise Eletroforética em gel de poli(acrilamida) (SDS-PAGE).....	34
4.1.3	Quantificação proteica e pesagem seca para compostos de baixa massa..	35
4.1.5	Determinação da massa molecular de compostos de baixa massa.....	35
4.2	Análise de ligações.....	41
4.2.1	Análise de ligações dos venenos brutos.....	41
4.2.1	Análise de ligação do veneno de <i>Bothrops jararacussu</i>	44
5	DISCUSSÃO.....	48
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53
7	REFERÊNCIAS	54

1. INTRODUÇÃO

Os animais peçonhentos possuem estruturas específicas como dentes, ferrões, agulhões, esporões, as quais são desenvolvidas para inoculação da secreção tóxica produzida (veneno), tendo um papel importante para defesa e alimentação. No Brasil, a alta biodiversidade permite que animais peçonhentos de diferentes gêneros e espécies sejam encontrados, como serpentes dos gêneros *Bothrops*, *Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Crotalus*, *Lachesis*, *Micrurus*; escorpiões do gênero *Tityus*, aranhas do gênero *Lactrodectus*, *Loxocoles* e *Phoneutria*, e abelhas do gênero *Apis*^{1,2}.

As toxinas animais surgem da evolução necessária a adaptação ao ambiente, seja como mecanismo de defesa ou ferramenta para obtenção de alimento. A função do veneno pode alterar sua composição, como em venenos de defesa (abelhas e peixes) que são extremamente conservados e com a ação primária de dor local imediata. Os venenos com função predatória são mais complexos e de elevada variabilidade, tanto em sua composição e como em efeitos no organismo. A diversidade de toxicidade está relacionada a taxonomia, população de algumas espécies, diferenças entre macho e fêmea e variações ontogenéticas^{3,4}.

O veneno das serpentes percorreu um longo processo evolutivo até o que conhecemos atualmente como glândula venenosa juntamente com músculos compressores e presas como canal interino, possibilitando a inoculação das secreções tóxicas produzidas cheguem ao interior do tecido das vítimas. Sendo uma das peçonhas mais complexas do reino animal, onde 90% do seu peso seco é de caráter proteico, compreendendo enzimas, toxinas não enzimáticas e proteínas não tóxicas. As frações não proteicas são formadas por carboidratos, lipídeos e metais (glicoproteínas e enzimas metaloproteicas), amins biogênicas, nucleotídeos e aminoácidos livres⁴.

As serpentes representantes do gênero *Bothrops*, popularmente conhecidas por jararacas, são responsáveis por 90% do número de acidentes por serpentes ocorridos no Brasil⁵. A elevada complexidade do veneno do gênero *Bothrops* pode causar efeitos como proteolítico, atividade inflamatória local induzida por aminas biogênicas, peptídeos, fosfolipases do tipo A2 e lectinas⁶. Levando a uma atividade inflamatória através da formação de trombos, consequentemente a hipóxia, edema e necrose do tecido; efeito coagulante, onde os fatores de coagulação são ativados e consomem fibrinogênio e fibrina intravascular, dificultando a coagulação sanguínea⁷. As diferentes espécies de *Bothrops* podem ocasionar diferentes níveis da atividade anticoagulante; e por fim, efeito hemorrágico, que pode ser tanto local como sistêmico, são atribuídas as hemorraginas, metaloproteinases que contem zinco, conseguem romper o endotélio vascular e tem atividade desintegrina, degradando vários componentes da matriz extracelular, como colágeno tipo 4 e fibronectina. Além disso, inibem a agregação plaquetária⁸.

Entre seus representantes, a espécie que se destaca dentro do gênero é a *Bothrops jararacussu*, que entre suas características pode medir até 1,8 metros de comprimento, possui uma cabeça grande, sendo a *Bothrops* com maior capacidade de inoculação de veneno, assim, sendo responsável por graves acidentes⁹. É predominantemente encontrada no Sudeste e Sul do Brasil. Sua alimentação é diversificada quando comparada as outras jararacas, alimentando-se de mamíferos, anfíbios e lagartos. Fazendo uma relação direta como a composição bioquímica do veneno com o tipo de alimentação, visto que o mesmo veneno precisa ser eficaz para presas fisiologicamente distinta^{10,11}. Na tabela 1, é possível verificar a composição geral bioquímica do veneno botrópico.

Venenos de serpentes de um mesmo gênero possuem atividade tóxica muito similar, mas perfis de eletroforese diferentes. Assim, o veneno de *B. jararacussu*

apresenta atividade miotóxica mais intensa quando comparado ao veneno de outras espécies do gênero. Esta característica é dada pela atividade de Bothropstoxina I, uma Lys49 fosfolipase A2 (PLA2), composta por 121 aminoácidos e de massa molecular aproximada de 13kDa. Esta proteína está associada a complicações locais como necrose^{12,13}.

Além do problema de saúde pública causado pelos envenenamentos⁵, o estudo da composição do veneno auxilia na elucidação do papel bioquímico possibilitando a compreensão de mecanismos fisiológicos e assim, promovendo o desenvolvimento de drogas e ferramentas de diagnóstico baseadas nos princípios ativos das toxinas^{14,15}.

Tabela 1- Resumo da composição Bioquímica do veneno Bothropico. Principais frações protéicas, não protéicas e peptídicas identificado no veneno de serpentes do gênero Bothrops, com base em (Iwaanaga & Suzuki, 1979¹⁶; Markland, 1998¹⁷).

Principais componentes Bioativos do veneno Botropico							
	Enzimáticos	Não Enzimáticos	Peptídicos	Desintegrina Neurotóxico Citotóxico Miotóxico Potenciadores de Bradicinina Natriuréticos Cardiotóxico	Não Proteico	Orgânicos	Não orgânicos
	Proteicos	Fosfolipases Fosfoesterases L- aminoácido oxiade Acetilcolinesterase Serinoprotease Metaloprotease Hialuronidases Catalases Aminotransferases Ativadores de fator X				Lectinas Ativadores de Proteína C Fatores de Crescimento Precusores de peptídeos bioativos	

Um exemplo muito importante da área de desenvolvimento de fármacos a partir de toxinas animais foi a descoberta do inibidor da enzima de conversão da angiotensina (ECA), o qual foi estudado a partir da observação do quadro clínico hipotensor adquirido em pacientes envenenados por acidentes com a serpente jararaca (*Bothrops jararaca*), e possibilitando o desenvolvimento do medicamento mais utilizado no mundo no tratamento de hipertensão, o Captopril®¹⁸. Outros importantes fármacos também

desenvolvidos a partir de toxinas animais são o de prevenção ao enfarto (Integrelin®) e o Selante de Fibrina desenvolvido pelo Centro de Estudo de Veneno e Animais Peçonhentos (CEVAP) - UNESP, sendo aplicado como cola biológica, estudos como de Sartoti-Filho e colaboradores (1998) constatou uma pesquisa *in vivo* em nervos ciáticos de ratos e pele de coelhos¹⁹ e *scaffold* para células tronco²⁰.

Venenos de escorpião, serpentes, aranhas e caracóis marinhos constituem um rico banco natural com mais de 10 milhões de peptídeos bioquimicamente estáveis e com propriedades farmacologias próprias^{21,22}.

A farmacologia reserva o termo “receptor” para interações do tipo reguladoras, onde uma pequena molécula pode atuar como agonista, liga-se ao sitio do receptor e o ativa, ou atuar como antagonista, liga-se ao sítio do receptor, mas não o ativa. A tendência de um ligante interagir com um receptor é denominada afinidade, enquanto a capacidade de ativar é chamada de eficácia^{23,24}.

Para medir a ligação das substâncias aos receptores utiliza-se moléculas radioativas (³H, ¹⁴C e ¹²³I). O ligante (agonista ou antagonista) com alta afinidade e especificidade com possibilidade de ser marcado com radioatividade que permita a medida de diminuta quantidade de radiação, onde ocorre a incubação do tecido (fragmentos de membrana) com várias concentrações da substancia radioativa até atingir o equilíbrio (saturação), remove-se o tecido por lavagem ou filtração e adiciona-se líquido de cintilação para leitura da radiação. Um ponto importante é a determinação de ligações não específicas, que é a capacidade da substância se ligar a outras estruturas que não sejam o receptor, então as ligações não específicas são calculadas na presença de uma concentração saturada de ligante (não radioativo) que inibe totalmente a ligação da substancia radioativa aos receptores, deixando para trás o componente não específico^{23,25}.

Os receptores acoplados a proteína-G (GPCRs, G-protein coupled receptors) também são conhecidos como heptaelicoidais (com estruturas α -hélices transmembrana), e são tidos como receptores de membrana acoplados a sistemas efetores intracelulares através de uma proteína G ^{23,26,27}. Estes receptores desempenham importantes papéis do ponto de vista médico, farmacológico e terapêutico. Em doenças monogênicas, variantes genéticas de GPCR, agonistas e antagonistas farmacológicos ^{28,29,30}.

Os GPCRs constituem uma abrangente família de proteínas de membrana possuindo até 1.100 resíduos em uma cadeia polipeptídica codificadas por mais de 800 genes humanos. São classificados pela IUPHAR (Internacional Union of Basic and Clinical Pharmacology) ou GPCRDB (G-protein coupled receptors data base) em quatro famílias de acordo sua função e seus ligantes: família rodopsina-like, com 701 representantes, secretina-like com 24 representantes, a família metabotropicos de glutamato/ferormonio com 15 representantes e a família vomeronasais e de paladar com 24 representantes. Há também dois grupos (receptores de ferormônios e receptores de cAMP), porém não são encontrados em mamíferos. Aproximadamente 370 GPCRs humanos possuem ligantes endógenos como hormônios e neurotransmissores. Existem em torno de 150 GPCRs com funções desconhecidas, estes são denominados receptores órfãos ^{23,31}.

Apesar da variedade da quantidade de receptores dentro das subfamílias, todas compartilham da mesma característica de sete domínios hidrofóbicos - 7TM helicoidal - conectado com três *loops* extracelulares e três *loops* intracelulares. A região N-terminal dos receptores se localiza na região extracelular sendo responsável pela interação e reconhecimento e modulação dos ligantes. Já o C-terminal se localiza no domínio intracelular. As maiores diferenças são observadas especialmente no *loop* da região extracelular, onde as estruturas secundárias se diferenciam ^{24,32}.

Os GPCRs compreendem variados receptores como muscarínicos de acetilcolina, os receptores adrenérgicos, receptores de dopamina, receptores de serotonina (5-HT), receptores de opióides, receptores de vários peptídeos, receptores de purina e muitos outros, incluindo os quimiorreceptores envolvidos no sentido do olfato³³. O primeiro receptor GPCR clonado foi o β -adrenérgico em 1986, que então iniciou o estudo, tornando-se um marco e início para elucidação e compreensão dos mecanismos desses receptores ^{32,33}.

Estes GPCRs podem ser ativados por uma grande variedade de ligantes, em sua maioria agonistas endógenos desde a lipídeos, açúcares, componentes orgânicos voláteis, aminoácidos, íons inorgânicos, nucleosídeos e nucleotídeos, aminas biogênicas, peptídeos (secretina, gastrina, vasopressina, ocitocina) e proteínas ³⁴.

A ativação de receptores de superfície celular é responsável pela transdução de sinais extracelulares, tornando-se uma importante interface de comunicação. Alguns exemplos são receptores de GABA A (ansiolítico, antiepilético e anestésico), receptor de insulina (hipoglicemiantes), receptor do fator de crescimento vascularendotelial (antitumorais) e β 1 – adrenoceptor (anti-hipertensivo). Os GPCRs estão relacionados a processo como neurotransmissão, crescimento, metabolismo e diferenciação celular, secreção e defesa imunológica ³⁵.

Sua expressão na membrana plasmática torna os GPCRs acessíveis, em especial para hormônios e drogas, incluindo agonistas e antagonistas, sua expressão em diferentes tecidos e células não é uniforme, o que confere seletividade, e em alguns casos especificidade³⁶.

As proteínas de membrana sofrem mudanças conformacionais quando recebem um ligante, iniciando uma grande variedade de efeitos fisiológicos e patológicos. Assim, os GPCRs são importantes alvos que podem conduzir ao desenvolvimento de fármacos para doenças, desde desordens do sistema nervoso central, doenças inflamatórias,

doenças cardíacas, doenças monogênicas, câncer e outros. No ano de 2012, aproximadamente 40 a 50% dos fármacos comercializados atualmente e 25% dos mais vendidos possuem como alvo os GPCRs^{37,38}.

Os GPCRs estão associados a muitos aspectos da função celular, atuando por mecanismos de transdução de sinais, ou seja, a ativação de eventos intracelulares por estímulos externos²³. As proteínas G auxiliam no estabelecimento da ligação entre o receptor de membrana e a primeira etapa da cascata de transdução de sinais. Estas são as proteínas intermediárias e recebem esse nome pois interagem com os nucleotídeos de guanina, GTP (guanosina trifosfato) e GDP (guanílicos guanosina difosfato). São proteínas de alta massa molecular possuindo três subunidades α , β e γ . As diferenças entre as subunidades dão origem a sua classificação em treze tipos de proteínas G, divididas em quatro famílias, divisão essa dada pela semelhança da estrutura e propriedades funcionais. São divididas em: $G\alpha$ estimuladora ($G\alpha_s$); $G\alpha$ inibitória ($G\alpha_i/o$); $G\alpha$ ativadoras de fosfolipases ($G\alpha_q/11$) e $G\alpha$ que interage com transportadores de íons ($G\alpha_{12/13}$)³⁵.

A ativação do receptor inicia-se quando a guanina liga-se à subunidade $G\alpha$, e com atividade enzimática catalisa a conversão do GDP em GTP. O GPCR quando interage com uma molécula agonista sofre uma alteração na sua conformação, adquirindo uma afinidade pelo complexo α - β - γ , dissociando o GDP ligado e substituindo-o por GTP, separando o complexo β - γ e conseqüentemente a liberação α -proteína GTP e o complexo β - γ . A proteína G, então na sua forma ativa inicia as cascatas de sinalização dentro da célula, tornando possível sua associação com enzimas e canais iônicos, levando a ativação ou inativação do processo. A hidrólise do GTP a GDP da subunidade α ocorre através a enzima GTPase, finalizando o processo^{23,35}.

As toxinas ativas em GPCRs são encontradas em venenos de caracóis marinhos e serpentes. Conus produzem toxinas que agem em vasopressinas, neurotensinas e

adrenoreceptores^{39,40}. Venenos de serpentes possuem sarafotoxinas, os quais são ativos em receptores endoteliais, toxinas muscarínicas que atuam sobre receptores muscarínicos ou β -cardiotoxinas que atuam em β -adrenoreceptores^{41,42,43}. Eles produzem uma ampla variedade de propriedades farmacológicas, atuando como agonistas, antagonistas e moduladores alostericos⁴⁴. Assim, venenos de animais representam uma fonte promissora de novos ligantes para GPCRs.

Rouget e colaboradores, 2010⁴⁵ encontraram no veneno de serpente *Dendroaspis angusticeps* (Mamba Verde) um GPCR adrenérgico, alvo das neurotoxinas dos responsáveis pelo bloqueio da neurotransmissão. As primeiras toxinas muscarínicas (MT1 e MT2) isoladas foram isoladas a partir do veneno da Mamba Verde e caracterizadas por sua capacidade de inibirem ligações antagonistas não específicas de receptores muscarínicos. As MT1 e MT3 foram utilizadas para quantificar receptores muscarínicos em cérebros de ratos. A MT1 bloqueou seletivamente 40% dos receptores muscarínicos do tipo 1, enquanto a MT3 bloqueou 88% dos receptores^{45,47}.

A acetilcolina e os receptores muscarínicos desempenham um importante papel em circuitos neuronais da formação do hipocampo, região essa relaciona a aquisição de memória. Ensaios quantitativos do receptor muscarínico M4 com toxinas MT3 marcadas radioativamente no hipocampo pós-morte em cérebros de paciente com Alzheimer, mostraram que a seletividade diminui neste receptor em comparação com o resultado da progressão da doença. Em ratos, a MT3 injetada na região hipocampo causou amnésia⁴⁸.

Um importante neurotransmissor que possui como alvo GPCRs é a Serotonina ou 5-Hidroxitriptamina (5-HT) é um dos mensageiros químicos mais estudados, e está ligado a diferentes efeitos no corpo humano mediados por 14 tipos de receptores, onde 13 deles estão associados a proteínas G e um receptor 5-HT₃ associado a canais iônicos. Amplamente encontrados no sistema nervoso central estão envolvidos a

processos como êmese, apetite, humor, memória, respiração, cognição e outras funções^{23,49,50}.

Além do sistema nervoso central, a maioria da serotonina é encontrada no trato gastrointestinal (GI), sendo produzida por enterocromafins; células que revestem o lúmen do intestino, responsáveis por uma maior atividade peristáltica. A serotonina encontrada no sangue está envolvida na coagulação sanguínea e vasoconstrição, a função que nomeia “sero” (de *serum*) e “tonina” (*tonin*, que induz a contração)²³.

A maioria das pesquisas sobre serotonina são realizadas na área de neuropsiquiatria para o desenvolvimento de fármacos para diferentes desordens, onde a especificidade é extremamente importante para a eficácia farmacêutica. Como exemplo da importância da especificidade, o uso de medicamentos a base de pergolida e bromocriptina são utilizados no tratamento da doença de Parkinson, entretanto sua venda foi interrompida nos EUA devido aos efeitos secundários causados, como indução a hipertrofia da válvula cardíaca, relacionada a ação agonista fora do alvo no receptor 5-HT_{2B}. Os fármacos que possuem como alvo os receptores de serotonina representam o top de vendas na década passada, como antidepressivos, que foram responsável por onze bilhões de dólares nas vendas no ano de 2008⁵¹.

Os receptores 5-HT são classificados em sete subtipos nomeado de 5-HT₁₋₇, todos acoplados a proteínas G, exceto pelo 5-HT₃, o qual tem ação através de canal iônico⁵². Nos receptores da família 5-HT₂ podemos encontrar 3 subtipos: 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} e 5-HT_{2c}. Estes receptores têm sido considerados responsáveis por regularem funções no sistema nervoso central como ansiedade, depressão, sono, saciedade e esquizofrenia. Modelos animais e humanos tem sido estudado para compreensão do mecanismo de diversas doenças. Os ligantes específicos, principalmente agonistas, tem feito a identificação dos subtipos de receptores envolvidos em doenças^{51,53}.

O receptor do tipo 5-HT_{2c} se liga a neurotransmissores endógenos. É acoplado a proteína G_q/G₁₁ e responsável pela neurotransmissão excitatória. O 5-HT_{2c} em humanos é localizado no cromossomo X. Sendo o gênero masculino possuindo apenas uma cópia e o gênero feminino duas, o gene é represso, polimorfismo nesse receptor pode afetar os dois sexos de maneiras diferentes⁵⁴.

A ativação desse receptor por serotonina inibe dopamina e noraepinefrina em certas áreas do cérebro. São responsáveis por regular o humor, ansiedade, alimentação e comportamento reprodutivo. Agindo sobre a liberação de dopamina no córtex pré-frontal, hipocampo, hipotálamo e amígdala⁵⁵. Estudos correlatam o elevado número de receptores 5HT_{2C} na região pré-frontal do córtex com casos de suicídio.

Diferente dos receptores 5-HT_{2A} e 5-HT_{2B}, há poucas evidências dos receptores 5-HT_{2C} fora do Sistema nervoso central. Estudos autorradiográficos em camundongos, usando ligantes como [³H] -5-HT, [³H] mesulergina e [³H] -LSD, forneceram os locais de distribuição ligação de 5-HT_{2C} para o rato e muitas outras espécies⁵⁶. Locais de ligação de 5-HT_{2C} são amplamente distribuídas e presente em áreas do córtex (núcleo olfativo, piriforme, cíngulo e retrosplenial), sistema límbico (o hipocampo e a amígdala) e o gânglios da base (núcleo caudado)⁵⁷.

A farmacologia do receptor 5-HT_{2C} é bem próximo, mas distinguíveis dos outros membros da família dos receptores 5-HT₂. A maioria dos ligantes de 5-HT₂ (por exemplo, antagonistas-ritanserina, Mesulergina,) não discriminam suficientemente entre os receptores⁵⁸.

A clonagem parcial do receptor 5-HT_{2C} em camundongos por Lubbert⁵⁹ foi seguida pelo sequenciamento completo em ratos por Julius e colaboradores em 1988⁶⁰, e, posteriormente, de humanos⁶¹. Um número de agentes antipsicóticos atípicos e típicos (incluindo a clozapina, loxapina, e clorpromazina) possuem elevada afinidade para receptores 5-HT_{2C} (incluindo, 5-HT_{2A}), alguns antidepressivos usuais convencionais e

atípicos também possuem elevada afinidade com esse receptor (por exemplo, antidepressivos tricíclicos, doxepina, a mianserina e a trazadona)⁶². Os receptores 5-HT_{2C} estão relacionados a alguns comportamentos como hipolocomoção, hipofagia, ansiedade, ereções penianas e hipertermia. Receptores 5-HT são alvos indiretos de inibidores da reabsorção de serotonina, como a fluoxetina, ou seja, medicamentos disponibilizam a serotonina na fenda sináptica. Os medicamentos utilizados no tratamento de depressão atuam sobre os inibidores de reabsorção ⁶³.

Por fim, devido a importância destes receptores para a pesquisa de novos medicamento, aliada à alta especificidade e seletividade das toxinas e peptídeos derivados dos venenos de serpentes, a busca de novas moléculas com este objetivo faz justificar-se plenamente este estudo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi identificar e caracterizar uma biomolécula/toxina isolada do veneno de *Bothrops jararacussu* com elevada afinidade para receptor acoplados a proteína G (GPCR).

2.2. Objetivos específicos

- Padronizar a metodologia purificação por cromatografia líquida de fase reversa (HPLC-RP) do veneno de *Bothrops jararacussu*;
- Avaliar as frações obtidas da HPLC-RP através de análises de ligações farmacológicas em receptores adrenérgicos β 1- β 2-; muscarínicos M2-, M3- e M5-; histamina H₄; dopaminérgico D₂; neurotensina NTS1; serotonina 5HT_{2C} e μ -opioid;
- Isolar e purificar as frações ativas para o receptor de interesse por HPLC-RP;
- Identificar a natureza das biomoléculas ativas para o receptor de interesse por meio de Espectrometria de Massas;
- Sequenciar as biomoléculas ativas para os receptores por espectrometria de massas ESI-Q-ToF, para peptídeos e proteínas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Veneno

O veneno da serpente *Bothrops jararacussu* foi obtido a partir do “pool” de venenos gentilmente cedidos pelo Centro de Estudo de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP-UNESP). Todas as serpentes são microchipadas individualmente, criadas e mantidas no CEVAP, garantindo assim a rastreabilidade deste veneno.

3.2. Aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética em Experimentação Animal

Esta pesquisa foi certificada e aprovada pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA), no dia 02 de agosto de 2012, está registrado sob o número de protocolo 957/2012, conforme anexo 1.

3.3. Isolamento e Purificação

3.3.1. Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (HPLC-RP)

O fracionamento do veneno de *B. jararacussu* foi realizado segundo metodologia de Calvete et al, 2011, com modificações, utilizando-se um cromatógrafo líquido LC-20AT (Shimadzu®). Todos os solventes orgânicos utilizados foram de grau HPLC e a água ultrapura do tipo Milli-Q (Milipore®).

A separação das biomoléculas presentes no veneno de *Bothrops jararacussu* foi realizada sob fase reversa utilizando-se uma coluna C18 (20 X 250 mm) (Shimadzu®). Foram aplicadas 30 mg de veneno bruto liofilizado solubilizado em 1 mL de 0,1% (v/v)

Ácido Trifluoroacético (TFA) e 5% (v/v) de Acetonitrila, sendo injetado manualmente no sistema com o auxílio de um loop de 1 mL. A eluição da amostra foi realizada por meio de dois tampões: (A) 0,1% TFA (v/v) e 5% Acetonitrila (v/v); (B) 0,1% TFA (v/v) e 60% Acetonitrila (v/v). A coluna foi equilibrada durante 15 minutos com o tampão A. Após o equilíbrio utilizou-se um gradiente de 2,5 a 100% do tampão B por 230 minutos, seguido de 50 minutos com 100% do tampão B. O fluxo utilizado foi de 1 mL/min, sendo que os picos foram coletados manualmente. A eluição foi monitorada na absorvância de 215 nm.

Após a análise de ligações descritas conforme o item 3.3.8., as frações que revelaram atividade positiva para o receptor, foram então avaliadas por SDS-PAGE (item 3.3.2) seguido de ultrafiltração (item 3.3.3) para a separação dos compostos de baixa massa molecular. Após estes procedimentos, um segundo passo cromatográfico por HPLC-RP foi realizado para a sua purificação.

Assim, as frações positivas foram solubilizados em 1 mL de 0,1% (v/v) Ácido trifluoroacético (TFA) e 5% (v/v) de Acetonitrila e injetados manualmente para as etapas de refracionamento por meio da estratégia de cromatografia líquida de fase reversa no equipamento LC-20AT (Shimadzu®) com o auxílio de um loop de 1 mL. A eluição da amostra foi feita através de dois tampões: (A) 0,1% (v/v) TFA; e (B) 0,1%(v/v) TFA e 100% (v/v) Acetonitrila. Utilizou-se para tanto um método isocrático de 0 -100% do solvente B por 35 minutos, tanto para as frações proteicas quanto daquelas de baixa massa separadas após a ultrafiltração. O fluxo utilizado foi de 1 mL/min, sendo que os picos foram coletados manualmente. A eluição foi monitorada na absorvância de 215 nm para peptídeos e 280nm para proteínas.

3.3.2 Análise Eletroforética SDS-PAGE

Para avaliar a pureza e integridade das amostras foram realizados géis de eletroforese SDS-PAGE das frações que revelaram atividade positiva para o receptor de serotonina 5HT_{2C}). Foram adicionadas 20 µg das amostras e 20 µL de tampão de amostra (glicerol 20% (v/v), β-mercaptoetanol 5% (v/v), SDS 2,3%(v/v), Tris-HCl pH 6,8), desnaturadas em banho maria a 70°C por 15 minutos. As amostras foram aplicadas em géis de poliacrilamida à 12% (m/v) com 1 mm de espessura, onde as proteínas foram isoladas por meio dos parâmetros: 1o step 100 mA, 150V por 12 minutos e 2o step para 150 mA, 200 V por 50 minutos, utilizando-se um sistema Bio-Rad® Electrophoresis System. Posteriormente, os géis foram corados em um recipiente contendo solução composta por 46% (v/v) de etanol, 46% (v/v) de Água, 8% (v/v) de ácido acético e corante Coomassie Brilliant Blue. Esta solução foi trocada periodicamente conforme sua saturação até que as bandas pudessem ser visualizadas. A massa molecular foi estimada pelo padrão de massa molecular ColorBurst™ Electrophoresis Marker (Sigma Aldrich®, St. Louis, EUA), contemplando massas moleculares de 8 a 220kDa por meio do software Platinum v.7 (Ge Healthcare).

3.3.3 Ultrafiltração

Após a revelação de constituintes protéicos por SDS-PAGE das frações que revelaram atividade positiva para o receptor de serotonina 5HT_{2C}, uma processo de ultrafiltração foi realizada para a separação das frações de baixa massa molecular e dos compostos proteicos por meio do filtro Ultra-4 Amicon® (Millipore® Corporation Belford, MA, USA) com auxílio de uma centrífuga a 40000xg e a 4°C. As frações foram diluídos em 3 mL de água Milli-Q e após a centrifugação, todos os compostos de baixa massa

molecular contendo massa molecular de 3 kDa ou menos foram separados e estocados em micro tubos, assim como aquelas frações acima desta massa molecular. Após secos em SpeedVac® foram mantidas a -20°C para utilização posterior em testes de ligação dos receptores e espectrometria de massas.

3.3.4 Quantificação de proteínas e peptídeos

A quantificação de proteínas foi realizada utilizando medição por UltraVioleta (NanoView® - GEHealthcare) a 280 nm . Para determinação da concentração aproximada de peptídeos e/ou compostos de baixa massas foi aplicada a metodologia de peso seco, onde os micro tubos foram pesados em uma balança de precisão e secos por SpeedVac antes e depois de receberem as frações.

3.3.5. Digestão de proteínas in gel

A digestão protéica in gel foi realizada segundo Shevchenko e colaboradores (2006). As bandas de proteínas de interesse foram recortados dos géis de eletroforese, descoloridos com solução 25 mM bicarbonato de amônio pH 8,0 e 50% (v/v) acetonitrila. Em seguida, as proteínas contidas nos spots foram submetidas às etapas de redução e alquilação das pontes de dissulfeto na presença de 10 mM DDT e 55 mM Iodoacetamida (IAA), respectivamente. Após esta etapa, os géis foram desidratados com 100% (v/v) acetonitrila, sendo então, submetidos à centrifugação a vácuo. Os géis desidratados foram incubados com uma solução 12,5 nmol/uL de tripsina (Promega) em tampão 25 mM bicarbonato de amônio, pH 8,0 durante 18 horas a 37oC. A hidrólise foi interrompida com a adição de 1% (v/v) ácido fórmico em relação ao volume da amostra e os

sobrenadantes foram coletados e secos por centrifugação a vácuo e posteriormente mantidos -20°C até sua análise por espectrometria de massas.

3.3.6. Sequenciamento peptídico por Espectrometria de Massas

As análises de espectrometria de massas foram realizadas em um equipamento do tipo electrospray (ESI) quadropolo, modelo MicrQ-TOF III (marca Bruker Daltonics), acoplado à um cromatógrafo líquido LC-20AT (marca Shimadzu). O cromatógrafo líquido foi equipado com um sistema binário de bombas e um aplicador de amostras automático. A fase móvel consistiu de água (A) e acetonitrila (B), contendo 0,1% (v/v) ácido fórmico. Em adição, a separação cromatográfica foi realizada por meio de um coluna de fase reversa C18 (4,5 mm x 100 mm, 1,8 μm). As condições de eluição foi otimizada num gradiente linear de 0 a 85% do solvente B por 60 minutos, num fluxo de 0,2 mL/min. A coluna e o aplicador automático de amostras foram mantidos a 25°C e 10°C , respectivamente. O volume de injeção dos compostos de referência e das amostras foi de 10 μL . O espectrômetro de massas foi atuou com os seguintes parâmetros: voltagem do capilar 4.5 kV, temperatura de secagem de 180°C , fluxo de nitrogênio de 6 L/min e pressão de 0.8 bar. A calibração externa foi realizada utilizando-se o kit Tunning MIX ESI (Agilent Technologies) antes das análises individuais. Os espectros de massas foram adquiridos no modo de ionização electrospray positiva (ESI) em um intervalo de ionização entre 100 m/z a 2500 m/z. Cada amostra submetida às análises de espectrometria em triplicada. Análises no modo de ionização electrospray negativa foram realizadas na presença do solvente metanol obedecendo as mesmas condições cromatográficas citadas anteriormente.

3.3.7. Análise dos dados de Espectrometria de Massas

Após a espectrometria de massas, os dados foram exportados e submetidos à análise automática com a ferramenta de bioinformática MASCOT v.2.1 (www.matrixscience.com), utilizando os seguintes parâmetros: enzima tripsina; taxonomia Chordata; banco de dados SwissProt; modificação fixa carbamidometilação; modificação variável oxidação da metionina; uma clivagem perdida pela enzima; massa molecular do tipo monoisotópica; erro de tolerância de peptídeos (MS) $\pm 0,3$ Da e erro de tolerância (MS/MS) $\pm 0,5$ Da; protonação + 1 e tipo de instrumento ESI-Q-TOF.

3.4. Análise de ligações

Para análise das ligações entre os receptores e as frações do veneno, os testes foram realizados no “Institut de Biologie et Technologies de Saclay (iBiTecS) da Commissariat à l'Énergie Atomique (CEA)”, Paris, França, seguindo a metodologia de Quinton et al., 2010⁶⁴.

Para tanto, foi verificada a afinidade entre a toxina de interesse e um radioligante específico do receptor. Para o screening (triagem) do veneno total foram avaliados os receptores: adrenérgicos $\beta 1$ - $\beta 2$ -; muscarínicos M2-, M3- e M5-; histamina H4; dopaminérgico D2; neurotensina NTS1; serotonina 5HT2C e μ -opioid.

Foram avaliados os venenos de *Bothrops jararacussu*, *Bothrops alternatus*, *Crotalus durissus terrificus* e do escorpião *Tityus serrulatus*. Apenas o veneno de *Bothrops jararacussu* revelou-se positivo para o receptor serotonina 5HT2C, então suas frações foram separadas, conforme descrito anteriormente, e avaliadas isoladamente.

Os experimentos foram realizados em placa de Elisa (96 poços). Foram utilizados tampões específicos para cada receptor.

Para os receptores 5-HT2C utilizou-se o radioligante 3H – mesulergina. Em um volume final de 100 μ L por poço. As placas foram incubadas por 24h em temperatura

ambiente. As reações de ligação foram interrompidas através de filtração por filtros GF/C equilibradas com 0,5% de polietilenoimina (PEI) em um coletor de células (PerkinElmer®) e as placas foram secas. Foi adicionado Ultimagold O (25 mL; PerkinElmer®) em cada poço e as amostras foram contadas utilizando TopCount (PerkinElmer®).

Uma curva de inibição foi ajustada aos dados de ligação utilizando Kaleidagraph (inibição Synergy® Software, Reading, PA, EUA). Os valores de IC50 foram convertidos em Ki para experiências de competição, utilizando a equação de Cheng-Prusoff.

Experiências de saturação de equilíbrio foram realizados com várias concentrações de ligante radioativo e uma quantidade constante de receptor. Ensaios cinéticos foram realizados utilizando uma quantidade constante de ligante radioativo e receptor, com vários tempos de incubação.

4. RESULTADOS

4.1 Isolamento e Purificação

4.1.1. Cromatografia Líquida – Fase Reversa

Obtivemos 97 frações a partir do veneno total de *Bothrops jararacussu* (Figura 1), por cromatografia líquida de fase reversa. Todas frações foram coletados manualmente, separados em micro tubos e liofilizados. Cada fração foi testada individualmente por sua capacidade de inibir o ligante radioativo ao receptor alvo.

Para obtenção de material necessário para os estudos, foram realizadas 10 coletas cromatográficas com 30 mg de veneno cada. Os perfis cromatográficos foram semelhantes, onde 97 frações foram coletados constantemente, entretanto, algumas frações apareciam esporadicamente, levando a soma total de 106 frações coletados de todas aplicações.

As frações 70 e 71, consideradas positivas nos testes de análise de ligação, foram ultrafiltradas para separar compostos (até 3KDa) e recromatografadas por fase reversa e coletadas manualmente (figura 2A e 2B; 3A e 3B), as frações majoritárias foram nomeado com fração70_4, fração 70_5, fração 71_2 e fração 71_5.

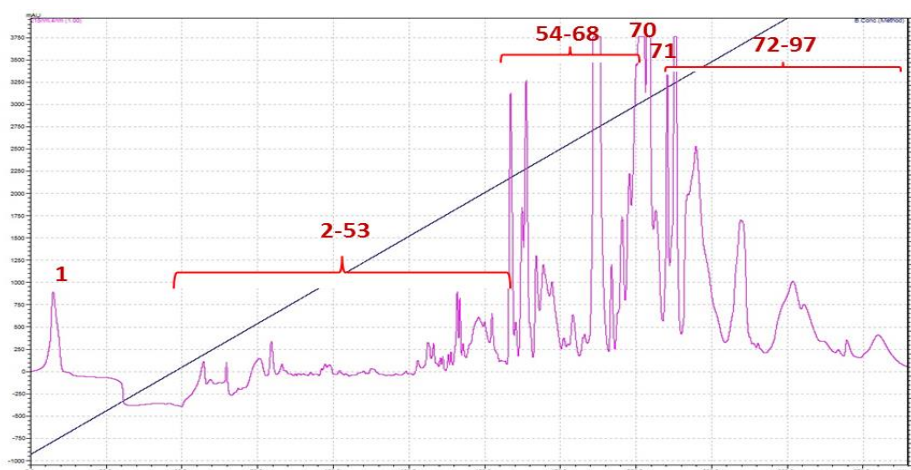


Figura 1 – Cromatografia de alto desempenho sob fase reversa do veneno total de *Bothrops jararacussu*, em uma coluna C18 (20 X 250 mm). Utilizando tampões (A) 0,1%(v/v) TFA e 5% (v/v) Acetonitrila e (B) 0,1%(v/v) TFA e 60% (v/v) Acetonitrila e fluxo utilizado de 1 mL/min. Foram obtidas 97 frações.

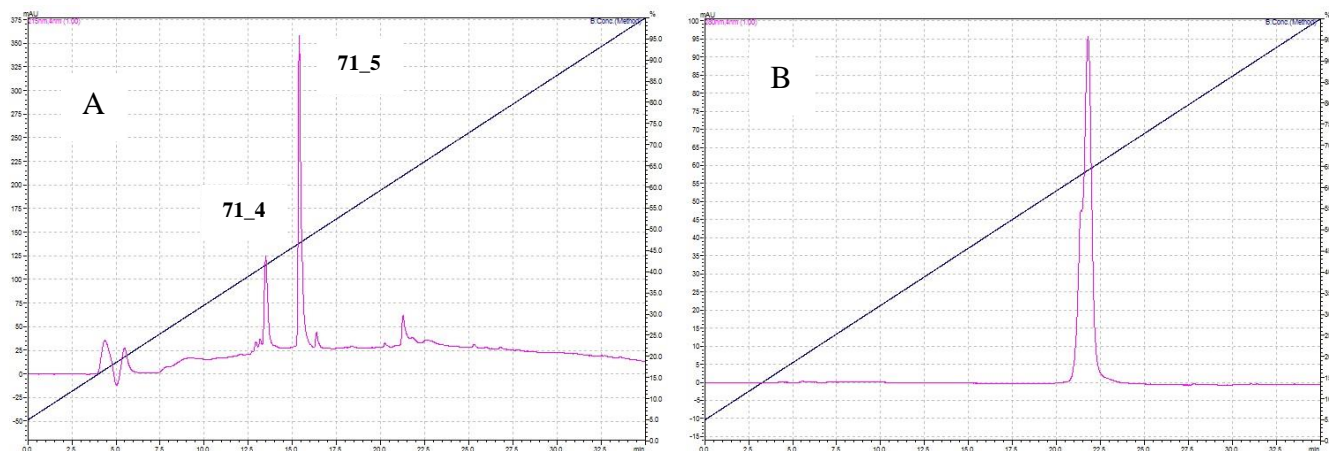


Figura 2 – Cromatografia de alto desempenho sob fase reversa da fração 70 de *Bothrops jararacussu*, em uma coluna C18 (20 X 250 mm). Utilizando tampões A: 0,1%(v/v) TFA e B: 0,1%(v/v) TFA e 100%(v/v) Acetonitrila, com um gradiente de 75% do tampão B por 35 minutos. (A) perfil cromatográfico dos compostos até 3KDa da fração 70, onde as frações majoritárias 70_4 e 70_5 foram coletados. (B) Perfil cromatográfico da porção proteica ultrafiltrada da fração 70.

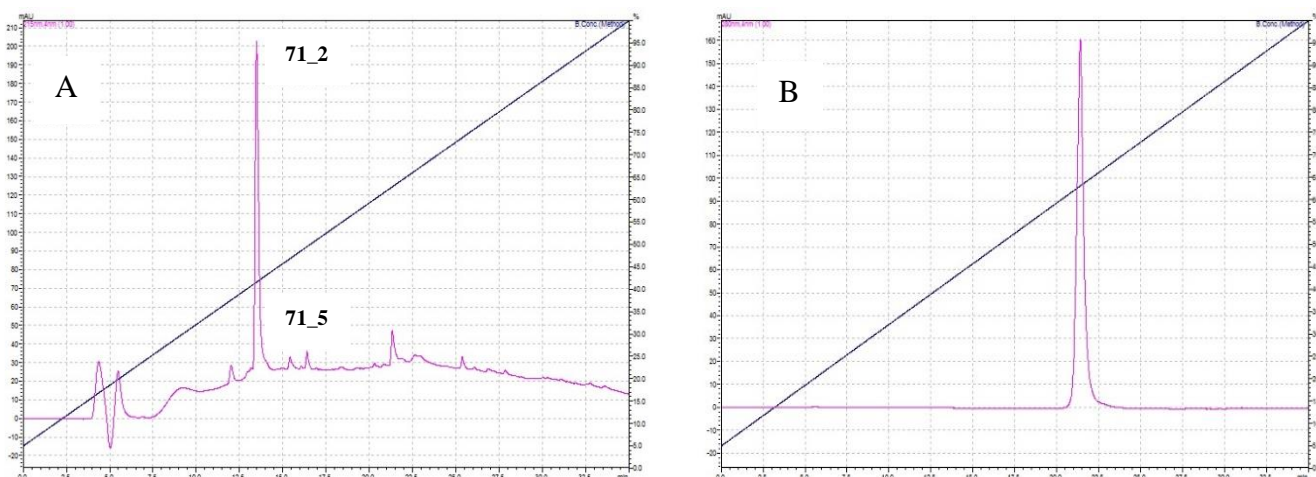


Figura 3 – Cromatografia de alto desempenho sob fase reversa da fração 71 de *Bothrops jararacussu*, em uma coluna C18 (20 X 250 mm). Utilizando tampões A: 0,1% (v/v) TFA e B: 0,1% (v/v) TFA e 100% (v/v) Acetonitrila, com um gradiente de 80% do tampão B por 35 minutos. (A) perfil cromatográfico dos compostos até 3KDa da fração 71, onde as frações majoritárias 71_2 e 71_5 foram coletados. (B) Perfil cromatográfico da porção proteica ultrafiltrada da fração 71.

4.1.2. Análise Eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A análise eletroforética realizada em gel de poliacrilamida a 12% (m/v), sob condições desnaturantes e reduzida das frações 70 e 71 (figura 4), em duplicata, evidenciou que as frações apresentam perfis similares de bandas.

O padrão sugere a presença de proteínas de 45 KDa e 20 KDa, não sendo possível identificar a presença de peptídeos por esse gel, visto que os peptídeos podem ser marcados somente abaixo de 4KDa. Conduzindo ao próximo passo de reomatografia das frações e ultrafiltração de proteínas e compostos de baixa massa.

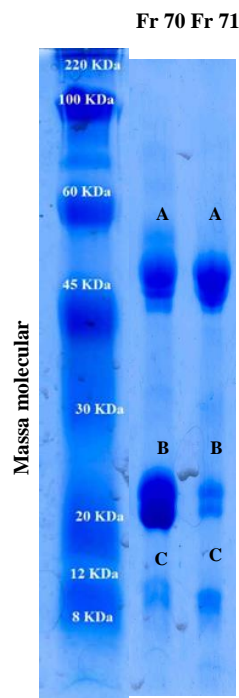


Figura 4- Análise eletroforética em gel de poliacrilamida 12% (m/v) evidenciando o padrão molecular (PMM) dos frações 70 e 71 obtidas a partir do veneno de *Bothrops jararacussu*. A constatação de três bandas por fração aproximadamente de 45kDa, 20kDa e 8kDa.

4.1.3 Quantificação proteica e pesagem seca para compostos de baixa massa

Após a coleta das 97 frações, estas foram secas em SpeedVac, armazenadas em microtubos e solubilizadas em 1 mL de água MilliQ. Todas frações foram quantificadas em triplicata por UV280nm.

A concentração de proteínas foi de 65,09 mg/mL para a fração 70 e 5,89 mg/mL para a fração 71.

Foram quantificados por peso seco as frações majoritárias dos compostos de baixa massa ultrafiltrados. Na fração 70 de compostos de baixa massa foram selecionadas frações majoritários da fração 70 (70_4 e 70_5) e na fração 71 (71_2 e 70_5). A fração 70_4 com aproximadamente 0,5 mg e a fração 70_5 com 0,5 mg, e as frações 71_2 e 71_5 ambos com aproximadamente 0,5 mg.

4.1.4 Identificação de proteínas por Espectrometria de Massas (LC-MS/MS)

Identificar as proteínas das frações 70 e 71 foram analisadas por um espectrômetro de massas híbrido do tipo ESI-Q-TOF (Bruker Daltonics, modelo micrOTOF-QIII). As seis bandas reveladas nas frações 70 e 71 do veneno de *Bothrops jararacussu* foram excisadas, digeridas e analisadas por espectrometria de massas em modo positivo (ESI+), Os resultados foram apresentados na tabela 1. Com auxílio da ferramenta MASCOT, as sequencias peptídicas encontradas. Os resultados das sequencias encontradas foram submetidas ao banco de dados SwissProt para verificação de proteínas homólogas.

Tabela 1 – Relação das sequencias das frações do veneno de *Bothrops jararacussu* similares depositadas no banco de dados MASCOT.

Nº da amostra	Código de Acesso	Nome da Proteína	Mascot score	Função
Fração 70_A	Q7T229	VSPH_BOTJR	154	Serino protease – <i>Bothrops jararacussu</i>
Fração 70_B	P83519	LECG_BOTJR	204	Lectina tipo C - <i>Bothrops leucurus</i>
Fração 70_C	P45881	PA2B2_BOTJR	39	Fosfolipase A2 – Botropstoxina-II

Fração 71_A	Q7T229	VSPH_BOTJR	166	Serino protease – <i>Bothrops jararacussu</i>
Fração 71_B	Q072L6	VSPL_BOTAS	192	Trombina-like <i>Bothrops asper</i>
Fração 71_C	P8697	PA2BD_BOTLC	131	Fosfolipase A2 – <i>Bothrops leucurus</i>

As frações 70_A e 71_A apresentaram similaridade a serino protease isolada a partir do veneno de *Bothrops jararacussu* depositada sob o código de acesso Q7T229. A fração 70_B foi similar a lectina tipo C encontrada no veneno de *Bothrops leucurus* sob o código de acesso P83519. A fração 70_C, apesar do baixo score, apresentou similaridade com a PLA2 isolada a partir do veneno de *Bothrops jararacussu*, que é encontrada pelo código de acesso P45881. A fração 71_B apresentou similaridade com a proteína de código Q072L6, uma trombina-like isolada a partir do veneno de *Bothrops asper*. E a fração 71_C apresentou similaridade com a PLA2 do veneno de *Bothrops leucurus* depositada sob o código de acesso P8697.

4.1.5 Determinação da massa molecular de compostos de baixa massa

As frações majoritárias recromatografados (fração 70_4, fração 70_5, fração 71_2 e fração 71_5) dos compostos até 3 kDa foram analisados tanto em modo positivo (figuras 5,6,7 e 8) como negativo (resultados não apresentados). A integração das frações e o processamento manual dos cromatogramas revelam a presença apenas de composto de baixa massa como esperado para as porções ultrafiltradas até 3 kDa. Entretanto, os perfis apresentados não sugerem a fragmentação de compostos peptídicos. As frações de composto de baixa massa analisados por LC-MS foram ionizados tanto no modo negativo (ESI -) como no modo positivo (ESI+). Foram identificados composto até 400 Da.

Na tabela 2, os principais íons do pico 70_4, pico 70_5, pico 71_2 e pico 71_5 analisados em modo positivo (ESI +) são apresentados. Todos íons apresentaram íon carga +1 como exemplificado na figura 9.

Tabela 2 – Relação massa/carga $[M+H]^+$ encontrada na espectrometria de massas.

FRAÇÃO	70_4	DA	70_5	DA	71_2	DA	71_5	DA
M/Z	177.1028	176.1028	244.9794	243.9794				
	195.1123	194.1123	288.2718	287.2718				
	239.1350	238.1350	262.9877	261.9877				
	238.1604	237.1604	309.1146	308.1146				
	305.1407	304.1407	327.1841	326.1841	261.1171	260.1171		
	321.1103	320.1103	337.0214	336.0214	309.1160	308.1160	415.2432	414.2432
	337.0242	336.0242	349.1670	348.1670	391.0704	390.0704	327.1883	326.1883
	365.1611	364.1611	353.1396	352.1396	416.2058	415.2058	349.1710	348.1710
	415.2340	414.2340	371.2109	370.2109				
	435.0947	434.0947	380.9473	379.9473				
	474.1046	473.1046	393.1922	392.1922				
			415.2340	414.2340				

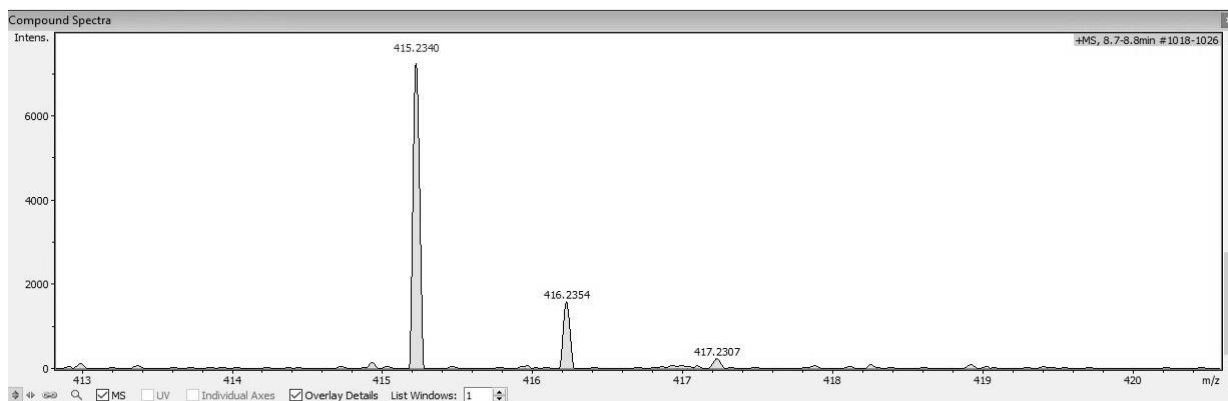


Figura 9 – Espectrometria de massas do tipo ESI-IT-TOF/MS da fração 71_2 em modo positivo. $[M+H]^+$ 415.2340 e seus isótopos, $[M+H]^+$ 416.2314 e $[M+H]^+$ 417.2307.

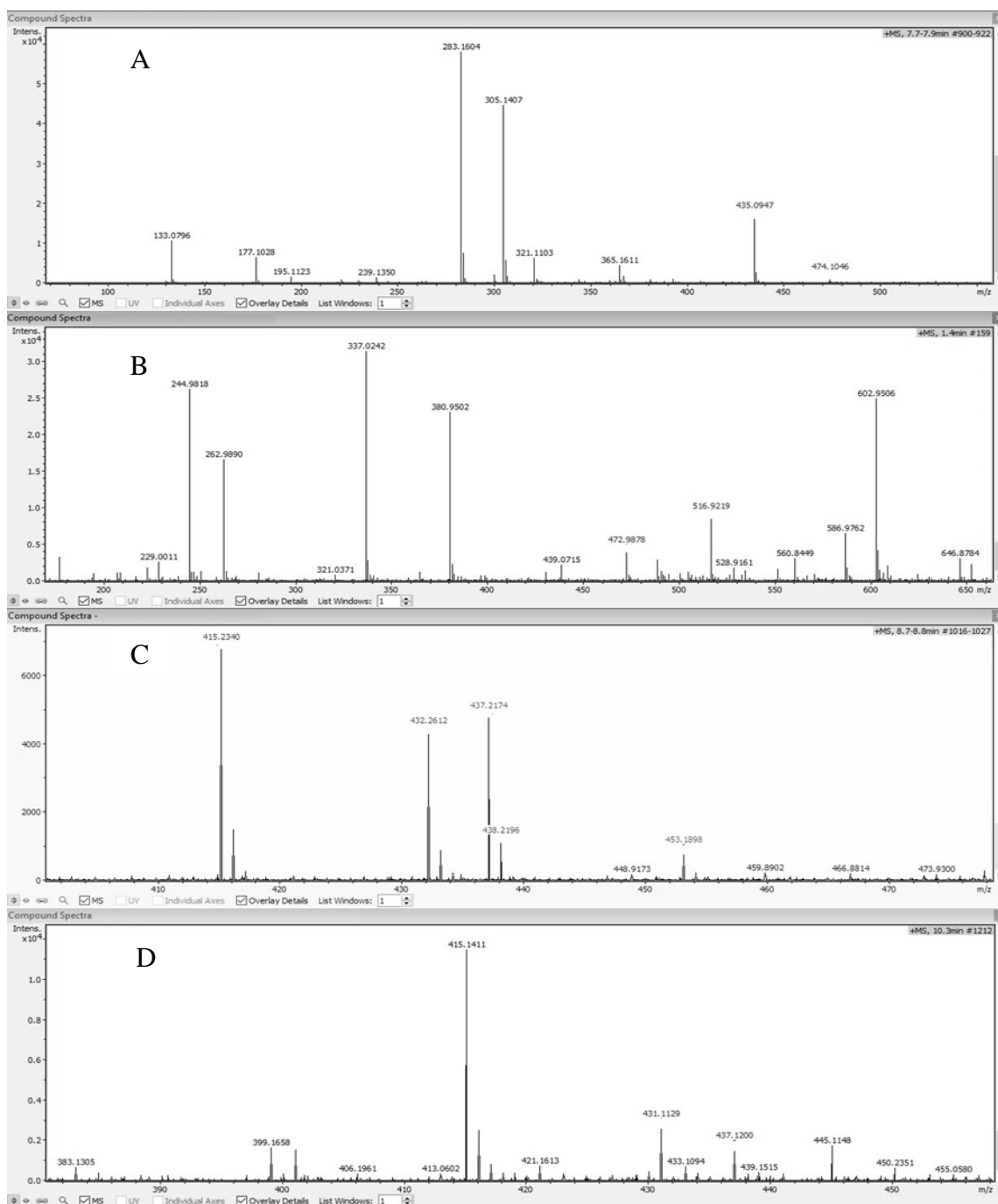


Figura 5 –Espectrometria de massas do tipo ESI-IT-TOF/MS da fração 70_4 em modo positivo.

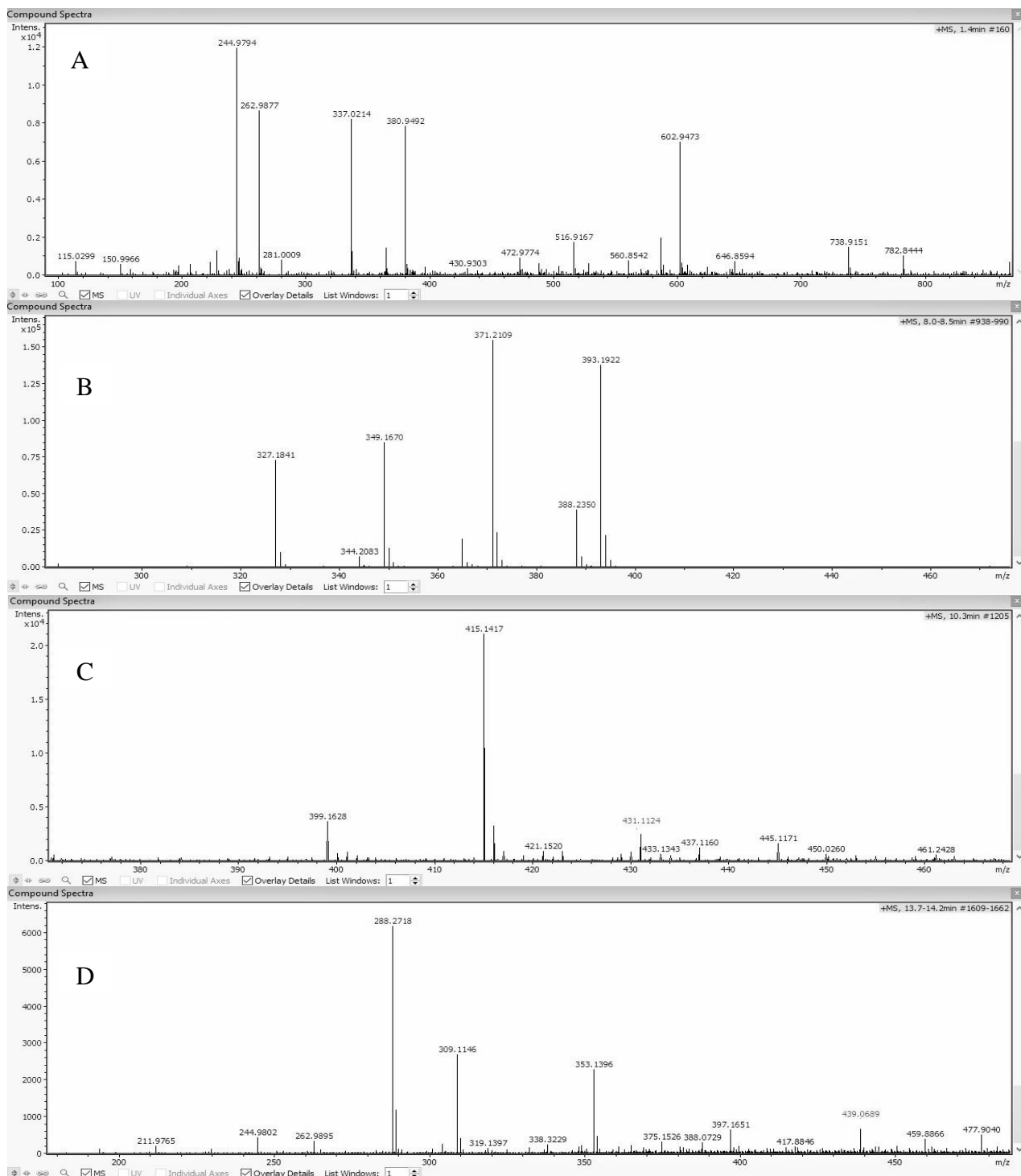


Figura 6 – Espectrometria de massas do tipo ESI-IT-TOF/MS da fração 70_5 em modo positivo.

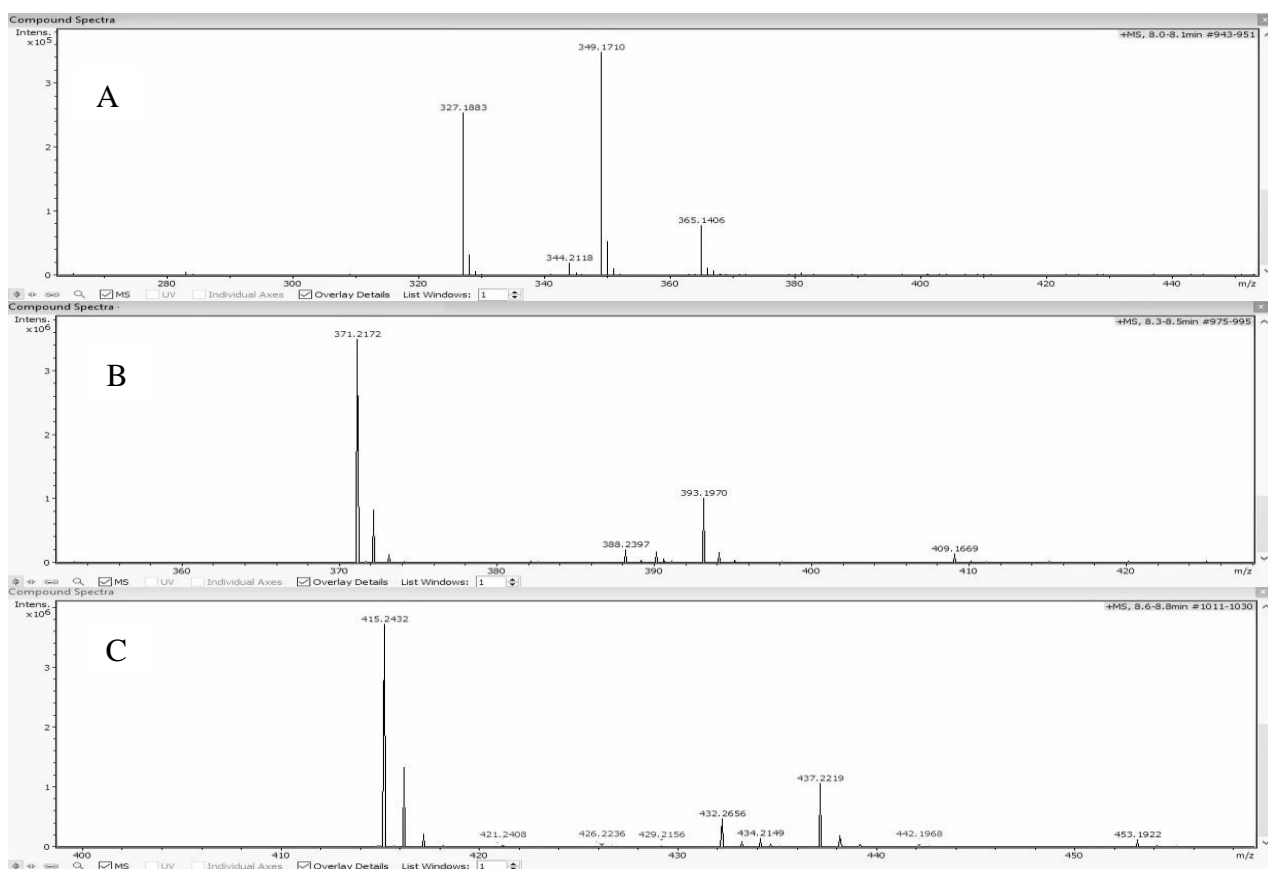


Figura 8 – Espectrometria de massas do tipo ESI-IT-TOF/MS da fração 71_5 em modo positivo.

4.2 Análise de ligações

4.2.1 Análise de ligações dos venenos brutos

Nesta primeira etapa as análises de ligações realizadas pelo “*Institut de Biologie et Technologies de Saclay (iBiTecS) da Commissariat à l'Énergie Atomique (CEA)*”, possuíram a função de verificar a afinidade do veneno total de *Bothrops alternatus*, *Bothrops jararacussu*, *Crotalus durissus terrificus* e *Tityus serrulatus* para os receptores adrenérgicos β 1- β 12-, receptores muscarínicos M2-, M3- e M5-, receptor de histamina H4, receptor dopaminérgico D2 , receptor neurotensina NTS1, receptor serotonina 5HT_{2C} e receptor μ -opioid. As ligações foram medidas analisando a afinidade entre o veneno e o ligante radioativo (L*)

específico do receptor. Ou seja, o veneno compete pelo sítio de ligação e ocupa-o não permitindo que o ligante específico se ligue ao receptor.

Os quatro venenos foram testados de acordo com o exemplo (figura 10) no esquema da placa de Elisa.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E	Cdt Oxy	Cdt Red	Bj Oxy	Bj Red	Ts Oxy	Ts Red	Ba Oxy	Ba Red	NS			
F												BT
G												
H												

Figura 10 – Esquema de uma placa de Elisa para o experimento da análise de ligação. Os venenos totais foram testados na sua forma oxidada e reduzida. NS (*no specific bindings*) representa teste de ligações não específicas e o BT

Os venenos de *Bothrops alternatus*, *Bothrops jararacussu*, *Crotalus durissus terrificus* e *Tityus serrulatus* não apresentaram afinidade para os receptores do tipo β_2 , como mostra a figura 11. Tanto o veneno oxidado como o reduzido apresentaram o mesmo perfil de ligações quando colocados na presença do receptor, não sendo considerados assim, ativos para este receptor. O radioligante específico utilizado foi o ^3H - DHA (dihydroalprenolol).

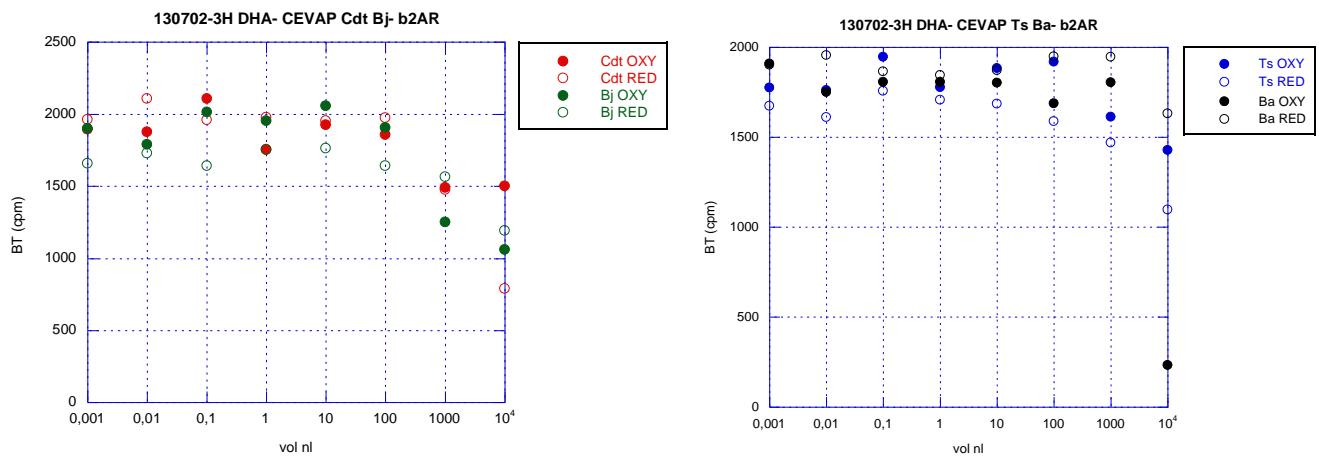


Figura 11 – Inibição da ligação do radioligante (^3H - DHA) pelo veneno total *Crotalus durissus terrificus oxidado* (Cdt OXY), *Crotalus durissus terrificus reduzido* (Cdt RED), *Bothrops jararacussu oxidado*, *Bothrops jararacussu reduzido* (BJ RED), *Tityus serrulatus oxidado* (TsOXY), *Tityus serrulatus reduzido* (TsRED), *Bothrops alternatus oxidado* (Ba OXY) e *Bothrops alternatus reduzido* (Ba RED). Não houve inibição significativa que indicasse que os componentes do veneno se ligaram ao receptor adrenérgico β_2 .

As análises de ligações dos venenos de *Bothrops alternatus*, *Bothrops jararacussu*, *Crotalus durissus terrificus* e *Tityus serrulatus* para receptor muscarínicos M2 (figura 12A) e o radioligante ^3H NMS. Os venenos de *Bothrops alternatus*, *Crotalus durissus terrificus* e *Tityus serrulatus* não apresentaram atividade diante a presença do receptor M2, diferente do veneno de *B jararacussu* considerado ativo para o receptor. Foi refeita a análise de ligação apenas para o *B jararacussu* e o receptor muscarínicos M2 onde o resultado anteriormente alcançado não foi repetido, assim, o veneno de *B jararacussu* descartado como ativo para o receptor muscarínicos M2 (figura 12B).

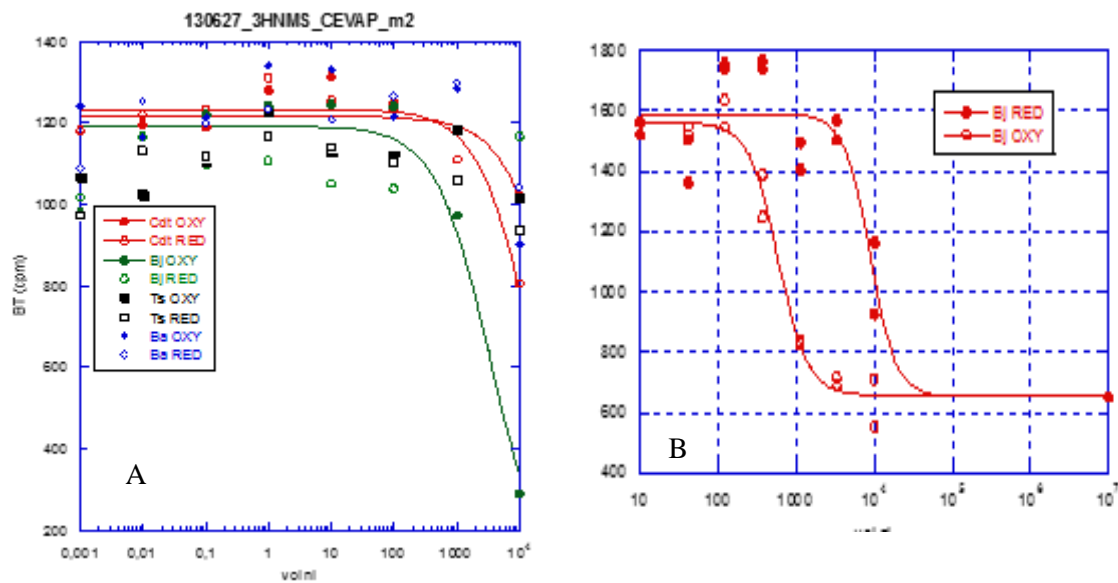


Figura 13 – (13A) Inibição da ligação do radioligante (^3H - NMS) pelo veneno total *Crotalus durissus terrificus* oxidado (Cdt OXY), *Crotalus durissus terrificus* reduzido (Cdt RED), *Bothrops jararacussu* oxidado, *Bothrops jararacussu* reduzido (Bj RED), *Tityus serrulatus* oxidado (TsOXY), *Tityus serrulatus* reduzido (TsRED), *Bothrops alternatus* oxidado (Ba OXY) e *Bothrops alternatus* reduzido (Ba RED). Não houve inibição significativa que indicasse que os componentes do veneno se ligaram ao receptor Muscarínico M2, exceto pelo veneno de *Bothrops jararacussu*. O qual em um segundo ensaio (13B) não apresentou atividade, assim sendo descartado como possível candidato.

As análises de ligações dos venenos de *Bothrops alternatus*, *Bothrops jararacussu*, *Crotalus durissus terrificus* e *Tityus serrulatus* para receptor de serotonina 5HT_{2C} (figura 14) e o radioligante ^3H Mesulergina.

Os venenos de *Crotalus durissus terrificus* e *Tityus serrulatus* também não apresentaram atividade diante a presença do receptor 5HT_{2c}, diferente do veneno de *B jararacussu* e *Bothrops alternatus*, o qual foi considerado ativo para o receptor.

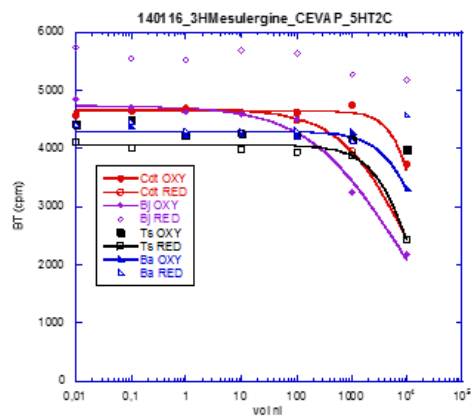


Figura 14 – Inibição da ligação do radioligante (^3H - Mesulergina) pelo veneno total *Crotalus durissus terrificus* oxidado (Cdt OXY), *Crotalus durissus terrificus* reduzido (Cdt RED), *Bothrops jararacussu* oxidado, *Bothrops jararacussu* reduzido (BJ RED), *Tityus serrulatus* oxidado (TsOXY), *Tityus serrulatus* reduzido (TsRED), *Bothrops alternatus* oxidado (Ba OXY) e *Bothrops alternatus* reduzido (Ba RED). Não houve inibição significativa que indicasse que os componentes do veneno se ligaram ao receptor de serotonina 5-HT_{2C}, exceto pelo veneno de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops alternatus* oxidado (Ba OXY) e *Bothrops alternatus* reduzido (Ba RED), os quais se demonstraram ativos onde o número de ligações do veneno oxidado foi superior ao do veneno na sua forma reduzida.

O veneno total de *Bothrops jararacussu* e *B alternatus* foi então testado novamente (figura 15) para o receptor 5HT_{2C}. Apenas o *Bothrops jararacussu* apresentou-se como candidato mais promissor aproxima etapa de cromatografia líquida – fase reversa para testes das 97 frações obtidas.

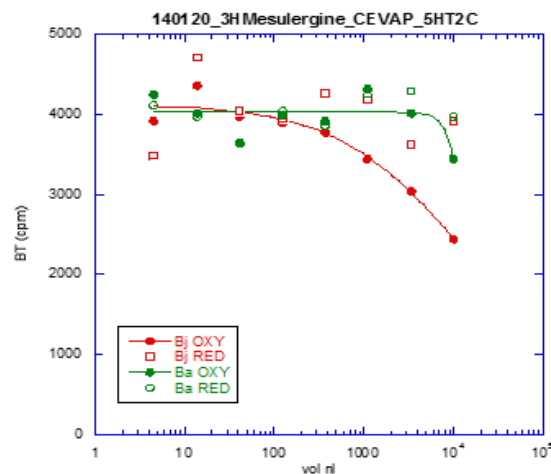


Figura 15 – Inibição da ligação do radioligante (^3H - Mesulergina) pelo veneno total de *Bothrops jararacussu* oxidado (BJ OXY), *Bothrops jararacussu* reduzido (BJ RED), *Bothrops alternatus* oxidado (Ba OXY) e *Bothrops alternatus* reduzido (Ba RED) ao receptor de serotonina 5-HT_{2C}, os quais apresentou atividade onde o número de ligações do veneno oxidado foi superior ao do veneno na sua forma reduzida.

4.2.2. Análise de ligação do veneno de *Bothrops jararacussu*

Primeiramente o veneno total (não fracionado) foi testado nos receptores. Para evitar resultados falsos positivos, o veneno foi utilizado em duas formas, na forma

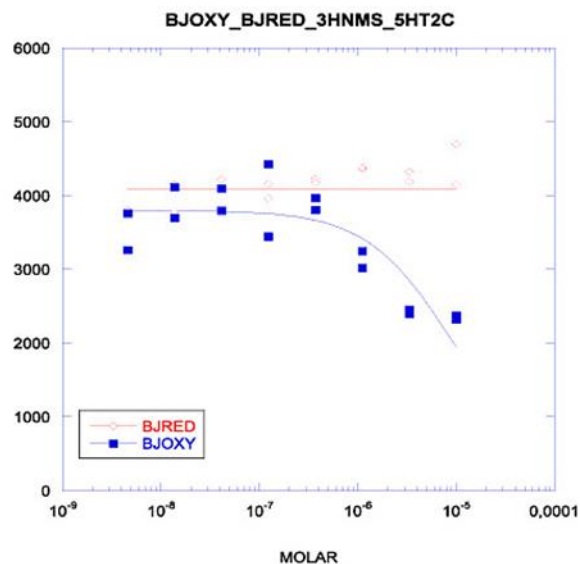


Figura 16- Inibição da ligação do radioligante (³H- NMS) pelo veneno total de *Bothrops jararacussu oxidado (BJ OXY)* , *Bothrops jararacussu reduzido (BJ RED)*. Onde o veneno oxidado apresentou-se ativo.

total (natural/oxidada) e reduzida (tratamento por TCPE, que quebra as pontes de dissulfeto inativando o veneno). Novamente foi analisada a capacidade do veneno total (Figura 16) em inibir a ligação do radioligante, desta vez o radioligante utilizado foi - ³H N-methylscopolamine (³H- NMS) - com o receptor de serotonina (5HT_{2c}). Houve queda no número de ligação total (BT- *Binding total*, eixo X) do veneno total oxidado (ativo) de maneira dose-dependente da concentração (eixo Y), enquanto o veneno total reduzido manteve o mesmo perfil de ligações. O veneno demonstrou afinidade, sendo levado a próxima etapa de fracionamento para identificar a fração responsável pela afinidade.

As 106 frações foram testadas também no receptor 5HT_{2c} (Figura 17), onde a fração 70 e 71 reduziram significativamente a ligação do radioligante ao receptor.

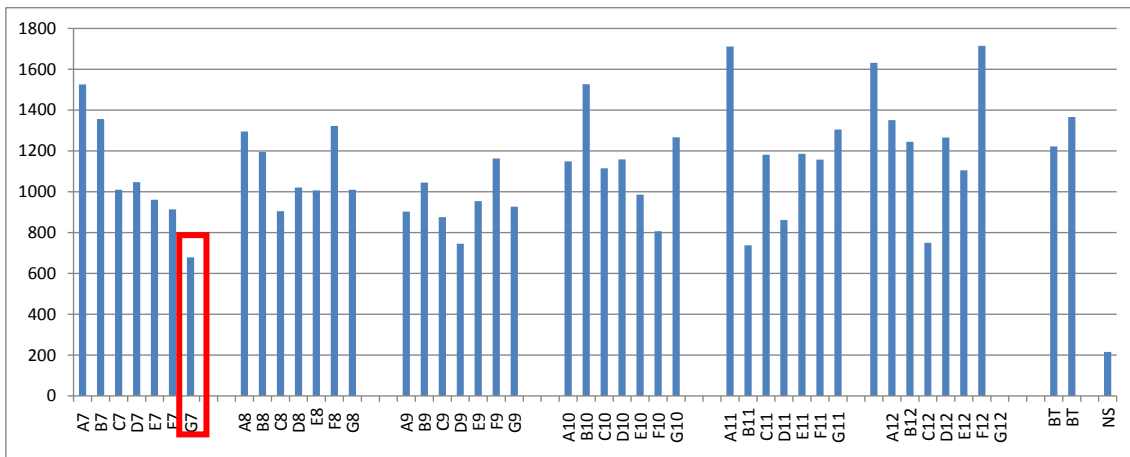


Figura 17- Resultado obtido da análise de ligações das 97 frações do veneno de *Bothrops jararacussu*. O poço G7 (destacado em vermelho) contém as frações 70 e 71. A afinidade é demonstrada pelo valor no número de ligações atingidas serem de aproximadamente a metade das ligações totais (BT). Indicando afinidade e competitividade com o radioligante utilizado, assim sugere-se que o peptídeo presente na fração possui alta afinidade com o receptor 5HT_{2C}.

6. DISCUSSÃO

As biomoléculas ativas isoladas a partir do veneno de animais têm demonstrado um grande potencial para elucidação de vias farmacológicas e fisiológicas, auxiliando assim, na caracterização identificação de novos receptores e melhor compreensão dos já existentes⁶⁵. Este interesse é devido à alta especificidade e seletividade destas biomoléculas aos seus receptores e seu estudo é realizado através da análise de ligação (toxina-receptor) e das respostas desencadeadas. Um dos grandes grupos de receptores que tem despertado grande interesse da indústria farmacêutica são os Receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), pois apesar de amplamente estudados pelo envolvimento em processos fisiológicos e doenças, ainda possuem uma grande quantidade de receptores órfãos, ou seja, que não são conhecidas suas funções⁶⁶. Portanto, a compreensão das propriedades de ligação a GPCRs tornam os venenos animais promissoras fontes de estudo para identificação e elucidação destes mecanismos⁶⁷.

Calvete et al, 2007⁶⁸ destacaram técnicas e estratégias importantes para venômica de serpentes, iniciando pelo fracionamento do veneno bruto por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (HPLC-RP), seguida das metodologias de sequenciamento do N-terminal, SDS-PAGE, eletroforese bidimensional e espectrometria de massas para determinação da massa molecular e sequenciamento. Essas técnicas combinadas permitem a caracterização estrutural das frações obtidas a partir do veneno bruto.

O fracionamento do veneno total de *Bothrops jararacussu* realizado por HPLC-RP utilizada neste estudo apresentou-se adequado como primeiro passo cromatográfico para a separação dos componentes do veneno permitindo assim a ampla visualização do perfil cromatográfico.

Apesar de outros autores utilizarem, como primeiro processo de separação, a cromatografia líquida por troca iônica, para então, num segundo momento utilizar o HPLC-RP^{69,70,71}. Em nossos resultados um maior número de frações foram obtidas. Além disso, autores como Calvete et al 2011⁷² e Calgarotto et al 2008¹⁷ que aplicaram o HPLC-RP como um primeiro passo de

separação dos componentes proteicos do veneno de *B. atrox* e *B. moojeni* obtiveram de 30-39 frações para veneno de *B. atrox* e 13 frações para o veneno de *B. moojeni* respectivamente. Através da metodologia utilizada neste estudo, obtivemos 97 frações.

Esta estratégia de fracionamento permitiu, com apenas uma etapa cromatográfica, a realização de um *screening* inicial especificamente para os receptores já identificados através da análise do veneno total. Foram avaliados inicialmente o *pool* dos venenos de *Bothrops jararacussu*, *B. alternatus*, *Crotalus durissus terrificus* e de *Tityus serrulatus*. Destes, o único veneno a mostrar afinidade pelos receptores avaliados foi o de *B. jararacussu*, sendo que mostrou afinidade apenas para os receptores 5 HT_{2c}, os quais correspondem a GPCRs de serotonina. As frações que apresentaram afinidade para este receptor foram as de número 70 e 71, tendo a sua eluição com o tempo de 200 minutos dentro da metodologia adotada.

Os experimentos de ligação adotaram o modelo de saturação segundo Quinton et al, 2010⁶⁴, os quais possuem como objetivo medir a ligação do radioligante (ou algum ligante que possa ser lido posteriormente) ao receptor. Para isso, obter uma estimativa de equilíbrio da constante dissociação do complexo radioligante-receptor (K_d) e o máximo número de sítio de ligações (B_{max}).

A análise do gel de SDS-PAGE 12% evidenciou que as frações de interesse, ou seja, as de número 70 e 71, apresentaram duas bandas por fração, ambas com marcação em torno de 45 KDa e 20 KDa. Desta maneira, devido ao fato de que a ação sobre estes tipos de receptores serem mais comum entre os peptídeos e compostos de baixa massa, utilizamos a técnica de ultrafiltração para separação de compostos de até 3 KDa²². A ultrafiltração mostrou-se eficiente, comprovado por SDS-PAGE sob as mesmas condições. O fato de estas frações apresentarem diferentes compostos ocorreu devido ao fato de que as características hidrofóbicas destes componentes serem muito próximas e apenas uma etapa cromatográfica não foi suficiente para separá-los⁷³.

Através da análise eletroforética SDS-PAGE 12%, foram recortadas 3 bandas tanto da fração 70 e 3 bandas da fração 71. A segunda etapa cromatográfica realizada apenas nas frações de baixa massa mostrou dois picos majoritários na fração 70 e apenas um pico na fração 71. Pela quantificação proteica realizada estimou-se 65,09 mg/mL para a fração total 70 e 5,89 mg/mL para a fração total 71.

Moléculas bioativas como fosfolipase A2, metaloproteases, desintegrinas, serino proteases, L- amino oxidase e fatores de crescimento são encontrados em venenos e tem se apresentado como promissores candidatos a tratamentos de doenças, e assim, intensamente estudados para sua identificação, caracterização e elucidação de seus mecanismos. Em especial, venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, os quais possuem proteínas como fosfolipases A2 (PLA2), serino proteases e metaloproteases em sua composição. Em estudos da glândula de veneno da serpente *B. jararacussu* foram encontrados oito sequencias de alta similaridade (93%) a serino proteases cDNA. Três enzimas coagulantes responsáveis pela indução da proteólise do fibrinogênio foram purificadas a partir do veneno *B. jararacussu*, entretanto apenas caracterizadas apenas em nível de proteína ^{74,75}.

As serino proteases possuem ação enzimática clivando ligações peptídicas. Possuem a denominada tríade catalítica composta por três aminoácidos His57, Asp102 e Ser195 (segundo numeração do quimotripsinogênio). Sua conformação permite a alta reatividade da serina. As serino proteases encontradas em venenos (SVSPs-*Snakr Venom Serine Proteases*) atuam sobre a homeostasia do organismo através das proteínas plasmáticas alterando a pressão sanguínea, fibrinólise, coagulação sanguínea, agregação plaquetária, sistema complemento e sistema nervoso. As SVSPs da família Viperidae estão presentes em até 20% das proteínas do veneno ^{76,77}. A partir da análise das frações protéicas isoladas neste estudo, as frações 70A e 71A apresentaram similaridade com a serino protease do veneno de *Bothrops jararacussu* nomeada VSPH_BOTJR.

A fração 70B apresentou similaridade com a proteína denominada LECG_BOTJR. Esta é uma lectina tipo C isolada a partir do veneno de *B. jararacussu*⁷⁸. Sua capacidade de ligar de maneira reversa a carboidratos permite alta taxa de aglutinação de hemácias. Em especial, a lectina de tipo C (CLEC) é uma proteína que liga-se a carboidratos e depende de cálcio para efetuar a ligação. Estão relacionadas a adesão celular, a resposta imune a patógenos e também a apoptose. Quando injetada em patas de ratos⁷⁹ provoca edema e aumenta a permeabilidade vascular. Já em experimentos realizados com ratos anestesiados, foi responsável pela diminuição a pressão arterial em cerca de 15%, com um rápido retorno ao nível de repouso. Em estudos a lectina BJcuL teve papel no combate a progressão tumoral inibindo o câncer e o crescimento de células endoteliais⁸⁰.

A fração 70C apresentou similaridade com a fosfolipase A2 nomeada PA2B2_BOTJR. As fosfolipases A2 em geral são encontradas em venenos de serpente, principalmente do gênero *Bothrops*. Em testes realizados em patas de rato *in vivo*, induziu necrose muscular juntamente com infiltração de células polimorfo nucleares. As fosfolipases A2 também tem sido descritas por suas atividades neurotóxicas, edematogênicas, agregação plaquetária, hipotensora e cardiotoxica⁸¹.

As PLA2s miotóxicas descritas no veneno de *Bothrops* são Asp-49, variantes cataliticamente ativos ou Lys-49, homólogos enzimaticamente inativos. A brothropstoxina II (BthTX-II) isolada a partir do veneno de *B. jararacussu* desempenha efeito miotóxico e coagulante, induzindo também agregação plaquetária e secretando sinais de vias de transdução⁸².

A similaridade encontrada na fração 71B foi relacionada a proteína VSPL_BOTAS, uma trombina-*like* da serpente *B. asper*. Essa trombina-*like* é uma serino protease com atividade coagulante em plasma humano e fibrinogênio bovino. Quando injetada de maneira intravenosa em ratos, é responsável pela atividade anticoagulante. Em ensaios realizados em ratos esta trombina-*like*

exibiu atividade na homeostasia da cascata de coagulação tanto *in vivo* como *in vitro*⁸³.

E finalmente, a fração 71C com similaridade para a proteína denominada PA2BD_BOTLC. Uma PLA2 isolada a partir do veneno de *B. leucurus*. As PLsA2 podem apresentar diferentes isoformas e pontos isoelétricos característicos, e são classificados como ácidos, básicos ou neutros. a sequência de aminoácidos descrita apresentou um elevado nível de homologia (75 - 93%) com fosfolipases A2 de diferentes espécies, sendo 100% homologa com a PLA2 do veneno de *B jararacussu*, sequencia esta deduzida de acordo com o banco de dados cDNA⁸⁴.

As frações majoritárias de baixa massa 70_4, 70_5, 71_2 e 71_4 obtidos após ultrafiltração e reomatografia por HPLC-RP quando analisados por espectrometria de massas apresentaram massa de até 400Da, não sendo este um perfil de peptídeos⁸⁵.

Os receptores de serotonina 5-HT estão acoplados a proteínas G e subsequentemente ativação da fosfolipase C, indução do fosfoinositol e aumento da concentração do cálcio no meio intracelular. Estes receptores geralmente são caracterizados tanto por teste de ligação radioativa⁸⁶ como por estudos funcionais. A seletividade dos ligantes, em particular os agonistas, tem auxiliado na identificação dos subtipos de receptores associados a doenças^{87,88}.

Estudos similares com venenos de *Phoneutria nigriventer* e GPCRs relataram que receptores de serotonina 5- HT₄ desempenham um importante papel na ativação na de fibras nervosas sensoriais nociceptivos por veneno de e sugerem estar relacionada ao desenvolvimento da dor e da inflamação a picadas desta aranha ⁸⁹.

Segundo England L *et al* 1998²⁹, a toxina GVIIIA Sigma isolada a partir do veneno de *Conus* possui habilidade de inativar o 5-HT₃, um canal iônico de serotonina excitatório dependente. A conotoxina possui um resíduo de triptofano, o qual provavelmente pode ser importante para a atividade do peptídeo, pois o ligante endógeno do 5 HT₃ é um hidroxilado derivado do triptofano. A conotoxina inativou o receptor 5 HT₃ por antagonismo competitivo e é um inibidor altamente

seletivo para esse receptor. Assim, o receptor 5-HT₃ passou a ser incluso entre os alvos de neurotoxinas naturais.

Até o presente momento não foram encontrados estudos que relatem afinidade e especificidade de frações do veneno de *Bothrops jararacussu* para GPCRs. Desta maneira a identificação de um receptor de serotonina 5-HT_{2c}, torna-se de extrema relevância. Outros estudos serão realizados a fim de identificar a toxina que interage com o receptor 5-HT_{2C}.

6. CONCLUSÃO

Até o presente momento o veneno de *Bothrops jararacussu* apresentou promissoras biomoléculas com afinidade para receptor acoplados a proteínas G, em especial, receptores de serotonina 5-HT_{2C}, por técnicas de proteômica e ensaio de ligações tem se mostrado eficiente. Não foram encontrados relatos na literatura trabalhos similares com o veneno de *Bothrops jararacussu* e receptores de serotonina.

7. REFERÊNCIAS

1. Calvete JJ. Snake venomics: from the inventory of toxins to biology. *Toxicon*. 2013;75:44-62
2. Gans C, Elliot WB. Snake venoms: production, injection and action. *Advances in Oral Biology*. 1968; 3:45-81.
3. Mosmann MN. Guia das principais serpentes do mundo, Editora Ulbra. 2001;2:392.
4. Cardoso JLC, França FOS, Wen F, Málaque CMS, Haddad Jr V. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes, Editora Sarvier. 2009; 3: 22- 81.
5. Secretaria de Vigilância em Saúde / Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. Disponível em:
http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual_aap.pdf.
Acesso em: 30 maio de 2016.
6. Pinho FM, Burdmann EA. Fatal cerebral hemorrhage and acute renal failure after young *Bothrops jararacussu* snake bite. *Ren. Fail.* 2001;23:269–277.
7. Melo PA, Suarez-Kurtz G. Release of creatine kinase from skeletal muscles by *Bothrops* venoms: heparin potentiation of inhibition by antivenin. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1988;21:545–548.
8. Amaral CFS, da Silva OA, Godoy P, Miranda D. Renal cortical necrosis following *Bothrops jararaca* and *B. jararacussu* snake bite. *Toxicon*. 1985;23: 877–885.
9. Milani R, Jorge MT, Ferraz de Campos FP, Martins FP., Bousso A, Cardoso, JLC, et al. Snake bites by the jararacuçu (*Bothrops jararacussu*): clinic pathological studies of 29 proven cases in São Paulo State, Brazil. *Q. J. Med.* 1997;90:323–334.
10. Bjarnason JB, Fox JW. Hemorrhagic toxins from snake venoms. *J Toxicol Toxin Rev.* 1989; (7): 121-209
11. Daltry JC, Wuster W, Thorpe RS. Diet and snake venom evolution. *Nature* 1996; 379 (6565) : 537-40.

12. Santo Neto HS, Vomero VU, Marques MJ. Insights into the loss of muscle mass following *B. jararacussu* venom in mice. *Toxicon*. 2004;44:847–850
13. Melo PA, Homs-Brandeburgo MI, Giglio JR, Suarez-Kurtz G. Antagonism of the myotoxic effects of *Bothrops jararacussu* venom and bothropstoxin by polyanions. *Toxicon*. 1993;31:285–291.
14. Utkin YN. Animal venom studies: Current benefits and future developments. *World J Biol Chem*. 2015;6(2):28-33.
15. Ohizumi Y. Application of physiologically active substances isolated from natural resources to pharmacological studies. *Jap J Pharmacol*. 1997;73:263-89.
16. Iwanaga S, Suzuki T. Enzymes in snake venom. In: *Snake Venom*, Editor Lee, C Y. Berlin: Springer-verlag; 1979: 61-158
17. Markland FS. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon*. 1998 Dec;36(12):1749-800. Review.
18. Rocha e Silva M. The physiological significance of bradykinin. *An NY Acad of Sci*. 1963;104:190-210.
20. Iuan FC, Santos IAT, Mendes-Giannin MJS, Toscano E, Moraes RA, Barraviera B. Reparation of peripheral nerves with fibrin glue prepared from snake venom. *São Paulo Medical Journal*, São Paulo SP. 1995;113:1000-1002.
21. Chippaux JP, Williams V, White J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon*. 1991;29:1279-303.
22. King GF, Gentz MC, Escoubas P, Nicholson GM. A rational nomenclature for naming peptide toxins from spiders and other venomous animals. *Toxicon*. 2008;52:264–276.
23. Rang HP, Dale MM. *Farmacologia*. 5ª Ed. Editora Guanabara Koogan; 2004
24. Goodman, Gilman. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 11ª Ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill; 2007.
25. Terry K. *A pharmacology primer*. 4ª Ed. 2014.
26. Bockaert J, Pin JP. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J*. 1999;18:1723–1729. Chang CC, Lee CY. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1963;144:241-57.

-
27. Jacoby E, Bouhelal R, Gerspacher M, et al. The 7TM G- protein coupled receptor target family. *Chem Med Chem*. 2006;1:760-82.
 28. Rasmussen SG, Choi HJ, Rosenbaum DM, Kobilka TS, Thian FS, Edwards PC, et al. Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*. 2007;450:383-387.
 29. Insel PA, Tang CM, Hahntow I, Michel MC. Impact of GPCRs in clinical medicine: monogenic diseases, genetic variants and drug targets. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1768(4):994-1005
 30. Thompson MD, Burnham WM, Cole DE. The G protein-coupled receptors: pharmacogenetics and disease. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2005;42:311–92.
 31. Horn F, Weare J, Beukers MW, et al. GPCRDB: an information system for G protein-coupled receptors. *Nucleic Acids Res*. 1998;26:275-9.
 32. Milligan G, Kostenis E. Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br J Pharmacol*. 2006;147:46-55.
 33. Dryer L, Berghard A. Odorant receptors: a plethora of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 1999;20(10):413-7.
 34. Bockaert J, Pin JP. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J*. 1999;18:1723–1729.
 35. Kobilka BK. G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim. Biophys. Acta* 2007;1768:794-807.
 36. Fredriksson R, Schioth HB. The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes. *Mol Pharmacol*. 2005;67:1414–25.
 37. Zhang Y, Scoumanne A, Chen X. G Protein-coupled receptor 87: a promising opportunity for cancer drug discovery. *Mol Cell Pharmacol*. 2010;2:111-6.
 38. Klabunde T, Hessler G. Drug design strategies for targeting G protein-coupled receptors. *Chem Bio Chem*. 2002;3:928-44.
 39. Sharpe IA, Gehrmann J, Loughnan ML, Thomas L, Adams DA, Atkins A, Palant E, Craik DJ, et al. Two new classes of conopeptides inhibit the alpha1-adrenoceptor and noradrenaline transporter. *Nat Neurosci*. 2001;4(9):902-7.
 40. Becker S, Terlau H. Toxins from cone snails: properties, applications and biotechnological production. *App MicroBiotechnol*. 2008;79:1–9.

-
41. Bradley KN. Muscarinic toxins from the green mamba. *Pharmacol Ther.* 2000;85(2):87-109.
42. Quinton L, Caer JP, Phan G, Ligny-Lemaire C, Bourdais-Jomaron J, Ducancel F, et al. Characterization of toxins within crude venoms by combined use of Fourier transform mass spectrometry and cloning. *J. Anal Chem.* 2005; 77(20):6630-9.
43. Servent D, Fruchart-Gaillard C. Muscarinic toxins: tools for the study of the pharmacological and functional properties of muscarinic receptors. *J Neurochem.* 2009;109(5):1193-202.
44. Birdsall NJ, Lazareno S. Allosterism at muscarinic receptors: ligands and mechanisms. *Mini Rev Med Chem.* 2005;5(6):523-43.
45. Rouget C, Quinton L, Maïga A, Gales C, Masuyer G, Malosse C, et al. Identification of a novel snake peptide toxin displaying high affinity and antagonist behaviour for the α_2 -adrenoceptors *Br J Pharm.* 2010;161:1361–1374.
46. Quinton L, Girard E, Maiga A, Rekik M, Lluel P, Masuyer G et al. Isolation and pharmacological characterization of AdTx1, a natural peptide displaying specific insurmountable antagonism of the $\alpha(1A)$ -adrenoceptor. *Br J Pharm.* 2010;159:316–325.
47. Mourier G, Dutertre S, Fruchart-Gaillard C, Menez A, Servent D. Chemical synthesis of MT1 and MT7 muscarinic toxins: critical role of Arg-34 in their interaction with M1 muscarinic receptor. *Mol Pharmacol.* 2003;63:26–35.
48. Schoneberg T, Schulz A, Biebermann H, Hermsdorf T, Rompler H, Sangkuhl K. Mutant G-proteincoupled receptors as a cause of human diseases. *Pharmacol Ther.* 2004;104:173–206.
49. Cruz LJ, de Santos V, Zafaralla GC, Ramilo CA, Zeikus R, Gray WR, et al. Invertebrate vasopressin/oxytocin homologs. Characterization of peptides from *Conus geographus* and *Conus straitus* venoms. *J Biol Chem.* 1987;262,15821–15824.
50. Berger M, Gray JA, Roth BL. The expanded biology of serotonin. *Annu Rev Med.* 2009.

-
51. Kroeze WK, Kristiansen K, Roth BL. Molecular biology of serotonin receptors structure and function at the molecular level. *Curr Top Med Chem*. 2002
52. Hoyer D, et al. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5- hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev*. 1994.
53. Besnard J, et al. Automated design of ligands to polypharmacological profiles. *Nature*. 2012.
54. Wacker D, et al. Crystal Structure of the 5-HT_{2B} Receptor: Biological Selectivity of Serotonin Receptors. *Science*. 2012.
55. Roth BL, Hanizavareh SM, Blum AE. Serotonin receptors represent highly favorable molecular targets for cognitive enhancement in schizophrenia and other disorders. *Psychopharmacology (Berl)*. 2004;174:17.
56. Bruinvels AT, Landwehrmeyer B, Waeber C, Palacios JM, Hoyer D. Homogeneous 5-HT_{1D} recognition sites in the human substantia nigra identified with a new iodinated radioligand. *Eur J Pharmacol*. 1991;202(1):89-9.
57. Smith BM, et al. Discovery and structure-activity relationship of (1R)-8-chloro-2,3,4,5-tetrahydro-1- methyl-1H-3-benzazepine (Lorcaserin), a selective serotonin 5-HT_{2C} receptor agonist for the treatment of obesity. *J Med Chem*. 2008.
58. Galeazzi R, Massaccesi L, Piva F, Principato G, Laudadio E. Insights into the influence of 5-HT_{2c} aminoacidic variants with the inhibitory action of serotonin inverse agonists and antagonists. *J Mol Model*. 2014;20:2120.
59. Lübbert H, Hoffman BJ, Snutch TP, van Dyke T, Levine AJ, Hartig PR, Lester HA. cDNA cloning of a serotonin 5-HT_{1C} receptor by electrophysiological assays of mRNA-injected *Xenopus oocytes*. *Proc Natl Acad Sci*. 1987;84(12):4332.
62. Roth BL, Sheffler DJ, Kroeze WK. Magic shotguns versus magic bullets: selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia. *Nat Rev Drug Discov*. 2004.
63. Wang, C. Structural basis for molecular recognition at serotonin receptors. *Science*. 2013;340,610–614.
64. Quinton L, Girard E, Maiga A, Rezik M, Lluet P, Masuyer G et al. Isolation and pharmacological characterization of AdTx1, a natural peptide displaying

specific insurmountable antagonism of the alpha(1A)-adrenoceptor. *Br J Pharm.* 2010;159:316–325.

65. Rodriguez-Aller M, Gurny R, Veuthey JL, Guillarme D. Coupling ultra high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry: constraints and possible applications. *J Chromatogr A.* 2013;1292:2-18.

66. Daulat AM, Maurice P, Froment C, et al. Purification and identification of G protein-coupled receptor protein complexes under native conditions. *Mol Cell Proteomics.* 2007;6:835-44.

67. Liebmann C. G protein-coupled receptors and their signaling pathways: classical therapeutical targets susceptible to novel therapeutic concepts. *Curr Pharm Des.* 2004;10:1937–58.

68. Calvete JJ, Juárez P, Sanz L. Snake venomomics. Strategy and applications. *J Mass Spectrom.* 2007 Nov;42(11):1405-14. Review.

69. Gomes MS, Naves de Souza DL, Guimarães DO, Lopes DS, Mamede CC4, Gimenes SN, Achê DC, Rodrigues RS, Yoneyama KA, Borges MH, de Oliveira F, Rodrigues VM. Biochemical and functional characterization of Bothropoidin: the first haemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops pauloensis* snake venom. *J Biochem.* 2015 Mar;157(3):137-49.

70. Fernandes de Oliveira LM, Ullah A, Masood R, Zelanis A, Spencer PJ, Serrano SM, Arni RK. Rapid purification of serine proteinases from *Bothrops alternatus* and *Bothrops moojeni* venoms. *Toxicon.* 2013 Dec 15;76:282-90

71. Silveira LB, Marchi-Salvador DP, Santos-Filho NA, Silva FP Jr, Marcussi S, Fuly AL, Nomizo A, da Silva SL, Stábeli RG, Arantes EC, Soares AM. Isolation and expression of a hypotensive and anti-platelet acidic phospholipase A2 from *Bothrops moojeni* snake venom. *J Pharm Biomed Anal.* 2013 25;73:35-43.

72. Calvete JJ, Sanz L, Pérez A, Borges A, Vargas AM, Lomonte B, Angulo Y, Gutiérrez JM, Chalkidis. Snake population venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: Paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. *J Proteomics.* 2011;74(4):510-27.

-
- 73.** Lancas, F. M. *Cromatografia Líquida Moderna - HPLC / CLAE*. 1. ed. Campinas: Editora átomo, 2009. v. 1. 382 p
- 74.** Quinton L, Girard E, Maiga A, Rekik M, Lluell P, Masuyer G *et al.* Isolation and pharmacological characterization of AdTx1, a natural peptide displaying specific insurmountable antagonism of the alpha(1A)-adrenoceptor. *Br J Pharm* 2010, 159: 316–325.
- 75.** Bonhaus DW, Bley KR, Broka CA, Fontana DJ, Leung E, Lewis R, Shieh A, Wong EH. Characterization of the electrophysiological, biochemical and behavioral actions of epibatidine. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995 Mar;272(3):199-203
- 76.** Braud S, Bon C, Wisner A. Snake venom protein acting on hemostasis. *Biochimie.*2000; 82 (9-10):851-9.
- 77.** Ouyang C, Teng CM, Huang TF. Characterization of snake venom principles affecting blood coagulation and platelet aggregation. *Adv Exp Med Biol.* 1990;281:151-63.
- 78.** Kassab BH, de Carvalho DD, Oliveira MA, Baptista GR, Pereira GA, Novello JC. Cloning, expression, and structural analysis of recombinant BJcuL, a c-type lectin from the *Bothrops jararacussu* snake venom. *Protein Expr Purif.* 2004 Jun;35(2):344-52.
- 79.** Panunto PC, da Silva MA, Linardi A, Buzin MP, Melo SE, Mello SM, Prado-Franceschi J, Hyslop S. Biological activities of a lectin from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon.* 2006 Jan;47(1):21-31.
- 80.** Pereira-Bittencourt M, de Carvalho D D, Gagliardi A R, Collins D C. The effect of a lectin from the venom of the snake, *Bothrops jararacussu*, on tumor cell proliferation. *Anticancer Res.* 19:4023-4025(1999);
- 81.** Pereira MF, Novello JC, Cintra A., Giglio JR, Landucci ET, Oliveira B, Marangoni S. The amino acid sequence of bothropstoxin-II, an Asp-49 myotoxin from *Bothrops jararacussu* (*Jararacucu*) venom with low phospholipase A2 activity. *Biochimie* 82:755-763(2000)
- 82.** Correa L.C., Marchi-Salvador D.P., Cintra A.C., Sampaio S.V., Soares A.M., Fontes M.R. Crystal structure of a myotoxic Asp49-phospholipase A2 with low

catalytic activity: insights into Ca²⁺-independent catalytic mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* 1784:591-599(2008).

83. Perez A.V., Rucavado A., Sanz L., Calvete J.J., Gutierrez J.M. Isolation and characterization of a serine proteinase with thrombin-like activity from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 41:12-17(2008)

84. Higuchi D.A., Barbosa C.M., Bincoletto C., Chagas J.R., Magalhaes A., Richardson M., Sanchez E.F., Pesquero J.B., Araujo R.C., Pesquero J.L. Purification and partial characterization of two phospholipases A₂ from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) snake venom. *Biochimie* 89:319-328(2007)

86. Bonhaus DW, Bley KR, Broka CA, Fontana DJ, Leung E, Lewis R, Shieh A, Wong EH. Characterization of the electrophysiological, biochemical and behavioral actions of epibatidine. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995 Mar;272(3):1199-203

87. Horn F, Weare J, Beukers MW, et al. GPCRDB: an information system for G protein-coupled receptors. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 275-9.

88. Klabunde T, Hessler G. Drug design strategies for targeting G protein-coupled receptors. *ChemBioChem* 2002; 3: 928-44

89. Costa SK, Brain SD, Antunes E, De Nucci G, Docherty RJ. Phoneutria nigriventer spider venom activates 5-HT₄ receptors in rat-isolated vagus nerve. *Br J Pharmacol.* 2003 May;139(1):59-64.

90. England LJ, Imperial J, Jacobsen R, Craig AG, Gulyas J, Akhtar M, Rivier J, Julius D, Olivera BM. Inactivation of a serotonin-gated ion channel by a polypeptide toxin from marine snails. *Science.* 1998 Jul 24;281(5376):575-8.

ANEXO

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA

UNESP

FACULDADE DE MEDICINA
FMB
1934
BOTUCATU

Comissão de Ética em Experimentação Animal
CEEA

Criada através da Portaria DFM nº 30 de 28/04/98

Certificado

Certificamos que o (Protocolo CEEA 957/2012) "Isolamento e caracterização de peptídeos dos venenos de *Brothrops jaracussu* e *B. alternatus* com afinidade para receptores muscarínicos e adrenérgicos de proteína G acoplada", a ser conduzido por Aline Ropelli Silva, orientada pelo Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Júnior, Co-orientada pela Profa Dra Luciene Delazari dos Santos, com a colaboração de Airton Lourenço Junior e apoio técnico de Airton Lourenço Junior e Luciana Curtolo de Barros, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os "ratos" são provenientes de Biotério convencional, sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEEA em 02/08/2012.


Profª Drª Maria Rosa Bet Moraes Silva
Presidente da CEEA


Alberto Santos Capellupi
Secretário da CEEA

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S. P. CEP- 18.618-970 Fone/Fax: (0xx14) 3811-8143 e-mail secretaria: capellupi@fmb.unesp.br