

Universidade de Brasília – UnB

Instituto de Ciências Biológicas - IB

Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

Isolamento e caracterização parcial da PLA₂ Frontolipase do veneno da serpente *Micrurus frontalis* e utilização como fonte de peptídeos opióides

Daniel Nogoceke Sifuentes

Orientador: Carlos Bloch Jr.

Brasília, 2011



Universidade de Brasília – UnB

Instituto de Ciências Biológicas - IB

Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

Isolamento e caracterização parcial da PLA₂ Frontolipase do veneno da serpente *Micrurus frontalis* e utilização como fonte de peptídeos opióides

Daniel Nogoceke Sifuentes

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biologia Animal.

Orientador: Carlos Bloch Jr.

Brasília, 2011



*À minha esposa por me
possibilitar enxergar a mim
mesmo e ao meu filho que me
motiva a seguir.*

*“Dans les champs de l'observation le
hasard ne favorise que les esprits
préparés”*

Louis Pasteur

Agradecimentos

Primeiramente e acima de todos, agradeço a Deus por ter arquitetado a minha vida desse jeito que só eu consigo viver. Às grandes doses de amor, ânimo, paixão, entusiasmo que derramou sobre mim desde o início e que não tenho outra alternativa a não ser espalhá-las aos que me cercam. Agradeço por toda a misericórdia e coração grato que sempre percebi através desses que me acompanham.

À minha linda esposa, pedaço de mim, por ser simplesmente quem ela é. A parte que é igual a mim é inclusive à qual eu menos agradeço. Mas sim àquela que eu enxergo, sinto, penso e amo diariamente, por expressar seu amor fazendo as coisas que sabe que me fazem bem. Não necessariamente menos sofridas, mas bem. Por ela eu procurei os melhores caminhos nas horas difíceis, procurei ser o meu melhor, mesmo quando queria mesmo era ser o pior. Por que eu via que ela se importava, eu me importei.

Ao meu filho que, mesmo sem saber da existência da maior parte do universo, contribui com sua inocência, dependência, ternura, e por ser escape de tanto amor que cultivo no meu peito.

À minha família inteira (pais, sogros, irmãos, cunhados, concunhados, primos, primas) por me fazer gostar de família. Pelo amor, interesse, pelo carinho, pela atenção e por tantos lanchinhos e almoços que me sustentaram nos fins de semana e tarde da noite. Por me ajudarem em tudo que podiam.

Ao meu orientador, Carlos Bloch Jr., por me mostrar caminhos, por me fazer buscar formas novas de fazer, falar e pensar, e me mostrar como é fácil se deixar contaminar pela injustiça. Pelos ensinamentos variados em química de proteínas, relações com a burocracia, e mais que tudo, a não se calar quando se sabe mais que os que estão ao redor. Pelos momentos em que me perguntou o que eu fazia, pelos filmes, pelas conversas e pelas idéias. Tudo isso só possível pela amizade que me fez descobrir.

À Karlinha, que me ajudou de todas as formas que pôde, também das formas que não pôde, a quem eu agradeço profundamente pela possibilidade do meu doutorado ter acontecido. Isso é claro além da fiel amizade, companheirismo, atenção e paciência demonstrada desde que a conheci.

Ao Luciano Paulino pela ajuda com as análises de espectros, utilização de softwares, pelas idéias e pelas boas conversas.

Aos amigos do laboratório de Espectrometria de Massa, pela companhia, pela ajuda e por manter o clima agradável e leve, especialmente Maura, Mari, Bia, Guil, Flávio, Jorge, Nathy, Éder, Lipe, Vlad, Zé, Eduardo e Richardson.

Aos colegas do Laboratório de Toxinologia pela ajuda com as análises farmacológicas, à Sol pelo incentivo e à Profa Márcia Mortari pelo esforço e dedicação que foram essenciais para que essa defesa de tese acontecesse.

À Martha do laboratório do Prof. Diógenes pela ajuda com as análises farmacológicas.

Ao Marcelo Bemquerer pela ajuda com a síntese, com a minha qualificação e pela ótima avaliação crítica sempre retribuída quando perguntada.

Ao Zé Roberto, pelas conversas, pelos conselhos e pela grande ajuda com o um dos projetos do meu doutorado.

Ao André Melro Murad, pelas modelagens moleculares.

Ao prof. Castelo pela ajuda com as análises cromatográficas do primeiro projeto de doutorado.

Aos amigos da minha vida, que sempre que tiveram a oportunidade, me ajudaram e me deram ânimo para continuar.

Aos amigos do Ministério da Saúde, pelo incentivo e amizade.

Ao prof. Paulo Melo, grande amigo, mestre na pesquisa e na vida. Obrigado por tanta confiança, ânimo e esperança sempre doadas com sobra.

À Graziella da morfologia, pela ajuda com as análises de inibição de enzimas.

À Profa Sonia Freita, pela ajuda com as análises de Dicroísmo Circular.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pela estrutura.

À Embrapa Agroenergia, por me dar a oportunidade de continuar pesquisando para viver.

À Galileo Galilei que descobriu o princípio da Inércia, sob o qual todos já vivíamos, mas sem saber. Pelas tantas descobertas que fez, sem ter prazos para isso e por isso, com tamanha espontaneidade.

Como dito pelo meu orientador na minha defesa: Quando se olha para um documento de 115 páginas assim, não se têm idéia do que foi esse doutorado. Três projetos com variados assuntos, técnicas e pessoas envolvidas. O moralismo de algumas pessoas frequentemente é grande obstáculo para a criatividade, espontaneidade e fluir de idéias inéditas, de modo que em grande parte das vezes, excelentes contribuições para a ciência ficam em silêncio por que são caladas. Fui ensinado a não ficar calado. A levantar depois de cada rasteira que me é dada. Incontáveis foram as vezes que tive que me reerguer nesse período de doutorado. Quero agradecer a cada pessoa que me motivou. Que essa história mostre e incentive cada pessoa que se dedica a adubar idéias de doutorado. Galileu não fez doutorado assim como tantos outros gênios. Mas pela dependência que o mundo atual construiu da ciência, hoje somos convidados a fazer pós-graduações como forma de incentivo ao salário, à carreira. Não deixemos que mestrados e doutorados se tornem meras disciplinas de pós-graduação que são pre-requisito para o título, mas que continuemos sim, testando hipóteses que a natureza nos incita a questionar a cada dia. Nunca fez mais sentido pra mim a frase de Einstein:

“Great spirits have always encountered violent opposition from mediocre minds.”

Índice

Lista de Abreviaturas e Siglas.....	xi
Lista de Aminoácidos	xii
Código de cores de aminoácidos	xii
Índice de figuras.....	xiii
Índice de tabelas	xx
Resumo	xxi
Abstract.....	xxiii
Introdução.....	1
Serpentes.....	1
Acidentes ofídicos e epidemiologia	2
Venenos de elapídeos	3
Bioquímica do veneno de <i>Micrurus</i>	5
<i>Micrurus frontalis</i>	6
As fosfolipases A ₂ (PLA ₂ s)	8
Peptídeos opióides.....	13
Perguntas levantadas:.....	15
Hipóteses propostas.....	15
Objetivos	16
Material e métodos	17
Veneno	17
Purificação.....	17
Redução, Alquilação e digestão com endoproteinasas	18

Espectrometria de Massa e Sequenciamento <i>de novo</i>	20
Sequenciamento por Degradação de Edman.....	21
Análise da sequência.....	21
Síntese de peptídeos.....	21
Construção de modelos e simulação de dinâmica molecular.....	23
Ensaio de Atividade Antinociceptiva	24
Animais	24
Ensaio do Tail-Flick	25
Ensaio de formalina	26
Análises estatísticas.....	27
Resultados.....	28
Separação das frações.....	28
Identificação das massas moleculares	28
Fração 18 (MF18)	31
Redução e Alquilação (fração 18).....	36
Fração 21 (MF21)	42
Determinação da estrutura primária das frações Mf18 e Mf21.....	48
Mf18	48
Mf21	55
Similaridade de sequências	57
Síntese dos peptídeos semelhantes a encefalina.....	60
Atividade Antinociceptiva.....	71
Discussão.....	75
Elapidorphins	80

Conclusões	82
Referências bibliográficas	83

Lista de Abreviaturas e Siglas

BK- Bradicinina

ACE – Enzima conversora da Angiotensina do inglês *Angiotensin Convertin Enzyme*

Ach - Acetilcolina

AchR - Receptor de acetilcolina

ACN - Acetonitrila

DTT - Ditioneitol

ESI - Ionização por eletro-spray, do inglês *electron spray ionization*

MALDI - Dessorção/ionização de matriz assistida por laser, do inglês *matrix assisted laser desorption/ionization*

Mf - Fração de *M. frontalis*

MM - Massa molecular

MM Exp. - Massa molecular experimental

MS - Espectrometria de massa, do inglês *mass spectrometry*

PLA₂- Fosfolipase A₂, do inglês *phospholipase A₂*

RedAlq - Polipeptídeo reduzido e alquilado

RP-HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, do inglês *reverse phase high performance liquid chromatography*

RT- Tempo de retenção, do inglês: *Retention Time*

TFA - Ácido trifluoroacético, do inglês *trifluoroacetic acid*

TOF - Tempo de voo, do inglês *time of flight*

UFLC - Cromatografia líquida ultra- rápida de alta eficiência do inglês *Ultra-fast liquid chromatography*

Lista de Aminoácidos

Nome	1 letra	3 letras	Fórmula	Massa Monoisotópica	Massa Média
Alanina	A	Ala	C ₃ H ₅ ON	71,03711	71,0788
Arginina	R	Arg	C ₆ H ₁₂ ON ₄	156,10111	156,1875
Asparagina	N	Asn	C ₄ H ₆ O ₂ N ₂	114,04293	114,1038
Aspártico	D	Asp	C ₄ H ₅ O ₃ N	115,02694	115,0886
Cisteína	C	Cys	C ₃ H ₅ ONS	103,00919	103,1388
Glutâmico	E	Glu	C ₅ H ₇ O ₃ N	129,04259	129,1155
Glutamina	Q	Gln	C ₅ H ₈ O ₂ N ₂	128,05858	128,1307
Glicina	G	Gly	C ₂ H ₃ ON	57,02146	57,0519
Histidina	H	His	C ₆ H ₇ ON ₃	137,05891	137,1411
Isoleucina	I	Ile	C ₆ H ₁₁ ON	113,08406	113,1594
Leucina	L	Leu	C ₆ H ₁₁ ON	113,08406	113,1594
Lisina	K	Lys	C ₆ H ₁₂ ON ₂	128,09496	128,1741
Metionina	M	Met	C ₅ H ₉ ONS	131,04049	131,1926
Fenilalanina	F	Phe	C ₉ H ₉ ON	147,06841	147,1766
Prolina	P	Pro	C ₅ H ₇ ON	97,05276	97,1167
Serina	S	Ser	C ₃ H ₅ O ₂ N	87,03203	87,0782
Treonina	T	Thr	C ₄ H ₇ O ₂ N	101,04768	101,1051
Triptofano	W	Trp	C ₁₁ H ₁₀ ON ₂	186,07931	186,2132
Tirosina	Y	Tyr	C ₉ H ₉ O ₂ N	163,06333	163,176
Valina	V	Val	C ₅ H ₉ ON	99,06841	99,1326

Código de cores de aminoácidos

As cores foram selecionadas utilizando o padrão do programa Bioedit, que faz gradações de cores de acordo com hidrofobicidade e cargas de cada resíduo de aminoácido:



Índice de figuras

Figura 1. Estrutura primária da PLA ₂ de <i>Micrurus dumerelii</i> com as regiões referentes a cada sítio funcional destacadas. (Belo <i>et al.</i> , 2005).....	10
Figura 2. Estruturas primárias de PLA ₂ s dos grupos IA e IIA mostrando resíduos conservados e idênticos em cada posição em uma comparação de aproximadamente 200 moléculas de PLA ₂ ; São apresentados também as regiões associadas a funções e com estrutura secundária. (Adaptado de Betzel <i>et al.</i> , 1999).	12
Figura 3. Fracionamento do veneno bruto de <i>M. frontalis</i> por meio de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa em coluna semipreparativa C ₄ , fluxo 2,5 mL/min, sob gradientes linear de 5 a 95% de acetonitrila. A absorbância foi monitorada a 216 e 280nm.	29
Figura 4. Espectro de massa da fração 18 após RP-HPLC em coluna semipreparativa C ₄ . São apresentadas massas moleculares nas faixas de 5, 7, 9, 10, 12 kDa, sendo o de maior intensidade o componente molecular de massa 13.447,00 Da. O espectro foi obtido por espectrômetro de massa do tipo NanoESI-SYNAPT HDMS e processado pela adição de sinais de cada envelope isotópico utilizando a função MaxEnt (MassLynx, Waters, USA). 31	31
Figura 5. Separação da fração 18 do veneno de <i>M. frontalis</i> . A fração 18 foi purificada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência em coluna analítica de fase reversa do tipo C ₁₈ , com fluxo de 1mL/min. A absorbância foi monitorada a 216 e 280 nm. As frações de menor absorbância foram ocultadas, preservando a fração 5 de interesse (33,2%).....	33
Figura 6. Espectro de massa por ESI-SYNAPT do componente 5 (33,2% ACN) do fracionamento por RP- HPLC em coluna C ₁₈ da fração 18 do veneno da serpente <i>M. frontalis</i> , revelando as massas moleculares 13.446,36±0,01 e 13.591,38±0.00 que foram identificadas.	34

Figura 7. Espectro de massa obtido via NanoESI-SYNAPT HDMS do componente $[M+H]^+ = 13.446,36 \pm 0,01$ Da presente na fração 18 do veneno da serpente *M. frontalis*, purificado por RP-HPLC em coluna C_{18} , revelando envelope isotópico carregado com 9 cargas ($[M+9H]^+$)..... 35

Figura 8. A: Perfil cromatográfico da separação da fração 5 após redução e alquilação por meio de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa em coluna analítica C_{18} , fluxo 1 mL/min, de MF18 com 11 corridas de semipreparativa do veneno de *M. frontalis* adicionadas. B: Perfil cromatográfico da separação da fração 4 após redução e alquilação por meio de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa em coluna analítica C_{18} , fluxo 1 mL/min, de MF18 com 15 corridas de semipreparativa do veneno de *M. frontalis* adicionadas. A absorbância foi monitorada a 216 e 280 nm e as concentrações de ACN de eluição são indicadas em cada fração..... 38

Figura 9. Espectros de massa das frações de cromatografia geradas após redução e alquilação da fração mais intensa da MF18. A: Fração 7, B: Fração 8, C: Fração 9, D: Fração 10, E: Fração 11, F: Fração 12, G: Fração 13, H: Fração 14, I: Fração 15, J: Fração 16, K: Fração 17 L: Fração 18..... 40

Figura 10. Espectro de massa obtido por ESI-SYNAPT deconvolvido do componente com maior número de alquilações mostrando sua massa exata de $14.263,48 \pm 2,23$ Da em suas formas de ionização com diversas cargas, de $[M+8H]^+$ a $[M+19H]^+$ sendo apresentadas. Os espectro mostra duas curvas gaussianas, que poderia sugerir mais de um componente. Porém após cálculo das massas moleculares dos envelopes isotópicos correspondentes a cada carga, foi verificado que alguns níveis de protonização ocorrem com maior frequência que outros..... 41

Figura 11. Espectro de massa da fração 21 da separação por coluna semipreparativa C_4 , obtido por ESI-SYNAPT, mostrando a diversidade de massas moleculares presentes. 42

Figura 12. Fracionamento da fração 21 do veneno de *M. frontalis* por meio de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa em coluna analítica C_{18} , fluxo 1

mL/min, onde a absorbância foi monitorada a 216 e 280 nm. Os números acima de cada fração representam a concentração de ACN na qual foram eluídas. 43

Figura 13. Espectro de massa obtido por ESI-SYNAPT deconvolvido do componente 5 (RT:25,9; 36,1% ACN) da fração 21 do veneno da serpente *M. frontalis*, revelando as massas moleculares dos 3 componentes principais detectados: a:13103.55±0.47; b:13305.45±0.01 e c:6843.17±0.01 Da, em suas formas multicarregadas..... 44

Figura 14. Espectro de massa obtido por ESI-SYNAPT do componente de massa 13,103.55±0.47 Da da fração 21 do veneno da serpente *M. frontalis*, revelando distribuição isotópica das forma carregada com 8 cargas ($[M+8H]^+$). 45

Figura 15.A: Separação da fração de tempo de retenção 25,9 da fração 21, do veneno de *M. frontalis* por meio de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa em coluna Source 5RPC, fluxo 1 mL/min, com gradiente otimizado para concentração de ACN de 30 a 40%. A absorbância foi monitorada a 216 e 280 nm. B: Purificação dos componentes de tempo de retenção 26,7 (35,2%, Mf21_4j_2) após redução e alquilação e C: Purificação dos componentes de tempo de retenção 31,3 (36,1%, Mf21_4j_3) após redução e alquilação..... 46

Figura 16.A: Separação da fração de tempo de retenção 27,3 da fração 21 (Mf21_5j), do veneno de *M. frontalis* por meio de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa em coluna Source 5RPC, fluxo 1 mL/min, B: purificação da mesma fração após redução e alquilação. A absorbância foi monitorada a 216 e 280 nm. 47

Figura 17. Perfil cromatográfico da separação da fração 5 (33,2% ACN) do MF18 do veneno de *M. frontalis* após redução, alquilação e digestão com a proteinase Glu-C por meio de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa em coluna analítica C₁₈, fluxo 1 mL/min, A absorbância foi monitorada a 216 e 280 nm. Os números acima dos picos correspondem à concentração de ACN em que eluíram. 49

Figura 18.A: Espectro de massa molecular dos compostos presentes na fração 11 obtido em modo linear, com detalhe das diferenças de massa referentes ao grupamento carbamidometil, revelando ao menos 5 níveis distintos de alquilação nesta fração. B: Espectro de massa obtido no modo LIFT com matriz α -ciano e sequenciamento de novo

do peptídeo de massa monoisotópica 2.744,87 Da presente na fração 5 da cromatografia de purificação de Mf18 digerida com GLUC. Os resíduos em vermelho necessitam de confirmação. 50

Figura 19. A: Espectro de massa MS/MS da fração 4 de massa 1.497,52 Da do fracionamento da proteína Mf18 digerida com GLUC utilizando a matriz α -ciano em modo LIFT. B: Espectro de massa da fração 2 de massa 1.266,47 Da do fracionamento da proteína Mf18 digerida com GLUC utilizando a matriz α -ciano em modo LIFT. 51

Figura 20. Espectro de massa da fração 11 de massa 2.196,47 Da oriundo do fracionamento da proteína Mf18 digerida com GLUC utilizando a matriz α -ciano em modo LIFT. A sequência obtida foi AKVHQCHPYWTI/LYSYD. 52

Figura 21. Espectro de massa da fração 11 utilizando a matriz DAN em modo ISD. A sequência obtida corresponde à série c de íons. Outra sequência utilizada para confirmação da mesma proteína com 57 Da de diferença, referente a uma alquilação a mais também é apresentada. 53

Figura 22. Estrutura primária parcial da PLA₂ purificada a partir da fração 18 do veneno bruto da serpente *M. frontalis*. As setas indicam os trechos da sequência que foram determinados por cada metodologia, ambas utilizando a toxina purificada, reduzida e alquilada. Sequenciamento direto foi designado quando a estrutura foi determinada por degradação de Edman, e GLU-C frag que foi determinada por sequenciamento de fragmentos por espectrometria de massa. 55

Figura 23. Alinhamento das estruturas primárias das PLA₂s presentes na fração Mf21. As 3 frações geradas pela purificação da subfração Mf21_4j em coluna Source foram reduzidas e alquiladas e então sequenciadas no modo ISD com matriz DAN. As sequências geradas foram alinhadas com a ferramenta ClustalW Multiple alignment, disponível no software Bioedit 7.0. Os espaçamentos foram introduzidos de forma a aumentar a similaridade das regiões mais conservadas como cisteínas. 56

Figura 24. Alinhamento das estruturas primárias da PLA₂s presentes na fração Mf21. A fração gerada pela purificação da subfração Mf21_5j em coluna Source foi reduzida e alquilada e então sequenciada no modo ISD com matriz DAN. As sequências

geradas foram alinhadas com a ferramenta ClustalW Multiple alignment, disponível no software Bioedit 7.0. Os espaçamentos foram introduzidos de forma a aumentar a similaridade das regiões mais conservadas como cisteínas.....56

Figura 25. Alinhamento da PLA₂ Mf18 com outras PLA₂s de serpentes de Elapídeos utilizando o software Bioedit 3.0, mostrando as regiões com ao menos 90% de conservação com fundo colorido. Também é destacada a conservação de sítios funcionais dessas proteínas, particularmente da região relativa ao *loop* ligante a Ca⁺.(Código de cores: página xi).....59

Figura 26. Alinhamento das sequências correspondentes ao fragmento localizado entre os resíduos 31 e 37 de PLA₂s dos venenos de serpentes da família elapidae e do pâncreas de mamíferos (ressaltados em vermelho).....61

Figura 27. Alinhamento da região conservada em PLA₂s de elapídeos com outros peptídeos opióides, mostrando o aminoácido N-terminal com 90% de identidade e o restante do N-terminal com 63% de identidade.....62

Figura 28. Cromatogramas alinhados dos peptídeos sintéticos Elapidorphin-Y, Elapidorphin-F e Elapidorphin-W, no último passo cromatográfico, suficiente para sua homogeneidade e pureza. Essa etapa correspondeu ao fracionamento RP-HPLC em coluna analítica C₁₈.....62

Figura 29. Espectros de massa com as respectivas cromatografias de fase reversa, mostrando a massa, pureza e intensidade dos compostos sintéticos após múltiplas etapas cromatográficas. A: Peptídeo sintético de massa 622,31 Da, purificado por coluna analítica C₁₈ (Fração mais intensa); B: Peptídeo sintético de massa 661,33 Da, purificado por coluna analítica C₁₈ (Fração de maior hidrofobicidade, maior tempo de retenção); C: peptídeo sintético de massa 638,36 Da, purificado por soluna semi-preparativa C₁₈ (Fração com tempo de retenção marcado).....63

Figura 30. Espectros de massa dos peptídeos sintetizados, purificados até homogeneidade, mostrando seu sequenciamento de novo e confirmação da estrutura primária. Os espectros foram obtidos por ESI HCT ou MALDI TOF Microflex, e processados pelo software Biotools. A: Elapidorphin-Y, B: Elapidorphin-F e C: Elapidorphin-W.67

Figura 31. Alinhamento de PLA₂s dos venenos dos elapídeos *Bungarus caeruleus* e *Ophiophagus hannah* e do pâncreas dos mamíferos *Sus scrofa* e *Bos taurus*. Em detalhe os resíduos da posição 31 de cada uma das moléculas, mostrando o direcionamento ao exterior dos resíduos aromáticos (Tyr e Trp) em comparação aos não aromáticos (Ser e Leu). 68

Figura 32. A. Representação tridimensional de uma das estruturas terciárias mais estáveis do peptídeo Elapidorphin-Y, onde é possível verificar o anel aromático que se mantém na mesma posição tridimensional em relação ao restante da molécula. B. Representação gráfica dos trechos de estrutura terciária mais estável por meio da dinâmica estrutural representada pela variação estrutural (*root-mean-square deviation-RMSD*) obtida por modelos dos peptídeos Elapidorphin Y (verde), Elapidorphin-W (azul), Elapidorphin-F (lilás), do peptídeo hipotético de sequência SGGSGTP (rosa), 6-Arg,7-Phe, Met-Encefalina (Lilás escuro) e Met-encefalina (laranja), no software GROMACS 4.5. 69

Figura 33. Comparação entre as estruturas terciárias de modelos dos peptídeos sintéticos YGGSGTP, WGGSGTP, FGGSGTP e SGGSGTP com a met-encefalina (YGGFM) e à 6-Arg,7-Phe, Met-Encefalina (YGGFMRF), gerados pelo software GROMACS 4.5. A cor amarelada mostra regiões hidrofílicas enquanto regiões azuladas são hidrofóbicas. 70

Figura 34. Período de investigação das variações de latências dependentes dos tratamentos das diferentes doses do peptídeo Elapidorphin-Y e tratamentos injetados por icv em ratos. Os símbolos *, # e + representam agrupamentos de respostas similares, onde símbolos iguais mostram que não há diferença estatisticamente verificável entre os pontos, e símbolos distintos revelam pontos onde a variação é significativa. 73

Figura 35. Área abaixo da curva relative ao índice de antinocicepção no ensaio de tail flick. Os símbolos *, # e + representam agrupamentos de respostas similares, onde símbolos iguais mostram que não há diferença estatisticamente verificável entre os pontos, e símbolos distintos revelam pontos onde a variação é significativa. 73

Figura 36. Efeito dos peptídeos Elapidorphin-F (F), Elapidorphin-W (W) e Elapidorphin-Y (Y), administrados s.c. na dor induzida por formalina (Primeira fase à

esquerda, e segunda fase à direita) a 16 nmol, em camundongos. As colunas representam as medias com erro padrão de ao menos 2 animais. ** Significativamente diferentes do controle ($P < 0.01$, ANOVA de duas vias). 74

Índice de tabelas

Tabela 1. Evolução dos acidentes por gênero de serpente no Brasil, 2001a 2009. (Fonte:SINAN/SVS/MS).*Sequelas mais frequentes de acordo com o tipo de envenenamento, ex.: amputação, necrose, etc.	2
Tabela 2. Heptapeptídeos sintetizados com respectivas massas monoisotópicas..	22
Tabela 3. Lista das massas moleculares presentes por tempo de retenção das frações do veneno da serpente <i>Micrurus frontalis</i> adquiridas por MALDI-TOF em modo de aquisição linear. As frações 18 e 21, onde se concentram a maioria das moléculas com massas moleculares próximos a 13 kDa são apresentadas. Massas moleculares sublinhadas indicam a ocorrência provável de duplas cargas.	30
Tabela 4. Principais frações eluídas de cromatografia líquida com coluna C ₁₈ da fração 5 isolada, reduzida e alquilada, sendo a fração Mf18-11 proveniente da adição de 11 corridas cromatográficas e a Mf18-15 proveniente da adição de 15 corridas. n.c.: não calculado por se tratarem de moléculas distintas.	39
Tabela 5.Massa molecular e sequência dos fragmentos oriundos da proteólise da fração MF18com enzima GLU-C. As sequências em azul foram obtidas por fragmentação por MS/MS utilizando matriz α -ciano dos fragmentos enzimáticos. As sequências em vermelho foram feitos utilizando matriz DAN e por fragmentação por ISD dos fragmentos enzimáticos.....	54

Resumo

Os venenos de serpentes são muito pesquisados pela diversidade de moléculas e suas atividades. Dentre as principais classes de moléculas presentes nesses venenos podem ser destacadas PLA₂s e neurotoxinas, por possuírem moléculas com ações ocultas, presentes em diferentes sítios das mesmas moléculas. As serpentes da família Elapidae são excelentes representantes desta diversidade, por apresentarem os dois tipos de moléculas. As serpentes brasileiras da família Elapidae estão restritas ao gênero *Micrurus*, chamadas corais-verdadeiras, pela coloração característica. *Micrurus frontalis* representa bem esse gênero devido à diversidade de moléculas contidas em seus venenos e alta imunogenicidade, que a levou a ser a principal espécie utilizada na fabricação de soro antielapídico. Este estudo objetivou o isolamento de PLA₂s presentes no veneno de *Micrurus frontalis*, e caracterização de atividades de peptídeos encriptados em suas estruturas primárias. Foram purificadas aproximadamente 30 frações do veneno de *M. frontalis* por meio de RP-HPLC em coluna semipreparativa, onde as de concentração de fase móvel ACN de eluição maior que 35% em geral apresentavam ao menos uma molécula de massa correspondente à de PLA₂s. A fração Mf18 foi escolhida pela pureza e abundância do componente de massa 13.447,37 Da. Sua estrutura primária foi determinada por Degradação de EDMAN e seqüenciamento *de novo* após redução, alquilação e digestão com enzima Glu-C. Após comparação com banco de dados de PLA₂s presentes em venenos de Elapídeos, a proteína Mf18 foi enquadrada por homologia, na categoria de PLA₂s de Classe I, pela presença da alça elapídica característica, número de pontes dissulfeto e comprimento da sequência. Pela conservação da região correspondente à alça ligante ao íon cálcio de todas as outras enzimas da Classe I, e pela identidade de seu N-terminal com peptídeos opióides, principalmente encefalina, foram sintetizados 3 peptídeos chamados Elapidorfina-Y, Elapidorfina-W e Elapidorfina-F. Os peptídeos encontrados encriptados na sequência da PLA₂ de *M. frontalis* foram liberados através de síntese em sílica. Após síntese em fase sólida por Fmoc e purificados, as atividades antinociceptivas foram avaliadas pelo ensaio de *tailflick* e ensaio de formalina.

O peptídeo Elapidorfina-Y apresentou significativa atividade antinociceptiva quando comparada ao controle, que se mostrou dependente da dose, do tempo após aplicação e da relação dose X tempo após aplicação. Essa atividade em doses nanoMolares foi comparável aquela obtida com morfina. Nos ensaios de formalina, todos os peptídeos apresentaram atividade antinociceptiva, sendo notadamente maior do que o controle na fase inflamatória para o peptídeo Elapidorfina-W. Muitas proteínas são fontes de peptídeos menores, utilizando para isso diversas formas de serem obtidas, sendo a principal as clivagens de suas sequências mais longas em sítios específicos, dando origem a peptídeos com diversas atividades biológicas, em alvos distintos. Um exemplo dessa possibilidade é o peptídeo Crotalphine que possui atividade antinociceptiva, e a mesma sequência da porção N-terminal da Crotoxina, proteína isolada do mesmo veneno (*Crotalus durissus*). Os resultados obtidos concordam com o descrito para a própria encefalina, que também é resultado da liberação endógena de um peptídeo por meio de modificações postraducionais da proteína precursora Proencefalina. O presente trabalho mostrou a identificação e caracterização parcial de PLA₂ do veneno de *Micrurus frontalis* e apresentou a atividade antinociceptiva no SNC e periférica de peptídeos liberados de sua sequência por meio de síntese em fase sólida.

Abstract

Many researches focus on snake venoms due to the diversity of the molecules they possess and their activities. Among the main classes of molecules in these venoms, the PLA₂s and neurotoxins are emphasized for pursuing different effects encrypted in each site. The elapidae snakes are excellent representatives of such diversity, because their venoms contain the two kinds of molecules. The brazilian elapidae are restricted to the *Micrurus* genus also known as the coral-snakes for their characteristic color. *Micrurus frontalis* well represents this genus for the diversity of molecules and high immunogenicity of its venom that led to its use in the manufacturing of the elapidae antivenom. The objective of this study was to identify, characterize and evaluate the PLA₂s present in *M. frontalis* venom and isolate encrypted peptides with sequences similar to that of bioactive peptides. The initial chromatography step led to the fractionation of the crude *M. frontalis* venom in approximately 30 fractions by RP-HPLC with C18 semi preparative column. Each fraction that eluted at an ACN mobile phase concentration of 35% and more had at least one molecule with molecular mass corresponding to that of a PLA₂. Fraction Mf18 was chosen for its purity and abundance of a component with a mass of 13.447,37 Da, which was then reduced, alkylated had its N-terminal sequenced by EDMAN degradation. The main fraction resulting of refractioning with analytical C₁₈ was digested using a GLU-C V8 enzyme. Each generated enzymatic cleavage fragment was purified and had their primary structure determined by *de novo* sequencing. After comparisons with online elapidae snake PLA₂s databanks, Mf18 protein was placed in the Class I snake PLA₂s category due to its similarity, the presence of the elapid loop, the number of disulfide bridges and the sequence length. The high conservation of the region corresponding to the Calcium binding loop among all the Class I snake PLA₂s and the identity of this region's N-terminal to enkephalin's, led us to use it as a model for the synthesis of three peptides named Elapidorphin-Y, Elapidorphin-W e Elapidorphin-F which only differ in their N-terminal by Y, W and F. Tertiary structure alignment of PLA₂s from elapid snakes venoms and mammal pancreas also revealed similarity in the three dimensional structure of this region. After

the synthesis, they were purified and had their sequence confirmed by mass spectrometry fragmentation and sequencing. Since the primary and tertiary structures resemble that of the antinociceptive peptide enkephalin, antinociceptive activity was evaluated through the tailflick and the formalin assay. The Elapidorphin-Y peptide presented significant antinociceptive activity when compared to control, dependent on the dose, time after infusion and the relation dose X time. This activity in nanoMolar scale was comparable to that of morphine. In the formalin assays, all the peptides presented antinociceptive activity, and was statistically higher than control in the inflammatory phase for the peptide Elapidorphin-W. The encrypted peptides discovered in a *M. frontalis* PLA₂ sequence were released by solid phase synthesis. Many proteins are sources of smaller peptides, using many different mechanisms to be obtained, among which the main is the cleavage of their sequence at specific sites by endoproteinases originating peptides with diverse activities in various localities. The peptide Crotalphine possesses antinociceptive activity, and in an interesting way presents the same sequence as the N-terminal portion of Crotoxin, a longer PLA₂ isolated from the venom of *Crotalus durissus*, raising the possibility of multiple cleavages after the endogenous synthesis. The obtained results agree with the described for enkephalin itself, which is also the result of the cleavage from its precursor protein Proenkephalin by different enzymes. In conclusion, the present work showed for the first time the partial sequence of a PLA₂ from the venom of *M. frontalis* and the peripheral and central nervous system antinociceptive activity of peptides released from its sequence by solid phase synthesis.

Introdução

Serpentes

Elapídeos são serpentes peçonhentas que fazem parte da superfamília Colubroidea. Parte da última, a família Elapidae inclui o gênero *Acontophis* (*deathadder*), *Dendroaspis* (mambas), *Naja* (cobras), *Hydrophis* e *Laticauda* (*seasnakes*), *Bungarus* (*kraits*), *Micrurus* (cobras coral), entre outros (Pyron *et al*, 2010).

As chamadas cobras-corais verdadeiras ou boicorás (do tupi-guarani: *Boi*:cobra; português: coral) pertencem ao gênero *Micrurus*, que junto aos gêneros *Micruroides* e *Leptomicrurus*, constituem a família Elapidae do novo mundo. São serpentes de pequeno porte, sendo o maior comprimento registrado de 1,60m (Sebben *et al*, 1996; Campbell e Lamar, 2004). As cores mais frequentes são o vermelho, preto, branco e amarelo, formando anéis com combinações variadas. As corais-verdadeiras não possuem fosseta loreal e apresentam dentição proteróglifa. São ovíparas e se alimentam de outras serpentes (ofiófagas)(Sebben *et al*, 1996). Apresentam cabeça e olhos pequenos e corpo cilíndrico, com cauda pequena quando comparada à da maioria dos colubrídeos. A cauda pode inclusive ser utilizada para diferenciar o sexo dos animais (Campbell e Lamar, 2004; Jorge da Silva e Sites, 1999).

As serpentes do gênero *Micrurus* são conhecidas pela sua capacidade de gerar envenenamento pela inoculação de seu veneno através de seus dentes inoculadores. Apesar de não desferirem botes, quando pegadas ou pisadas podem morder, circunstâncias em que acontecem a maioria dos acidentes (Sebben *et al*, 1996; SINAN/SVS, 2010). Despertam bastante interesse pela gravidade de seus envenenamentos e pelo quadro clínico caracteristicamente neurotóxico acarretado em consequência da grande quantidade de neurotoxinas em seus venenos (Savage e Slowinski, 1992; Jorge da Silva e Sites, 1999).

O gênero *Micrurus* é distribuído em 19 espécies no Brasil, das quais as únicas com ocorrência registrada no DF e entorno são *M. frontalis* e *M. lemniscatus*. A espécie *M. frontalis* se encontra na lista de répteis ameaçados de extinção como provavelmente ameaçada (ibama.gov, acessado em 22/02/2010), fato que estimula o melhor estudo para sua preservação, já que seu veneno é utilizado para fabricação do soro antielapídico (Jorge da Silva e Sites, 1999; Jorge da Silva e Bucarechi, 2009).

Acidentes ofídicos e epidemiologia

As cobras-corais são serpentes consideradas peçonhentas que causam acidentes com a menor frequência no Brasil. Provavelmente pelo seu comportamento menos agressivo que de outras serpentes, hábito semi-fossorial, pequena abertura bucal, pequeno tamanho da presa e ocorrência em lugares pouco habitados por humanos. De acordo com dados do Ministério da Saúde, foram responsáveis por 0,69% (n=1159) dos 169.182 casos dos acidentes ofídicos notificados entre os anos de 2001 a 2009, sem nenhum óbito registrado (www.saude.gov.br/sinanweb, acessado em 22/02/2010)(Tabela 1).

Tabela 1. Evolução dos acidentes por gênero de serpente no Brasil, 2001a 2009. (Fonte: SINAN/SVS/MS). *Sequelas mais frequentes de acordo com o tipo de envenenamento, ex.: amputação, necrose, etc.

Tipo acidente ofídico	Cura	Cura com seqüela *	Óbito	Total	Porcentagem do total
Botrópico	139355	2105	386	141846	83.84
Crotálico	14383	255	111	14749	8.72
Elapídico (<i>Micrurus</i>)	1142	17	0	1159	0.69
Laquético	4800	107	30	4937	2.92
Não Peçonhenta	6453	38	0	6491	3.84
Total	166133	2522	527	169182	100.00

A atividade mais marcante do ponto de vista clínico é a neurotóxica, porém, o quadro do acidente elapídico pode ser dividido em local e sistêmico (Jorge da Silva e Bucarechi, 2009). As manifestações locais são discretas, geralmente dor e parestesia. Já as manifestações sistêmicas são resultado da ação neurotóxica, gerando síndrome miastênica e manifestações paralíticas tais como: ptose palpebral, turvação da visão, dificuldade de deglutição e mastigação, dificuldades de manutenção da posição ereta, diminuição da força muscular, paralisia total dos membros, dispnéia obstrutiva e restritiva até paralisia diafragmática (Vital Brazil, 1987).

Os efeitos locais como edema e hemorragia são bastante estudados nos venenos de corais. De acordo com Gutiérrez *et al.* (1983), os venenos de *M. nigrocinctus* e *M. alleni* provenientes da Costa Rica, *M. frontalis*, *M. carinicauda* e *M. surinamensis* da Colômbia, não induzem edema ou hemorragia. No entanto, Barros *et al.* (1994) mostram que os venenos de *Micrurus* oriundos da região Amazônica, exceto *M. surinamensis*, nas mesmas doses testadas por Gutiérrez *et al.* (1983), apresentam intensa atividade edematogênica. Cechini *et al.* (2005), comparando a atividade biológica e enzimática entre diferentes espécies de *Micrurus* brasileiras, relatam significativa formação de edema e miotoxicidade inclusive em *M. surinamensis*.

Alguns pacientes mordidos por *M. surinamensis* e *M. filiformis* descritos na Amazônia Brasileira demonstraram parestesia no membro mordido e pouca dor (Pardal *et al.*, 2010). Nestes casos apenas o sintoma neurotóxico referente à paralisia foi claramente evidenciado.

Venenos de elapídeos

O conteúdo neurotóxico e os efeitos fisiológicos atribuídos aos venenos de elapídeos representam as características mais distintas entre os venenos de serpentes em

geral, que são principalmente constituídos de PLA₂s e metaloproteases (Alam *et al*, 1996, Nawaraket *et al*, 2003, Graham, 2008).

Quando testados *in vitro* ou com animais de experimentação os venenos de *Micrurus* apresentam extremamente ativos e com alta toxicidade. Vital Brazil (1987) descreve mudanças neurofisiológicas como as induzidas pelas α -neurotoxinas e efeitos pré-sinápticos nas junções neuromusculares provocadas pelos venenos de *M. corallinus* e ação pré e pós-sináptica pelos venenos de *M. frontalis* e *M. lemniscatus*.

As neurotoxinas pré-sinápticas são proteínas de massas moleculares que variam de 12 a 60 kDa. Atuam impedindo a liberação de acetilcolina na fenda sináptica nas terminações nervosas axônicas da junção neuromuscular de nervos motores (Vital Brazil 1987; Oliveira *et al*, 2000).

As neurotoxinas pós-sinápticas possuem massa molecular variando entre 6 a 14 kDa, e atuam por fixação competitiva nos receptores colinérgicos das membranas pós-sinápticas, sem atividade enzimática. São encontradas nos venenos de *M. surinamensis* (Aird *et al*, 1993), *M. frontalis* (Francis *et al*, 1997) e atividade semelhante foi identificada em veneno bruto de *M. lemniscatus* (Vital Brazil, 1965). O veneno de *M. frontalis* age de maneira reversível e irreversível, quando da competição por D-tubocurarina (Vital Brazil e Vieira, 1996).

As cardiotoxinas são estruturalmente próximas das neurotoxinas e a ação cardiovascular é também descrita experimentalmente, com os venenos de *M. fulvius* (Francis *et al*, 1993) e *M. frontalis* (Francis, *et al*, 1997). Os autores relacionaram esse efeito à presença de uma PLA₂ hipotensora (HT), a qual ainda não possui sua estrutura determinada em *M. frontalis*. Estudos prévios do laboratório de toxilogia da Universidade de Brasília mostraram atividade cardiotoxicidade causada pelo veneno bruto de *M. frontalis* em coração *in situ* de *Rana catesbeiana* quando injetados na veia cava, efeito não evidenciado nos testes com o veneno de *M. lemniscatus* (dados não mostrados).

Bioquímica do veneno de *Micrurus*

As serpentes do gênero *Micrurus*, pelo seu reduzido tamanho e consequentemente pequeno crânio, produzem pouca quantidade de veneno. Além disso, são serpentes de difícil manutenção em cativeiro, pois as corais-verdadeiras raramente se alimentam nesse ambiente. Isso aliado ao baixo rendimento de veneno por extração leva esse veneno a ser difícil de ser estudado e, consequentemente, à escassez de estudos bioquímicos e farmacológicos no gênero (Jorge da Silva e Bucarechi, 2009).

O veneno das serpentes varia em constituição influenciado por vários fatores como sexo, alimentação, clima, reprodução, estresse, modo de extração e origem geográfica. Diferenças interespecíficas foram determinadas em relação à composição, concentração enzimática e atividade miotóxica entre os venenos de *Micrurus* (Aird e Silva, 1991; Gutiérrez *et al*, 1992). Dessa forma, um fator que se torna importante é a presença de várias espécies novas, ainda não identificadas, que podem ainda serem confundidas com as já descritas (Campbell e Lamar, 2004).

Foi observado que *Micrurus frontalis* não possui atividades coagulante, desfibrinogênica, hemorrágica, necrótica ou proteolítica comparável à gerada por *Bothrops alternatus* e *Crotalus durissus* (Sanchez *et al*, 1992), sugerindo que cada atividade fosse caracterizada individualmente. Outros estudos em *M. altirostris* mostram intensa resposta edematogênica e inflamatória, quando comparado com os venenos de *M. lemniscatus*, *M. frontalis* e *M. ibiboboca*, que geram edema menor (Moraes *et al*, 2003). No mesmo trabalho é mostrada atividade miotóxica causada pelo veneno do gênero *Micrurus*. Embora hajam também efeitos hemorrágicos que começaram a ser demonstrados experimentalmente, estes nunca foram registrados clinicamente em humanos. Os venenos de *M. brasiliensis*, *M. lemniscatus*, *M. pyrrhocryptus*, *M. corallinus* e *M. frontalis* causam hemorragia visceral, pulmonar e subendocárdica em ratos (Francis *et al*, 1998; Jorge da Silva e Bucarechi, 2009). Já foram também caracterizadas atividades proteásica, fosfodiesterásica e 5' nucleotidásica; atividade L-aminoácido oxidase, L-aminoácido desidrogenase, acetilcolinesterásica e leucina aminopeptidásica variável; atividade

hialuronidásica e fosfolipásica entre moderada e alta em algumas espécies de *Micrurus* (Aird e Jorge da Silva, 1991; Tan e Ponnudurai, 1992).

Os venenos de *M. nigrocinctus*, *M. lemniscatus*, *M. surinamensis* e *M. frontalis* apresentam alta taxa de ruptura de preparações de lipossomos e atividade miotóxica. Além disso foi detectado que a maior taxa de atividade anticoagulante e a maior atividade fosfolipásica está presente em *M. frontalis* e *M. nigrocinctus*, sendo estas as espécies com os venenos mais tóxicos testados (Cechini *et al*, 2005).

Os venenos de *Micrurus* foram estudados para detecção de componentes isolados com atividade biológica. Foi purificada do veneno de *M. fulvius* uma fosfolipase do tipo A₂ de massa molecular de 14 kDa, com 119 resíduos de aminoácidos sendo 12 cisteínas, que apresenta homologia com fosfolipases de *Naja melanoleuca* e *Naja mossambica* (Possani *et al*, 1979). Aird e colaboradores (1993), caracterizaram uma neurotoxina pós-sináptica de massa 6545 Da no veneno de *M. surinamensis* que possui forte homologia em seqüência N-terminal com as encontradas nos venenos de outros elapídeos como *Dendroaspis jamesonii*, *Dendroaspis viridis* e *Naja melanoleuca*.

Foram isoladas e caracterizadas do veneno de *M. nigrocinctus* sete α -neurotoxinas, cinco fosfolipases A₂ e asnigroxinas, que são proteínas que se ligam a receptores de acetilcolina e são estruturalmente relacionadas as α -neurotoxinas de cadeia curta e longa de *Naja* (Rosso *et al*, 1996; Alape-Girón *et al*, 1996).

Micrurus frontalis

M. frontalis é uma espécie fundamental do ponto de vista de saúde pública, pois seu veneno é altamente imunogênico e possui alta diversidade de componentes. O soro antielapídico produzido atualmente no Brasil possui no *pool* de inoculação em cavalos, os venenos de *M. frontalis* e *M. corallinus*, o que o torna eficiente para a grande maioria de acidentes causados por corais-verdadeiras nopaís (Jorge da Silva e Bucarechi, 2009). No

entanto, ultimamente esta espécie tem sido de difícil captura, e em alguns estados se encontra incluída na lista de espécies provavelmente ameaçadas (Ibama, 2010).

O veneno da serpente *M. frontalis* apresenta dose-letal (i.v.) de 0,5 µg/g de camundongos (Jorge da Silva *et al*, 1993), atividade miotóxica elevada com níveis de creatino-cinase no plasma entre 226 ± 25 e 606 ± 35 U/mL e induz edema no local de inoculação (Gutiérrez *et al*, 1983). Em ratos, causa hemorragia visceral, pulmonar e subendocárdica e em camundongos provoca hipotensão (Francis *et al*, 1997).

Moreira *et al* (2010) realizaram procedimentos cromatográficos diferentes dos que haviam descritos até o momento e separaram, na primeira etapa cromatográfica semipreparativa, mais de 20 frações do veneno de *Micrurus frontalis*, enquanto estudos anteriores identificavam 10 frações iniciais (Jorge da Silva *et al*, 1991; Francis *et al*, 1997). Este estudo também purificou e caracterizou seis novas neurotoxinas possivelmente da classe de neurotoxinas de “3 dígitos”, testadas na junção neuromuscular de *Rana catesbeiana*, o que confirmou atividade neurotóxica pós-sináptica. Foram identificadas homologias com toxinas presentes em outras espécies de *Micrurus* e *Naja* (Moreira *et al*, 2010).

Dentre as várias frações purificadas por Moreira *et al*, (2010), muitas ainda carecem de ser caracterizadas. Por se tratar de um complexo de 7 espécies de *Micrurus*, a serpente *M. frontalis* possui ainda grande diversidade de toxinas em seu veneno que induzem atividades a serem descritas (Jorge da Silva e Sites, 1999).

Esse trabalho prioriza a exploração do veneno de *M. frontalis*, para a identificação e caracterização dos componentes que ainda não foram descritos, além de apresentar possíveis estratégias de busca e demonstrações de novas atividades biológicas antes consideradas improváveis.

As fosfolipases A₂ (PLA₂s)

As PLA₂s constituem uma grande família de enzimas com diversos fatores que as relacionam e as fazem ser classificadas nos grupos de I a XII. Esses fatores são principalmente catálise, sequência proteica, massa molecular, número de pontes dissulfeto e dependência de Ca²⁺ para desempenho de atividade (Kini, 2003, 2006). São uma família de enzimas lipolíticas que catalizam a hidrólise de ligações de ésteres de ácidos graxos na posição 2 de 1,2-diacil-*sn*-3-fosfolglicerídeos produzindo ácidos graxos livres, que são por si só líticos, e lisofosfolipídeos (Mukherjee, 2007).

A maior parte dos efeitos tóxicos das PLA₂s de serpentes está ligado a esse mecanismo, chamado de atividade catalítica ou enzimática. Alguns estudos mostram que essas enzimas primeiramente se ligam à membrana para somente então carregar o sítio ativo para a reação de lipólise. Essa reação depende da estrutura dupla de His-Asp com uma molécula de água como nucleófilo e utilizam um íon de Ca²⁺ como cofator (Mukherjee, 2007). Então, tem se tornado cada vez mais clara a diferença na seletividade que PLA₂s de diferentes fontes possuem por membranas com diferentes cabeças polares e cadeias de ácidos graxos (Mukherjee, 2007).

As fosfolipases do tipo A₂, apesar de apresentarem a estrutura primária e grande parte da estrutura secundária conservadas, possuem outras atividades biológicas, que podem ou não depender da atividade enzimática. Tais atividades são determinadas por “sítios farmacológicos” presentes na molécula de PLA₂, os quais são reconhecidos por regiões específicas da superfície da membrana celular, que atuam como receptores ou aceptores. A interação entre o sítio farmacológico e a proteína alvo se dá por carga, hidrofobicidade ou forças de van der Waal's. Os fatores como concentração, dependência de outras proteínas e do íon cálcio, também influenciam na afinidade ao receptor (Kini, 2003). Os alvos das PLA₂s são constituídos por proteínas ou glicoproteínas, que são característicos para cada espécie ou táxon. A afinidade da atividade enzimática é de 4 a 6 vezes maior que aquela da atividade farmacológica, o que pode explicar a formação de

complexos protéicos e ainda, por que frequentemente a atividade farmacológica depende da atividade enzimática.

Gutiérrez *et al*(1983, 1992) descreveram atividades hemolítica, cardiotoxicidade, miotóxica e neurotóxica pós-sináptica no veneno de *Micrurus*. A ação miotóxica pode estar associada à ação neurotóxica, ou parcialmente mascarada por essa. Experimentalmente a maioria dos venenos de *Micrurus* pode causar mionecrose.

As fosfolipases A₂ podem agir de forma direta ou indireta na formação do edema (Lomonte *et al*, 1993). Uma PLA₂ com ação miotóxica foi isolada a partir do veneno de *M. nigrocinctus* (Arroyo *et al.*, 1987), sugerindo que outros venenos do gênero possuem compostos similares (Mebis, 1986).

Nas contribuições de Francis *et al.* (1997) foi detectado, no veneno de *M. frontalis*, PLA₂s de sequências semelhantes às pancreáticas, principalmente por conterem um chamado *D-loop* formando α -hélice, descrito como característico de PLA₂s na faixa de massa de 18 a 22kDa. Neste estudo destacam a possibilidade de se formarem agregados proteicos, que eluíram juntos dos demais na filtração em gel, dificultando o isolamento pela metodologia utilizada.

Em escala molecular, as atividades farmacológicas de cada PLA₂ são desempenhadas de acordo com a sequência de aminoácidos de cada sítio da PLA₂. Por isso atualmente as PLA₂s já são divididas em porções ou sítios (Kini, 2003). Alguns desses sítios, considerados estruturais, são mais conservados do que outros, dando origem a atividades ou características mais diversas. Belo *et al.* (2005) utilizaram o delineamento de regiões funcionais que é apresentado ilustrativamente na Figura 1.



Figura 1. Estrutura primária da PLA₂ de *Micrurus dumerelii* com as regiões referentes a cada sítio funcional destacadas. (Belo *et al.*, 2005)

Dividindo a PLA₂ em regiões, Kini (2003) propõe uma forma como poderiam ser nomeados os sítios de acordo com suas atividades:

1. Região de neurotoxicidade pré-sináptica:

Os padrões hidropáticos das enzimas PLA₂s permitiram que fosse predito que a hélice E hidrofóbica, com base em 26 sequências de aminoácidos (Kini e Iwanaga, 1986a) possui relação com a neurotoxicidade. Com isso o segmento hidrofóbico entre os resíduos 80 e 100 foi caracterizada como preditor da atividade neurotóxica. No entanto com o trabalho de Krizaj *et al.* (1989) é que foi possível identificar um sítio neurotóxico na porção C-terminal de PLA₂s, onde a substituição de Lisina por Ácido Glutâmico modificou as propriedades eletroestáticas da molécula, reduzindo a atividade neurotóxica.

2. Região miotóxica

Com base na distribuição de cargas e sua densidade Kini e Iwanaga(1986b), identificaram uma região com características catiônicas que só é presente em PLA₂s miotóxicas. Esta região se localiza na porção imediatamente a N-terminal da hélice E hidrofóbica.

3. Região anticoagulante

Kini e Evans (1987) identificaram, a partir da comparação de enzimas com coagulação forte, fraca e não coagulantes, uma região entre os resíduos 54 e 77 relacionada com esta atividade. Nas duas extremidades desta região há resíduos de Lys, que podem ou não ser reposicionados por aminoácidos carregados positivamente ou neutros.

Alguns resíduos de aminoácidos também foram notados por exercerem papéis importantes na função biológica, como é o caso da Prolina. Além da elevada probabilidade de serem encontradas em segmentos de dobra da proteína, são considerados sítios de interação proteína-proteína em potencial (Kini e Evans, 1994).

Tendo por base a identificação destas regiões, alguns sítios das PLA₂s podem determinar a ocorrência de atividades diferenciadas que ainda não foram detectadas, seja por estarem mascaradas por outras atividades em que os receptores possuem maior afinidade, ou aquelas nas quais as PLA₂s ocorrem em maior quantidade no veneno bruto. Essas regiões foram determinados pela análise dos aminoácidos presentes, e por homologia de sequências em proteínas que desempenham a atividade com muita intensidade. É possível hipotetizar que atividades que nunca foram descritas em serpentes estejam estruturalmente presentes nessas proteínas, mas ainda dependam de alguma forma de liberação ou exposição para que possam ser desempenhadas.

Apesar da composição, variedade de isoformas e a abundancia relativa de PLA₂s em elapídeos poder ser comparadas às de viperídeos (Nawarak et al, 2003, McCue, 2005), essas duas fontes de PLA₂s, agrupadas em Grupos I e II, respectivamente, apresentam diferenças significativas nas sequências de aminoácidos, entre as quais a mais marcante é a chamada de alça elapídica (Figura 2).

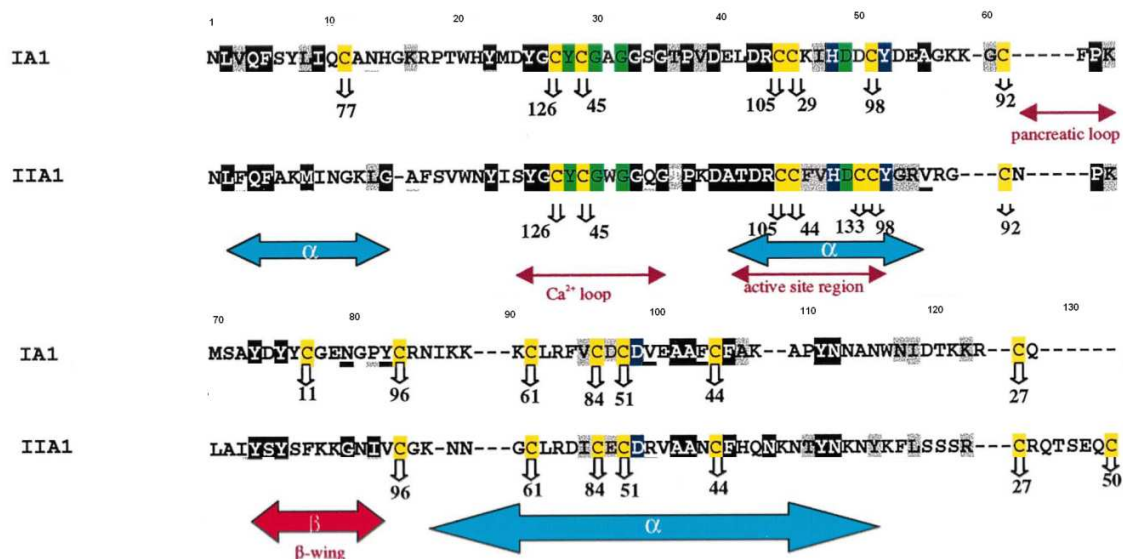


Figura 2. Estruturas primárias de PLA₂s dos grupos IA e IIA mostrando resíduos conservados e idênticos em cada posição em uma comparação de aproximadamente 200 moléculas de PLA₂; São apresentados também as regiões associadas a funções e com estrutura secundária. (Adaptado de Betzel *et al*, 1999).

Foram mostrados no trabalho de Oliveira e colaboradores (2008) os efeitos de PLA₂s encontradas no veneno de *M. lemniscatus* em eletroencefalogramas de ratos, após administração no hipocampo. Foram detectados distúrbios comportamentais, convulsões e epileptogenia fraca. Estes efeitos são semelhantes àqueles encontrados em PLA₂s do velho mundo, que provocam os mesmos distúrbios e degeneração neuronal. Estas crises epiléticas, caracterizadas por movimentos clônicos, tiveram início tardio (Oliveira et al, 2008).

Os trabalhos apresentados nos parágrafos anteriores revelam a diversidade de moléculas presentes nos venenos de *Micrurus spp.* atuantes no SNC. Esse variado espectro de formas, de mecanismos de ação leva a acreditar em última instância, que expressões de segmentos diferentes do código genético destes animais leva a variações nas sequências das PLA₂s que alteram a forma como estas interagem com as membranas e suas proteínas. A maior proximidade filogenética entre Elapídeos, sejam do velho ou do novo mundo, conservou de tal maneira os sítios responsáveis por estas ações, que a maioria das moléculas descritas apresenta algum tipo de atividade neurotóxica. À medida

que novos métodos de caracterização são desenvolvidos, mais evidências vão surgindo da formação de agrupamentos moleculares neurotóxicos nos venenos de elapídeos constituídos por neurotoxinas, PLA₂s e outras proteínas, todas intimamente relacionadas em suas funções como resultados de suas estruturas.

Mais estudos são necessários para relacionar a sequência de cada um destes sítios com a atividade que podem desempenhar, como estudos de engenharia molecular que mostrem a influência que cada resíduo de aminoácido possui na conformação da proteína e possibilitem a predição de atividades pela sequência e estrutura. Como resultado será possível o desenvolvimento de peptídeos que possam ser incluídos/substituídos em determinadas proteínas para desenvolver ações desejadas.

Peptídeos opióides

As encefalinas são pentapeptídeos endógenos encontrados em altas concentrações em tecidos endócrinos e cerebrais (Hughes *et al*, 1975). Esses peptídeos estão diretamente envolvidos na regulação da nocicepção em vertebrados devido à sua afinidade pelos receptores μ , δ e κ . Em humanos, as encefalinas maduras resultam do processamento enzimático de um precursor com 267 aminoácidos de sequência, contendo quatro cópias de Met-encefalina, uma Leu-encefalina e duas formas da Met-encefalina com o C-terminal estendido (Comb *et al*, 1982; Noda *et al*, 1982).

Os receptores opióides fazem parte da família de receptores acoplados a proteína G, que estão atualmente divididos em quatro tipos, a partir de suas afinidades farmacológicas: μ (MOR), δ (DOR), κ (KOR) e um grupo semelhante a receptores opióides (ORL). Os genes desses receptores possuem regiões altamente conservadas, assim como as proteínas codificadas por eles. As variações de inserções ou perdas de resíduos de aminoácidos em diferentes regiões das proteínas precursoras é responsável pelas mudanças em funções fisiológicas (Herrero-Turrion e Rodríguez, 2008).

Os genes da Proencefalina-A (PENK) estão presentes em vários vertebrados, mostrando alta identidade de sequências (Dores et al. 2002; Walthers e Moore, 2005). Mais recentemente, Bojnik e colaboradores (2011) reportaram que análogos sintéticos de formas estendidas da Met-encefalina, o heptapeptídeo YGGFMRF e as variantes polimórficas presentes em 56 espécies apresentam mutações pontuais nos seus C-terminais, mas conservam a região sinal de opióides YGGF. A presença de mutações aliadas a funcionalidade de peptídeos permite a investigação de funções estrutural-atividade, desenvolvida pela evolução ou pela síntese direcionada pela engenharia genética.

A produção de peptídeos bioativos a partir do processamento de proteínas mais longas que podem diferir em atividade não é um fenômeno exclusivo da Proencefalina-A. Outros peptídeos opióides como Hemorfinas, Dinorfinas, Nociceptinas, Beta-Casomorfina, Rubiscolina-6 são produzidos até suas formas maduras por processamento endógeno por meios de enzimas, ou mesmo exógeno (Gutstein e Huda, 2006).

Perguntas levantadas:

- As PLA₂s de *Micrurus frontalis* apresentam níveis de semelhanças às PLA₂s pancreáticas de mamíferos característicos das encontradas para Elapídeos?
- Essas moléculas pertencem à classe 1A?

Hipóteses propostas

1. Como as PLA₂ secretadas de elapídeos e pâncreas de mamíferos possuem sequências com elevado grau de similaridade e funções digestivas comuns, seria possível identificar motivos neuroativos inéditos nas sequências das enzimas multitóxicas de elapídeos que não estejam presentes naquelas de pâncreas de mamíferos?
2. A sequência derivada seria traduzível em novos análogos sintéticos os quais, uma vez isolados da sequência parental manteriam sua nova função fisiológica predita previamente?

Objetivos

A proposta deste estudo foi a identificação e o sequenciamento de PLA₂s no veneno de *Micrurus frontalis*.

1. Purificar e caracterizar PLA₂s encontradas no veneno de *Micrurus frontalis*;
2. Determinar a estrutura primária, por seqüenciamento MS/MS de novo e degradação de Edman, de proteínas purificadas.
3. Comparar similaridade de estrutura primária com sítios funcionais de outras toxinas para predição de atividade;
4. Sintetizar peptídeos correspondentes a sítios estruturais com potencial atividade biológica encontrados nas toxinas purificadas
5. Determinar atividades biológicas dos peptídeos sintetizados com ensaios farmacológicos

Material e métodos

Veneno

O veneno de serpentes *M. frontalis* adultas (pool de 4 animais) foi gentilmente cedido pelo Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas (CEPB) da Universidade Católica de Goiás (UCG).

A extração dos venenos de *Micrurus* ocorreu segundo o procedimento manual de Aird e Jorge da Silva (1991), no qual tubos microcapilares de 25 a 70 μ L foram utilizados durante a extração.

Purificação

Alíquotas de 5 mg do veneno de *M. frontalis* foram dissolvidas em 500 μ L de água Milli-Q filtrada (Millex 0,22 μ m) e aplicadas em um sistema RP-HPLC (*ReversePhase - High Performance LiquidChromatography*) (Shimadzu Co., Kyoto, Japan, Série LC-10VP) com coluna semi-preparativa (Vydac C₄214TP1010, 5 μ m, 10x250 mm, Hesperia, USA). Foi utilizado gradiente linear de 5% até 95% de acetonitrila com 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) em 120 minutos com fluxo em 2,5 mL/min.

As frações foram coletadas manualmente e recromatografadas em colunas analíticas (Vydac C₁₈ 218TP54, 5 μ m 4,6x250 mm, 300 Å, Hesperia, USA e/ou Source 5 RPC ST 4.6/150 GE Healthcare, Waukesha, WI). Os gradientes foram otimizados de acordo com o componente de interesse, com fluxo de 1 mL/min, usando como fases móveis água Milli-Q e acetonitrila, ambas com 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) (v/v). Todas as cromatografias foram monitoradas a 216 e 280 nm.

Após cada corrida cromatográfica, as amostras eram liofilizadas, utilizando concentrador a vácuo (Centrivap concentrator, Labconco, Kansas City, MO), e estocadas a temperatura de -20°C, para minimizar degradação.

Redução, Alquilação e digestão com endoproteinasas

As frações purificadas contendo proteínas com massa molecular maior que 6 kDa foram dissolvidas em tampão carbonato de amônio 100mM pH 8,0 e reduzidas após adição de 50mM de DTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a 70°C por 2 horas. Logo em seguida, 25 mM de iodoacetamida (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) foram acrescentados à solução e incubadas a 37°C por 1h.

A alquilação foi interrompida por resfriamento. As amostras então foram dessalinizadas e fracionadas por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna C₁₈ analítica (218TP54 Grace Vydac, USA) em gradiente de forma que o sal fosse eluído separadamente das amostras de interesse (gradiente linear de 5 a 95% de ACN em água, em 60 minutos, com 15 minutos a 5% ACN iniciais para eluição de sal). As frações também foram coletadas individualmente e liofilizadas, para posterior análise de massas por ESI e MALDI-TOF/MS. Para identificação dos diferentes níveis de alquilação, foi utilizado a massa do grupamento carbamidometil (57 Da) que se liga ao grupo tiol de cada cisteína. A diferença entre a massa nativa e a massa alquilada deve então ser múltipla de 57, e o número de cisteínas alquiladas corresponde a essa diferença dividido por 57. Foi empregada a fórmula abaixo para estimar o número de cisteínas alquiladas:

$$N^{\circ}Calq = \frac{Malq - Mnat}{57,1}$$

Onde:

N^oCalq: número de resíduos de cisteína alquiladas

Malq: massa molecular da proteína reduzida e alquilada

Mnat: massa molecular da amostra nativa

57,1: massa molecular em Daltons correspondente a carbamidometilação com iodoacetamida.

As frações com maior número de cisteínas alquiladas foram utilizadas para a etapa de digestão.

Para digestão das proteínas foram utilizadas duas enzimas: Glu-C (immobilized-V-8, Pierce Biotechnology-Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA) e tripsina (Immobilized TPCK, Pierce Biotechnology-Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA). As clivagens enzimáticas foram executadas de acordo com as recomendações do fabricante em tampão bicarbonato de amônio 100 mM pH 7,8, para clivagem específica em ácido Glutâmico (GLU-C) e tampão 0,1M NH_4HCO_3 em pH 8,0, para digestão em Lisina e Arginina (tripsina). Para verificação do progresso do processo de digestão, a cada hora de andamento, uma alíquota de 1 μL foi misturada a matriz α -ciano-4-hidroxicinâmico e analisado por MALDI-TOF/MS.

Após a clivagem, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante separado e aplicado em coluna analítica C_{18} (218TP54 Grace Vydac, USA) para fracionamento por cromatografia líquida de alta eficiência. Foi utilizado gradiente linear de 5 a 95% de acetonitrila com TFA 0,1%, monitoradas a 216 e 280 nm. Cada fração foi coletada separadamente e manualmente, congelada em Nitrogênio líquido e liofilizadas. As frações coletadas foram dissolvidas em 30 μL de água Milli-Q, donde 1 μL foi retirado e misturado com as matrizes α -ciano-4-hidroxicinâmico (α -ciano) ou 1,5-diaminonaftaleno(DAN), para análise por fragmentação nos métodos LIFT (*Laser Induced Fragmentation Technique*) ou ISD (*In Source Decay*), respectivamente, para análise, como descrito abaixo.

Espectrometria de Massa e Sequenciamento *de novo*

Alíquotas de cada fração cromatográfica foram diluídas em água Milli-Q, donde 1 μL foi adicionado na proporção de 1:3 de solução saturada das matrizes α -ciano-4-hidroxicinâmico (α -ciano) ou 1,5-diaminonaftaleno (DAN) em acetonitrila 50% e TFA 0,3% e aplicadas em placa de MALDI-TOF/TOF. Após cristalizadas à temperatura ambiente foram analisadas em modo MS (α -ciano) e por fragmentação nos métodos LIFT (*Laser Induced Fragmentation Technique*) com α -ciano ou ISD (*In Source Decay*) com DAN.

Os dados obtidos por espectrometria de massa (MS e MS/MS) foram gerados no equipamento MALDI-TOF/TOF (Ultraflex III, BrukerDaltonics) com laser SmartBeamTM, controlado pelo software FlexControl 3.0. Os espectros foram adquiridos nos modos MS linear ou refletido, MS/MS (LIFT) ou ISD, utilizando como calibrantes uma mistura de proteínas (Bruker Daltonics, USA) contendo: insulina, ubiquitina, citocromo C, mioglobina, citocromo C $[M+2H]^+$ e mioglobina $[M+2H]^+$ no modo linear. Já a calibração no modo refletido foi realizada com calibrante Bruker contendo bradicinina, angiotensinas I e II, substância P, bombesina, substrato renina, ACTH (1-17) e insulina. Para o modo ISD o calibrante utilizado foi BSA (*bovine serum albumin*) e seus fragmentos.

Os espectros de massa foram adquiridos em séries de 200 disparos de laser até que fosse obtido um espectro passível de ser analisado, a uma frequência de 100 Hz e detecção de massa nas faixas de 700 a 4000 Da e 4000-31000 Da para os modos refletido e linear, respectivamente.

Para fragmentação de peptídeos foi utilizado o modo MS/MS, utilizando o método de LIFT com aceleração de 19kV. Neste método, o íon parental foi selecionado por PCIS (*Precursor Ion Selector*), para posteriormente atravessar a unidade de LIFT onde foi fragmentado e em seguida tendo a massa parental suprimida por PLMS (*post lift metastable suppressor*). Desta maneira foram gerados espectros nos quais a massa precursora é isolada e adicionada ao espectro graficamente e os fragmentos são gerados somente a partir da molécula precursora. Os espectros foram processados utilizando o

software FlexAnalysis 3.3, por meio do qual também foi executado o seqüenciamento *de novo*, auxiliado pelo software PepSeq (MassLynx, Waters).

Seqüenciamento por Degradação de Edman

Para seqüenciamento da porção N-terminal de proteínas purificadas do veneno de *M. frontalis*, foi utilizado o seqüenciador automático de proteínas e peptídeos PPSQ-23 (Shimadzu Co., Japão). Para identificação da estrutura primária as toxinas foram primeiramente reduzidas e alquiladas.

A massa molecular dos peptídeos foi determinada por espectrometria de massa do tipo electrospray (HCT Ultra ETD, BrukerDaltonics). Após identificação da massa, as amostras foram seqüenciadas seguindo as instruções do fabricante.

Análise da seqüência

A seqüência de aminoácidos das proteínas e peptídeos foram comparadas com seqüências disponíveis em bancos de dados por meio do programa FASTA 3 no ExPasy Molecular Server (<http://www.expasy.org/>) e pelo programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?Jform=1>). O alinhamento das seqüências foi realizado pela ferramenta de múltiplos alinhamentos Clustal W pelo site <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> e pelo programa Bioedit.

Síntese de peptídeos

Os peptídeos apresentados na Tabela 2 foram sintetizados manualmente pelo método de síntese em fase sólida. A resina Fmoc-Pro-Wang (100-200 mesh, 1% DVB, peptides International) foi usada como suporte para a síntese e dois grupos

protetores de cadeias laterais foram utilizados a depender do aminoácido a ser acoplado: tBu para Thr, Ser e Tyr e Boc para Trp. Para as etapas de remoção do grupo Fmoc foram empregadas soluções de 4-metilpiperidina em DMF (20% em volume), sob agitação de 15 minutos. Após desproteção, foi utilizando TBTU (ativador), dimetilformamida (DMF) e DIPEA (Ethildiisopropilamina) para acoplamento de cada aminoácido. Os peptídeos foram clivados da resina e seus protetores de cadeias laterais removidos com TFA, TIS (triisopropilsilano) e água Milli-Q (95:2,5:2,5; v:v:v).

Tabela 2. Heptapeptídeos sintetizados com respectivas massas monoisotópicas.

Nome	Sequência	[M+H] ⁺
Elapidorphin-F	H-FGGSGTP-COOH	622.25
Elapidorphin-Y	H-YGGSGTP-COOH	638.26
Elapidorphin-W	H-WGGSGTP-COOH	661.26

Para avaliação da eficiência de cada etapa de acoplamento das sínteses foi utilizado o teste de Kaiser. Neste teste foram adicionadas soluções de 1)piridina em KCN → 2)fenol em etanol → 3)ninhidrina em piridina, nas proporções 1:2:1 (Troll e Cannan, 1953) à resina testada. Nos casos de acoplamentos bem sucedidos, a solução se tornou amarelada ou avermelhada, indicando que não existiam amins livres para reagir com a solução de ninhidrina. Quando o resultado da reação foi negativo a solução adotou coloração azulada, por existirem amins livres, indicando que o acoplamento da reação não foi eficiente.

Cada peptídeo sintetizado e clivado teve as massas de seus componentes determinada para conferência prévia à purificação por meio de HPLC com coluna semipreparativa C₁₈. A homogeneidade de cada fração foi também comprovada por análise em espectrometro de massa do tipo ion trap HCT Ultra ETD (Bruker Daltonics), com o qual também foram fragmentados e sequenciados por sequenciamento *de novo*.

Construção de modelos e simulação de dinâmica molecular

As coordenadas atômicas da sequência da PLA₂ (31)YGGSGTP(37) de *Bungarus caeruleus* (pdb code: 1U4J) (Singh et al, 2005) foram usadas como modelo para construção. Essa estrutura foi cortada usando o software Pymol v 0.99 (DeLano et al, 2002) e a sequência modificada trocando os resíduos necessários para obter os modelos YGGSGTP, FGGSGTP, WGGSGTP, SGGSGTP, I/LGGSGTP, YGGFM; YGGFMRF e FGGFTGAR. As simulações de dinâmica molecular foram desenvolvidas utilizando o software GROMACS v. 4.5 (Van Der Spoel et al, 2005). Todas as simulações foram efetuadas pelos seguintes procedimentos: primeiro, cada estrutura modelo foi posicionada em uma caixa cúbica de 4x4x4 e solvatadas com moléculas de água de carga de ponto simples utilizando Gromos96 como campo de força. A minimização de energia foi então executada com o algoritmo descendente mais íngreme até que a energia fosse menor do que $-1.0e+05$ kJ mol⁻¹. Segundo, uma corrida de MD (*Molecular dynamics*) curta com restrição de posição foi conduzida até que a energia potencial convergiu e estabilizou. A temperatura de Berendsen foi ligada, setando a temperatura para 300°K. Nenhum pareamento de pressão foi utilizado e o MD foi desenvolvido por 200 ps. Terceiro e último, uma corrida inteira de MD sem restrições foi efetuada por 500 ps. O pareamento da temperatura de Beredsen e pressão isotrópica foi utilizado, ajustando a temperatura para 300°K e pressão para 1.0 atm. As condições de ligação periódicas foi ajustada a coordenadas XYZ e a dinâmica de Langevin foi ligada. As simulações foram analisadas com ferramentas inclusas no pacote GROMACS, visualizadas e editadas utilizando o Pymol software. Os desvios da raiz quadrada média (RMSD) foram calculados usando g_rms. Todos os gráficos foram gerados utilizando o software de plotagem xmgrace (<http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/>).

Ensaio de Atividade Antinociceptiva

Animais

Para o teste de *tail flick* foram utilizados ratos Wistar machos pesando entre 220 e 250 g do biotério da Universidade de Brasília. Os animais eram mantidos em gaiolas de fundo plástico e tampas de metal, com ciclo claro/escuro de 12 horas controlado, água e alimento *ad libitum*. Os procedimentos de acomodação animal se mantiveram de acordo com a Sociedade Brasileira de ética em Neurociências e Comportamento, que concorda com os *guidelines for animal care* (EUA). Todos os procedimentos foram planejados para gerar os dados necessários minimizando o número e o sofrimento potencial dos animais.

Para o ensaio da formalina, foram utilizados camundongos machos pesando entre 25 a 30 g providenciados pela Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) (n= 6 por grupo experimental). Os camundongos foram mantidos em prateleiras ventiladas (©ALESCO) com temperatura (22 ± 2 °C) e umidade (60-80 %) controladas, com ciclo de 12h de claro e escuro, acesso a água e alimentação *ad libitum* até o momento da experimentação. Aclimatização de pelo menos uma hora foi permitida para todos os camundongos antes dos ensaios, que ocorreram sempre entre 8 e 14hs. Os animais foram usados somente uma vez e logo após término foram imediatamente submetidos à eutanásia por deslocamento cervical para minimizar desconfortos adicionais. Os procedimentos experimentais seguiram rigorosamente os preceitos do *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* do *National Institutes of Health* (NIH) quanto aos padrões de ética para experimentação em animais conscientes. Estes procedimentos foram desenvolvidos de acordo com os preceitos da lei 11.794 de 9 de outubro de 2008.

Ensaio do Tail-Flick

A cirurgia dos animais foi realizada de 5 a 7 dias antes das injeções intra cerebros ventriculares para acomodação da prótese no crânio, utilizada para inocular na posição intracerebro ventricular (i.c.v.), de maneira que isso não interfira significativamente nos resultados comportamentais. A cirurgia, injeção e medidas de latência foram executadas como descrito por Mortari *et al* (2007). Um analgesímetro de calor (Insight, Brasil) foi usado para medir a latência, que é o tempo em que o rato permanece com a cauda em contato com a fonte de calor. Os ratos responderam ao estímulo de aquecimento a uma taxa de 9 °C/s dobrando repentinamente suas caudas, desbloqueando o acesso de um feixe de luz à célula fotosensível. O intervalo entre o início do aquecimento e a retirada repentina da cauda foi mensurado até o tempo máximo de 7 segundos (63°C), temperatura acima da qual poderia causar dano tecidual à pele do rato. Essa latência foi medida e quantificada como média de três mensurações. Três medições foram feitas de 5 em 5 minutos antes do início da sessão experimental para o estabelecimento da linha de base. As medidas de antinocicepção foram tomadas aos 5, 10, 20, 30, 45, 60, 80, 100 e 120 minutos após recebimento da injeção icv do tratamento de cada grupo. Os grupos (n=6 por grupo) foram divididos em: grupo de controle negativo (salina), morfina (controle positivo a 6, 12 e 24 nmol) ou o peptídeo de sequência Tyr-Gly-Gly-Ser-Gly-Thr-Pro (Elapidorphin-Y) nas concentrações de 4, 8 e 16 nmol. As concentrações foram determinadas tendo por base a atividade da morfina, para produzir efeito antinociceptivo com intensidade dependente do tempo após injeção. Os resultados foram analisados com teste T (Teste t-Student não pareado; P<0,05 em todos os casos). Para análise, os tempos de latência (t) foram normalizadas pela criação do índice de antinocicepção utilizando a fórmula:

$$\text{Índice de Antinocicepção (AI)} = \frac{(t_{\text{medido}} - t_{\text{base}})}{(t_{\text{máx}} - t_{\text{base}})}$$

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média dos valores de AI e plotados por tempo em que foram medidos. A área abaixo da curva AIxtempo foi calculada e expressa com a unidade AUC.

Ao final dos experimentos os animais foram submetidos à eutanásia por overdose de tiopental sódico perfundido pelo ventrículo esquerdo com solução salina (0,9%, v:v) e depois com paraformaldeído (4% solução salina com tampão fosfato, pH 7,4 a 41°C). Após a perfusão, o corante azul toluidina foi injetado pela cânula cranial com o mesmo volume injetado nos grupos experimentais para marcação exata da posição da cânula. Cada cérebro foi imediatamente removido e colocado em solução de formaldeído (4% salina, pH 7,4) e mantido a 41°C por 24 horas, quando foram lavados com solução 10 a 20% de sacarose em salina (pH 7,3) a 41°C por 12hs cada. Cada porção de tecido foi embedida em *Tissue Tek Paraform* (Sakura, USA), congelada e cortada (40mm) em um criostato (HM 505 E, Microm, Zeiss).

Ensaio de formalina

Os camundongos foram colocados individualmente em compartimentos de vidro transparente (cúbico de 30 cm de aresta) e aclimatizados por pelo menos 20 minutos antes do experimento. Os peptídeos utilizados para tratamento eram aplicados pela via s.c. 30 minutos antes da aplicação da formalina. Como estímulo nociceptivo os camundongos receberam injeção intraplantar s.c. de 20 μ l de formalina 2,5 % na pata posterior direita. Após injeção, os animais foram imediatamente devolvidos às câmaras de observação. O tempo em que cada animal passava lambendo ou mordendo a pata injetada foi contabilizado cumulativamente durante um período total de 30 min. Ao menos dois animais foram observados simultaneamente para cada sessão experimental. O tempo gasto em segundos para a resposta a estimulação química, foi registrado em dois períodos: 0-5 minutos (primeira fase ou fase neurogênica) e 15-30 min (segunda fase ou

fase inflamatória). Ao final dos experimentos os animais foram submetidos a eutanásia por overdose de tiopental sódico.

Análises estatísticas

Os resultados do teste de *tail flick* tiveram a normalidade avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados normalizados foram analisados usando ANOVA de medidas repetidas incluindo tempo e dose de tratamento como variáveis. Para detecção exata dos tempos e tratamentos com atividades significativas foi empregado o teste de Tukey. O programa “R para computação estatística” foi utilizado. As curvas apresentadas foram comparadas por regressão não linear com o teste F, considerando diferenças significativas quando $P < 0.05$ ou valor valor de F excedendo o valor de F crítico.

Os resultados do teste da formalina foram expressos como a média \pm erro padrão da média de 6 animais por grupo. As diferenças estatísticas entre os grupos foram avaliadas através de análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo teste de Dunnett. Valores de P menores que 0,05 ($P < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância.

Resultados

Separação das frações

O fracionamento do veneno de *Micrurus frontalis* (Figura 3) por meio de cromatografia líquida de alta eficiência com coluna semipreparativa C₄ revelou ao menos 28 frações. A eluição do maior número de componentes se deu entre 26 e 46 minutos. Neste intervalo, na análise por espectrometria de massa, foram detectados diversos íons moleculares de massa variando principalmente entre 5-8 e 12-15 kDa. As frações estudadas neste trabalho foram as de número 18 e 21.

Identificação das massas moleculares

Cada fração cromatográfica do intervalo de 30 a 40 minutos foi analisada utilizando-se espectrômetro de massa (MALDI-TOF Ultraflex III) no intuito de identificar os componentes moleculares presentes. Os espectros de massa médios das frações do veneno de *M. frontalis*, no intervalo de tempo de retenção de 30 a 40 minutos são o alvo de estudo (Tabela 3). As massas identificadas variaram entre 3.000 e 60.000 Da, sendo onde se concentram a maioria das moléculas na faixa de massa de 6 a 15 kDa (Tabela 3), correspondentes a neurotoxinas e fosfolipases.

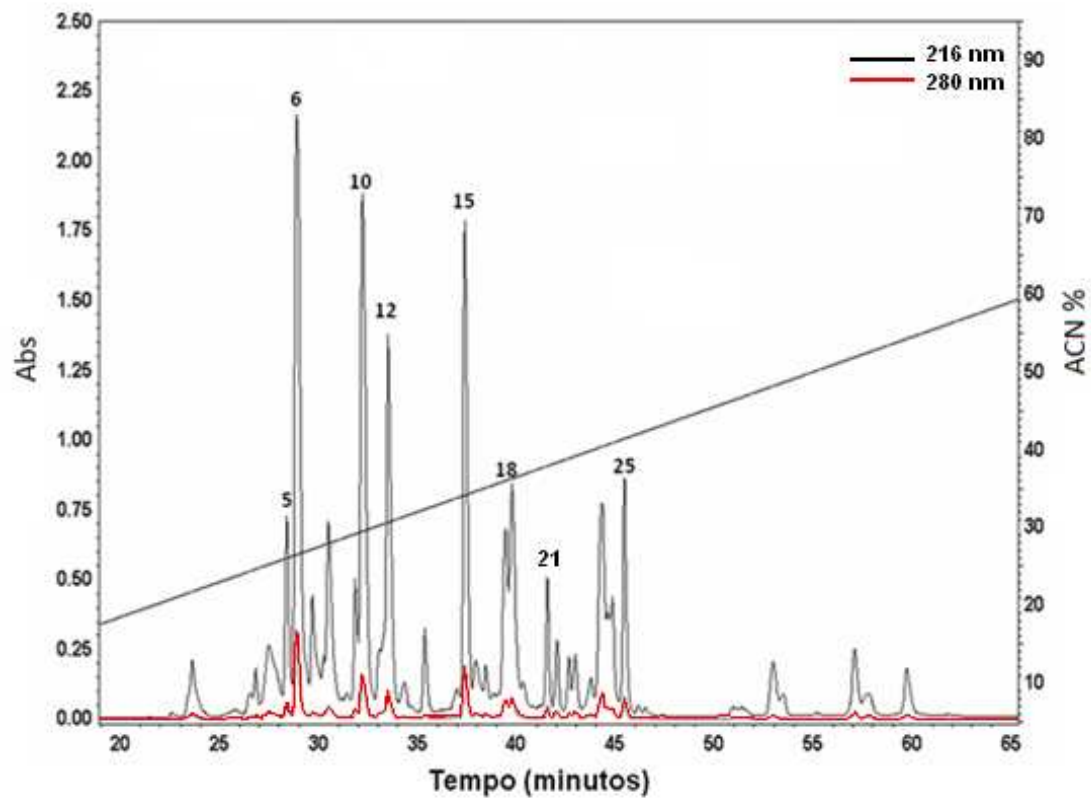


Figura 3. Fracionamento do veneno bruto de *M. frontalispor* meio de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa em coluna semipreparativa C_4 , fluxo 2,5 mL/min, sob gradientes linear de 5 a 95% de acetonitrila. A absorbância foi monitorada a 216 e 280 nm.

Tabela 3. Lista das massas moleculares presentes por tempo de retenção das frações do veneno da serpente *Micrurus frontalis* adquiridas por MALDI-TOF em modo de aquisição linear. As frações 18 e 21, onde se concentram a maioria das moléculas com massas moleculares próximos a 13 kDa são apresentadas. Massas moleculares sublinhadas indicam a ocorrência provável de duplas cargas.

Tempo de retenção (min)	[M + H] ⁺						
38,55(Fr18)	6552,53	<u>6723,51</u>	6794,96	7097,93	7163,60	7519,88	12887,88
	<u>13444,66</u>	18361,96	18732,91	19139,73	20231,01	20585,43	20987,60
	22266,47	25453,69	26954,76	29374,57	33212,18	40035,66	40423,99
	47607,25	54850,12					
40,20(Fr21)	<u>6553,56</u>	6653,95	6771,22	6843,32	7189,62	11135,40	11169,09
	<u>13103,35</u>	13305,00	13538,80	20554,89	22339,81	22761,02	24686,28
	25144,64	26658,04	27649,76	34647,72	44624,89	49232,67	
41,43	5325,74	7141,68	7286,85	17704,54	18281,54	19599,13	20749,68
	25312,75	25786,80					
42,34	5329,50	5345,44	6669,99	6742,73	13338,11	13483,10	18111,42
	18670,53	20007,61	24473,13	25168,03	26689,59	30861,81	32031,89
	32334,28	39596,47	40042,28	53406,27	54163,83		
42,90	5327,42	6641,68	6677,67	13279,58	13351,42	18101,40	18681,10
	19988,64	20871,05	22968,32	24613,10	25140,66	26660,81	30846,31
	39544,18	39879,63					
43,26	2107,96	2663,26	2882,88	4093,99	4446,95	4448,69	5327,18
	6152,10	6223,86	6673,15	6745,97	12301,03	12443,83	13344,23
	13489,41	17151,02	17630,37	18144,72	22969,73	24080,38	25192,15
	27931,27	37350,78	38508,30	39632,37			
43,62	5329,21	6675,57	6748,65	7954,59	13350,82	13495,91	15905,24
	17689,74	18888,54	19796,21	20047,23	21375,86	25205,92	25702,12
	26713,89	27984,04	29275,64	31034,48	34130,57	35043,27	36999,14
	37689,39						
45,03	6758,24	6871,07	13514,72	13741,52	18517,08	20194,02	20388,55
	25686,95	27174,11	29010,02	30231,42	33017,76	40400,38	40760,05
	43694,95	54267,24	55341,93				
45,39	6725,96	13450,83					

Fração 18 (MF18)

Esta fração que já havia sido analisada por MALDI-TOF (Ultraflex III, Bruker Daltonics) foi novamente analisada utilizando-se de espectrômetro de massa de resolução mais elevada NanoESI-SYNAPT HDMS (Waters Co.) para determinação de massas presentes (Figura 4), onde foi detectado que a fração contém diversas faixas de massas moleculares, e portanto ainda necessita de novos passos cromatográficos para melhor separação.

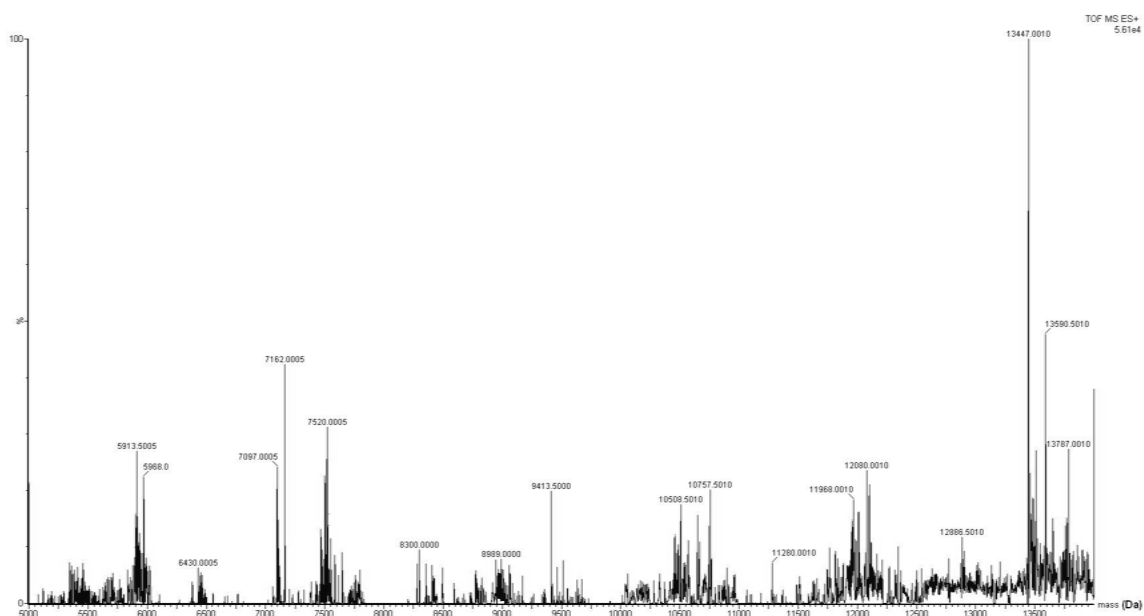


Figura 4. Espectro de massa da fração 18 após RP-HPLC em coluna semipreparativa C₄. São apresentadas massas moleculares nas faixas de 5, 7, 9, 10, 12 kDa, sendo o de maior intensidade o componente molecular de massa 13.447,00 Da. O espectro foi obtido por espectrômetro de massa do tipo NanoESI-SYNAPT HDMS e processado pela adição de sinais de cada envelope isotópico utilizando a função MaxEnt (MassLynx, Waters, USA).

As massas detectadas com maior intensidade na fração 18 foram 13.447,0 Da e 13.590,5 Da (Figura 4). Outros componentes menos intensos foram encontrados, de massa 7.093,9; 12.888,0 e 15.000,0 Da. Para que a caracterização da cada molécula fosse feita,

foi necessário remover todos os contaminantes. Deste modo, foi necessária realização de novos passos cromatográficos em coluna analítica.

No segundo passo cromatográfico, em coluna C₁₈ analítica, a fração 18 se subdividiu em 5 outras frações, dentre as quais a última e de maior absorvância (fração 5) é apresentada na Figura 5, encontrada no tempo de retenção igual a 22,1 min (33,2% ACN) que foi analisada em espectrômetro de massa ESI-SYNAPT obtendo os componentes mostrados na Figura 6. Confirmando e corrigindo o anteriormente obtido, o primeiro componente apresentou massa molecular de $13.446,36 \pm 0,01$ Da e o segundo, $13.591,38 \pm 0,00$ Da (Figura 6).

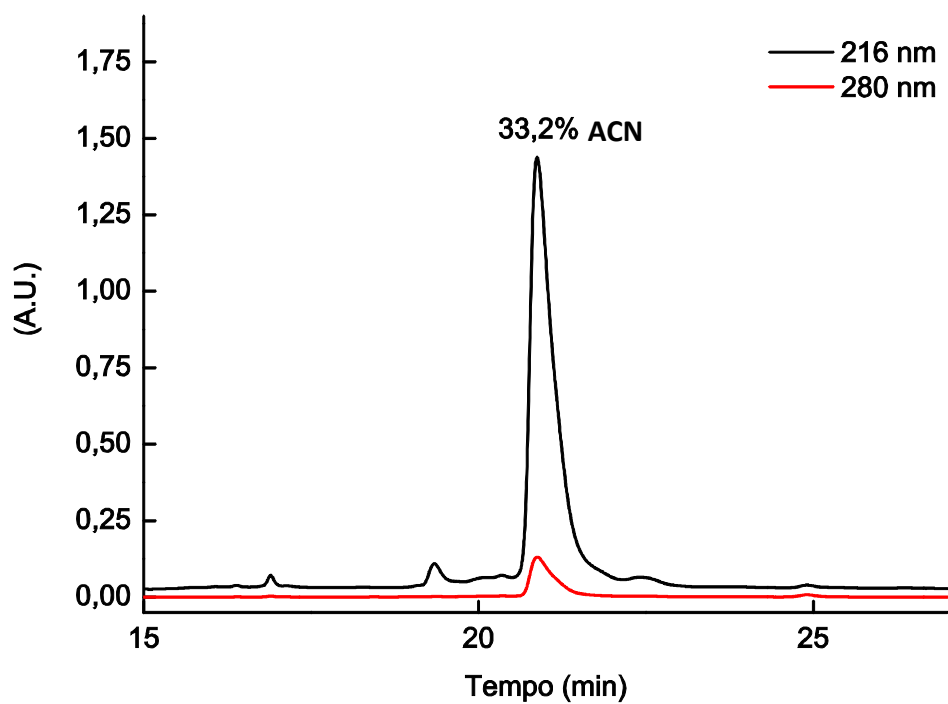


Figura 5. Separação da fração 18 do veneno de *M. frontalis*. A fração 18 foi purificada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência em coluna analítica de fase reversa do tipo C₁₈, com fluxo de 1mL/min. A absorbância foi monitorada a 216 e 280 nm. As frações de menor absorbância foram ocultadas, preservando a fração 5 de interesse (33,2%).

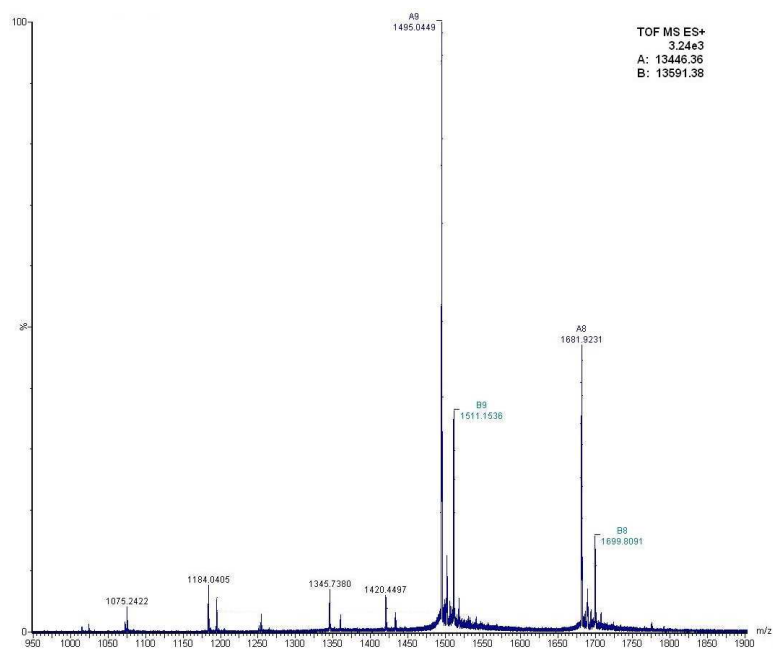


Figura 6. Espectro de massa por ESI-SYNAPT do componente 5 (33,2% ACN) do fracionamento por RP- HPLC em coluna C_{18} da fração 18 do veneno da serpente *M. frontalis*, revelando as massas moleculares $13.446,36 \pm 0,01$ e $13.591,38 \pm 0,00$ que foram identificadas.

A Figura 7 apresenta a distribuição isotópica em $[M+9H]^+$ do componente de massa monoisotópica $[M+H]^+ = 13.446,36 \pm 0,01$. Esta massa molecular é característica de fosfolipases. Essa proteína foi seqüenciada após redução, alquilação e digestão com as enzimas descritas anteriormente.

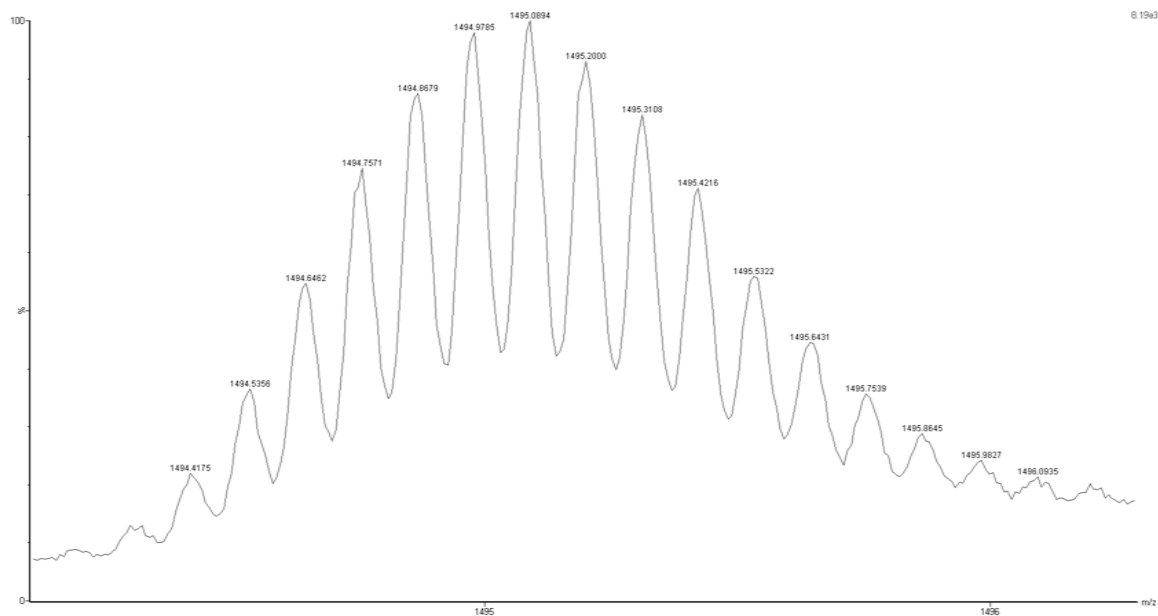


Figura 7. Espectro de massa obtido via NanoESI-SYNAPT HDMS do componente $[M+H]^+ = 13.446,36 \pm 0,01$ Da presente na fração 18 do veneno da serpente *M. frontalis*, purificado por RP-HPLC em coluna C_{18} , revelando envelope isotópico carregado com 9 cargas ($[M+9H]^+$).

Redução e Alquilação (fração 18)

A fração contendo a molécula de massa molecular $13.446,36 \pm 0,01$ Da (fração 5 da C_{18} analítica) foi submetida à redução com Dithiothreitol (DTT) e alquilação com Iodoacetamida. A remoção de sal e refractionamento para revelar os diferentes níveis de alquilação foi realizado por cromatografia de fase reversa com coluna C_{18} analítica. O resultado dessa corrida foram 10 frações, mostrado na Figura 8, onde as duas frações de maior absorvância são as de tempo de retenção 67,7 (fracão 6) e 68,8 (fracão 7), com concentração de ACN igual a 37,3 e 37,9%, respectivamente.

As 10 frações obtidas tiveram suas massas determinadas utilizando espectrômetro de massa MALDI-TOF, com o qual foram detectadas aquelas nas quais a alquilação ocorreu em maior número (Tabela 4). Pela diferença das massas nativa e alquilada se obteve o número total de 7 pontes dissulfeto presentes na molécula, devido às prováveis 14 cisteínas presentes em suas estruturas primárias.

A primeira adição de 11 tubos, cada um advindo de uma corridacromatográfica de fracionamento por coluna semipreparativa levou a uma recromatografia em coluna analítica com pequena diversidade de frações, porém a maioria das frações continha a proteína original alquilada, mesmo que em diferentes níveis (Figura 8 A). Na segunda adição de 15 tubos de mesma origem levou a um perfil de recromatografia após redução e alquilação totalmente diferente (Figura 8 B), no qual algumas frações possuíam massas não contidas na fração de origem (Figura 9, Tabela 4). Diversas massas moleculares detectadas nessas frações de cromatografia após redução e alquilação não correspondiam à múltiplas cargas das massas moleculares nativas, ou mesmo à formas alquiladas em diferentes níveis (Figura 9). Tal fato pode ser explicado pela presença de instabilidade da molécula que perdeu sua estrutura terciária após a redução, que levou a possibilidade de hidrólise, gerando fragmentos da proteína precursora. As PLA₂s são também conhecidas por gerarem agregados de proteínas (Magro et al, 2003), como dímeros. Então é possível

que, ao reduzir essa fração, tenham sido liberadas outras moléculas que estavam agregadas formando este complexo protéico.

As frações nas quais foi observado que a maior parte das cisteínas estavam alquiladas foram utilizadas para sequenciamento direto através de degradação de EDMAN ou digeridas com endoproteínases para sequenciamento *de novo*.

Após conferência da pureza de cada fração proveniente da alquilação, por meio das massas moleculares presentes (Figura 9), foram determinadas as frações com o maior nível de alquilação da proteína principal presente na fração Mf18, e esta teve sua massa exata determinada utilizando equipamento ESI SYNAPT (Figura 10).

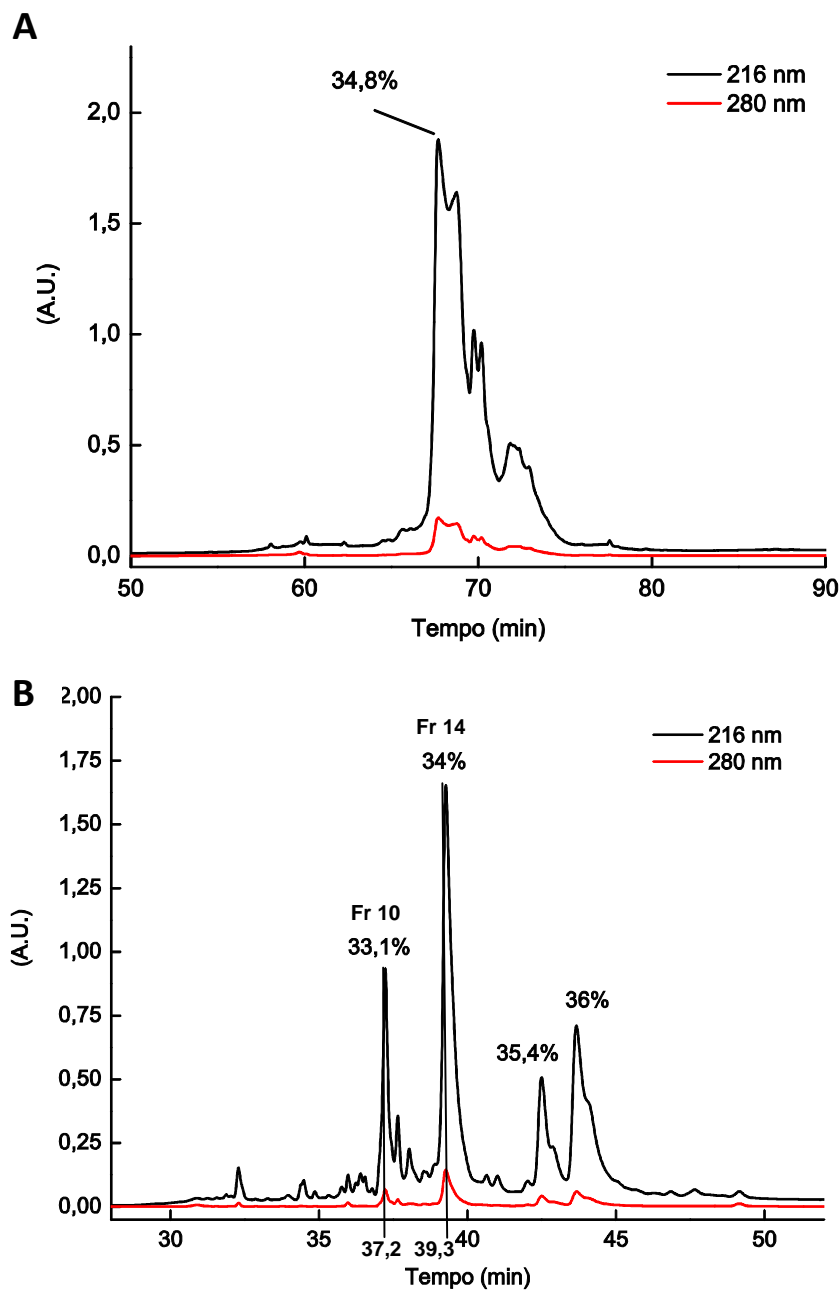


Figura 8. A: Perfil cromatográfico da separação da fração 5 após redução e alquilação por meio de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa em coluna analítica C_{18} , fluxo 1 mL/min, de MF18 com 11 corridas de semipreparativa do veneno de *M. frontalis* adicionadas. B: Perfil cromatográfico da separação da fração 4 após redução e alquilação por meio de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa em coluna analítica C_{18} , fluxo 1 mL/min, de MF18 com 15 corridas de semipreparativa do veneno de *M. frontalis* adicionadas. A absorbância foi monitorada a 216 e 280 nm e as concentrações de ACN de eluição são indicadas em cada fração.

Tabela 4. Principais frações eluídas de cromatografia líquida com coluna C₁₈ da fração 5 isolada, reduzida e alquilada, sendo a fração Mf18-11 proveniente da adição de 11 corridas cromatográficas e a Mf18-15 proveniente da adição de 15 corridas. n.c.: não calculado por se tratarem de moléculas distintas.

Fração MF18-11	Tempo de retenção	Massa média nativa	Massa média alquilada	Cisteínas alquiladas
6	67,7		14.263,0	14
7	68,8	13.446,36	14.260,0	14
8	70,1		14.202,0; 14.345,0	13
Fração MF18-15	Tempo de retenção	Massa média nativa	Massa média alquilada	Cisteínas alquiladas
7	34,5		6616,26	n.c.
8	36,0		5002,68; 5790,97	n.c.
9	36,5		4197,40	n.c.
10	37,2		9296,49; 8544,04	n.c.
11	37,7		7284,49	n.c.
12	38,0	13.446,36	5764,17; 7677,75; 11540,85	n.c.;
13	38,6		7933,58; 6490,85	n.c.
14	39,3		7107,37; 14213,32	13
15	40,7		7128,26; 14265,86	14
16	41,0		7153,32; 14262,54	14
17	42,5		7128,50; 14266,21	14
18	43,6		7100,41; 14210;533	13

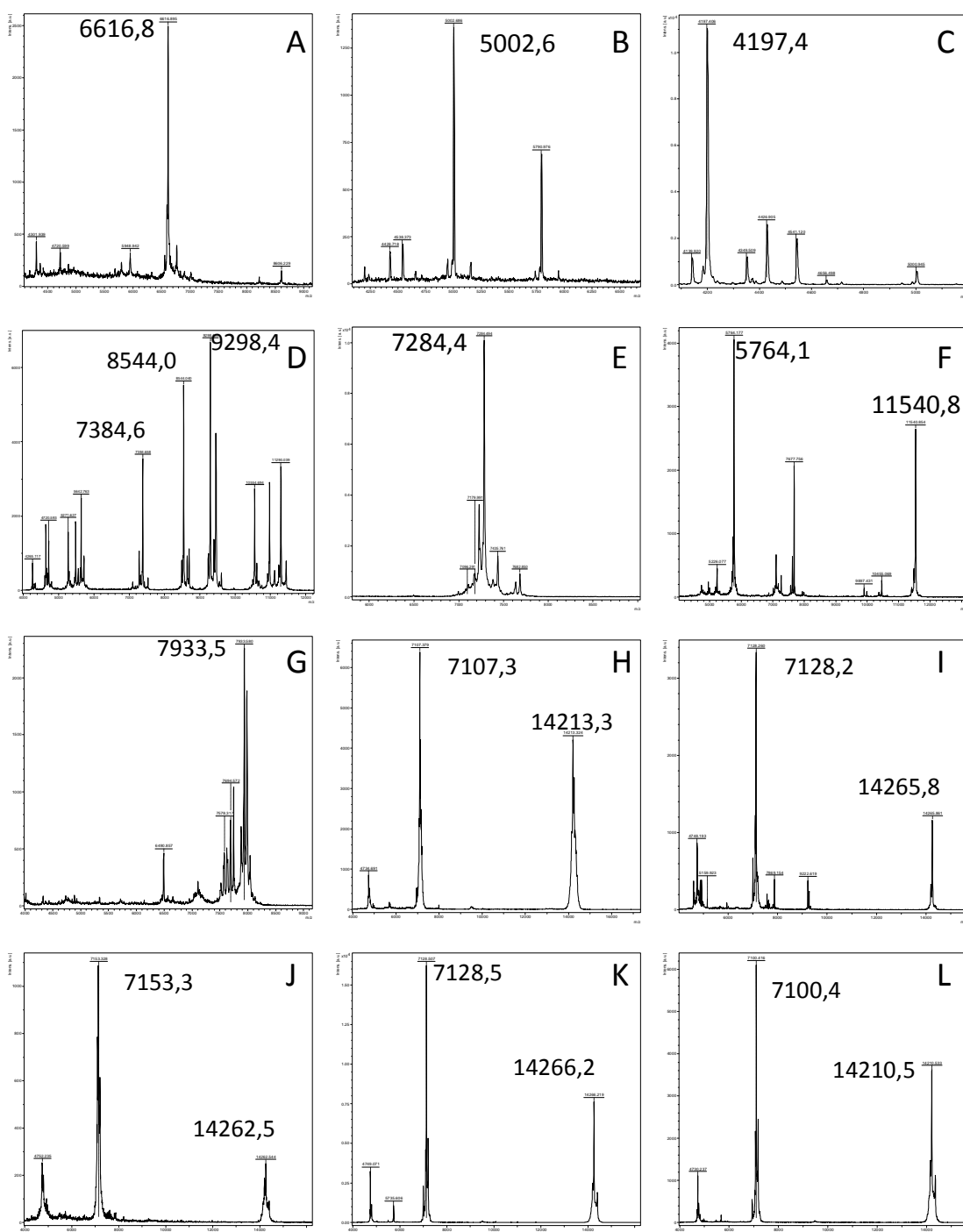


Figura 9. Espectros de massa das frações de cromatografia geradas após redução e alquilação da fração mais intensa da MF18. A: Fração 7, B: Fração 8, C: Fração 9, D: Fração 10, E: Fração 11, F: Fração 12, G: Fração 13, H: Fração 14, I: Fração 15, J: Fração 16, K: Fração 17 L: Fração 18.

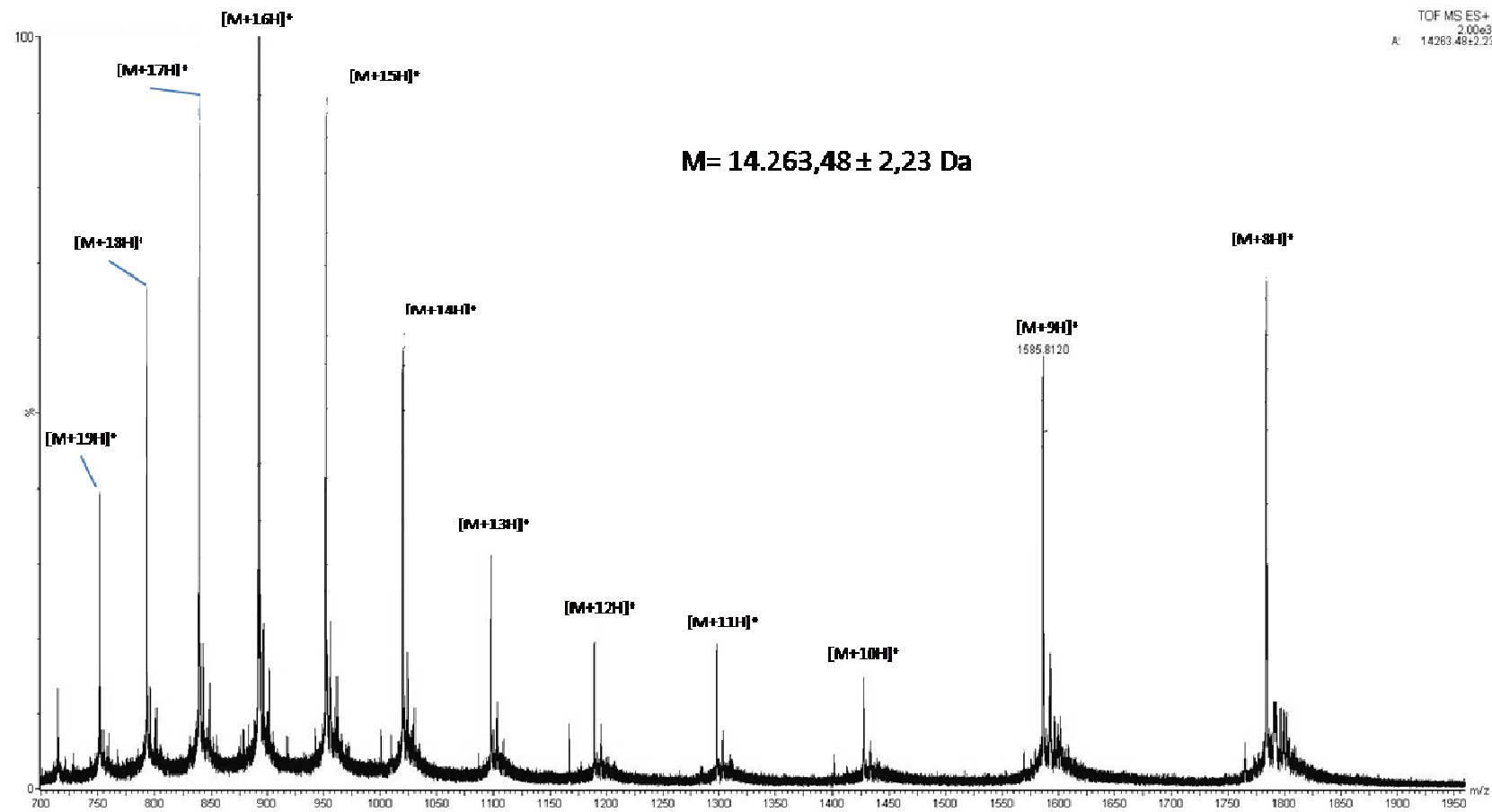


Figura 10. Espectro de massa obtido por ESI-SYNAPT deconvolvido do componente com maior número de alquilações mostrando sua massa exata de $14.263,48 \pm 2,23$ Da em suas formas de ionização com diversas cargas, de $[M+8H]^+$ a $[M+19H]^+$ sendo apresentadas. Os espectro mostra duas curvas gaussianas, que poderia sugerir mais de um componente. Porém após cálculo das massas moleculares dos envelopes isotópicos correspondentes a cada carga, foi verificado que alguns níveis de protonização ocorrem com maior frequência que outros.

Fração 21 (MF21)

Esta fração foi analisada através de espectrômetro de massa ESI-SYNAPT para visualização das massas dos componentes presentes (Figura 11).

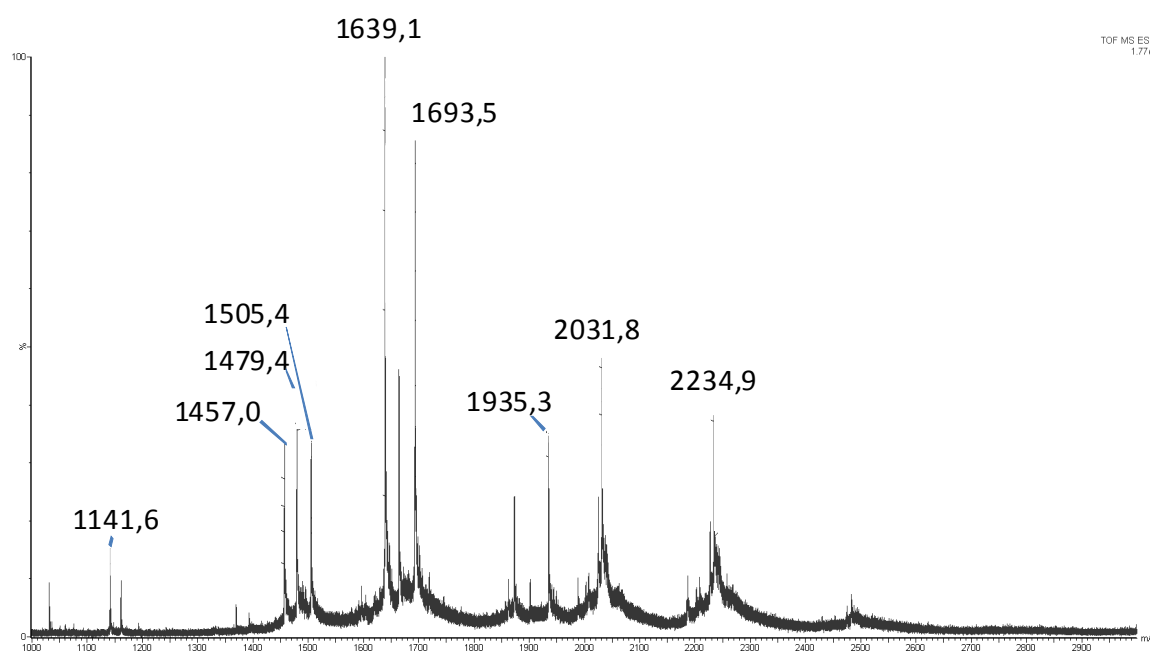


Figura 11. Espectro de massa da fração 21 da separação por coluna semipreparativa C₄, obtido por ESI-SYNAPT, mostrando a diversidade de massas moleculares presentes.

No segundo passo cromatográfico, em coluna C₁₈ analítica, a fração 21 foi recromatografada em 5 outras frações (Figura 12), dentre as quais a número 4, de tempo de retenção igual a 25,9 minutos (34,8% ACN) foi analisada por espectrometria de massa do tipo ESI-SYNAPT, obtendo os componentes mostrados na Figura 13.

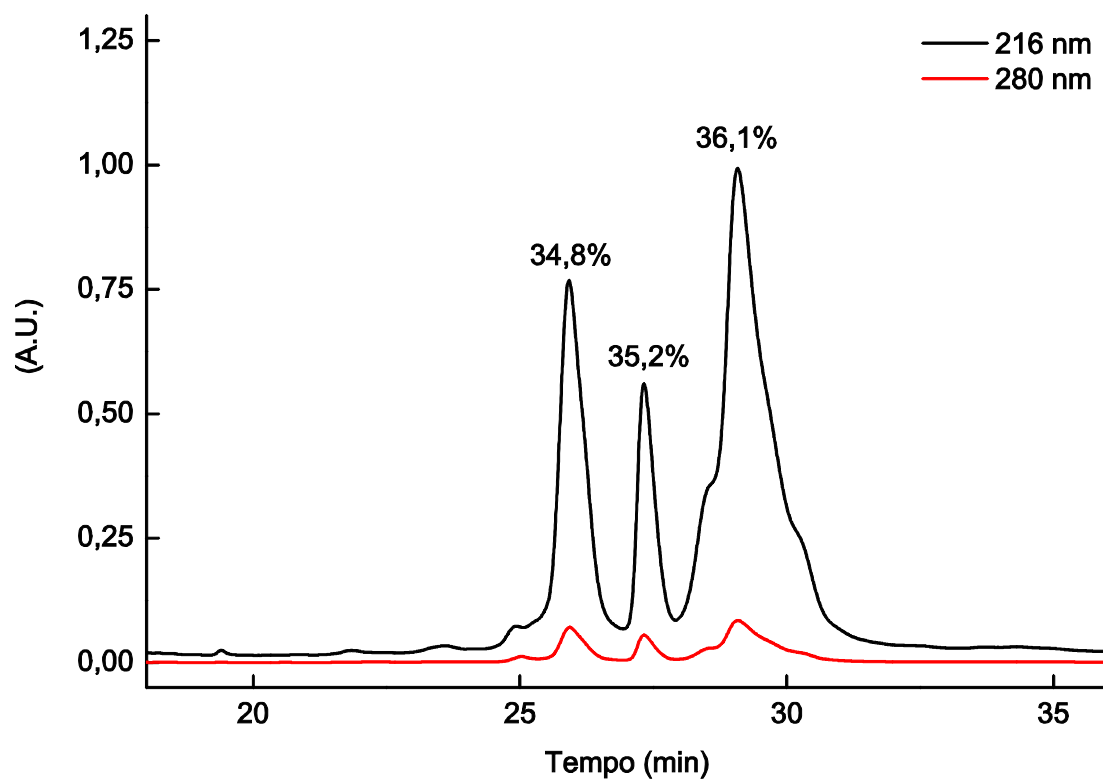


Figura 12. Fracionamento da fração 21 do veneno de *M. frontalis* por meio de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa em coluna analítica C_{18} , fluxo 1 mL/min, onde a absorbância foi monitorada a 216 e 280 nm. Os números acima de cada fração representam a concentração de ACN na qual foram eluídas.

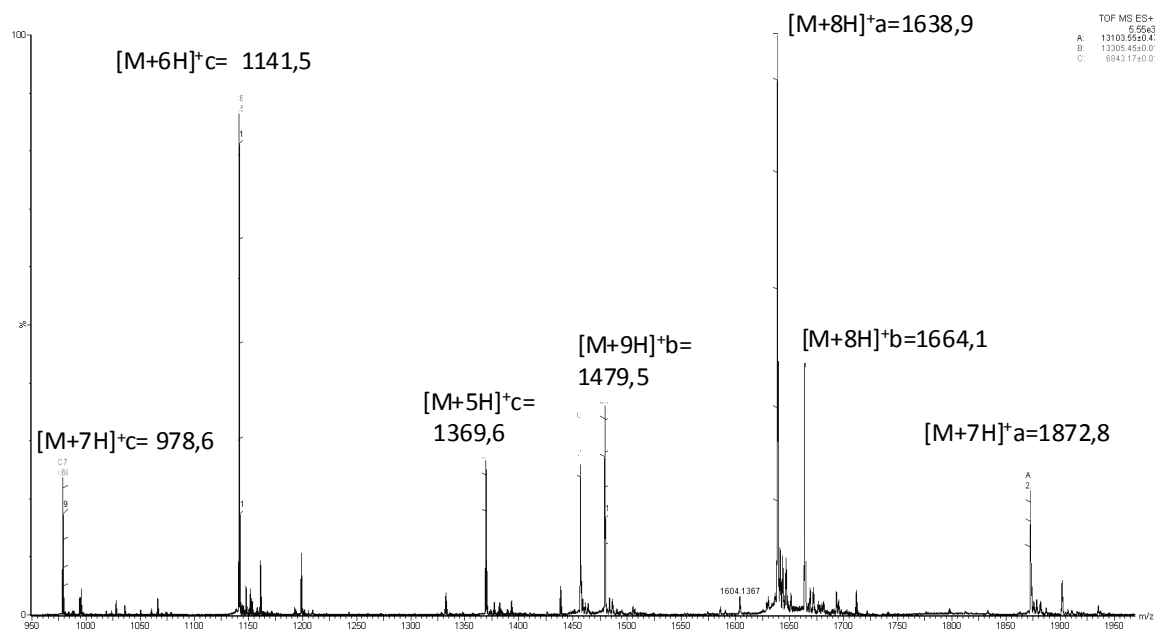


Figura 13. Espectro de massa obtido por ESI-SYNAPT deconvolvido do componente 5 (RT:25,9; 36,1% ACN) da fração 21 do veneno da serpente *M. frontalis*, revelando as massas moleculares dos 3 componentes principais detectados: a:13103.55±0.47; b:13305.45±0.01 ec:6843.17±0.01 Da, em suas formas multicarregadas.

Também na fração de tempo de retenção 25,9 min foi visualizada massa de 6.843,17±0,01 Da, que se encontra na faixa de massa de neurotoxinas. Esta foi então recromatografada para isolamento. A Figura 14 apresenta a distribuição monoisotópica em 8 ([M+8H]⁺) do componente de massa 13.103,55±0,47 Da, que é característica de fosfolipases.

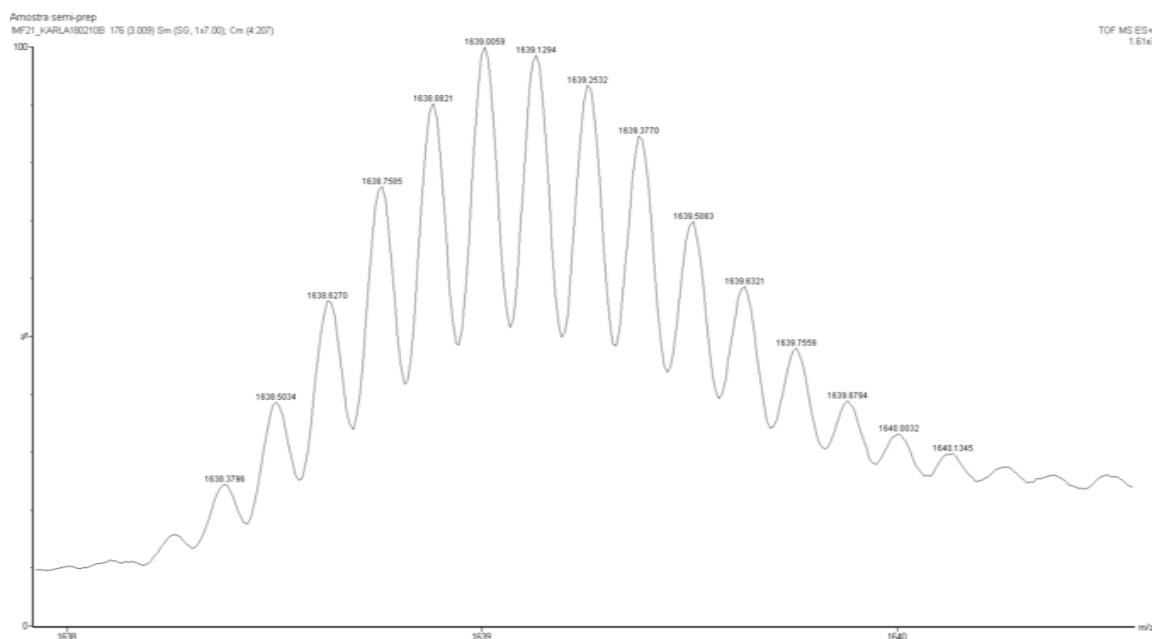


Figura 14. Espectro de massa obtido por ESI-SYNAPT do componente de massa $13,103.55 \pm 0.47$ Da da fração 21 do veneno da serpente *M. frontalis*, revelando distribuição isotópica das forma carregada com 8 cargas ($[M+8H]^+$).

Os três componentes detectados nessa fração (RT=25,9) foram visualizados quando esta foi recromatografada em coluna Source 5RPC, que nitidamente os separou com maior resolução (Figura 15 A). Dos componentes gerados, o segundo e o terceiro (Mf21_4j_2 e Mf21_4j_3) foram submetidos a redução e alquilação e novas purificações, mostradas na Figura 15 B e C. As frações de maior absorvância mostradas tiveram suas massas determinadas, para conferência da redução de todas as 14 cisteínas. Suas sequências foram parcialmente determinadas por fragmentação em MALDI-TOF MS/MS (Bruker Daltonics) em modo ISD.

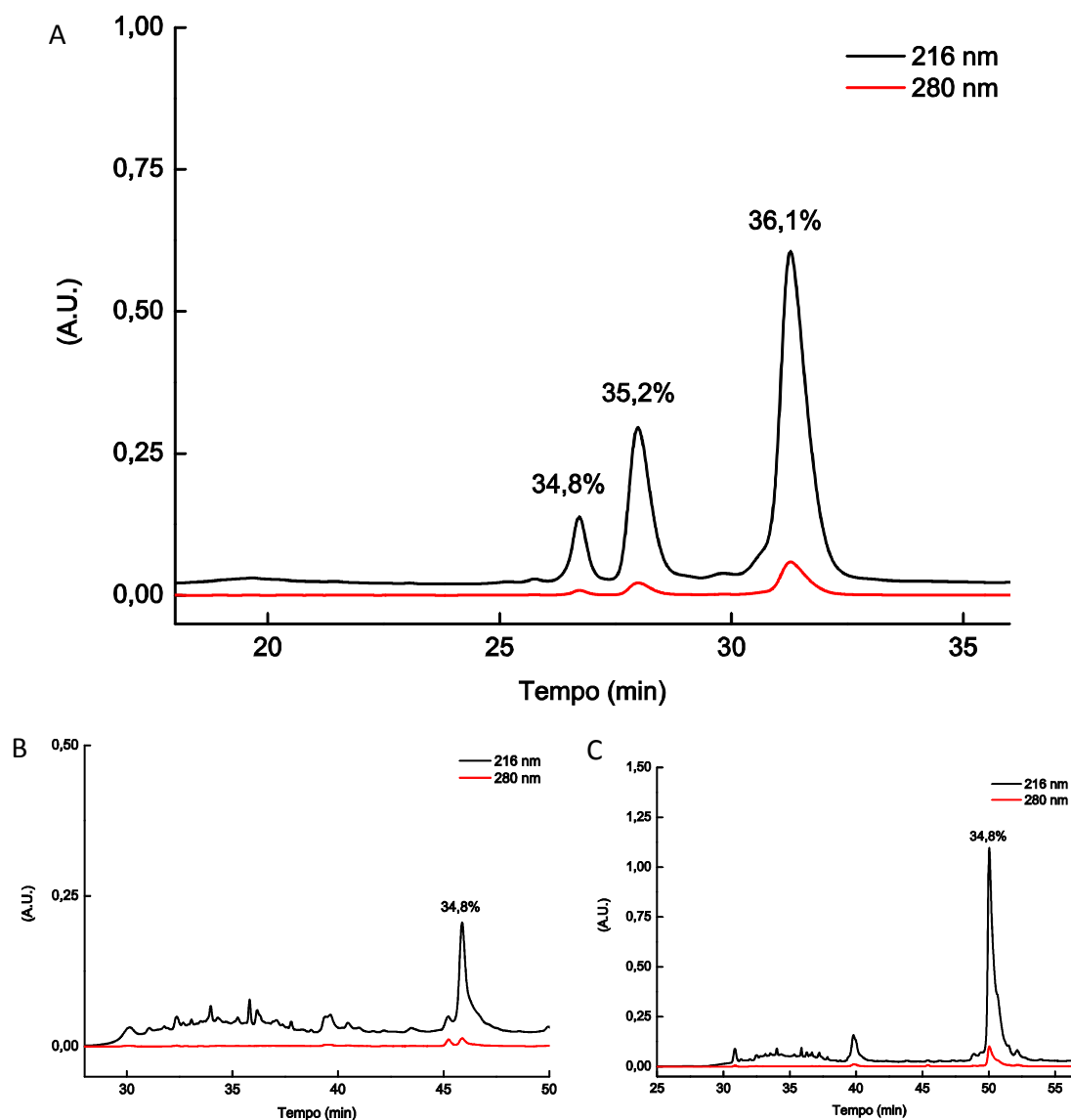


Figura 15.A: Separação da fração de tempo de retenção 25,9 da fração 21, do veneno de *M. frontalis* por meio de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa em coluna Source 5RPC, fluxo 1 mL/min, com gradiente otimizado para concentração de ACN de 30 a 40%. A absorbância foi monitorada a 216 e 280 nm. B: Purificação dos componentes de tempo de retenção 26,7 (35,2%, Mf21_4j_2) após redução e alquilação e C: Purificação dos componentes de tempo de retenção 31,3 (36,1%, Mf21_4j_3) após redução e alquilação.

O componente proveniente da cromatografia em coluna analítica da fração 21 de tempo de retenção 27,3 (35,2% ACN, Mf21_5j) também teve sua massa e purezas verificadas. Este componente foi também reduzido e alquilado. As alquilações de cisteínas foram confirmadas por espectrometria de massa (Figura 16).

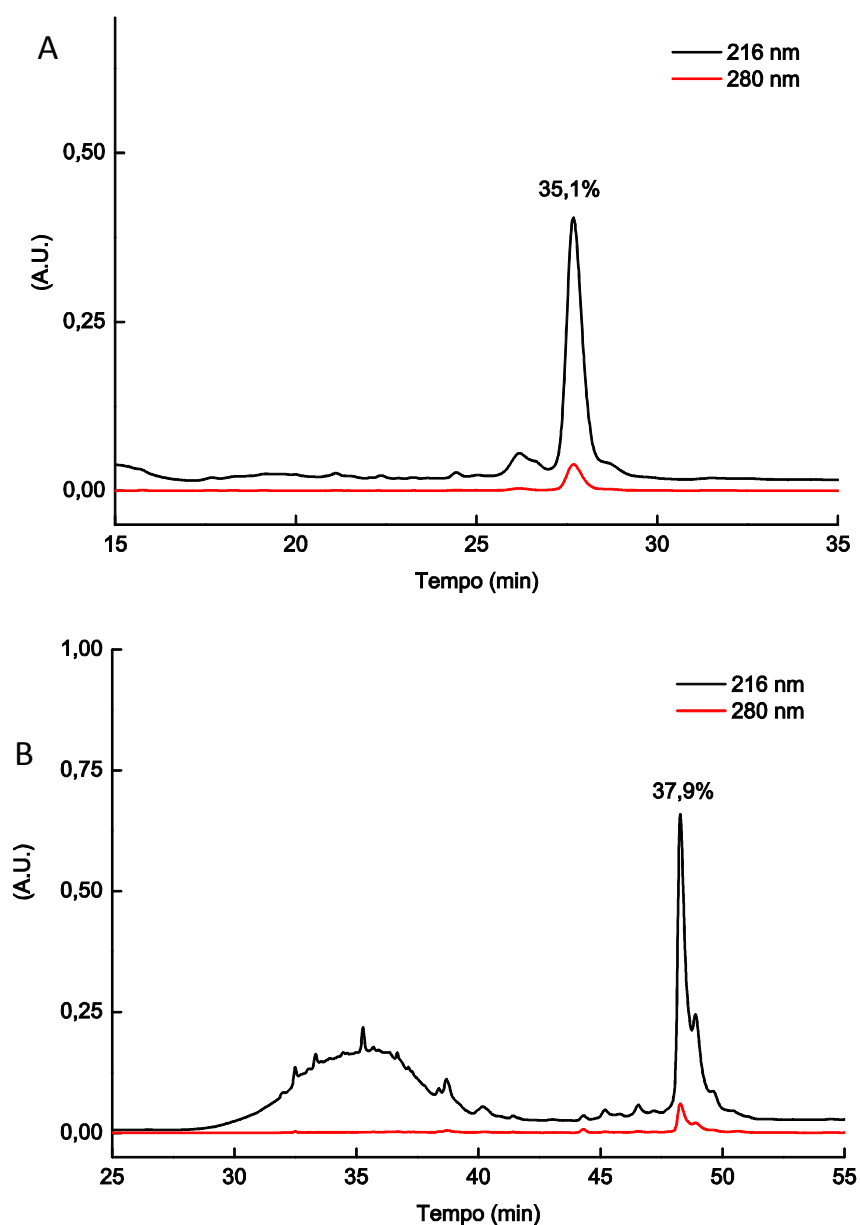


Figura 16.A: Separação da fração de tempo de retenção 27,3 da fração 21 (Mf21_5j), do veneno de *M. frontalis* por meio de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa em coluna Source 5RPC, fluxo 1 mL/min, B: purificação da mesma fração após redução e alquilação. A absorbância foi monitorada a 216 e 280 nm.

Determinação da estrutura primária das frações Mf18 e Mf21

Mf18

A linearização da fração Mf18 além de fornecer dados estruturais sobre o número de resíduos de cisteína, que permitem o enquadramento na classe das PLA₂s, também permitiu que esta pudesse ser analisada utilizando o sequenciador automático por degradação de Edman. Por esta técnica, chamada neste trabalho de sequenciamento direto, a sequência pôde ser determinada até o aminoácido de número 65a partir do N-terminal. A sequência encontrada por degradação de Edman foi levada para comparação em bancos de dados, e os alinhamentos mostraram que a Mf18 tem similaridade com PLA₂s presentes em serpentes da família Elapidae, o que permitiu a predição do restante da estrutura primária de modo a escolher a melhor enzima para clivagem.

A endoproteínase GLU-C e Tripsina foram utilizadas para hidrólise e posterior sequenciamento das demais porções da toxina. Com a utilização desta enzima foram gerados ao menos quatro fragmentos menores detectáveis, de massas moleculares entre 2000 e 5000 Da, passíveis de serem sequenciados por fragmentação na fonte do equipamento MALDI-TOF (In Source Decay-ISD)(Figura 17). Para fracionamento e então purificação de cada fragmento gerado foi então utilizado RP-HPLC com coluna C₁₈ (Figura 17). Foram obtidos 17 frações, das quais as mais intensas foram utilizadas para sequenciamento da estrutura primária (Tabela 5). As frações menos intensas podem ser produto da clivagem de porções que não foram alquiladas.

O sequenciamento dos fragmentos gerados pela clivagem em MALDI-TOF por método ISD utilizando a matriz DAN e por LIFT utilizando a matriz α -ciano ofereceu dificuldade pela presença de diferentes níveis de alquilação em cada fração cromatográfica(Figura 18A). A massa da diferença entre uma alquilação de cisteína é igual a 57, mesma massa da Gly, aminoácido presente com frequência nas PLAs. Por isso mais de uma estratégia metodológica foi utilizada para sequenciar a Mf18.

Os fragmentos de MS/MS e/ou enzimáticos foram sequenciados utilizando o software FlexAnalysis 3.0. Este tipo de seqüenciamento, além de confirmar partes da seqüência previamente obtida por degradação de Edman, permitiu a identificação de novas porções da toxina (Figura 18B, Figura 19, Figura 20 e Figura 21).

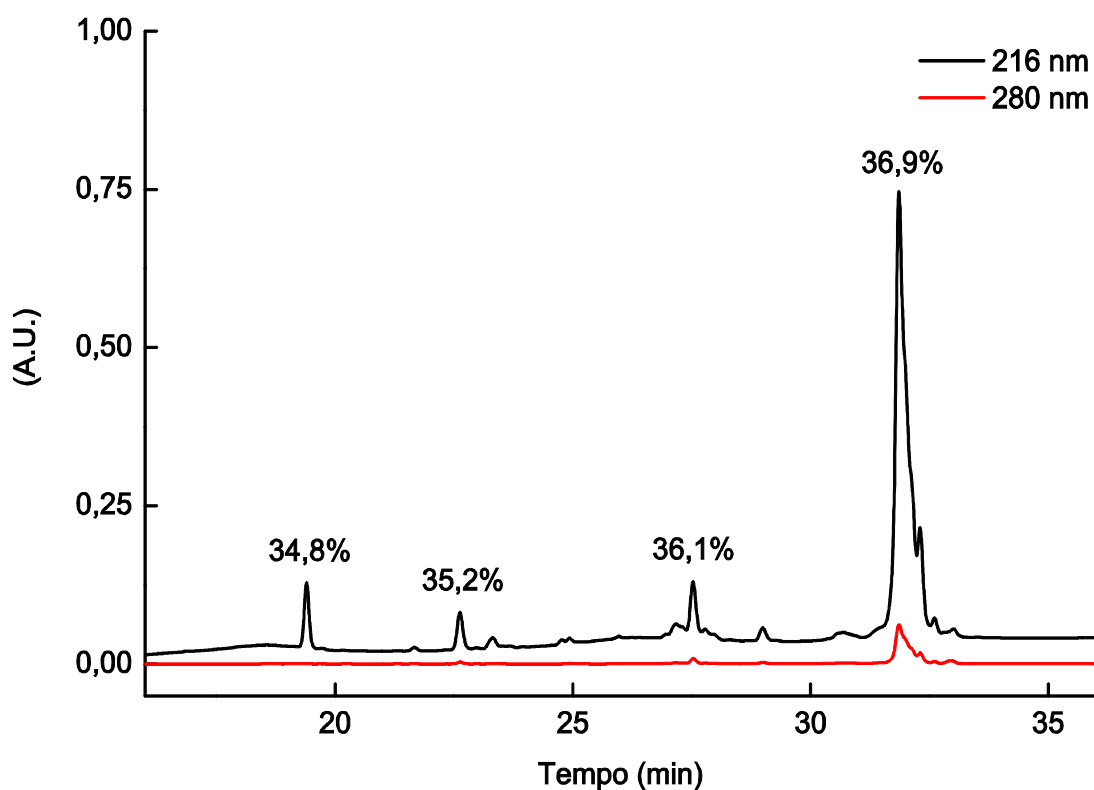


Figura 17. Perfil cromatográfico da separação da fração 5 (33,2% ACN) do MF18 do veneno de *M. frontalis* após redução, alquilação e digestão com a proteinase Glu-C por meio de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa em coluna analítica C₁₈, fluxo 1 mL/min, A absorbância foi monitorada a 216 e 280 nm. Os números acima dos picos correspondem à concentração de ACN em que eluíram.

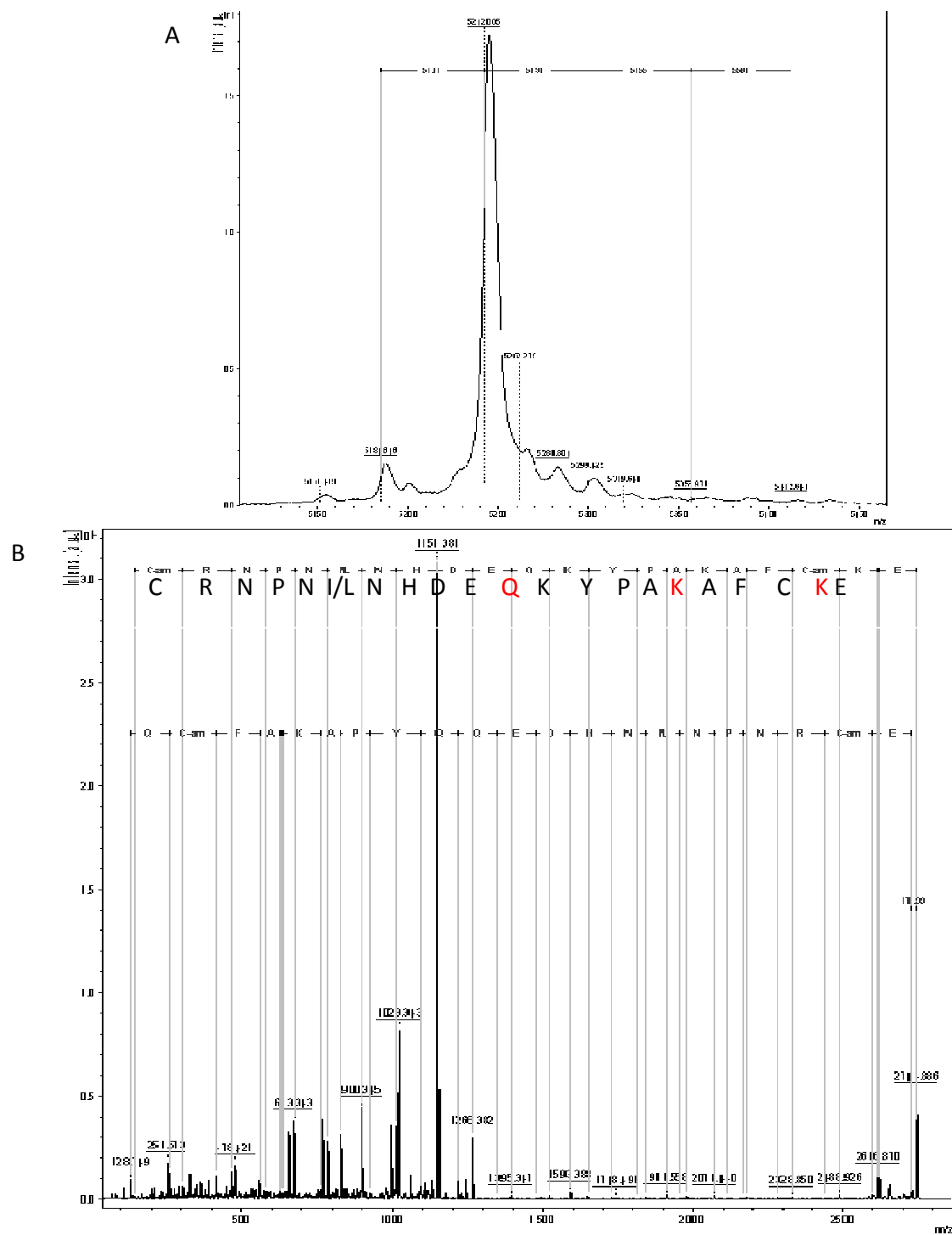


Figura 18.A: Espectro de massa molecular dos compostos presentes na fração 11 obtido em modo linear, com detalhe das diferenças de massa referentes ao grupamento carbamidometil, revelando ao menos 5 níveis distintos de alquilação nesta fração. **B:** Espectro de massa obtido no modo LIFT com matriz α -ciano e sequenciamento de novo do peptídeo de massa monoisotópica 2.744,87 Da presente na fração 5 da cromatografia de purificação de Mf18 digerida com GLUC. Os resíduos em vermelho necessitam de confirmação.

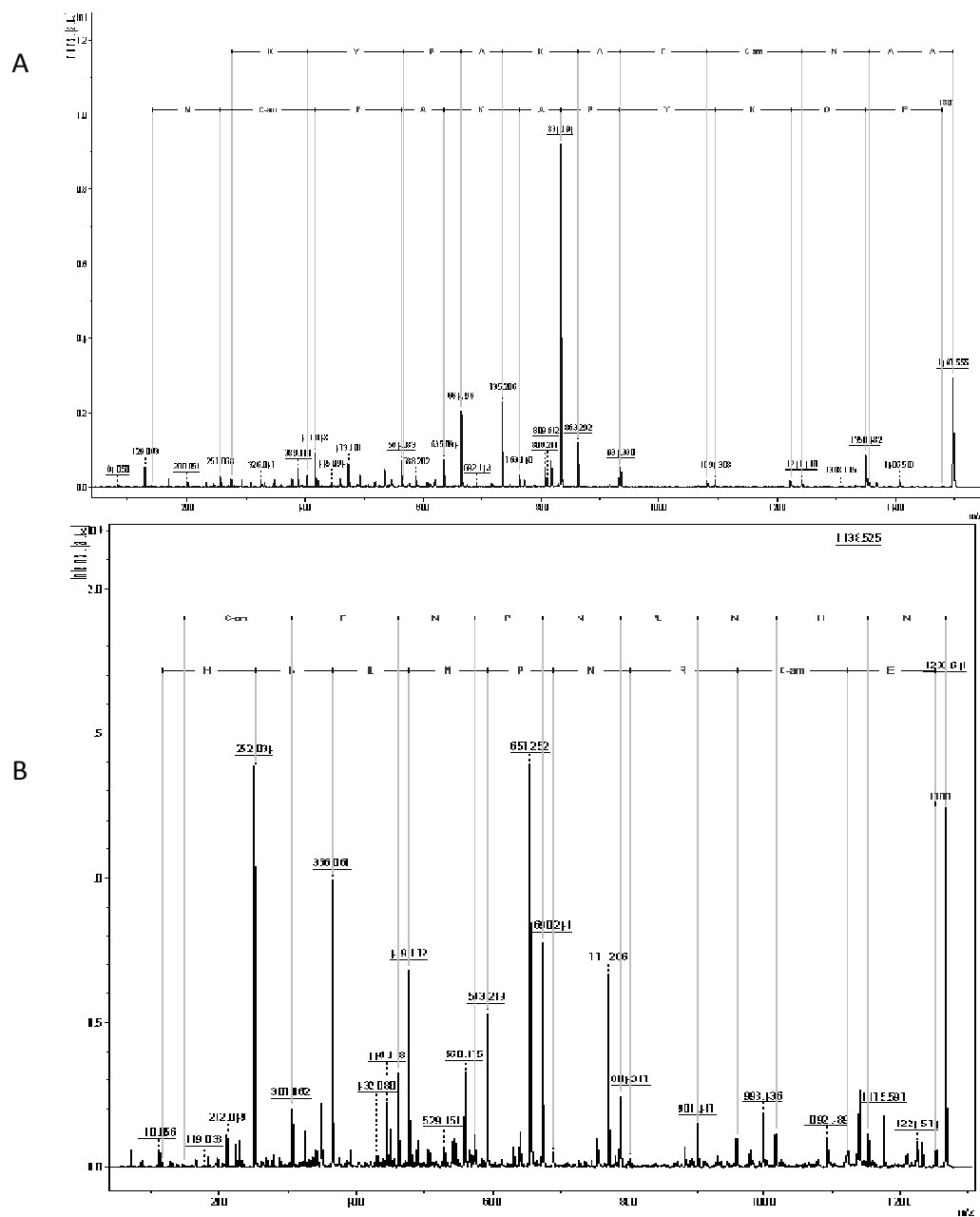


Figura 19. A: Espectro de massa MS/MS da fração 4 de massa 1.497,52 Da do fracionamento da proteína Mf18 digerida com GLUC utilizando a matriz α -ciano em modo LIFT. B: Espectro de massa da fração 2 de massa 1.266,47 Da do fracionamento da proteína Mf18 digerida com GLUC utilizando a matriz α -ciano em modo LIFT.

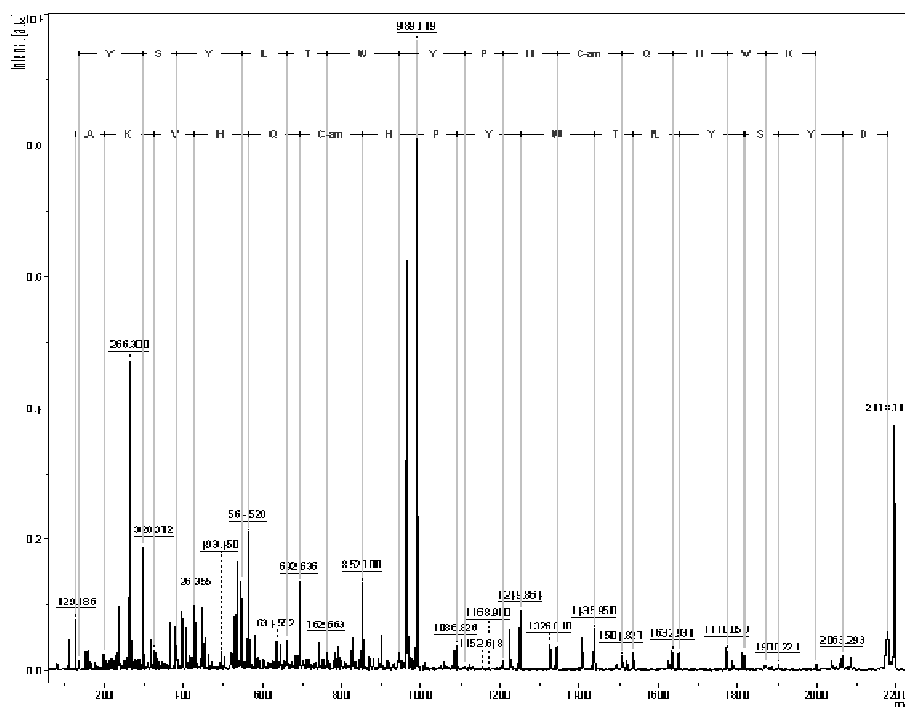


Figura 20. Espectro de massa da fração 11 de massa 2.196,47 Da oriundo do fracionamento da proteína Mf18 digerida com GLUC utilizando a matriz α -ciano em modo LIFT. A sequência obtida foi AKVHQHPYWTI/LYSYD.

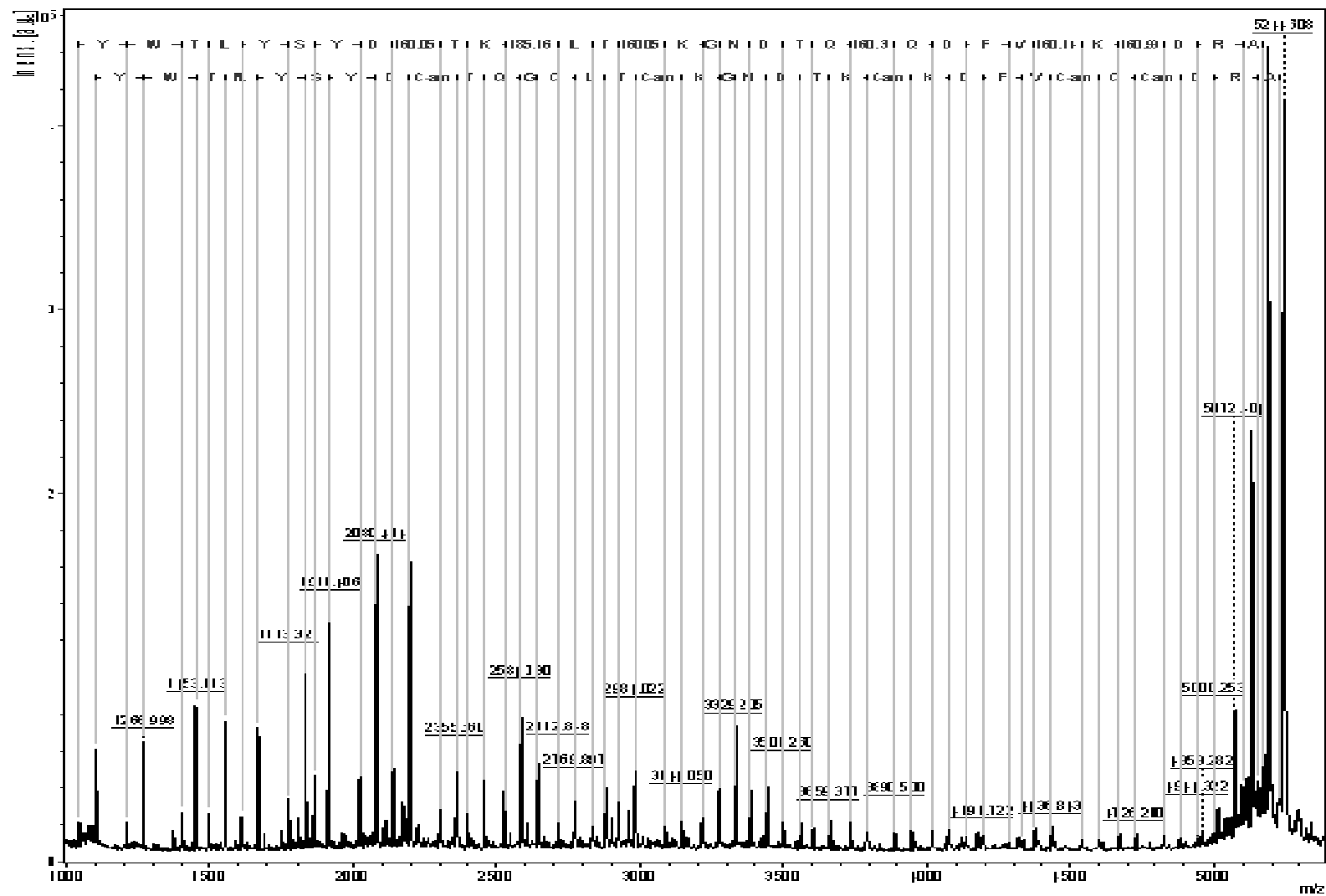


Figura 21. Espectro demassa da fração 11 utilizando a matriz DAN em modo ISD. A seqüência obtida corresponde à série c de íons. Outra seqüência utilizada para confirmação da mesma proteína com 57 Da de diferença, referente a uma alquilação a mais também é apresentada.

Tabela 5. Massa molecular e sequência dos fragmentos oriundos da proteólise da fração MF18 com enzima GLU-C. As sequências em azul foram obtidas por fragmentação por MS/MS utilizando matriz α -ciano dos fragmentos enzimáticos. As sequências em vermelho foram feitas utilizando matriz DAN e por fragmentação por ISD dos fragmentos enzimáticos.

Fração	Tempo de retenção	Massa detectada [M+H] ⁺	Sequência obtida
2	18,3	1266,47	DHNINPNRCE
4	21,0	1497,52	AANCFAPYKQE
11	25,5	2196,47	EAKVHQCHPYWTLYSYD
5	21,7	2744,87	EKCFAPYKQEDHNINPNRCE
11	25,5	5244,00	YWTLYSYDCTKGKLTCKGNLTKCKDFVCQCDRA
15	30,0	6306,74	NLYQFKNMIQCTNTRSWLDFADYGCYCGSGGSGKP VDQLDRCCQVHDNCYDE

A superposição das sequências dos diferentes fragmentos gerados após digestão enzimática, permitiu a identificação da estrutura primária contendo 117 resíduos de aminoácidos (Figura 22). A predição da localização de cada fragmento foi feita por homologia de sequências de PLA₂s de outras serpentes do gênero *Micrurus*. A estrutura primária nativa encontrada apresenta massa de 13.414,93 Da, e 14.213,23 Da após redução e alquilação com iodoacetamida. A diferença de massa entre o cálculo pela sequência obtida e a proteína nativa Mf18 (13.447,00 Da) é de aproximadamente 50 Da. Isso revela a necessidade de confirmar os aminoácidos da sequência inteira por digestão com outras enzimas, principalmente nos pontos de clivagem da enzima GLUC e suas vizinhanças, pela dificuldade de distinção se a origem do fragmento é de outro nível de alquilação ou da série de íons de interesse. Além disso, aminoácidos isobáricos como Leucina e Isoleucina necessitam outras formas de confirmação. Aminoácidos com massas próximas como Lisina, Ácido Glutâmico e Glutamina ainda necessitam de conferência utilizando técnicas com maior resolução. A sequência parcial obtida foi denominada Frontolipase.

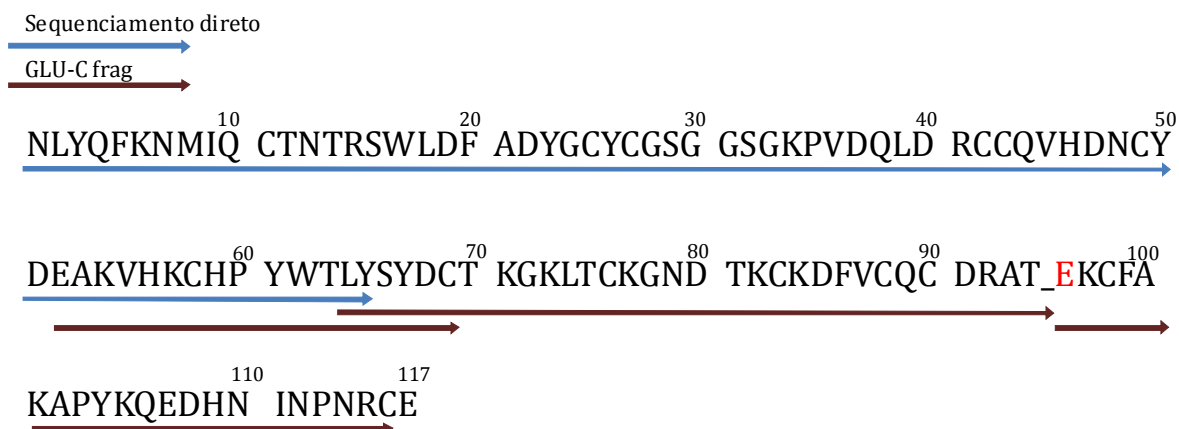


Figura 22. Estrutura primária parcial da PLA₂ purificada a partir da fração 18 do veneno bruto da serpente *M. frontalis*. As setas indicam os trechos da sequência que foram determinados por cada metodologia, ambas utilizando a toxina purificada, reduzida e alquilada. Sequenciamento direto foi designado quando a estrutura foi determinada por degradação de Edman, e GLU-C frag que foi determinada por sequenciamento de fragmentos por espectrometria de massa.

Mf21

Após a redução e alquilação a estrutura primária das subfrações purificadas de Mf21 foram sequenciadas por sequenciamento de novo. A fragmentação ocorreu no modo ISD com matriz do tipo DAN.

As sequências foram obtidas a partir da comparação entre os fragmentos gerados por MS/MS e o banco de dados de PLA₂s presentes nos venenos de outros elapídeos (Figura 23, Figura 24).

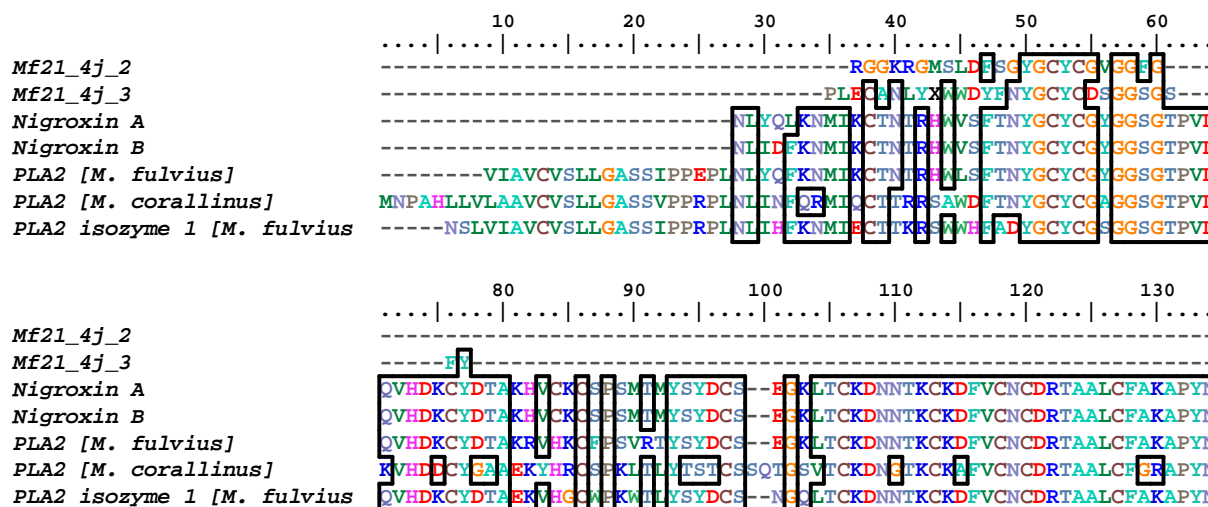


Figura 23. Alinhamento das estruturas primárias das PLA₂s presentes na fração Mf21. As 3 frações geradas pela purificação da subfração Mf21_4j em coluna Source foram reduzidas e alquiladas e então sequenciadas no modo ISD com matriz DAN. As sequências geradas foram alinhadas com a ferramenta ClustalW Multiple alignment, disponível no software Bioedit 7.0. Os espaçamentos foram introduzidos de forma a aumentar a similaridade das regiões mais conservadas como cisteínas.

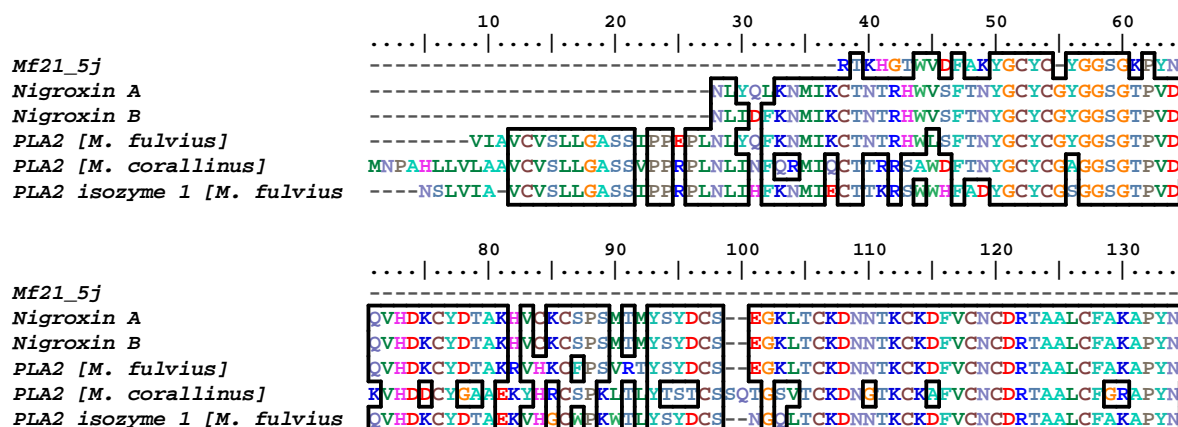


Figura 24. Alinhamento das estruturas primárias da PLA₂s presentes na fração Mf21. A fração gerada pela purificação da subfração Mf21_5j em coluna Source foi reduzida e alquilada e então sequenciada no modo ISD com matriz DAN. As sequências geradas foram alinhadas com a ferramenta ClustalW Multiple alignment, disponível no software Bioedit 7.0. Os espaçamentos foram introduzidos de forma a aumentar a similaridade das regiões mais conservadas como cisteínas.

Similaridade de sequências

A busca por sequências similares à estrutura primária da proteína Mf18 usando o software online BLAST resultou em 93% de similaridade com sequências de PLA₂ de outras serpentes da família Elapidae (Figura 25). A maior identidade registrada foi de 71% com uma PLA₂, cobrindo 99% da sequência de Mf 18 (Tsai et al., 2005). A segunda maior similaridade registrada também ocorreu com outra PLA₂isozyme 1 de *M. fulvius* (Tsai et al., 2005), sendo 70% idêntica, cobrindo também 99% da sequência. PLA₂s de outros elapídeos como *Naja*, *Bungarus*, *Notechis*, e outros elapídeos do velho mundo possuem identidade de 55 a 69%, sendo as *Micrurus corallinus* e outras *Micrurus* brasileiras as com identidade mais próxima de 71%.

Kini e Evans (1989) apresentaram um modelo para explicar as atividades com base na estrutura primária das PLA₂s. Utilizando este modelo e com a contribuição de Carredano *et al* (1998) foi possível estabelecer hipóteses sobre as possíveis atribuições para determinadas regiões na sequência da proteína encontrada em alinhamento com as homólogas encontradas (Figura 25).

Pela delimitação de cada um desses sítios, a região onde as sequências são mais conservadas é correspondente ao *loop* ligante de cálcio (entre os resíduos 25 e 37). Provavelmente por esta ser uma região funcional, manteve sua estrutura conservada na maioria das PLA₂s Classe I de Elapídeos. Dentro da região correspondente a esse loop, particularmente os aminoácidos entre 31 a 37 foram identificados por terem alta homologia com a porção N-terminal de peptídeos derivados de Encefalina. Uma análise mais minuciosa revelou que somente os resíduos de número 31 e 34 variam significativamente nesta pequena região. O N-terminal semelhante à Encefalina somente se diferencia pelo primeiro resíduo, que varia entre outros aminoácidos aromáticos (Figura 25).

	10	20	30	40	50	
<i>Mf18</i>	NLYQFKNMIQCTNT--RSWLD	FADYGCYCGSGGSGKPV	QLDRCCQVHDN	48		
<i>Micrurus fulvius</i>	NLYQFKNMIKCTNT--RHWLSFTN	YGCYCGYGGSGTPELDRCCQVHDK	48			
<i>Micrurus nigrocinctus</i>	NLYQLKNMIKCTNT--RHWVSFTN	YGCYCGYGGSGTPELDRCCQVHDK	48			
<i>Aspidelaps scutatus</i>	NLYQFKNMIQCTVTP-NRSWWHFAD	YGCFCGYGGSGTPELDRCCQTHDN	49			
<i>Naja oxiana</i>	NLYQFKNMIKCTVTP-SRSWLD	FADYGCYCGRGGSGTPELDRCCQIHDN	49			
<i>Naja kaouthia</i>	NLYQFKNMIQCTVTP-NRSWWD	FADYGCYCGRGGSGTPELDRCCQVHDN	49			
<i>Naja sagittifera</i>	NLYQFKNMIQCTVTP-SRSWQD	FADYGCYCGKGGSGTPELDRCCQVHDN	49			
<i>Bungarus fasciatus</i>	NLFQFKNMIQCAG--TRSWTDYVS	YGCYCGKGGSGTPELDRCCKVHDD	48			
<i>Naja atra</i>	NLYQFKNMIQCTVTP-SRSWWD	FADYGCYCGKGGSGTPELDRCCQVHDN	49			
<i>Naja sputatrix</i>	NLYQFKNMVQCTVTP-NRSWWD	FADYGCYCGRGGSGTPELDRCCQVHDN	49			
<i>Micrurus corallinus</i>	NLINFQRMICQCTTR--RSAWDFTN	YGCYCGAGGSGTPELDRCCKVHDD	48			
<i>Pseudechis porphyriacu</i>	NLYQFKNMIQCANKGSRSWLDYVN	YGCYCGWGGSGTPELDRCCQTHDN	50			
<i>Lapemis hardwickii</i>	NLYQFKNMIQCANHGSRMTLDYMD	YGCYCGTGGSGTPELDRCCKIHDD	50			
<i>Hemachatus haemachatus</i>	NLYQFKNMIKCTVTP-SRSWWHFAN	YGCYCGRGGSGTPELDRCCQTHDN	49			
<i>Naja mossambica</i>	NLYQFKNMIHCTVTP-SRPWWHFAD	YGCYCGRGGKGTAVDLDLDRCCQVHDN	49			
<i>Naja pallida</i>	NLYQFKNMIHCTVTP-SRPWWHFAD	YGCYCGRGGKGTAVDLDLDRCCQVHDN	49			
<i>Naja nigricollis</i>	NLYQFKNMIHCTVTP-SRPWWHFAD	YGCYCGRGGKGTAVDLDLDRCCQVHDN	49			
<i>Demansia vestigiata</i>	HLMQFANMITCANRNTRSWISYTN	YGCYCGSGGSGTPELDRCCQVHDD	50			
<i>Pseudechis australis</i>	NLIQFKSIIECANRGSRRWLDYAD	YGCYCGWGGSGTPELDRCCKVHDE	50			
<i>Ophiophagus hannah</i>	HLVQFNMIIRCTIPGSIPWWDYS	YGCYCGSGGSGTPELDRCCQVHDN	50			
<i>Bungarus flaviceps</i>	NLIQFSSLIQCANGGSRPTWHYAD	YGCYCGKGGGTPELDRCCQTHDN	50			
<i>Naja melanoleuca</i>	NLYQFKNMIQCTVTP-NRSWWHFAN	YGCYCGRGGSGTPELDRCCQIHDN	49			
<i>Notechis scutatus scut</i>	NLVQFSNMIQCANHGSRPSLAYAD	YGCYCSAGGSGTPELDRCCKTHDD	50			
<i>Laticauda semifasciata</i>	--VQFSNMIKCTIPGSRPLLDYAD	YGCYCGAGGSGTPELDRCCQTHDN	48			

N-terminal

Loop ligante

A Ca⁺

Sítio

Catalítico

continua...

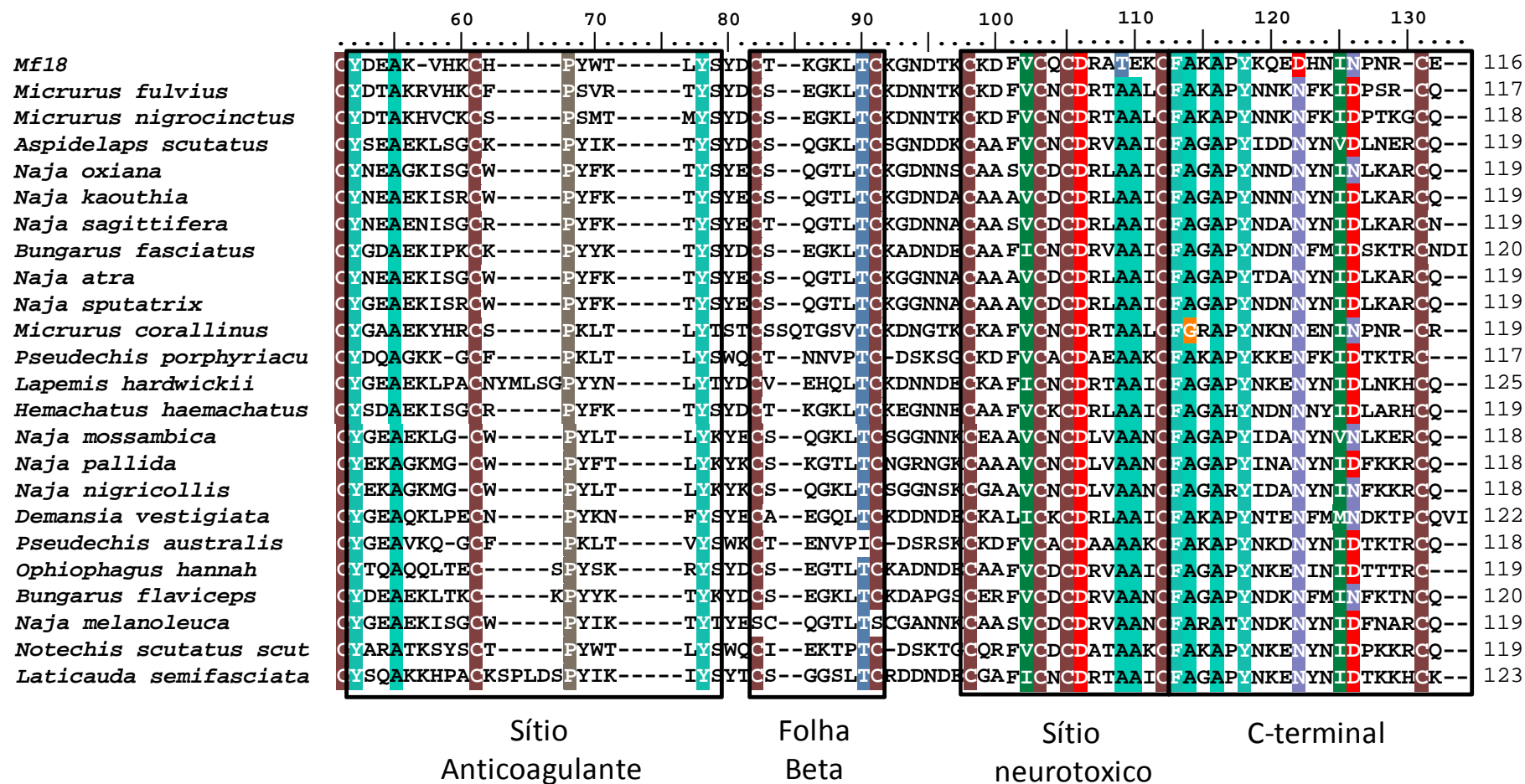


Figura 25. Alinhamento da PLA₂ Mf18 com outras PLA₂s de serpentes de Elapídeos utilizando o software Bioedit 3.0, mostrando as regiões com ao menos 90% de conservação com fundo colorido. Também é destacada a conservação de sítios funcionais dessas proteínas, particularmente da região relativa ao *loop* ligante a Ca⁺. (Código de cores: página xi)

Síntese dos peptídeos semelhantes a encefalina

O motivo semelhante à encefalina, identificado com alta conservação entre as espécies de *Micrurus* foi utilizado como modelo para sintetizar três peptídeos cujas sequências são encontradas em PLA₂s de Elapídeos, PLA₂s pancreáticas e até mesmo de urocordados. Os heptapeptídeos sintetizados apresentam alta similaridade com peptídeos opióides. A Figura 27 mostra esses três peptídeos alinhados com peptídeos opióides, nos quais o aminoácido N-terminal apresenta 90% de identidade entre as sequências. A única variação na porção N-terminal dos opióides se dá de Tirosina para outro aminoácido aromático, a Fenilalanina. Já entre as serpentes, a mutação se dá de Tirosina para Triptofano, mais frequente em serpentes do Gênero *Pseudechis*. Os dois aminoácidos seguintes do N-terminal apresentam 63% de identidade. Logo, os três aminoácidos aromáticos que ocorrem, seja em outros opióides ou em serpentes, foram escolhidos para iniciar os heptapeptídeos, seguindo a hipótese de que oferecem estruturação mais rígida e a distância necessária para a ligação em receptores opióides (Figura 25).

O produto obtido da síntese de cada peptídeo foi purificado por meio de cromatografia líquida de fase reversa em coluna semipreparativa C₁₈, em seguida analisados por meio de espectrometria de massa para conferência das massas presentes. Sendo verificada a necessidade de novos passos de purificação em dois casos, os mesmos foram submetidos a recromatografia em coluna analítica C₁₈ de fase reversa, utilizando gradiente linear de 5 a 95% de ACN em 60 minutos (Figura 28 e

Figura 29: A, B, C).

	10	
	
<i>W. aegyptia</i>	YGCYCGYGGSGTPV	14
<i>M. fulvius</i>	YGCYCGYGGSGTPV	14
<i>B. fasciatus</i>	YGCYCGYGGSGTPV	14
<i>B. caeruleus</i>	YGCYCGYGGSGTPV	14
<i>M. nigrocinctus</i>	YGCYCGYGGSGTPV	14
<i>B. multicinctus</i>	YGCYCGYGGSGTPV	14
<i>A. scutatus</i>	YGCFCGYGGSGTPV	14
<i>P. australis</i>	YGCYCGWGGSGTPV	14
<i>N. scutatus</i>	YGCYCGWGGSGTPV	14
<i>P. porphyriacus</i>	YGCYCGWGGSGTPV	14
<i>N. scutatus scutatus</i>	YGCYCGWGGSGTPV	14
<i>A. antarcticus</i>	YGCYCGWGGSGTPV	14
<i>A. labialis</i>	YGCYCGSGGSGTPV	14
<i>A. superbis</i>	YGCYCGSGGSGTPV	14
<i>D. vestigiata</i>	YGCYCGSGGSGTPV	14
<i>O. hannah</i>	YGCYCGSGGSGTPV	14
<i>L. laticaudata</i>	YGCYCGIGGSGTPV	14
<i>S. scrofa</i>	YGCYCGWGGSGTPV	14
<i>A. melanoleuca</i>	YGCYCGLGGSGTPV	14
<i>P. abelii</i>	YGCYCGLGGSGTPV	14
<i>C. jacchus</i>	YGCYCGLGGSGTPV	14
<i>O. cuniculus</i>	YGCYCGLGGSGTPV	14
<i>H. sapiens</i>	YGCYCGLGGSGTPV	14
<i>E. caballus</i>	YGCYCGLGGSGTPV	14
<i>R. norvegicus</i>	YGCYCGLGGSGTPV	14
<i>P. troglodytes</i>	YGCYCGLGGSGTPV	14
<i>M. mulatta</i>	YGCYCGLGGSGTPV	14
<i>B. taurus</i>	YGCYCGLGGSGTPV	14

Figura 26. Alinhamento das seqüências correspondentes ao fragmento localizado entre os resíduos 31 e 37 de PLA₂s dos venenos de serpentes da família elapidae e do pâncreas de mamíferos (ressaltados em vermelho).

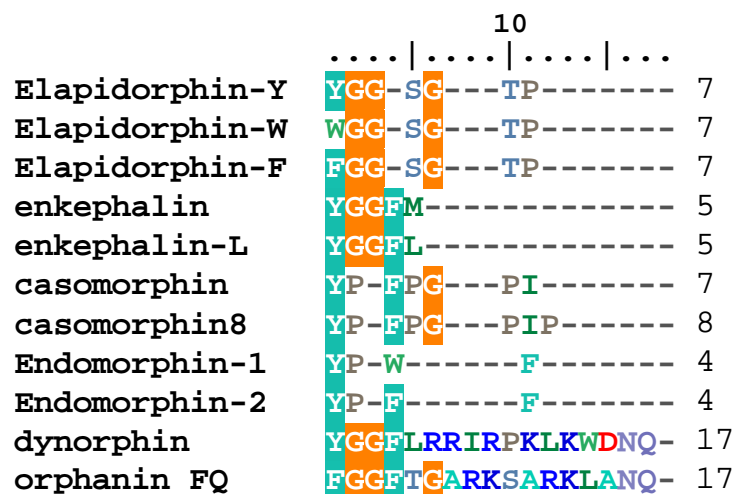


Figura 27. Alinhamento da região conservada em PLA₂s de elápidos com outros peptídeos opióides, mostrando o aminoácido N-terminal com 90% de identidade e o restante do N-terminal com 63% de identidade.

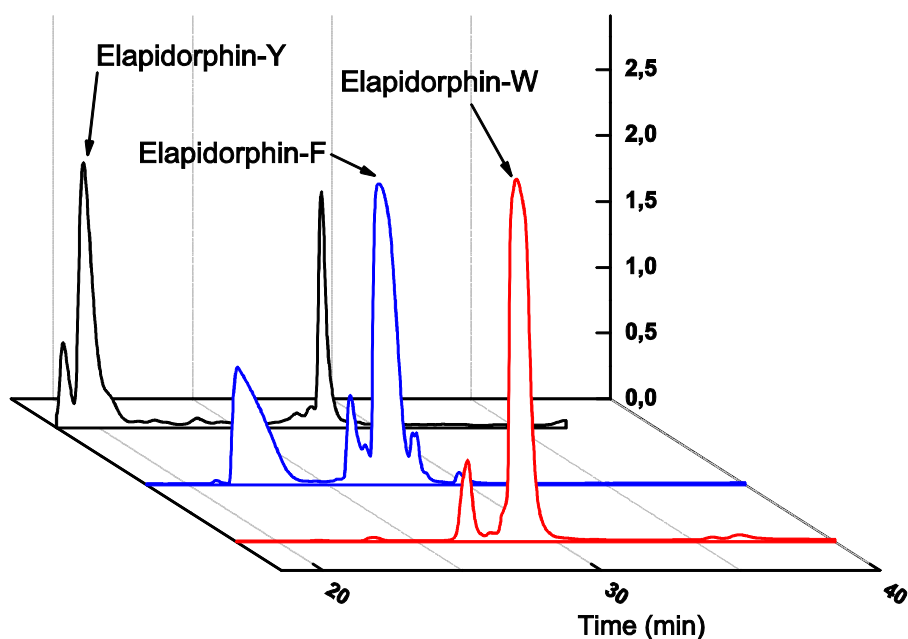


Figura 28. Cromatogramas alinhados dos peptídeos sintéticos Elapidorphin-Y, Elapidorphin-F e Elapidorphin-W, no último passo cromatográfico, suficiente para sua homogeneidade e pureza. Essa etapa correspondeu ao fracionamento RP-HPLC em coluna analítica C₁₈.

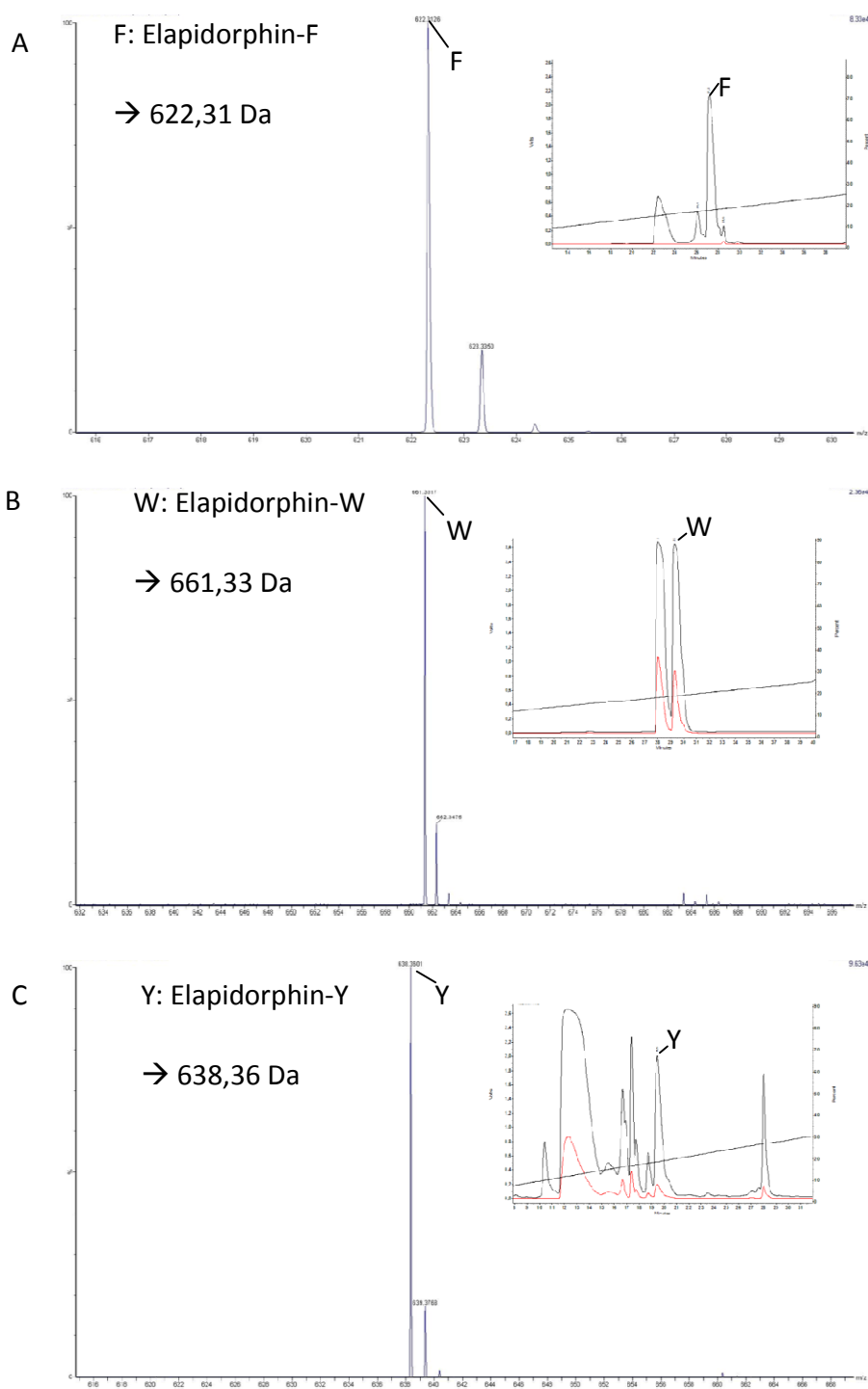


Figura 29. Espectros de massa com as respectivas cromatografias de fase reversa, mostrando a massa, pureza e intensidade dos compostos sintéticos após múltiplas etapas cromatográficas. A: Peptídeo sintético de massa 622,31 Da, purificado por coluna analítica C_{18} (Fração mais intensa); B: Peptídeo sintético de massa 661,33 Da, purificado por coluna analítica C_{18} (Fração de maior hidrofobicidade, maior tempo de retenção); C: peptídeo sintético de massa 638,36 Da, purificado por soluna semi-preparativa C_{18} (Fração com tempo de retenção marcado).

A alta similaridade das porções N-terminais dos peptídeos sintéticos à encefalina, que é um peptídeo opióide endógeno, sugerem atividade analgésica. No entanto, nunca foi verificada atividade antinociceptiva por PLA₂s de elapídeos. Para posterior conferência da atividade antinociceptiva, é fundamental a conferência da estrutura primária dos peptídeos. Os peptídeos ofereceram grande dificuldade em sua síntese pela presença de uma Prolina C-terminal.

Como a síntese se dá da porção C para a N-terminal, após a desproteção da primeira prolina ligada à resina, a chance de ser formada dicetopiperazina ciclisando o peptídeo é alta, levando a um impedimento da síntese (Goolcharran e Borchardt, 1998). Desta forma, os rendimentos das sínteses foram baixas, sendo que mesmo fazendo a uma escala alta uma série de coprodutos foram separados durante a purificação e as frações de interesse eram proporcionalmente pouco concentradas (

Figura 29). Por isso foram diversos os passos cromatográficos e a purificação foi extremamente laboriosa.

O alinhamento de estrutura terciária de PLA₂s dos venenos dos elapídeos *Bungarus caeruleus* e *Ophiophagus hannah* e do pâncreas dos mamíferos *Sus scrofa* e *Bos taurus* permitiu a observação de que os resíduos da posição 31 de cada uma das moléculas se direcionam ao exterior quando trata-se de resíduos aromáticos (Tyr e Trp) em comparação aos não aromáticos (Ser e Leu) (Figura 31). Os venenos de elapídeos são constituídos em sua maioria por resíduos aromáticos nessa posição enquanto os de mamíferos e outros organismos possuem os resíduos não aromáticos. Essa característica se relaciona com a

estrutura terciária da alça que contém esse resíduo que, nos casos das PLA₂s de veneno possuem uma funcionalidade que não está presente nas secretadas em pâncreas de mamíferos. A possibilidade de uma atividade não detectada até a atualidade foi levantada pela semelhança da sequência de aminoácidos (estrutura primária) da região correspondente a essa alça com peptídeos opióides com as encefalinas.

Por modelagem dos peptídeos desenhados foi possível representar tridimensionalmente como se comportariam estruturalmente essas moléculas (Figura 32 A). A representação gráfica dos trechos de estrutura terciária mais estável por meio da variabilidade estrutural (root-mean-square deviation - RMSD) obtida por modelos dos peptídeos Elapidorphin Y (verde), Elapidorphin-W (azul), Elapidorphin-F (lilás), do peptídeo hipotético de sequência SGGSGTP (rosa), 6-Arg,7-Phe, Met-Encefalina (Lilás escuro) e Met-encefalina (laranja), no software GROMACS 4.5 permitiu a comparação e definição de estabilidades estruturais (Figura 32). Pela representação de uma das estruturas terciárias mais estáveis do peptídeo Elapidorphin-Y, é possível verificar o anel aromático que se mantém na mesma posição em relação ao restante da molécula, mostrando que existe a possibilidade da formação de estrutura com afinidade por receptores opióides de acordo com a chamada “Regra da Morfina” (Kane *et al*, 2006). Para verificação dessa possibilidade, uma das conformações mais estáveis foi comparada à mesmas de outros peptídeos sintetizados e à da Met-encefalina e 6-Arg,7-Phe, Met-Encefalina (Figura 33), que mostra semelhança em sua forma geral, além da distribuição de regiões hidrofílicas e hidrofóbicas, com a protrusão do resíduo N-terminal aromático. Todas as semelhanças estruturais dos

peptídeos sintetizados neste trabalho com peptídeos opióides favorecem a hipótese de que os primeiros poderiam exercer atividade antinociceptia comparável aquela à de opióides.

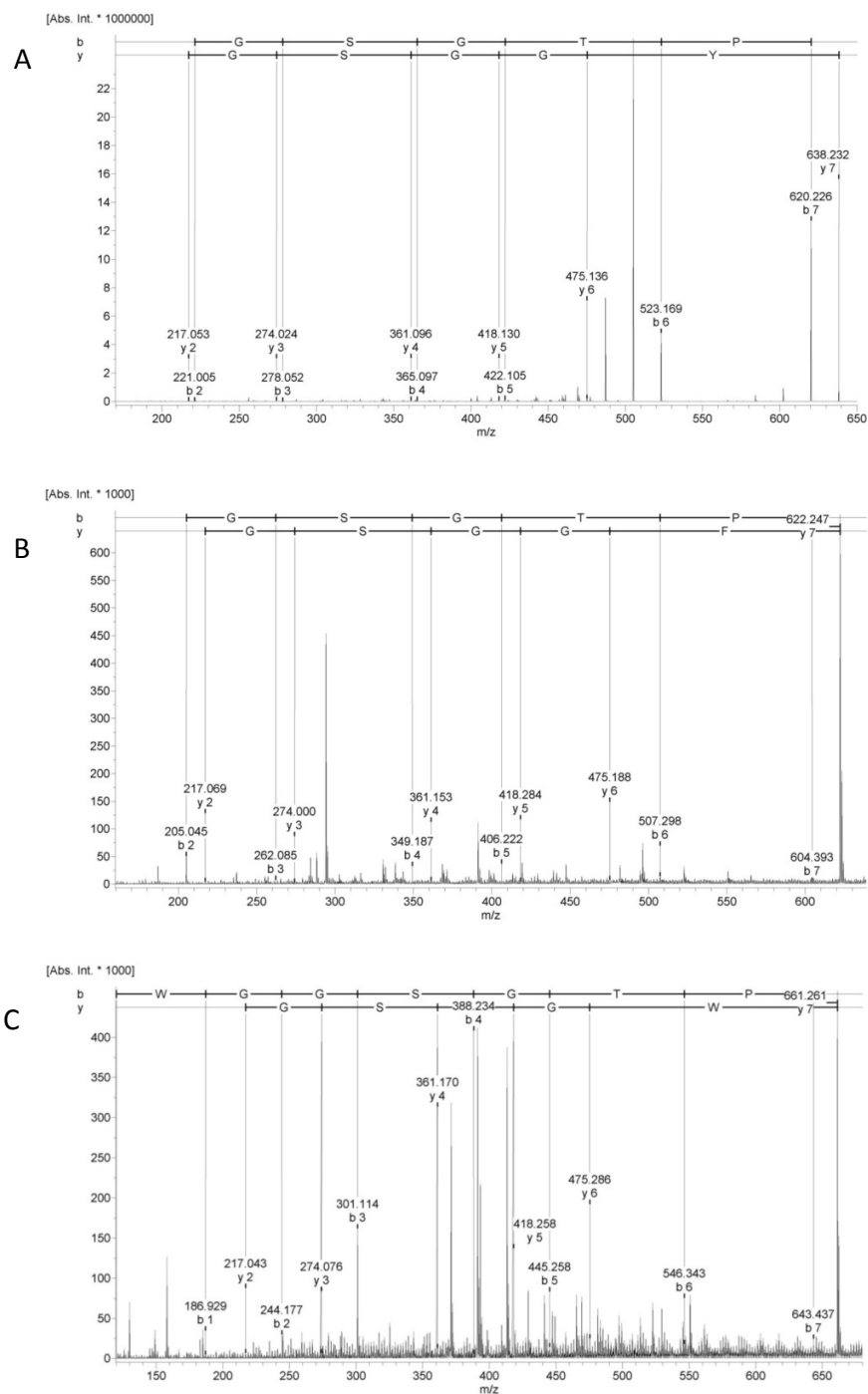


Figura 30. Espectros de massa dos peptídeos sintetizados, purificados até homogeneidade, mostrando seu sequenciamento de novo e confirmação da estrutura primária. Os espectros foram obtidos por ESI HCT ou MALDI TOF Microflex, e processados pelo software Biotoools. A: Elapidorphin-Y, B: Elapidorphin-F e C: Elapidorphin-W.

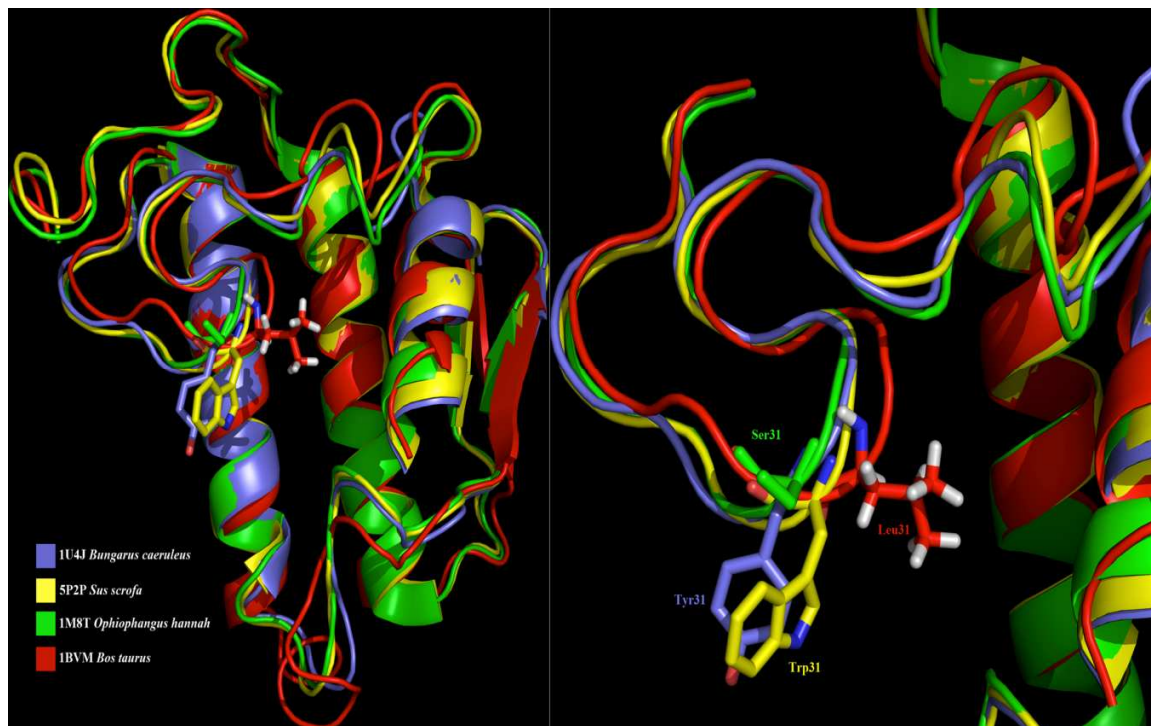


Figura 31. Alinhamento de PLA₂s dos venenos dos elapídeos *Bungarus caeruleus* e *Ophiophagus hannah* e do pâncreas dos mamíferos *Sus scrofa* e *Bos taurus*. Em detalhe os resíduos da posição 31 de cada uma das moléculas, mostrando o direcionamento ao exterior dos resíduos aromáticos (Tyr e Trp) em comparação aos não aromáticos (Ser e Leu).

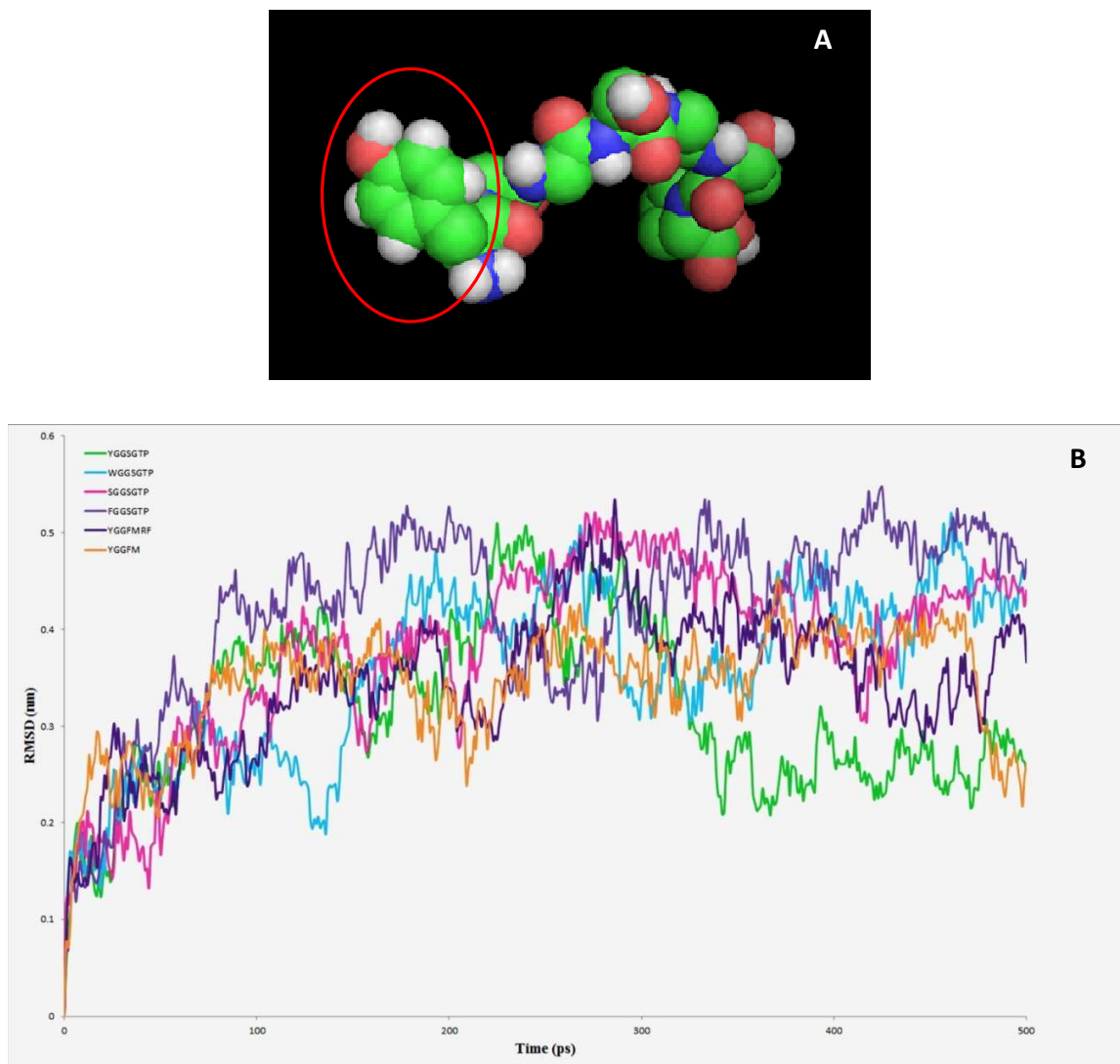


Figura 32. A. Representação tridimensional de uma das estruturas terciárias mais estáveis do peptídeo Elapidorphin-Y, onde é possível verificar o anel aromático que se mantém na mesma posição tridimensional em relação ao restante da molécula. **B.** Representação gráfica dos trechos de estrutura terciária mais estável por meio da dinâmica estrutural representada pela variação estrutural (*root-mean-square deviation*- RMSD) obtida por modelos dos peptídeos Elapidorphin Y (verde), Elapidorphin-W (azul), Elapidorphin-F (lilás), do peptídeo hipotético de sequência SGGSGTP (rosa), 6-Arg,7-Phe, Met-Encefalina (Lilás escuro) e Met-encefalina (laranja), no software GROMACS 4.5.

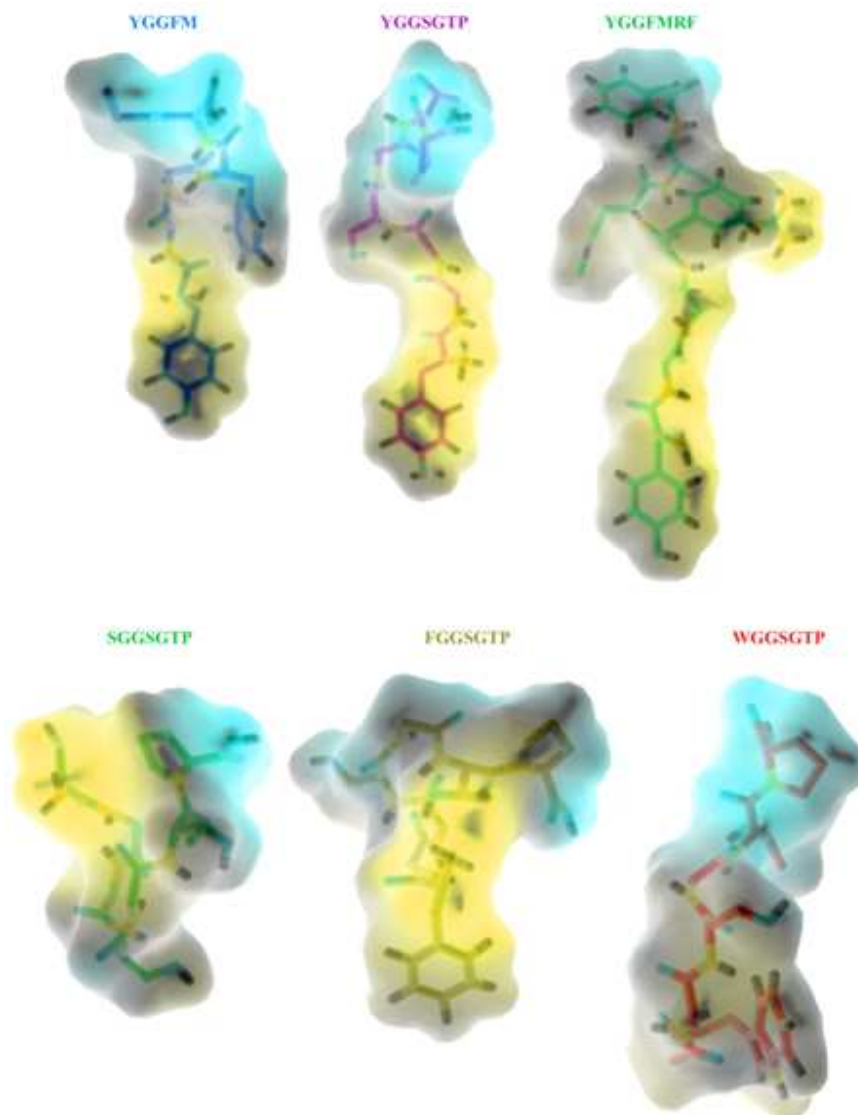


Figura 33. Comparação entre as estruturas terciárias de modelos dos peptídeos sintéticos YGGSGTP, WGGSGTP, FGGSGTP e SGGSGTP com a met-enkefalina (YGGFM) e à 6-Arg,7-Phe, Met-Enkefalina (YGGFMRF), gerados pelo software GROMACS 4.5. A cor amarelada mostra regiões hidrofílicas enquanto regiões azuladas são hidrofóbicas.

Atividade Antinociceptiva

Ensaio de *Tail-flick*

Os peptídeos tiveram sua ação antinociceptiva testada por duas metodologias, sendo uma com injeção Intracerebroventricular (icv) e outra subcutânea. Para a primeira foi utilizado o ensaio de *tail-flick*. O peptídeo de sequência mais próxima à da encefalina (Elapidorphin-Y) foi escolhido para verificar se a homologia dos três primeiros aminoácidos da sequência N-terminal é o suficiente para conferir alguma atividade.

O peptídeo Elapidorphin-Y induziu efeito antinociceptivo dependente de dose no teste de *tailflick*. Foram detectadas diferenças significativas (de acordo com os testes estatísticos apresentados na seção Análises estatísticas) dependentes de tratamento (pela injeção de Elapidorphin-Y) [$F(4,17) = 2,57; P < 0,05$], tempo [$F(7,17) = 3,90; P < 0,05$] e pela interação de tempo com tratamento [$F(28,119) = 0,95; P < 0,05$]. O teste ANOVA de uma via mostrou efeito significativo dos tratamentos no tempo 50 minutos [$F(4,17)$ variando de 6.47 a 19.30; $P < 0,05$] (Figura 34). Análises *post hoc* por teste de Tukey mostraram ainda o efeito do peptídeo nas diferentes concentrações produziram efeito antinociceptivo significativo quando comparado com controle. A maior dose testada do peptídeo (16 nmol) induziu efeito antinociceptivo durante todo o período do teste. Além disso, no tempo 120 minutos uma diferença significativa foi verificada entre a dose mais alta e as duas outras doses. A potencia relativa do peptídeo foi medida comparando-a com aquela da morfina (12 nmol). Esta dose de morfina foi escolhida experimentalmente por ser a mais alta que ainda demonstra um efeito dependente de tempo. Em doses mais altas o efeito permanece paralelo ao eixo x , demonstrando efeito total, que independe do tempo após aplicação. As análises *post hoc* mostraram que as latências de retirada de cauda induzidas pela morfina foram significativamente maiores que as causadas pelo peptídeo Elapidorphin-Y nas duas concentrações menores aos 60 min ($p < 0,05$), mas não diferiram expressivamente da dose maior do peptídeo (Figura 34).

A dose 16 nmol Elapidorphin-Y alcançou maior eficácia aos 100 minutos e aparentemente permaneceu por mais tempo em ação que outras doses e que a morfina, que alcançaram seus ápices aos 60 min. Considerando o tempo que cada uma das concentrações injetadas e os diferentes tratamentos necessitam de determinado período para alcançar sua atividade máxima, e posterior queda aos níveis pre-teste, o tempo em que cada curva atinge o ápice corresponderia à metade do tempo total de ação. O tempo total de ação corresponde ao tempo em que o peptídeo leva para ser metabolizado no organismo do sujeito. A avaliar pelo tempo de atividade máxima do peptídeo em sua dose mais alta e da morfina, pode-se hipotetizar que o peptídeo causa um efeito antinociceptivo mais duradouro que a morfina.

Por essa razão, os dados de área abaixo da curva (AUC) foram avaliados, e mostraram um efeito antinociceptivo similarmente dependente da dose [$F(4,14) = 20.18$; $P < 0.001$]. As análises *post hoc* desses dados mostraram efeito antinociceptivo para o peptídeo Elapidorphin-Y (16 nmol) quando comparados às doses mais baixas e à solução salina (Figura 35). De fato, estes efeitos induzidos pela morfina foram significativamente maiores que os de controle, como também os efeitos das duas doses menores do peptídeo. Mais uma vez a maior dose do peptídeo e a morfina não diferiram significativamente, o que mostra comportamento similar ao da morfina quanto à intensidade acumulada da resposta.

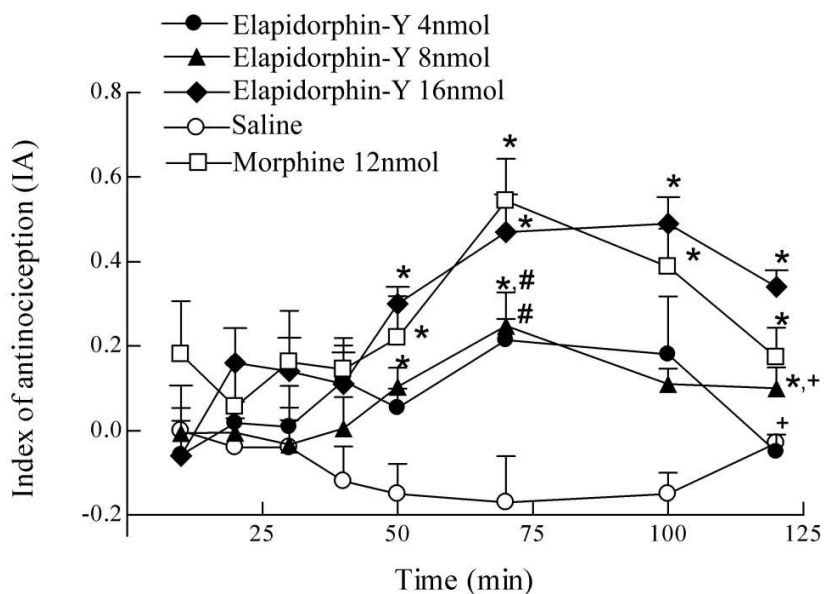


Figura 34. Período de investigação das variações de latências dependentes dos tratamentos das diferentes doses do peptídeo Elapidorphin-Y e tratamentos injetados por icv em ratos. Os símbolos *,# e + representam agrupamentos de respostas similares, onde símbolos iguais mostram que não há diferença estatisticamente verificável entre os pontos, e símbolos distintos revelam pontos onde a variação é significativa.

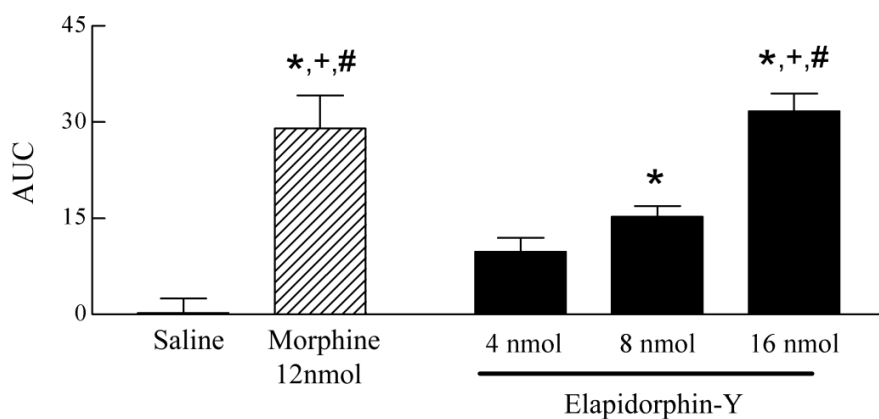


Figura 35. Área abaixo da curva relativa ao índice de antinociceção no ensaio de tailflick. Os símbolos *,# e + representam agrupamentos de respostas similares, onde símbolos iguais mostram que não há diferença estatisticamente verificável entre os pontos, e símbolos distintos revelam pontos onde a variação é significativa.

Teste da Formalina

Os três peptídeos Elapidorphin-Y, Elapidorphin-F and Elapidorphin-W foram testados usando o ensaio da formalina usando a dose com o maior efeito antinociceptivo (16 nmol) como determinado pelo teste de *tailflick*.

O efeito dos peptídeos sobre a reação (lambadura da pata) causada pelo agente nociceptivo químico, a formalina, é mostrado na Figura 36. Concordando com o teste de *tail-flick*, a primeira fase do teste da formalina (5 min) não mostrou efeito antinociceptivo significativo dos peptídeos, embora tenham mostrado uma ligeira redução nos tempos em que passaram lambendo a pata em relação ao controle.

A segunda fase revelou redução significativa na dor causada pela formalina causada pelo tratamento com o peptídeo Elapidorphin-W. Os outros peptídeos mostraram também maior redução que a demonstrada na primeira fase, porém não foram significativas quando comparadas com controle. Na segunda fase os camundongos passaram mais tempo lambendo a pata devido a resposta inflamatória, e esse efeito foi exatamente quando os peptídeos mostraram seu maior efeito.

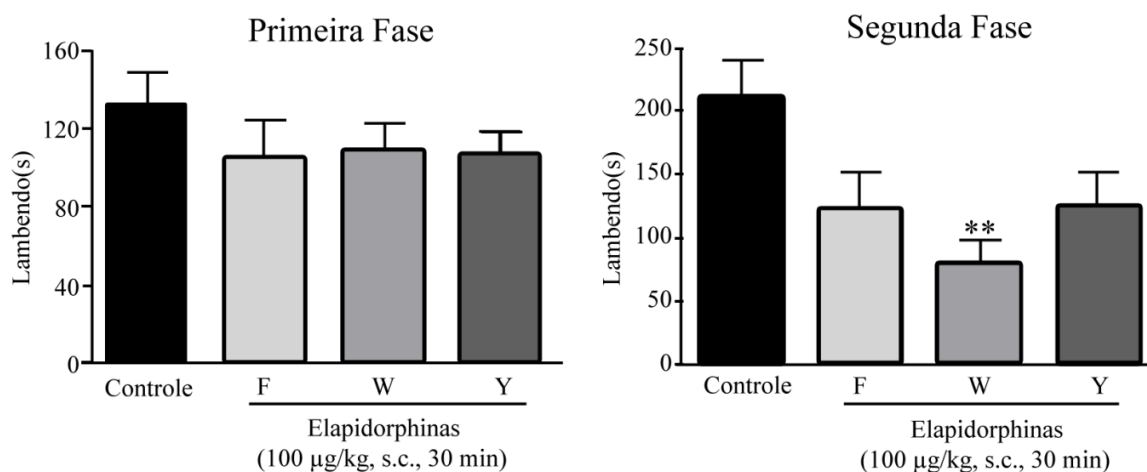


Figura 36. Efeito dos peptídeos Elapidorphin-F (F), Elapidorphin-W(W) e Elapidorphin-Y (Y), administrados s.c. na dor induzida por formalina (Primeira fase à esquerda, e segunda fase à direita) a 16 nmol, em camundongos. As colunas representam as médias com erro padrão de ao menos 2 animais. ** Significativamente diferentes do controle ($P < 0.01$, ANOVA de duas vias).

Discussão

Esse trabalho descreve a identificação, purificação e sequenciamento parcial de uma nova fosfolipase A_2 *Micrurus frontalis*, aqui chamada de Frontolipase. Um trabalho prévio executado pelo laboratório de espectrometria de massa da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia identificou e purificou neurotoxinas e demonstrou as atividades destas em junções neuromusculares de rãs (Moreira et al, 2010). Neste último trabalho também foram identificadas massas e fragmentos de sequências com similaridade à de PLA_2 s. Porém o estudo atual é o que alcançou maior sequência de uma PLA_2 presente no veneno da serpente *Micrurus frontalis*, mesmo com a necessidade de confirmação.

Outras análises proteômicas atuais tentaram elucidar mais sobre a composição protéica do veneno de serpentes do gênero *Micrurus* (Olamendi-Portugal et al., 2008, Dokmetjian et al., 2009, Leão et al., 2009). A escassez de dados a respeito de *Micrurus spp.* advém da dificuldade da manutenção dessas serpentes em cativeiro, muitas vezes necessária para a extração de veneno. Essas serpentes, além de dificilmente encontradas em seus habitats naturais, oferecem pouco volume de veneno bruto a cada extração. Além disso, foi registrado pelo IBAMA que *Micrurus frontalis* se encontra ameaçada de extinção em alguns estados onde ocorria, pois é muito difícil ser encontrada nesses habitats. Como exemplo dessa dificuldade, realizando-se buscas no banco de dados de proteínas da NCBI com a palavra *Micrurus*, são apresentados apenas 185 entradas como resultado, das quais 64 são somente a respeito da cobra-coral mexicana *M. fulvius*. Alterando a busca para as palavras *Micrurus e phospholipase*, apenas 19 resultados são apresentados, dos quais apenas 5 mostram sequências completas de PLA_2 s, sendo apenas 3 brasileiras, uma de *M. corallinus* e duas de *M. nigrocinctus*. Até o momento, os estudos com o gênero *Micrurus* concentram-se em neurotoxinas devido ao efeito neurotóxico que o envenenamento por esse gênero causa e a importância para Saúde Pública que esses casos geram. As PLA_2 s são mais estudadas entre os viperídeos brasileiros devido às características marcantes dos envenenamentos causados serem a miotoxicidade e edema, além do número de acidentes ser mais de 10 mil vezes maior do que os causados por elapídeos.

Aird e Jorge da Silva (1991) estão entre os únicos que estudaram a bioquímica do veneno de *M. frontalis*, no qual detectaram alta diversidade de componentes em relação à outras serpentes do mesmo gênero. Esses dados concordam com os achados neste trabalho, pois somente nas separações iniciais em coluna semipreparativa do veneno bruto de *M. frontalis* foram reveladas aproximadamente 28 frações. A partir do tempo de retenção de 35 min, (aprox 35% de ACN), todas as frações apresentavam ao menos uma massa molecular que se encontrava na faixa correspondente à de PLA₂s (13kDa). Ao serem recromatografadas, as frações revelaram em média 6 outras frações, cada. Esses resultados concordam com Possani e colaboradores (1979) que identificaram 5 frações por gel filtração seguida por fracionamento com coluna de CM-cellulose onde identificaram mais oito frações com atividade fosfolipásica. O menor número de frações é explicado pela técnica utilizada para purificação. Nesse estudo com *M. frontalis*, o número de frações bem resolvidas é condizente com a técnica de cromatografia em fase reversa e com o volume de veneno bruto disponível para estudo. Olamendi-Portugal et al (2008) também utilizaram espectrometria de massa com ionização por ESI e MALDI TOF para detecção de componentes do veneno de *M. surinamensis*, porém não obtiveram sequências completas de PLA₂s e só identificaram fragmentos oriundos da digestão com tripsina advindos de um conjunto de moléculas desconhecidas, onde se utilizaram de similaridade de sequências para reconhecer digeridos de PLA₂s. Por isso não conseguiram identificar a diversidade de PLA₂s presentes no veneno analisado.

A diversidade, acurácia e resolução em análises de componentes passíveis de serem detectados através técnicas de espectrometria de massa depende da qualidade da amostra oriunda de purificação prévia, devido à grande supressão de sinal por moléculas facilmente ionizáveis, principalmente em análises por MALDI-TOF. A ionização por Eletrospray (ESI) é frequentemente empregada para análises em que é necessário quantificar, ou mesmo realizar cromatografia de alta pressão em série com espectrometria de massa. Mesmo nessa técnica, a purificação prévia e a preparação do analito pode influenciar diretamente o resultado obtido. Após a purificação primária realizada neste estudo, foram identificados variados componentes em cada fração. Novos passos cromatográficos foram necessários

para a purificação e homogeneidade de cada fração, de maneira que foram realizados de 2 a 3 passos cromatográficos por componente identificado para que fosse atingido o grau desejado de pureza para as análises seguintes. Aliando ao fato de que as PLA₂s tendem a formar complexos protéicos ou, mais especificamente, dímeros, é levantada a questão sobre a pureza de caracterizações prévias feitas apenas com gel bidimensional ou com apenas um passo cromatográfico com colunas de exclusão molecular. Nesses casos, se duas moléculas apresentam PI (Ponto isoelétrico) e massa próxima, a separação não será eficiente, então quando o corte do gel for executado, é bem provável que várias isoformas ou contaminantes sejam selecionados junto com a amostra de interesse

Diversas neurotoxinas provenientes de triagens feitas em estudo prévio em nosso laboratório foram apresentadas (Moreira et al, 2010). Moléculas que apresentavam massa molecular semelhante a neurotoxinas foram identificadas principalmente nas frações eluídas em até 40% de ACN. Nossos resultados demonstram presença das PLA₂s nas frações após 35% de ACN utilizando o mesmo gradiente, quando os componentes apresentavam massas concentradas principalmente de 12 a 15 kDa.

As serpentes da família Elapidae são conhecidas pelos envenenamentos com sinais neurotóxicos, que levam a danos severos e até mesmo óbitos. Apesar desta atividade estar intimamente relacionada a neurotoxinas, na atual análise do veneno de *M. frontalis* foi mostrado que o veneno possui diversidade não apenas de neurotoxinas, mas também de PLA₂s. Além disso, enquanto variadas PLA₂s de viperídeos possuem atividade miotóxica, hemorrágica, cardiopéptica, entre outras, as únicas que apresentam atividade neurotóxica são as da Classe I, presentes apenas em Elapídeos (Kini, 2003).

Diversos autores tem concentrado em descrever formas de classificação de PLA₂s de acordo com o comprimento da sequência, estrutura tridimensional, número e posição de resíduos de cisteína e das pontes dissulfeto além das cargas e hidrofobicidade de resíduos em posições específicas (Dufton e Hider, 1983, Carredano et al., 1998, Valentin et al, 1999, Kini, 2003). De acordo com essa classificação a PLA₂ caracterizada neste estudo pertence à classe I, pois além de possuir as 7 pontes dissulfeto características, possui também as

cisteínas para que seja formada ponte dissulfeto entre o resíduo 11 e 77. Além disso pode exercer atividade enzimática, pois possui Asp na posição 49 e os aminoácidos relativos ao *loop* entre 25 a 37 conservados. O sítio descrito como neurotóxico, que se encontra entre os resíduos 59 e 92, é altamente conservado entre frontolipase e outras PLA₂ neurotóxicas de serpentes. No entanto os resíduos Met⁷⁰, Asp⁷⁴, Asn⁸⁰, Gly⁸¹, Tyr⁸³, Arg⁸⁵, Lys⁸⁹, Lys⁹⁰, Val¹⁰⁰, Ala¹¹⁴ são descritos como invariáveis em todas as PLA₂s com atividade neurotóxicas monoméricas (Carredano et al, 1998). Dentre esses aminoácidos considerados invariáveis, a Frontolipase só possui coincidência na posição 80 (Asn), portanto teria pouca indicação de possuir atividade neurotóxica quando em forma monomérica. Em caso de estudos futuros comprovarem a atividade neurotóxica desta fração, seria conveniente reparar na formação de complexos protéicos. Os resíduos relativos ao *loop* elapídico também são conservados, entre as PLA₂s usadas para comparação e a frontolipase, indicando ser parte também da Classe I. O objetivo das classificações desses autores é determinar fatores relacionados à estrutura que venham predizer a atividade biológica que possuem.

As posições 3, 64 e 66 são também importantes para dimerização e para atividade enzimática de PLA₂s, sendo mais frequente quando ocupadas pelos resíduos Tyr, Trp e Phe, respectivamente. Dal Belo e colaboradores (2005) descreveram a ausência de atividades enzimática e miotóxica nas PLA₂s isoladas a partir do veneno de *Micrurus dumerellii curanicauda* pela ausência desses aminoácidos nestas posições. Frontolipase possui Tyr³ e Trp⁶⁴, mas não a Phe⁶⁶, sugerindo baixa atividade enzimática. Foi mostrado também pelo mesmo autor usando o modelo de Singh et al (2001), que a presença de resíduos de Lys nas posições 76 e 86 poderiam decrescer a hidrofobicidade dessa região e conseqüentemente a capacidade de interagir com os receptores N e M, responsáveis pelo desencadeamento da atividade neurotóxica de acordo com Valentin et al (1999). A frontolipase possui Lys nas posições 74 e 84, que gera também menor hidrofobicidade nesta região, porém ainda são necessários testes de neurotoxicidade para detectar a contribuição deles para ligação em seus receptores.

As funções biológicas não diretamente relacionadas à digestão atribuídas às PLA₂s de elapídeos são cada vez melhor estudadas e atribuídas a caracteres específicos da estrutura

dessas enzimas. No entanto algumas funções ainda não muito bem entendidas e trazem dúvida a respeito da utilidade real, presente em certas regiões na sequência de PLA₂s. Comportamento semelhante ocorre com a Crotalphine, um peptídeo antinociceptivo isolado a partir do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (Konno et al, 2008) que apresenta 100% identidade com os 14 aminoácidos C-terminal da cadeia ácida da Crotoxina (Bouchier et al.,1988, Faure et al, 1991, 1994). Não é conhecido se realmente a porção C-terminal desta toxina é liberada através de clivagem enzimática, e não foram atribuídas outras funções a esta região. A pergunta sobre a possibilidade de liberação desse peptídeo ainda é uma incógnita. Existem duas hipóteses que podem explicar a origem deste peptídeo: A que considera a possibilidade da existência de um gene independente para crotalphina e crotoxina, e a que admite que a liberação da crotalphina ocorre pelo processamento postraducional de proteínas maiores, como no caso, a Crotoxina.

Valentin et al (1999) e Craig e colaboradores (1999) demonstram uma variedade de polipeptídeos de serpentes, de escorpiões e de *Conus* que vem sendo gerado através de proteínas precursoras maiores, através de processamento postraducional. Peptídeos funcionais se encontram encriptados nas sequências de proteínas maiores, necessitando de alguma forma de liberação. No estudo atual foi detectada uma região da PLA₂ no *loop* que contém a sequência que permite a ligação a Calcio, que apresenta alta identidade e conservação relacionada a PLA₂s de outros gêneros de Elapídeos, de mamíferos e até mesmo de urocordados. A conservação desse motivo pode estar relacionada à necessidade de cálcio para desempenhar as atividades enzimáticas, seja tóxica ou não, desde a proteína primitiva útil na digestão de lipídios, até as funções de defesa atuais em venenos de serpentes (Valentin et al, 1999). Portanto sempre existe a possibilidade de ter existido como uma região funcional da proteína que durante os processos evolutivos se manteve por desempenhar função essencial na ligação das PLA₂s a seus alvos nas células. Essa região apresenta também alta homologia a peptídeos opióides como a encefalina na sua porção N-terminal.

Elapidorphins

Os heptapeptídeos foram sintetizados com base nas regiões mais conservadas de PLA₂s de serpentes da família Elapidae que possuem homologia com peptídeos opióides. O peptídeo sintético Elapidorphin-Y apresenta N-terminal idêntico ao das encefalinas L e M, Dynorphin A e B, além de α -endorphina, sugerindo efeito analgesico. Esse peptídeo foi purificado até atingir homogeneidade, a qual foi conferida por espectrometria de massa. O sequenciamento do peptídeo revelou o correto acoplamento de todos os aminoácidos.

O peptídeo Elapidorphin-Y apresentou efeito antinociceptivo dependente da dose no ensaio de *tail-flick*, concordando com o esperado pela sua homologia de sequência. Após plotar o gráfico de área abaixo da curva, foi detectado que o efeito antinociceptivo cumulativo dos 120 minutos para as duas doses mais altas testadas também é significativamente maior que controle. O efeito produzido por este peptídeo foi comparável aquele produzido por morfina. Novos testes devem ser realizados para verificação de inibição do efeito verificado por antagonistas dos diferentes receptores opióides.

Outros peptídeos foram também sintetizados diferindo apenas o aminoácido da região N-terminal. O peptídeo Elapidorphin-W utilizou o aminoácido N-terminal mais conservado entre diferentes PLA₂s de Elapídeos na posição da sequência onde foi encontrado o Elapidorphin-Y de *M. frontalis*. O peptídeo Elapidorphin-F trocou a Tyr N-terminal por Phe, aminoácido que ocupa essa posição na Nociceptina/Orphanina FQ (Reinscheid et al, 1995). Os três heptapeptídeos foram purificados à homogeneidade e sequenciados para confirmação da estrutura primária. Esses peptídeos foram testados junto ao primeiro pelo teste da formalina, e mostraram efeito redutor da percepção de dor induzida por formalina em camundongos por via subcutânea. Esse efeito somente se revelou significativamente maior que controle na segunda fase do teste (fase inflamatória), para o peptídeo Elapidorphin-W.

Os dois N-terminais mais comuns dentre as PLA₂s de Elapídeos foram os que geraram atividade antinociceptiva mais expressiva, que foram W e Y. Devido à maior homologia com a sequência da encefalina, era esperado que o Elapidorphin-Y desenvolvesse maior analgesia, porém no teste da formalina somente Elapidorphin-W promoveu tal efeito de maneira

significativamente diferente do controle. Estes dados podem suportar a teoria desenvolvida por Goldberg (2010), que propõe que aminoácidos aromáticos de cadeia lateral com estrutura rígida possam adotar uma conformação semelhante à da piperidina na morfina, levando ao afastamento ideal reconhecido pelo receptor opióide. Porém ainda são necessários outros dados para que a estrutura formada seja calculada e confirmada, além de dados farmacológicos com antagonistas para cada receptor opióide que evidenciem suas participações no desenvolvimento da analgesia.

O C-terminal dos peptídeos possui homologia na posição 6 e 7 com análogos a Bradicinina (Zhou et al 2008). Li et al (1990) demonstraram que mudanças na Pro na sétima posição alteravam a meia-vida de endorfina em fatias de cérebro. BPPs isolados de venenos de serpente tem se mostrado inibidores da clivagem por peptidases como a ACE (enzima conversora de Angiotensina), sendo o C-terminal o principal responsável por esse efeito (Oka and Hiranuma, 1992). Os peptídeos testados no ensaio da formalina apresentam o C-terminal similar a inibidores de proteinases, o que sugere que o C-terminal poderia gerar uma resistência a degradação, e por conseguinte, uma ação prolongada. Em comparação com outros trabalhos, foi observado uma tendência a prolongamento da ação, porém os dados ainda são inconclusivos com relação a este efeito (Kanai et al, 2002).

Conclusões

Este trabalho identificou, purificou e sequenciou a maior porção de sequência de uma PLA₂ do veneno de *M. frontalis*. Essa PLA₂ apresentou alta homologia com as presentes em venenos de outros Elapídeos e alta identidade com outras PLA₂s presentes em venenos de serpente do gênero *Micrurus*. Foram detectadas pelo menos outras 4 componentes de massas correspondentes a PLA₂s, que ainda necessitam ser estudados e melhor caracterizadas.

Foi identificada região na sequência de PLA₂s de Elapídeos com elevado grau de similaridade com Encefalinas e outros peptídeos opióides. Foi demonstrado que esses peptídeos, quando liberados do restante da estrutura da enzima, possuem atividade antinociceptiva.

O peptídeo de N-terminal Tyr apresentou efeito antinociceptivo no ensaio de tail flick. O peptídeo de N-terminal de Trp foi o único que apresentou o mesmo efeito no teste da formalina.

Então foi detectada atividade antinociceptiva em uma região de PLA₂s de Elapídeos. Novos estudos são encorajados para determinar a natureza dessa atividade, em que tipo de receptor esses peptídeos se ligam e qual é o tempo de duração dessa atividade. É possível a detecção de estruturas primárias dentro de proteínas que podem exercer atividade uma vez liberadas.

Referências bibliográficas

Aird, S.D. e Jorge da Silva Jr., N., 1991. Comparative enzymatic composition of Brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 99:287-294.

Aird, S.D. e Jorge da Silva Jr., N., Griffin, P.R. 1993. Primary structure of a short postsynaptic neurotoxin from the venom of *Micrurus surinamensis*. *Toxicon* 31:108.

Alam, J. M., Qasim, R., e Alam, S. M. 1996. Enzymatic activities of some snake venoms from families Elapidae and Viperidae. *Pakistan J. Pharm. Sci.* 9 (1) 37-41.

Alape-Girón, A., Stiles, B., Schmidt, J., Girón-Cortes, M., Thelestam, M., Jörnvall, H., Bergman, T. 1996. Characterization of multiple nicotinic acetylcholine receptor-binding proteins and phospholipases A2 from the venom of the coral snake *Micrurus nigrocinctus*. *FEBS Letters.* 380:29-32.

Arroyo, O., Rosso, J.P., Vargas, O., Gutiérrez, J.M., Cerdas, L. 1987. Skeletal muscle necrosis induced by a phospholipase A2 isolated from venom of the coral snake *Micrurus nigrocinctus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 87: 949-952.

Barros, A.C.S., Fernandes, D.P., Ferreira, L.C.L., dos Santos, M.C. 1994. Local effects induced by venoms from five species of genus *Micrurus* sp. (coral snake). *Toxicon.* 32:445-452.

Betzel, C., Genov, N., Rajashankar, K. R. e Singh, T. P. 1999. Modulation of phospholipase A2 activity generated by molecular evolution. *Cell. Mol. Life Sci.* 56 : 384–397.

Bojnik, E., Bojnik, E. Corbani, M. Babos, F. Magyar, A. Borsodi, A. Benyhe, S. 2011. Phylogenetic diversity and functional efficacy of the C-terminally expressed heptapeptide unit in the opioid precursor polypeptide proenkephalin A. *Neuroscience*, Volume 178, 31 March, Pages 56-67.

Bouchier, C., Ducancel, F., Guignery-Frelat, G., et al., 1988. Cloning and sequencing of cDNAs encoding the two subunits of Crotoxin, *Nucl. Acids Res*, 16 (18): 9050.

Carredano, E., Westerlund, B., Persson, B., Saarinen, M., Ramaswamy, S., Eaker, D., Eklunda, H., 1998. The three-dimensional structures of two toxins from snake venom throw light on the anticoagulant and neurotoxic sites of phospholipase A2. *Toxicon* 36 (1998) (1) 75-92.

Campbell, J.A., Lamar, W.W., 2004. *The Venomous Reptiles of Western Hemisphere*. Volume I. Cornell University Press, Ithaca, New York, U.S.A. 476p.

Comb, M., Seeburg, P. H., Adelman, J., Eiden, L., Herbert, E. 1982. Primary structure of the human Met- and Leu-enkephalin precursor and its mRNA. *Nature* 295, 663-666 (25 February).

Cecchini, A.L., Marcussi, S., Silveira, L.B., Borja-Oliveira, C.R., Rodrigues-Simioni, L., Amaral, S., Stábeli, R.G., Giglio, J.R., Arantes, E.C., Soares, A.M., 2005. Biological and enzymatic activities of *Micrurus* sp. (Coral) snake venoms. *Comp.Biochem.Physiol.AMol.Integr.Physiol.*140, 125-134.

Craig, A.G., Bandyopadhyay, P., Olivera, B.M., 1999. Post-translationally modified neuropeptides from *Conus* venoms. *Eur. J. Biochem.* **264**, pp. 271–275.

Dal Belo, C. A., Toyama, M. H., Toyama, D. O., Marangoni, S., Moreno, F. B., Cavada, B. S., Fontana, M. D., Hyslop, S., Carneiro, E. M., Boschero, A. C. 2005. Determination of the Amino Acid Sequence of a New Phospholipase A2 (MIDCA1) Isolated from *Micrurus dumerilii carinicauda* Venom. *The Protein Journal*, Vol. 24, No. 3.

De Lano, W. L. (2002). *The PyMOL Molecular Graphics System*. San Carlos, CA, USA, De Lano Scientific.

Dokmetjian, J.C., Canto, S., Vinzón, S., Bonino, M.B.J., 2009. Biochemical characterization of the *Micrurus pyrrhocryptus* venom. *Toxicon* 53, 375-382.

Dores, R. M., Lecaude, S., Bauer, D., Danielson, P. B. 2002. Analyzing the evolution of the opioid/orphanin gene family. *Mass spectrometry reviews*, vol. 21, no 4, pp. 220-243.

Dufton, M.J. e Hider, R.C., 1983. Classification of phospholipases A₂ according to sequence. Evolutionary and pharmacological implications, *European Journal of Biochemistry* **137**, pp. 545–551.

Faure, G., Guillaume, J.L., Camoin, L., et al., 1991. Multiplicity of acidic subunit isoforms of crotoxin, the phospholipase A₂ neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom, results from posttranslational modifications, *Biochemistry* 30 (32) 8074-83.

Faure, G., Choumet, V., Bouchier, C., et al., 1994. The origin of the diversity of crotoxin isoforms in the venom of *Crotalus durissus terrificus*, *Eur J Biochem.* 223 (1) 161-4.

Francis, B. R., Williams, E.S., Seebart, C., Kaiser, I. I. 1993. Proteins isolated from the venom of the common tiger snake (*Notechis scutatus scutatus*) promote hypotension and hemorrhage. *Toxicon.* 31:447-458.

Francis, B. R., Jorge da Silva, Jr, N., Seebart, C., Casais e Silva, I. I., Schmidt, J. J., Kaiser, I. I., 1997. Toxins isolated from the venom of the Brazilian coral snake (*Micrurus frontalis frontalis*) include hemorrhagic type phospholipases A₂ and postsynaptic neurotoxins. *Toxicon.* 35:1193-1203.

Francis, B. R., Jorge da Silva, Jr, N., Kaiser, I.I. 1998. A new type of toxic snake venom phospholipase A₂ which promotes hypotension and hemorrhage in mice. In: *Enzymes from Snake Venom*. Bailey, S., Fort Collin: Alaken Inc, 481-502.

Goldberg, J. S. 2010. Stereochemical basis for a unified structure activity theory of aromatic and heterocyclic rings in selected opioids and opioid peptides. *Perspec. Med. Chem.* 4 (2010)1-10.

Goolcharran C, Borchardt RT. 1998. Kinetics of diketopiperazine formation using model peptides. *J Pharm Sci.* Mar;87(3):283-8.

Graham, R. L., Graham, C., Theakston, D. et al., 2008. Elucidation of trends within venom components from the snake families Elapidae and Viperidae using gel filtration chromatography, *Toxicon*, 51 121–129.

Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., Portilla, E., Cerdas, L., Rojas, E. 1983. Local effects induced by coral snake venoms: evidence of myonecrosis after experimental inoculations of venoms from five species. *Toxicon*. 26:777-783.

Gutiérrez, J.M., Rojas, G., Jorge da Silva, Jr., N., Núñez, J. 1992. Experimental myonecrosis induced by the venoms of South American *Micrurus* (coral snakes). *Toxicon*. 30: 1299-1302.

Gutstein, H. B. e Akil, Huda. Opioid Analgesics, In: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis Of Therapeutics. 11th. Ed, 2006. The McGraw-Hill Companies, Inc, New York.

Hughes J, Smith TW, Kosterlitz HW, Fothergill LA, Morgan BA, Morris HR. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature*. 1975 Dec 18;258(5536):577-80.

Herrero-Turrion, M. J. e Rodríguez, R. E. 2008. Bioinformatic analysis of the origin, sequence and diversification of μ opioid receptors in vertebrates. Original Research Article *Molecular Phylogenetics and Evolution*, Volume 49, Issue 3, December, Pages 877-892.

Jorge da Silva, N.Jr., Bucarechi, F. 2009. Mecanismo de Ação do Veneno Elapídico e Aspectos Clínicos dos Acidentes. In: Cardoso, J.L.C., França, F.O.S., Wen, F.H., Málaque, C.M.S., Haddad JR., V. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica, terapêutica dos acidentes. São Paulo :SARVIER, 2ª edição, pag. 116-122.

Jorge da Silva Jr.,n., Griffin, P.R., Aird, S.D., 1991. Comparative chromatography of Brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms. *Comp. Biochem. Physiol. B*. 100B:117-126.

Jorge da Silva Jr., N. e Sites, Jr.J.W. 1999. Revision of the *Micrurus frontalis* complex (Serpentes: Elapidae). *Herpetological Monographs*. 13:142-194.

Kanai, M., Takahashi, S., Kosaka, K. Iwao, K., Kobayashi, H., e Oka, T. 2002. [Met5]enkephalin-Arg-Gly-Leu-induced antinociception is greatly increased by peptidase inhibitors. *European Journal of Pharmacology* Volume 453, Issue 1, 18 October, Pages 53-58

Kane, B.E., Svensson, B., Ferguson, D.M. Molecular Recognition of Opioid Receptor Ligands. *AAPS Journal*. 2006; 8(1): E126-E137.

Kini, R.M. e Evans, H.J. 1987. Structure–function relationships of phospholipases: The anticoagulant region of phospholipases A₂. *J. Biol. Chem.* 262, pp. 14402–14407.

Kini, R.M. e Evans, H.J. 1989. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂, *Toxicon* 27 (1989), pp. 613–635.

Kini, R.M. e Evans, H.J. 1994. A common structural feature enclosing interaction sites: prediction of protein–protein interaction sites and development of potent bioactive peptides. In: J. Menon, Editor, *Current Topics in Peptide and Protein Research* vol. 1, Council of Scientific Information, Trivandrum, pp. 297–311.

Kini, R. M. 2003. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. *Toxicon* Volume 42, Issue 8, December, Pages 827-840.

Kini, R. M. 2006. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. *Biochem J.* 2006 August 1; 397(Pt 3): 377–387.

Kini, R.M., e Iwanaga, S. 1986a. Structure function relationships of phospholipases I: prediction of presynaptic neurotoxicity. *Toxicon* 24, pp. 527–541.

Kini, R.M., e Iwanaga, S. 1986b. Structure function relationships of phospholipases II: charge density distribution and the myotoxicity of presynaptically neurotoxic phospholipases. *Toxicon* 24, pp. 895–905.

Konno, K., Picolo, G., Gutierrez, V.P., et al., 2008. Crotalphine, a novel potent analgesic peptide from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*, *Peptides* 29 (2008) (8) 1293-304.

Krizaj, D. Turk, A. Ritonja e F. Gubensek, 1989. Primary structure of ammodytoxin C further reveals the toxic site of ammodytoxin. *Biochim. Biophys. Acta* 999, pp. 198–202.

Leão, L.I., Ho, P.L., Junqueira-de-Azevedo, I.L.M., 2009. Transcriptomic basis for an antiserum against *Micrurus corallinus* (coral snake) venom. *BMC Genomics* 10, 112.

Lomonte, B., Tarkowski, A., Hanson, L.A. 1993. Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells, and cytokine release in mouse mode. *Inflammation*. 17:93-105.

Magro, A. J., Soares, A. M., Giglio, J. R. e Fontes, M. R.M, 2003. Crystal structures of BnSP-7 and BnSP-6, two Lys49-phospholipases A2: quaternary structure and inhibition mechanism insights. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 311, 713–720

McCue, M. D. 2005. Enzyme activities and biological functions of snake venoms, *Appl. Herpetology*, 2 109-123.

Mebs, D., 1986. Myotoxic activity of phospholipase A2 isolated from cobras venoms: neutralization by polyvalent antivenoms. *Toxicon*. 24: 1001-1008.

Moraes, F.V., Sousa-e-Silva, M.C.C., Barbaro, K.C., Leitão, M.A., Furtado, M.F.D. 2003. Biological and immunochemical characterization of *Micrurus altirostris* venom and serum neutralization of its toxic activities. *Toxicon*. V. 41, p. 71-79.

Moreira, K.G., Prates, M.V., Andrade, F.A.C., Silva, L.P., Beirão, P.S.L., Kushmerick, C., Naves, L.A., Bloch Jr., C., 2010. Frontoxins, three-finger toxins from *Micrurus frontalis* venom, decrease miniature endplate potential amplitude at frog neuromuscular junction. *Toxicon*. 2010 Aug 1;56(1):55-63. Epub 2010 Mar 21.

Mortari, M. R., Cunha, A. O. S., Carolino, R. O. G., Coutinho Netto, J., Tomaz J.C., Lopes, N.P., Coimbra, N. C. , Santos, W. F. d. 2007. Inhibition of acute nociceptive responses in rats after i.c.v. injection of Thr6-bradykinin, isolated from the venom of the social wasp, *Polybia occidentalis*. *British Journal of Pharmacology*, v. 151, p. 860-869.

Mukherjee, A. K., 2007. Correlation between the phospholipids domains of the target cell membrane and the extent of *Naja kaouthia* PLA₂-induced membrane damage: Evidence of distinct catalytic and cytotoxic sites in PLA₂ molecules. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, Volume 1770, Issue 2, February, Pages 187-195.

Nawarak, J., Sinchaikul, S., Wu, C., et al. 2003. Proteomics of snake venoms from Elapidae and Viperidae families by multidimensional chromatographic methods, *Electrophoresis*, 24 2838–285.

Noda, M., Teranishi, Y., Takahashi, H., Toyosato, M., Notake, M., Nakanishi, S., Numa, S. 1982. Isolation and structural organization of the human preproenkephalin gene. *Nature*. Jun 3;297(5865):431-4.

Oka T e Hiranuma T., 1994. Almost complete protection of dynorphin-(1–8) hydrolysis in ileal and striatal membrane preparations by peptidase inhibitors. *Regulatory Peptides* Volume 53, Supplement 1, 21 February, Pages S121-S122

Olamendi-Portugal, T., Batista, C.V.F., Restano-Casulini, R., Pando, V., Villa-Hernandez, O., Zavaleta-Matínez-Vargas, A., Salas-Arruz, M.C., Veja, R.C.R, Becerril, B., Possani, L.D., 2008. Proteomic analysis of the venom from the fish eating coral snake *Micrurus surinamensis*: Novel toxins, their function and phylogeny. *Proteomics*. V. 8, p. 1919-1932.

Oliveira, D.A. Harasawa, C., Seibert, C.S., Casais e Silva, L.L., Pimenta, D.C., Lebrun, I. Sandoval, M.R.L. 2008. Phospholipases A2 isolated from *Micrurus lemniscatus* coral snake venom: Behavioral, electroencephalographic, and neuropathological aspects. *Brain Research Bulletin* 75 629–639.

Oliveira, J.S., Silva, A.R.B.P, Soares, M.B., Stephano, M.A., Dias, W.O., Raw, I., Ho, P.L. 2000. Cloning and characterization of an α -neurotoxin-type protein specific for the coral snake venom *Micrurus corallinus*. *Bioch. Bioph. Res. Comm.*, 267(3) 887:891.

Pardal, P.P.O.; Pardal, J.S.O.; Gadelha, M.A.C.; Rodrigues, L.S.; Feitosa, D.T.; Prudente, A.L.C. & Fan, H.W. 2010. Envenomation by *Micrurus* coral snakes in the Brazilian Amazon region: report of two cases. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 52(6): 333-7.

Possani, L.D., Alagón, A.C., Fletcher, P.I., Varela, M.J., Julia, J.Z., 1979. Purification and characterization of a phospholipase A2 from the venom of the coral snake, *Micrurus fulvius microgalbineus* (Brown and Smith). *Biochem. J.*, 179:603-606.

Pyron, R. A., Burbrink, F. T., Colli, G. R., et al. 2010. The phylogeny of advanced snakes (Colubroidea), with discovery of a new subfamily and comparison of support methods for likelihood trees, *Mol. Phyl. Evol*, 58 329–342.

Reinscheid, R.K., Nothacker, H.P., Bourson, A., Ardati, A., Henningsen, R.A., Bunzow, J.R., Grandy, D.K., Langen, H., Monsma, F.J. Jr., Civelli, O. 1995. Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. *Science*. Nov 3;270(5237):792-4.

Rosso, J.P., Vargas-Rosso, O., Gutiérrez, J.M., Rochat, H., Bougis, P.E. 1996. Characterization of α -neurotoxin and phospholipase A2 activities from *Micrurus* venoms and determination of the amino acid sequence of the major α -neurotoxin from *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus*. *Eur. J. Biochem.* 238:231-239.

Sanchez, E.F., Freitas, T.V., Ferrera-Alves, D.L., Velarde, D.T., Diniz, M.R., Cordeiro, M.N., Agostini-Cotta, G., Diniz, C.R. 1992. Biological activities of venoms from South American snakes. *Toxicon*. 30:95-103.

Savage, J.M. E Slowinski, J.B., 1992. The colouration of the venomous coral snake (family Elapidae) and their mimics (families Aniliidae and Colubridae). *Biological Journal of the Linnaean Society* 45:235-254.

Sebben, A., Neo, F. A., Nascimento, C. L. A., Brandão, R. A.; Duar, B. A. 1996. Cartilha de Ofidismo. Cobras do Distrito Federal e Entorno. Identificação, Prevenção de Acidentes e Primeiros Socorros. Editora Universidade de Brasília, Brasília. p.16.

Singh, G, Gourinath, S., Sharma, S., Paramasivam, M., Srinivasan, A., Singh, T.P., 2001. Sequence and crystal structure determination of basic phospholipase A₂ 93 from common krait (*Bungarus caeruleus*) at 2.4 Å resolution: identification and characterization of its pharmacological sites. *J Mol Biol.* V. 307, p. 1049-1059.

Singh, G., Gourinath, S., Sarvanan, K., Sharma, S., Bhanumathi, S., Betzel, C., Yadav, S., Srinivasan, A., Singh, T.P., 2005. Crystal structure of a carbohydrate induced homodimer of phospholipase A₂ from *Bungarus caeruleus* at 2.1 Å resolution. *J Struct Biol* 149: 264-272

Tsai, H.Y., Tsai, I.H. and Wang, Y.M. 2005. Characterization and sequencing of venom proteins of *Micrurus f. fulvius*. Biological Chemistry, Academia Sinica, P. O. Box 23-106, Taipei, Taiwan 10798, Republic of China

Tan, N.H. E Ponnudurai, G. 1992. The biological properties of venoms of some American coral snakes (Genus *Micrurus*). *Comp. Biochem. Physiol. B.* 101:471-474.

Troll, W., Cannan, K. 1953. A modified Photometric Nihydrin method for the analysis of amino and imino acids. *J. Biol. Chem.* 200: 803-811.

Valentin, E., Ghomashchi, F., Gelb, M.H., Lazdunski, M., Lambeau, G., 1999. On the diversity of secreted phospholipases A₂. Cloning, tissue distribution, and functional expression of two novel mouse group II enzymes. *J Biol Chem.* 1999 Oct 29;274(44):31195-202.

Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A.E., Berendsen, H.J. (2005). Gromacs: Fast, flexible, and free. *J Comput Chem* 26(16): 1701-1718

Vital Brazil, O., 1965. Ação neuromuscular da peçonha de *Micrurus*. *O Hospital.* 68:183-224.

Vital Brazil, O., 1987. Coral snake venom: mode of action and pathophysiology of experimental envenomation. *Rev. Ins. Med. Trop. São Paulo.* 29:119-126.

Vital Brazil, O. E. Vieira, R.N., 1996. Neostigmine in the treatment of snake accidents caused by *Micrurus frontalis*: report of two cases. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 38 (1):61-67.

Walthers, E. A. e Moore, F. L. 2005. Corresponding Author Contact Information Cloning proenkephalin from the brain of a urodele amphibian (*Taricha granulosa*) using a DOR-specific primer in a 3'RACE reaction. General and Comparative Endocrinology, Volume 142, Issue 3, July, Pages 364-370

Zhou, M., Peng, Z., Fives-Taylor, P. e Wu, Hui. 2008. A Conserved C-Terminal 13-Amino-Acid Motif of Gap1 Is Required for Gap1 Function and Necessary for the Biogenesis of a Serine-Rich Glycoprotein of *Streptococcus parasanguinis* {triangledown}. Infection and Immunity, December 2008, p. 5624-5631, Vol. 76, No. 12.