

Corpo Editorial

- Denise V. Tambourgi
- Matheus F. F. Pedrosa
- Gisele Picoli
- Luis R. C. Gonçalves
- Inácio L. M. J. Azevedo

Está é a 17ª Edição do Boletim Eletrônico da SBT_x.

Estamos de volta com notícias, artigos e informações sobre Toxinologia.

Contribuições e sugestões ao boletim serão sempre bem-vindas!

Abraços,

Denise, Matheus, Gisele, Luis e Inácio

NESTE VOLUME

- EDITORIAL
- COMENTÁRIO SOBRE TRABALHO DE IMPACTO EM TOXINOLOGIA
- APRESENTAÇÃO DE GRUPOS DE PESQUISA EM TOXINOLOGIA
- SBT_x JOVEM
- COMO CONTRIBUIR PARA O TOXINSIGHTS
- AGENDA DE EVENTOS

EDITORIAL

Prezados Colegas,

Nesta nova edição do nosso boletim, temos boas notícias para compartilhar. A SBTx participará, na XXXI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), que acontecerá em Foz de Iguaçu, de 29/08 a 01/09 de 2016. No evento, o Dr Luís Roberto de Camargo Gonçalves coordenará a conferencia que será ministrada pela Dra Maria Elisa Peichoto (INMeT, Argentina) sobre “Animais venenosos da Mata Atlântica do Alto Paraná: uma abordagem biotoxinológica”.

Neste novo volume do ToxInsights, temos a apresentação do grupo de pesquisa da Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo do Departamento de Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFSCar, discussão de artigo de pesquisa pelo Dr. Alexandre Keiji Tashima, Professor Adjunto do Departamento de Bioquímica da Escola Paulista de Medicina/UNIFESP, notícias da SBTx Jovem, bem como informações sobre eventos nacionais e internacionais.

Boa leitura!

Abraços,

Denise, Matheus, Gisele, Luís e Inácio

NOTAS DE IMPACTO

Comentário feito pelo Dr. Alexandre Keiji Tashima, Professor Adjunto do Departamento de Bioquímica da Escola Paulista de Medicina/UNIFESP sobre o artigo:

Mapping proteoforms and protein complexes from king cobra venom using both denaturing and native top-down proteomics

Melani RD, Skinner OS, Fornelli L, Domont GB, Compton PD, Kelleher NL.

Mol Cell Proteomics. 2016 – In Press. doi: 10.1074/mcp.M115.056523

Assim como as próprias serpentes, o nosso conhecimento sobre os venenos ofídicos evoluiu bastante, acompanhando o aprimoramento de técnicas analíticas ao longo das últimas cinco décadas. A caracterização dos venenos de serpentes era tradicionalmente realizada por técnicas cromatográficas de fracionamento, ensaios de atividades biológicas e detecção imunológica, passando posteriormente para o fracionamento de centenas de componentes proteicos por eletroforese bidimensional e identificação por espectrometria de massas, até chegar à técnica amplamente empregada atualmente, a abordagem de bottom-up proteomics. Nesta abordagem, amostras complexas de venenos são digeridas em solução e analisadas por espectrometria de massas para a identificação de toxinas em larga escala por meio da busca em bancos de dados, em geral transcriptômicos.

O trabalho que Melani e colaboradores publicaram recentemente na Molecular & Cellular Proteomics sobre o veneno da serpente *Ophiophagus hannah* (king cobra) adota uma outra linha metodológica para a caracterização das proteínas e peptídeos do veneno, a *top-down proteomics*, e representa um avanço importante para os estudos proteômicos de venenos de serpentes. Em estudos de bottom-up, as proteínas são digeridas por enzimas específicas para gerar vários fragmentos peptídicos por proteína. Os peptídeos geram espectros mais completos de fragmentação no espectrômetro de massas e por isso têm sua estrutura primária mais facilmente determinada. Frequentemente, espectros completos representando as estruturas primárias são obtidos. A desvantagem dessa metodologia surge quando isoformas ou proteoformas de proteínas são analisadas. Para essas isoformas, porções significativas das moléculas apresentam homologias. A menos que sejam identificados um ou mais peptídeos com aminoácidos ou modificações pós-traducionais em regiões que diferenciem essas isoformas, não é possível afirmar inequivocamente que determinada isoforma tenha sido identificada. Em se tratando de toxinas, diversas isoformas estão presentes nos venenos ofídicos.

Na análise top-down, é possível diferenciar as isoformas desde o início da análise por MS, pois as diferenças de massa entre as isoformas são observadas na molécula intacta e informações sobre a estrutura primária são obtidas da proteína precursora, e não a partir de seus peptídeos. No artigo publicado, os autores utilizaram a abordagem top-down em amostras de veneno, conseguindo identificar 184 proteínas e isoformas pertencentes a 14 famílias de proteínas. Para chegar a esse número, as proteínas do veneno foram fracionadas por eletroforese ou focalização isoelétrica em condições denaturantes e analisadas em espectrômetros de massa de alta resolução. O maior número de

identificações foi observado pelo fracionamento prévio por focalização isoelétrica, totalizando 131 proteínas.

Um outro aspecto tecnicamente interessante a respeito deste trabalho são as janelas de tolerância de massa utilizadas para a identificação. A maior parte das identificações (86%) foram obtidas a partir de buscas com altas tolerâncias de massas para as proteínas precursoras (2,5-2000 Da), o que foi necessário devido às largas distribuições isotópicas e sobreposições dos picos entre as diversas isoformas. Entre as identificações, 53 proteínas foram atribuídas a isoformas, sendo que o maior número de isoformas foi observado para toxinas da família *three-finger toxin* (3FTx), seguidas pelas famílias de fosfolipases A2 (PLA2), inibidores do tipo Kunitz e toxinas do tipo cysteine-rich secretory protein (CRISP). Aproximadamente 70% das isoformas eram originárias de modificações na estrutura primária ou de modificações pós-traducionais não relacionadas ao processamento proteolítico. A toxina com o maior número de variações foi a neurotoxina Oh-55, que apresentou cinco proteoformas. Uma delas apresentou sete mutações, porém em regiões não ligadas às funções neurotóxicas.

Para a análise de complexos proteicos (multímeros), os autores realizaram as análises top-down em condições não desnaturantes. Em condições nativas as diversas subunidades de complexos proteicos podem se manter agregadas por interações não covalentes. Através dessas análises, foram determinadas as estruturas homodiméricas de duas L-aminoácido oxidases (LAAO), uma PLA2 e uma CRISP, esta última observada pela primeira vez como uma estrutura dimérica. Os perfis e as possíveis estequiometrias de glicosilação de algumas toxinas também puderam ser observadas.

Análises pela metodologia bottom-up foram utilizadas para comparação, na qual uma digestão em solução do veneno bruto foi seguida por análises de LC-MS/MS e buscas em bancos de dados. Essas análises resultaram na identificação de 113 proteínas, representando 19 famílias de proteínas. Comparando-se os resultados com a análise top-down em condições desnaturantes, 18 proteínas a menos foram identificadas pela abordagem bottom-up. Porém, na abordagem bottom-up o veneno não foi submetido a fracionamentos prévios. É possível que se o veneno tivesse sido fracionado como nas análises top-down, um número maior de proteínas pudesse ter sido identificado.

No entanto, pelo fato de se poder resolver isoformas altamente similares, além de se caracterizar a estequiometria de modificações pós-traducionais e a estrutura quaternária de proteínas, a abordagem top-down representa um novo horizonte em estudos venômicos e abre a possibilidade de novos trabalhos relacionados à evolução molecular das toxinas através de suas proteoformas.

TIMES EM DESTAQUE

Grupo de pesquisa de matriz extracelular e câncer do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, São Carlos-SP

O grupo de pesquisa do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular – LBBM, coordenado pela Professora Doutora Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo, está situado no Departamento de Ciências Fisiológicas, no Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFSCar. O espaço conta com uma ampla infraestrutura, contendo um laboratório de microbiologia e um de bioquímica, equipados com cromatógrafos, espectrofotômetros, fluorímetros, dentre outros, permitindo estudos desde a clonagem expressão e purificação de proteínas recombinantes, bem como a realização de diversas técnicas de biologia molecular como SDS-PAGE, dosagem proteica, western blotting, qPCR e ELISA.

Além do laboratório de bioquímica, há alguns anos o grupo também tem tido forte participação em pesquisas envolvendo ensaios celulares *in vitro* e, para isso, conta com um laboratório de cultura celular completo equipado com um microscópio high content screening de fluorescência e citômetro de fluxo, que auxiliam na geração de dados robustos e confiáveis.

O objetivo do LBBM é pesquisar o papel de desintegrinas recombinantes e nativas na progressão tumoral. O estudo dos efeitos nas interações célula - matriz extracelular (MEC) por meio de desintegrinas, derivadas de veneno de serpente, pode proporcionar o desenvolvimento de inibidores de integrinas para a prevenção de metástases. As desintegrinas são pequenas proteínas com elevada afinidade por integrinas, que por sua vez são receptores heterodiméricos de adesão celular. Quando as integrinas são bloqueadas por inibidores, a célula não consegue aderir à matriz extracelular, permanecendo em suspensão e eventualmente entrando em apoptose. É fácil entender então porque as integrinas se tornaram alvos farmacológicos na prevenção de metástases. Uma célula tumoral circulante que não consiga aderir a um novo sítio, deve provavelmente morrer por apoptose, evitando-se assim a metástase. As integrinas são fundamentais também em outro processo celular muito importante para a formação de metástases: a migração celular. Na presença de desintegrinas, as células perdem a capacidade de se movimentarem em direção a um estímulo e podem ficar “girando em círculos”.

Nesse contexto, o laboratório registrou a patente da desintegrina nativa alternagina-C (ALT-C) devido ao seu potencial regenerativo e anti-metastático dependente da concentração. Foi verificado que a ALT-C inibe a adesão ao colágeno tipo I via integrina $\alpha_2\beta_1$ em várias linhagens celulares. Nosso laboratório demonstrou também que a interação da desintegrina recombinante DisBa-01 (*Disintegrin of Bothrops alternatus*) com a integrina $\alpha_v\beta_3$ inibe, em linhagens celulares tumorais e não tumorais, a adesão a componentes da MEC, a migração celular, assim como a metástase de melanoma pulmonar *in vivo*. Além disso, essas desintegrinas estudadas modulam a expressão de genes relacionados à angiogênese em células endoteliais.

O LBBM tem como missão formar pós-graduandos e graduandos com conhecimento integrado desde estudos moleculares e proteômicos até a investigação dos efeitos celulares das desintegrinas. Nossa conduta visa contribuir com a sociedade por meio de publicações e informações ao público sobre venenos como fonte de novos inibidores para o tratamento de doenças.

Desta forma, as principais linhas de pesquisa do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular são:

- Biologia celular e molecular de desintegrina;
- Estudo da interferência de desintegrinas derivadas de venenos de serpentes na adesão, migração celular e angiogênese;
- Matriz extracelular e o microambiente tumoral;
- Procura de novos alvos moleculares e desenvolvimento de novos fármacos para a prevenção de metástases tendo como base as interações célula - matriz extracelular;

Atualmente o laboratório é integrado por um Pesquisadora responsável e Professora Titular do Departamento de Ciências Fisiológicas, um Pós-Doutorando, três alunos de Doutorado, dois de Mestrado e dois de Iniciação Científica. Os projetos contam com financiamento de diferentes agências de fomento, incluindo Fapesp, Capes e CNPq.



Equipe do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBBM), UFSCar. Na foto, da esquerda para a direita, Karoline (Iniciação Científica), Milene (Doutoranda), Rafael (Mestrando), Tais (Doutoranda), Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo (Líder do Grupo), Patty (Doutoranda), Bruna (Mestranda), Tayná (Iniciação Científica), Wanessa (Pós-Doutoranda) e Anelyse (Iniciação Científica).

SBTx JOVEM



Junho 2016 – nº 17

Atualidade: Bioengenharia para superar resistência à toxinas

Toxinas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis* ligam os receptores das células de intestino de insetos, causando lise celular e morte do animal. Estas toxinas foram transfectadas para plantas para uso como inseticida, e estão sendo utilizadas mundialmente desde 1996. Porém os insetos desenvolveram resistência rapidamente via mutação, deleção ou regulação negativa dos receptores alvos. Badran et al. (2016) descreveram a utilização de um método de mutação direcionada das toxinas via evolução contínua assistida por fagos (*Phage-assisted continuous evolution* - PACE) para ultrapassar as barreiras da resistência.

A metodologia PACE foi desenvolvida pelo grupo do Professor David Liu (da Universidade de Harvard) e permite a realização de experimentos de evolução de proteínas em um curto espaço de tempo. O método desenvolvido por Liu e colaboradores utiliza bacteriófagos M13 como carreadores da biblioteca ou gene de interesse, os fagos utilizados nesta técnica não apresentam o gene III para transmissão vertical (responsável pela produção da proteína III que é essencial para a produção de fagos aptos para a infecção). O gene da proteína III é inserido em um plasmídeo contendo o gene da luciferase para a expressão da quimera proteína III-luciferase (denominado AP) e células de *E. coli* são então transformadas com este plasmídeo (AP) e outro denominado MP (Plasmídeo de mutagênese). O plasmídeo MP contém produtos que elevam a taxa de erro na replicação do DNA inibindo as vias de reparo.

A população de fagos contendo a biblioteca ou gene de interesse é mantida em um recipiente de volume fixo (denominado “lagoa”) sobre o qual um fluxo de células de *E. coli* irá passar. A seleção da atividade de interesse será feita por intermédio da expressão da proteína III, e apenas os fagos que contenham uma biblioteca de interesse ativa (ou seja, com alguma proteína com a atividade desejada) acionarão a expressão da proteína III e irão produzir bacteriófagos aptos a infectar novas células. Adicionalmente a taxa de expressão da proteína III é relacionada com a taxa de produção de fagos infecciosos, genes que resultam em uma elevada ativação da expressão da proteína III irão infectar mais células do que as demais sequências. Na saída do fluxo de células, após a lagoa, um monitor de luminescência acompanhará a ativação da produção de proteína III-luciferase nas células de *E. coli*, o que permite avaliar o processo de evolução do gene de interesse. Devido ao curto ciclo de vida dos bacteriófagos a metodologia garante a seleção por muitas gerações em um único dia.

Assim, a aplicação desta metodologia permitiu o desenvolvimento de toxinas modificadas que conservam sua especificidade de ação e superam a resistência dos insetos à toxina natural, pelo menos até eles desenvolverem estratégias de resistência via mutações, para este novo receptor.

Para saber mais: (Nature 533, 39–40, 05 May 2016)

<http://www.nature.com/nature/journal/v533/n7601/full/nature17938.html>

<http://www.nature.com/nature/journal/v533/n7601/full/nature17893.html>

Participe do próximo boletim: sugestões de temas
sbtxjovem@butantan.gov.br



sbtx.org.br / (11) 2627-9427
www.facebook.com/pages/SBTx

Fique Ligado!

✓ **Curso de Formação de Controladores de vetores e pragas urbanas – 06-08/07/2016**
www.aprag.org.br

✓ **I Workshop de Biodiversidade Aquática – 30/06 a 01/07/2016**
<http://www.clp.unesp.br/#!/workshop-biodiversidade-aquatica/apresentacao/>

✓ **41º Congresso da FEBS 2016 – 03-08/09/2016**
<https://www.febs2016.org/bursaries>

✓ **45º Reunião Anual da SBBq 2016 – 18-21/06/2016**
<http://www.sbbq.org.br/reuniao/2016/>

BOLETIM ELETRÔNICO

Conteúdo e como contribuir com material para divulgação

Com o objetivo de criar um veículo de comunicação rápida e objetiva com seus sócios, a SBTx publica o boletim informativo ToxInsights que é enviado trimestralmente a cada sócio por email. Gostaríamos de contar com ampla contribuição dos sócios da SBTx para compor os seguintes conteúdos do Boletim:

- **Times em Destaque:** Apresentação de grupos de pesquisa em Toxinologia. Deverá conter a descrição do grupo, linhas de pesquisa e principais contribuições (máximo de 300 palavras; nomes dos componentes do grupo; foto do grupo; informações para contato). Solicitamos que os grupos enviem informações para sbtx@butantan.gov.br;

- **Notas de Impacto:** Comentário por um especialista sobre um ou dois trabalhos recentes publicados em Toxinologia (máximo de 1000 palavras para cada trabalho). Solicitamos que os interessados em redigir comentários sobre publicações recentes e relevantes na área, que foram publicadas por outros pesquisadores, enviem suas propostas para sbtx@butantan.gov.br;

- Anúncios de eventos;

- Anúncios de patrocinadores.

AGENDA DE EVENTOS

CONGRESSOS E CURSOS INTERNACIONAIS

68ª Reunião Anual da SBPC

Julho, 3 a 9, 2016

Porto Seguro, BA

<http://www.sbpcnet.org.br/portoseguro/home/>

Gordon Research Conference - Microbial Toxins & Pathogenicity

Julho, 10-15, 2016

Waterville Valley, NH, EUA

<https://www.grc.org/programs.aspx?id=11641>

XXXI Reunião Anual da FeSBE

Agosto, 29 a 1º de setembro de 2016

Foz do Iguaçu, PR

<http://fesbe2016.fesbe.org.br/>

Venoms 2016: Making sense of venoms in health and disease

Setembro, 05-06, 2016,

St Hilda's College, Oxford, Reino Unido

<http://lpmhealthcare.com/venoms-2016>

12th Congress of the Pan-American Section of the International Society on Toxinology

Setembro, 18 a 23, 2016

Miami Beach, FL, EUA

<http://www.ist2016.com/>

10th International Conference on Toxic Cyanobacteria

Outubro, 23-28, 2016

Wuhan, China <http://www.ictc10.org/dct/page/1>