

## Corpo Editorial

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

*Está é a 18ª Edição do Boletim Eletrônico da SBTx.*

*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
- SBTx JOVEM
- COMO CONTRIBUIR PARA O TOXINSIGHTS
- AGENDA DE EVENTOS

## EDITORIAL

---

Prezados Colegas,

Neste boletim, compartilhamos mais algumas informações do universo da Toxinologia. Aconteceu no fim de setembro o XII Congresso da Seção Pan-Americana da Sociedade Internacional de Toxinologia (IST), realizado em Miami Beach, EUA. O Congresso contou com forte presença de brasileiros (ao menos 28, vide foto) que apresentaram desde pôsteres e comunicações rápidas até conferências plenas em diversas temáticas.

Aproveitamos para lembrar que foi convocada a Assembleia Geral Ordinária da SBTx, que será realizada no dia 31 de outubro de 2016 (segunda-feira), das 14h30 às 16h, no Instituto Butantan. Contamos com a presença dos sócios!



Foto do grupo de brasileiros presente no jantar comemorativo do Congresso Pan-Americano de Toxinologia.

## NOTAS DE IMPACTO

Comentário feito pelo Dr. Stephan Mackessy, professor da School of Biological Sciences, University of Northern Colorado, sobre seu próprio artigo:

### **Full-Length Venom Protein cDNA Sequences from Venom-Derived mRNA**

Cassandra M. Modahl & Stephen P. Mackessy

*PLoS Neglected Tropical Diseases* 10(6): e0004587.

Determining the sequence of snake venom protein and peptide toxins is a necessary component of many studies in toxinology, and this was accomplished historically using N-terminal sequencing (Edman degradation) of intact proteins and peptide fragments. This laborious and costly procedure was largely displaced by many PCR-based molecular tools, allowing the rapid sequencing of complete toxin genes and then inferring protein sequences. Near complete transcriptomes of venom gland proteins are now routinely constructed (e.g., Junqueira-de-Azevedo et al. 2006; Pahari et al. 2007), but these typically require sacrifice of animals, removal of glands and isolation of mRNA. In 2002, Chen et al. demonstrated that mRNAs were present in crude venoms, but this approach seems to have generated limited attention. My lab, along with others, attempted replicating their results the next year, but our results were disappointing at best and we did not pursue it further at that time. Over the next ten years, very few papers were published using this technique, suggesting that our early experience was not unique.

Several years ago, one of my outstanding PhD students, Cassandra Modahl, re-examined the use of venoms as a source of mRNA, and she began to generate complete transcripts of specific venom protein family representatives, particularly viperid PLA<sub>2</sub>s. Her initial successes were encouraging, and she developed this technique as an integral part of her dissertation research. The end result of this project was published earlier this year (Modahl and Mackessy 2016) and demonstrates that most, if not all, mRNAs for expressed venom proteins are present in the crude venoms and can be used to obtain transcript sequences (and therefore protein sequences). mRNA can be obtained from as little as 2 mg lyophilized venom or 100 µL fresh venom; some of the more salient points of this work are discussed here.

Like Chen et al. (2002), we were motivated by a desire to be able to continue sampling venom from rare or hard to obtain specimens, precluded by standard transcriptome approaches, and still obtain sequences without resorting to protein sequencing. Early experiments were aimed at determining parameters necessary for successful isolation and amplification of mRNAs. From multiple alignments of known venom toxins, Cassie designed degenerate sense primers targeting highly conserved signal peptide/5'UTR regions for five major protein toxin families (3FTx, PLA<sub>2</sub>, CTL, SVSP, SVMP). It soon became clear that mRNA levels were very low, regardless of isolation method; however, TRIzol isolation yielded the highest and most consistent levels. The previously published method, using Dynabeads, which should isolate only mRNAs (rather than total RNA), resulted in exceptionally low amounts of mRNA and did not yield successful amplifications. In addition, it should be noted that Nanodrop determination of yields typically greatly overestimated yields, often by several orders of magnitude (compared to Qubit based estimates). Isolated mRNA was then reverse-transcribed into cDNA (using 3' RACE), ligated into a vector system and transformed into *E. coli*; three to 18 colonies were then picked and sequenced using “old school” Sanger sequencing. Both fresh and lyophilized venom produced amplifiable yields of specific toxin cDNAs: as little as 10 µL fresh venom or 1 mg lyophilized venom was sufficient. mRNA in venom appears to be exceptionally stable – complete PLA<sub>2</sub> transcripts were obtained

from 20 year old lyophilized and from 8 year old air-dried rattlesnake venoms. As proof of concept, many of the PLA<sub>2</sub> sequences obtained were identical to previously published sequences, including those for Mojave toxin subunits A and B. Buoyed by her successes with *Crotalus* venoms, I encouraged Cassie to explore venoms from other snake families. Sequences were soon obtained for many rear-fanged “colubrid” three finger toxins, elapid PLA<sub>2</sub>s and a “colubrid” SVMP, demonstrating that these venoms also contain stable mRNAs and that expressed protein sequences can be obtained from their venoms.

At about the same time as we were exploring venoms as a source of mRNA, Rob Harrison and colleagues were doing the same at the Liverpool School of Tropical Medicine. These two independent efforts coincided at the 2015 IST World Congress in Oxford, England on September 2015, where we gave back-to-back presentations of our work. Our papers were published in the same issue of the journal PLoS NTD earlier this year (Modahl and Mackessy, 2016; Whitely et al., 2016). As their title suggests, one major focus was stabilization of venom mRNA under various conditions; interestingly, amplifications of mRNA from lyophilized venoms gave very low yields, whereas we were able to obtain significant amounts of amplicons from fresh venoms as well as lyophilized and desiccated venoms, several of which were decades old. The reason for these differences is not immediately clear, but it may have to do with the different species analyzed and the different amplicons produced. As in our study, several toxins amplified showed a high degree of sequence identity to known toxins from the same venoms. Both studies obtained sequences from elapid and viperid venoms, but we also were able to obtain sequences from numerous rear-fanged snakes.

It is clear from these and several other studies that snake venoms contain small amounts of mRNAs that are coding for expressed proteins, and that these transcripts can be isolated and sequenced to obtain sequence information about expression patterns of venom proteins in all of the major clades of venomous snakes. A logical next question is whether or not this material is suitable for next-generation sequencing technologies, which can allow entire transcriptomes to be obtained in a single (larger) experiment. Our initial results suggest that the answer to this question is a qualified “Yes”; the methods described here *do not* transfer seamlessly to next-gen techniques, as a manuscript currently in review indicates (Modahl et al., 2016; in review). However, given the rapid progress in sequencing technologies in general, we are hopeful that present limitations can be soon overcome.

So will venom-based isolations of mRNA replace current gland-based methods for obtaining transcript/cDNA sequences of venom proteins? It seems unlikely at present, because as both studies have demonstrated, venom mRNA yields are *much* lower when compared with venom gland yields, and this may cause serious limitations. However, in cases where animal sacrifice is not desirable or possible, or when *only* venom is available, venom mRNA represents a viable alternative that can be used to obtain reliable sequence data that in turn can be used in evolutionary studies and to support proteomic studies. In addition, venom-derived sequences can be used in studies of genotype-phenotype relationships, using materials derived from the same individual and over different time points, for example, in evaluating ontogeny of venom phenotypes. Further, it may not be desirable for the entire venom gland transcriptome to be sequenced, if one is interested in only one to several venom protein families. We demonstrated that obtaining most expressed isoform variants of a protein family may be possible without sequencing a large number of clones, decreasing overall costs and reducing time-consuming data analyses, because Sanger sequencing routinely results in read lengths of 700+ bp; for smaller toxins with many closely related isoforms, some of which may have drastically different pharmacologies based on a small number of sequence differences (i.e., 3FTxs), this approach is ideal. This approach is also feasible for smaller labs/institutions that lack large core facilities, as all steps except final sequencing can be conducted using a minimum of specialized larger equipment. DNA sequencing services are now widely available and are inexpensive, allowing researchers to obtain significant data sets on a minimal budget.

A final question is the source of mRNA in the venom. Because venom glands are essentially closed systems, and because dead/apoptotic cells are shed into the lumen, loss from disrupted cells (rather than co-secretion with exocytosed venom proteins) seems a likely source. We compared mRNA yields from crude venom as extracted from the snake and crude venom centrifuged at 10k x g to pellet insoluble materials (cell debris, etc.), and no difference in yields was noted. However, anecdotally we note that larger snakes (with concomitant larger glands) seem to give better mRNA yields, and this is consistent with the idea that mRNA accumulates as cells die/are shed into the gland lumen. Regardless of how the mRNA ends up in the venom, the fact that it is stable over years, even in the presence of endogenous venom nucleases, is remarkable, and it provides us a convenient tool for obtaining venom protein sequences.

## References:

- Chen TB, Bjourson AJ, Orr DF, Kwok H, Rao PF, Ivanyi C, Shaw C. 2002. Unmasking venom gland transcriptomes in reptile venoms. *Analytical Biochemistry* 311(2):152–156.
- Junqueira-de-Azevedo IL, Ching AT, Carvalho E, Faria F, Nishiyama MY Jr., Ho PL, Diniz MR. 2006. *Lachesis muta* (Viperidae) cDNAs reveal diverging pit viper molecules and scaffolds typical of cobra (Elapidae) venoms: Implications for snake toxin repertoire evolution. *Genetics* 173:877-889.
- Modahl CM, Mackessy SP. 2016. Full-length venom protein cDNA sequences from venom-derived mRNA: Exploring compositional variation and adaptive multigene evolution. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10(6): e0004587.
- Pahari S, Mackessy SP, Kini RM. 2007. The venom gland transcriptome of the Desert Massasauga Rattlesnake (*Sistrurus catenatus edwardsii*): Towards an understanding of venom composition among advanced snakes (superfamily Colubroidea). *BMC Molecular Biology* 8:115.
- Pook CE, McEwing R. 2005. Mitochondrial DNA sequences from dried snake venom: A DNA barcoding approach to the identification of venom samples. *Toxicon* 46(7):711–715.
- Whiteley G, Logan RAE, Leung K-Y D, Newberry FJ, Rowley PD, Dunbar JP, Wagstaff SC, Casewell NR, Harrison RA. 2016. Stabilising the integrity of snake venom mRNA stored under tropical field conditions expands research horizons. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10(6): e0004615.

## TIMES EM DESTAQUE

### **Grupo de Genômica e Proteômica do Laboratório Especial de Toxinologia do Instituto Butantan, São Paulo–SP**

Apresentamos o Grupo de Genômica e Proteômica do Laboratório Especial de Toxinologia do Instituto Butantan, liderado pelos pesquisadores Inácio Junqueira de Azevedo e Solange Serrano. O grupo formou-se pela afinidade natural das linhas de pesquisa desses pesquisadores, envolvendo ciências "ômicas", que gradualmente passaram a se complementar nos estudos de venenos de animais peçonhentos. Com a formação do Centro de Toxinas, Resposta Imune e Sinalização Celular (CeTICS), um dos CEPIDs (Centros de Pesquisa, Inovação e Difusão) financiados pela FAPESP, a associação dos dois grupos de pesquisa se consolidou no mesmo ambiente, permitindo olhares mais completos sobre projetos já em execução.

A história dessa união teve origem na percepção de um foco convergente e complementar nas pesquisas de ambos os grupos, que consistia no interesse em caracterizar a composição de venenos ofídicos em larga escala. Já no início dos anos 2000, o primeiro trabalho de transcriptômica de glândulas de veneno de uma serpente fora realizado, no qual o perfil de transcritos expressos nas glândulas de *Bothrops insularis* indicou a potencialidade desse tipo de abordagem para descrever os possíveis componentes de veneno (Junqueira de Azevedo et al., 2002). Ao mesmo tempo, os avanços nos instrumentos de espectrometria de massas e nas técnicas de separação de proteínas começavam a permitir estudos mais diretos acerca do conteúdo global de toxinas nos venenos. Nesse contexto, o grupo de proteômica realizou uma série de estudos proteômicos sobre venenos das serpentes do gênero *Bothrops* (Paes Leme et al., 2009; Zelanis et al., 2010, 2011, 2012, 2016; Tashima et al., 2012; Dias et al., 2013; Andrade-Silva et al., 2016). A prática nos mostrou então que a transcriptômica poderia ser muito beneficiada pela corroboração de alguns de seus achados por meio da identificação proteica permitida pela espectrometria de massas; por outro lado, ficou evidente que esta última era totalmente dependente de uma boa base de dados de sequências para poder permitir as identificações.

A combinação transcrito-proteína passou então a ser aplicada para descrição de venenos completamente desconhecidos, como os das serpentes colubrídeas (família Dipsadidae), levando a descoberta de novas classes de componente de venenos. Como exemplos temos a caracterização das secreções de *Philodryas olfersii* (Ching et al., 2006), de *Thamnodynastes strigatus* (Ching et al., 2009) e mais recentemente o estudo multiômico de *Phalotris mertensi* (Campos et al., 2016).

A partir desses estudos de composição, os objetivos do grupo evoluíram para focar em diversos outros aspectos da toxinologia, como o entendimento da complexidade dos venenos, das suas variações ontogenéticas, da evolução de suas toxinas e da regulação da produção de veneno nas glândulas de veneno. Também passaram a ser abordados estudos sistêmicos dos efeitos de venenos em modelos animais e celulares, incluindo análises degradômicas e de expressão diferencial (RNAseq). Hoje temos como projetos principais em desenvolvimento no laboratório, na área toxinológica:

- 1) Transcriptômica de serpentes dipsadíneas do grupo “goo-eaters”;
- 2) Transcriptômica de aracnídeos;
- 3) Sequenciamento genômico de serpentes do gênero *Bothrops*;
- 4) Estudo do papel da diversificação dos venenos no processo de especiação de serpentes do Novo Mundo;
- 5) N-terminômica de venenos do gênero *Bothrops*;
- 6) Glicoproteômica e glicômica de venenos do gênero *Bothrops*;
- 7) Toxigenômica do envenenamento por *Micrurus corallinus*;
- 8) Degradoma de substratos das proteinases HF3 e PA-BJ.

Atualmente, além dos pesquisadores líderes, o grupo é composto por pesquisadores associados do CeTICS (Leo Iwai, Milton Nishiyama Jr e Marcelo Reis), alunos de mestrado, de doutorado, pós-doutorandos, e técnicos (vide foto). Sendo parte do CeTICS, o grupo de Genômica e Proteômica frequentemente realiza processos seletivos para recrutamento de alunos de pós-graduação e de pós-doutores. Os pesquisadores orientam no Programa de Pós-Graduação em Toxinologia do Instituto Butantan, além de programas da Universidade de São Paulo, como o de Biotecnologia e de Bioquímica. O laboratório possui ainda uma completa infraestrutura tanto para análise proteômica como para análises transcriptômicas e genômicas, não apenas de venenos mas também de outros alvos de pesquisa. Assim, realizamos estudos em colaboração dentro das nossas áreas de atuação, e estamos sempre abertos a discutir projetos para aprofundar nosso conhecimento sobre toxinas animais e biologia geral.



Pesquisadores, pós-doutorandos, alunos e técnicos do grupo de Genômica e Proteômica do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada, Instituto Butantan: Carolina Brás, Vincent Vialla, Milene Menezes, Ana Pagotto, Bruno Souza, Paloma Lima, Ursula Oliveira, Felipe Grazziotin, Débora Andrade-Silva, Andrea Camarano, Solange Serrano, Nancy Ros, Pollyanna Campos, Eduardo Kitano, Ismael Lima, Inácio Junqueira de Azevedo, Milton Nishiyama, Diego Dantas, Leo Iwai e Eric Gren (da esquerda para a direita).

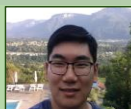
## SBT<sub>x</sub> JOVEM



### SBTx Jovem

Boletim setembro/2016

#### Apresentação dos novos membros



##### Alexandre Kazuo Kuniyoshi (Presidente)

Biólogo, Mestre em Ciências, doutorando pelo programa em Biotecnologia da USP e desenvolvendo suas atividades no Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan, com ênfase em proteínas e peptídeos de venenos animais.

##### Daniela Cajado Carvalho (Vice-Presidente)

Bióloga, Mestre em Ciências e doutoranda do programa Biotecnologia (USP). Atualmente desenvolve suas atividades no Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan, sob a orientação da Dra. Fernanda C.V. Portaro no estudo de proteases do veneno do escorpião amarelo *Tityus serrulatus*.



##### Bruno Duzzi (Secretário)

Possui graduação em Farmácia e Bioquímica, Mestrado em Biotecnologia (USP) e cursando o Doutorado em Biotecnologia (USP). Trabalha com peptídeos oriundos da peçonha do escorpião *Tityus serrulatus* capazes de interagir com proteases de importância médica. Desenvolve seu projeto no Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan.

##### Juliana Félix da Silva

Possui graduação em Farmácia e Mestrado em Ciências Farmacêuticas pela UFRN. Atualmente é aluna de Doutorado em Bioquímica pela mesma instituição, no Laboratório de Tecnologia & Biotecnologia Farmacêutica. Tem experiência nas áreas de Toxinologia, Enzimologia e na avaliação e caracterização de atividades biológicas de produtos naturais.



##### Felipe Silva de França

Graduado em Ciências Biológicas e aprimorado em Imunologia pelo Instituto Butantan. Atualmente é doutorando em Imunologia pelo Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e desenvolve seu projeto de pesquisa no Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan. Possui experiência em Imunoquímica e atua investigando os eventos inflamatórios envolvidos nos envenenamentos por serpentes.

##### Maria Andrea Camarano Eula

Química Farmacêutica e doutoranda do programa de Pós-Graduação em Ciências - Toxinologia do Instituto Butantan. Atualmente desenvolve suas atividades no Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantan, sob a orientação do Dr. Inácio L.M.J. de Azevedo e a Dra. Solange M. T. Serrano no estudo dos efeitos do envenenamento por *Micrurus corallinus* em um modelo murino.



#### Propostas da Nova Gestão

Nossa maior meta para esta gestão é aumentar a divulgação sobre os diferentes aspectos da vida dos jovens toxinologistas espalhados pelo Brasil. Para isso, pretendemos investir na criação e manutenção de canais de comunicação social onde divulgaremos eventos, cursos e trabalhos na área da Toxinologia, além de dicas para quem está entrando agora nesse vasto universo. Precisamos da sua ajuda! Curta a página da SBT<sub>x</sub> no Facebook e deixe os seus comentários. Em breve, pretendemos também divulgar e te ouvir pelo Instagram e pelo Twitter!

#### Fique Ligado!!!

- |                                                                                                   |                                                                                                  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ❑ XLI Congress of the Brazilian Society of Immunology - Campos do Jordão-SP<br>29/10 a 02/11/2016 | ❑ I Simpósio em Biologia Estrutural e Funcional: da Forma a Função - Natal-RN<br>01 a 02/12/2016 |
| ❑ VII Proteomics Workshop - LNBio - Campinas-SP<br>08 a 09/11/2016                                | ❑ II International Symposium on Pathophysiology and Toxicology - São Paulo-SP<br>07 a 08/12/2016 |
| ❑ Reunião Regional da SBBq – Fortaleza-CE<br>27 a 30/11/2016                                      | ❑ III Curso de Verão de Farmacologia do PgPNSB - CCS - UFPB - João Pessoa-PB<br>22 a 31/01/2016  |
| ❑ Reunião Científica Anual 2016 do Instituto Butantan - São Paulo-SP<br>30/11 a 02/12/2016        |                                                                                                  |

## 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](mailto: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](mailto:sbtx@butantan.gov.br);

- Anúncios de eventos;

- Anúncios de patrocinadores.

## AGENDA DE EVENTOS

---

### CONGRESSOS E CURSOS INTERNACIONAIS

**Simpósio Internacional Sobre Cobras-Corais**

Outubro 17-21, 2016

<http://sites.pucgoias.edu.br/eventos/isc/>

**10th International Conference on Toxic Cyanobacteria**

Outubro, 23-28, 2016

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