

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**ESTUDO DOS COMPONENTES PROTÉICOS DA PEÇONHA
DA SERPENTE *Micrurus frontalis* (SERPENTES:
ELAPIDAE)**

KARLA GRAZIELLA MOREIRA

**Brasília – DF
2010**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**ESTUDO DOS COMPONENTES PROTÉICOS DA PEÇONHA
DA SERPENTE *Micrurus frontalis* (SERPENTES:
ELAPIDAE)**

KARLA GRAZIELLA MOREIRA

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 – DF
2010

**À minha mãe,
Fonte de persistência, apoio e amor.**

**“A verdadeira viagem de descobrimento
não consiste apenas em procurar novas
paisagens, e sim em ter novos olhos.”**

Marcel Proust

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo carinho, preocupação e apoio em todos os momentos da minha vida. À minha querida mãe, pelos valiosos ensinamentos a respeito da vida e dedicação, respeito e inesgotável amor.

Ao Carlos Bloch Jr., pela confiança, pelo apoio, ensinamentos (não apenas científicos) e amizade. Obrigada também pelos momentos de silêncio, que tanto me fizeram refletir sobre o que sou e o que quero e também, pelos deliciosos cafezinhos.

À Maura Viana Prates pelas orientações, sugestões, confiança e inestimável amizade.

À Profa. Lígia Naves e ao Prof. Paulo Sérgio Beirão, da Universidade Federal de Minas Gerais, pela importante contribuição nos testes biológicos e por todo auxílio e dedicação na escrita do artigo e tese.

Ao Luciano Paulino pela amizade, apoio, críticas, sugestões e ajuda nos experimentos.

Ao Dr. Nelson Jorge da Silva Jr., grande culpado pelo meu interesse no veneno de *Micrurus*.

À Marta Regina, companheira de viagem GYN-BSB, sou grata pela importante amizade e carinhoso apoio. Obrigada por gentilmente extrair e ceder os venenos de *Micrurus frontalis*.

Ao Dr. Richard Valente por algumas análises de espectrometria de massa realizadas na Fiocruz.

Aos colegas do Laboratório de Espectrometria de Massa, Guilherme, Mariana, Nathy, Kelliane, Jorge Alex, Flávio, Daniel, Ana Carolina, Luisa Geraldine, Lindomar, Eder, Tatiane, Marcelo, Saulo, Caroline, Beatriz e Steffan por tornarem o laboratório um ambiente agradável e divertido.

À Fabyola Amanda do Laboratório de Eletrofisiologia Celular da Universidade Federal de Minas Gerais, por toda dedicação e comprometimento na execução dos testes eletrofisiológicos.

À Mari Quezado, grande amiga de todas as horas boas e ruins. Obrigada pelo carinho, pela força, apoio, paciência, festinhas e puxões de orelha.

À Rachel Sampaio, pela enorme amizade, carinho e momentos de descontração. Obrigada também por me ajudar durante alguns experimentos “fornecendo” alguns itens.

À Nathália Carolina pela grande amizade e importantes conversas de cunho nada científico.

Aos amigos Simone, Marcos, Bruno, Cláudia, Rosinha e Ricardo pelo constante e carinhoso apoio apesar da distância.

Ao meu querido Luís Henrique, pelo apoio, companheirismo, carinho, paciência quase inesgotável, compreensão, ombros e ouvidos. Obrigada por estar presente nos bons e difíceis momentos.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) – Recursos Genéticos e Biotecnologia por permitir o uso de suas instalações.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE AMINOÁCIDOS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Serpentes e venenos	1
1.2. Composição dos venenos	3
1.2.1. Toxinas de Três-dígitos.....	4
1.2.2. Fosfolipases do tipo A2 (PLA2).....	9
1.2.3. Proteases	10
1.2.4. L-Aminoácido Oxidase (LAAO).....	11
1.2.5. Fator de crescimento neural (NGF).....	11
1.2.6. Peptídeos natriuréticos	12
1.2.7. Snacles (Snake venom C-type lectins).....	12
1.2.8. Waprinas	13
1.3. Gênero <i>Micrurus</i>	13
1.4. <i>Micrurus frontalis</i>	19
2. OBJETIVOS.....	21
2.1. Objetivo Geral	21
2.2. Objetivos Específicos	21
3.MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1. Veneno.....	22
3.2. Purificação	22
3.3. Análise da massa molecular.....	23

3.4. Quantificação dos resíduos de cisteína	24
3.5. Tratamento enzimático	24
3.6. Sequenciamento da Estrutura Primária.....	25
3.6.1. Degradação de Edman	25
3.6.2. <i>De novo</i>	26
3.7. Análise das sequencias primárias obtidas	26
3.8. Atividade Neurotóxica.....	26
4.RESULTADOS	28
4.1. Caracterização geral do veneno da serpente <i>M. frontalis</i>	28
4.2. Componentes identificados	32
4.2.1. <i>Neurotoxinas</i>	32
4.2.2. WAP - " <i>Whey acid protein</i> "	56
4.2.3. Fosfolipases A ₂ (PLA ₂)	61
5. DISCUSSÃO.....	69
5.1. Caracterização geral do veneno da serpente <i>M. frontalis</i>	69
5.2. Frontoxinas	70
5.2.1. Frontoxinas de cadeia curta	72
5.2.2. Frontoxinas de cadeia longa	75
5.2.3. Inibição do potencial de placa em miniatura.....	77
5.3. Miwaprina.....	78
5.4. Fosfolipase A ₂	79
6. CONCLUSÕES.....	81
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
8. ANEXO	97

LISTA DE AMINOÁCIDOS

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

LISTA DE ABREVIATURAS

Ach	Acetilcolina
AchR	Receptor de acetilcolina
ACN	Acetonitrila
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CLRP	Lectina semelhante á lectina de tipo C
CLT	Lectina de tipo C verdadeira
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTT	Ditiotreitol
EPP	Potencial de placa terminal
ESI	Ionização por eletro-spray, do inglês <i>electron spray ionization</i>
FTx	Frontoxina
HEPES	4 - (2-hidroxietil)-1-ácido piperazineethanesulfônico
LAAO	L-aminoácido oxidase
MALDI	Dessorção/ionização de matriz assistida por laser, do inglês <i>matrix assisted laser desorption/ionization</i>
MEPP	Potencial de placa terminal em miniatura, do inglês <i>miniature end-plate potential</i>
MFRONT	Fosfolipase de <i>M. frontalis</i>
MiDCA1	Fosfolipase A2 pré-sináptica de <i>M. dumerelli carinicauda</i>
Mlx	Fosfolipase A2 pré-sináptica de <i>M. lemniscatus</i>
MM	Massa molecular
MM Exp.	Massa molecular experimental
Mnn	α -neurotoxina de <i>M. nigrocinctus nigrocinctus</i>
MS	Espectrometria de massa, do inglês <i>mass spectrometry</i>
nAChR	Receptor nicotínico de acetilcolina
NGF	Fator de crescimento neural
PLA2	Fosfolipase A2, do inglês <i>phospholipase A2</i>
Red_Alq	Polipeptídeo reduzido e alquilado
RP-HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, do inglês <i>reverse phase liquid chromatography</i>
Snacle	Lectinas do tipo C do veneno de serpente, do inglês <i>Snake venom C-type lectins</i>
TFA	Ácido trifluoroacético, do inglês <i>trifluoroacetic acid</i>
TOF	Tempo de voo, do inglês <i>time of flight</i>
UFLC	Cromatografia líquida ultra- rápida de alta eficiência do inglês <i>Ultra-fast</i>

WAP *liquid chromatography*
Do inglês *Whey acid protein*

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
Figura 1	Tipos de dentição das serpentes.....	3
Figura 2	Similaridade estrutural entre as toxinas de três-dígitos.....	5
Figura 3	Alvos das toxinas em três dígitos de serpentes.....	6
Figura 4	Estrutura do receptor nicotínico de acetilcolina muscular.....	7
Figura 5	Espécime de <i>Micrurus frontalis</i> procedente do estado de Goiás.....	20
Figura 6	Perfis cromatográficos do veneno bruto da serpente <i>M. frontalis</i> em coluna semi-preparativa C ₄ (A) e analítica C ₂ C ₁₈ (B).....	29
Figura 7	Perfil cromatográfico analítico da fração 5 do veneno de <i>M. frontalis</i>	33
Figura 8	Espectro de massa molecular do componente 1 da fração 5 do veneno de <i>M. frontalis</i>	33
Figura 9	Purificação dos componentes presentes na fração 6 do veneno de <i>M. frontalis</i>	34
Figura 10	Massa molecular dos componentes 1 (A) e 2 (B) da fração 6 do veneno de <i>M. frontalis</i>	35
Figura 11	Perfil cromatográfico analítico e massa molecular da fração 10 do veneno de <i>M. frontalis</i>	36
Figura 12	Purificação e massa molecular da fração 12 do veneno de <i>M. frontalis</i> ...	37
Figura 13	Perfil cromatográfico analítico e massa molecular da fração 7 do veneno de <i>M. frontalis</i>	38
Figura 14	Purificação das frações 6.1 (A), 6.2 (B), 5 (C), 10 (D), 12 (E) e 7 (F) após redução e alquilação.....	40
Figura 15	Estrutura primária parcial da FTx I.....	41
Figura 16	Purificação dos peptídeos oriundos da digestão enzimática da fração 6.1 com endoproteínase Glu-C.....	42
Figura 17	Similaridade entre Frontoxina I e outras neurotoxinas de elapídeos.....	43

Figura 18	Purificação dos peptídeos oriundos da digestão enzimática da fração 6.2 com diferentes endoproteínases.....	44
Figura 19	Estrutura primária completa da FTx II.....	45
Figura 20	Alinhamento da Frontoxina II e outras neurotoxinas de elapídeos.....	46
Figura 21	Purificação dos peptídeos oriundos da digestão enzimática da fração 5 com diferentes endoproteínases.....	47
Figura 22	Estrutura primária completa da FTx III.....	48
Figura 23	Alinhamento da Frontoxina III e outras neurotoxinas de elapídeos.....	48
Figura 24	Estrutura primária completa da FTx IV.....	49
Figura 25	Purificação dos peptídeos oriundos da digestão enzimática da fração 10.....	50
Figura 26	Alinhamento da Frontoxina IV com outras neurotoxinas de elapídeos.....	51
Figura 27	Estrutura primária completa da FTx V.....	52
Figura 28	Alinhamento da Frontoxina V com outras neurotoxinas de elapídeos.....	52
Figura 29	Sequência N-terminal da FTx VI.....	53
Figura 30	Alinhamento da porção N-terminal da Frontoxina VI com outras neurotoxinas de elapídeos.....	53
Figura 31	Efeito das Frontoxinas (1 μ M) sobre a frequência e amplitude dos potenciais de placa terminal em miniatura em junção neuromuscular de rã.....	55
Figura 32	Inibição dose-dependente do tamanho dos MEPPs causada pelas Frontoxinas na junção neuromuscular de rã.....	56
Figura 33	Separação dos componentes da fração 18 do veneno de <i>M. frontalis</i>	57
Figura 34	Sequenciamento <i>de novo</i> da proteína com 5336,74 Da.....	58
Figura 35	Alinhamento da seqüência de aminoácidos da Miwaprina e similaridade com outras WAPs.....	61

Figura 36	Separação analítica das PLA2 presentes na fração 18 do veneno de <i>M. frontalis</i>	62
Figura 37	Sequenciamento <i>de novo</i> e alinhamento do fragmento tríptico da PLA2 com 13305,27 Da.....	63
Figura 38	Sequenciamento <i>de novo</i> e alinhamento do fragmento tríptico da PLA2 com 13486,4 Da.....	64
Figura 39	Purificação da fração 25 do veneno de <i>M. frontalis</i>	65
Figura 40	Espectro de massa molecular nativo (A) e reduzido e alquilado (B) do componente majoritário da fração 25.....	66
Figura 41	Alinhamento da PLA2 de <i>M. frontalis</i> com outras PLA2 de elapídeos.....	67
Figura 42	Purificação dos peptídeos oriundos da digestão enzimática da fração 25 com endoproteinase Lys-C.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
Tabela 1	Lista das massas moleculares encontradas no veneno da serpente <i>Micrurus frontalis</i> adquiridas por MALDI-TOF-TOF em modo de aquisição linear	30
Tabela 2	Massa molecular e número de resíduos de cisteína das neurotoxinas purificadas a partir do veneno da serpente <i>M. frontalis</i>	39
Tabela 3	Fragmentos peptídicos provenientes do tratamento enzimático da fração 6.1 do veneno de <i>M. frontalis</i> com Glu-C. A massa molecular experimental foi obtida por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF.....	42
Tabela 4	Fragmentos peptídicos provenientes do tratamento enzimático da fração 6.2 do veneno de <i>M. frontalis</i> com Asp-N, Glu-C, quimotripsina e tripsina. A massa molecular experimental foi obtida por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF.....	45
Tabela 5	Fragmentos peptídicos provenientes do tratamento enzimático da fração 5 do veneno de <i>M. frontalis</i> com Glu-C, Lys-C e tripsina. A massa molecular experimental foi obtida por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF.....	48
Tabela 6	Fragmentos peptídicos provenientes do tratamento enzimático da fração 10 do veneno de <i>M. frontalis</i> com Glu-C e Lys-C. A massa molecular experimental foi obtida por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF.....	49
Tabela 7	Massa monoisotópica dos íons <i>b</i> e <i>y</i> observados na porção N-terminal da sequência de aminoácidos da proteína de 5336,7 Da ..	59
Tabela 8	Massa monoisotópica dos íons <i>b</i> e <i>y</i> observados na região interna da sequência de aminoácidos da proteína de 5336,7 Da	59
Tabela 9	Massa monoisotópica dos íons <i>b</i> e <i>y</i> observados na porção C-terminal da sequência de aminoácidos da proteína de 5336,7 Da ..	60

RESUMO

As serpentes corais pertencentes ao gênero *Micrurus* possuem uma peçonha rica em proteínas e peptídeos biologicamente ativos. No entanto, estudos bioquímicos e farmacológicos com os componentes desses venenos são escassos devido à grande dificuldade de coleta, manutenção em cativeiro das serpentes e a pequena quantidade de veneno obtida em cada extração. O presente estudo descreve o isolamento, a determinação da massa molecular e o seqüenciamento completo e parcial de algumas moléculas biologicamente ativas presentes no veneno de *Micrurus frontalis*. Os componentes foram purificados após vários passos de fracionamento em cromatografia líquida de fase reversa. A pureza e as massas moleculares foram determinadas por espectrometria de massa de tipo MALDI-TOF e *electrospray* (ESI). As seqüências de aminoácidos dos componentes nativos e dos peptídeos gerados após proteólise foram determinadas por degradação de Edman e sequenciamento *De novo*. Foram identificadas toxinas da família de três-dígitos, PLA2 e waprinas. As toxinas do tipo três dígitos receberam o nome de Frontoxinas (FTx) I a VI. As FTx I, II, III e VI possuem 4 ligações dissulfeto conservadas e são estruturalmente similares às α -neurotoxinas de cadeia curta. Já as FTx IV e V apresentaram alta similaridade com α -neurotoxinas de cadeia longa, com 10 resíduos de cisteína conservados. Quando aplicadas em junção neuromuscular de rã, as FTx II, III e IV reduziram a amplitude dos potenciais de ação em miniatura de maneira tempo- e concentração-dependente, sugerindo que essas FTxs bloqueiam os receptores nicotínicos de acetilcolina. As PLA2 foram identificadas após o sequenciamento de fragmentos, os quais apresentaram alta similaridade com PLA2 de elapídeos. Uma nova família de proteínas ofídicas, a waprina, foi encontrada na peçonha de *M. frontalis*. Esta toxina, pouco abundante no veneno, possui quatro ligações dissulfeto conservadas e recebeu o nome de Miwaprina, em virtude da alta identidade com waprina de *Naja nigricollis*. As FTx I, V, VI, as PLA2s e a Miwaprina, não foram submetidas à testes biológicos devido à quantidade insuficiente de amostra purificada. Este trabalho corresponde ao primeiro estudo de caracterização da estrutura primária e biológica de componentes isolados a partir do veneno de *M. frontalis*, abrindo perspectivas não só para a identificação dos demais componentes, como também do provável papel dos mesmos na captura de presas e nos envenenamentos.

ABSTRACT

Coral snakes (*Micrurus* genus) venoms contain a wide spectrum of biologically active proteins and peptides. The major obstacle to study *Micrurus* venoms is the small amount of material that can be collected. Therefore, the biochemistry and pharmacology of components from coral snakes venoms are mostly unknown. In this study we describe the isolation, molecular mass determination, complete and partial amino acid sequencing of short and long -chain three-finger toxins, PLA2 and waprin isolated from *Micrurus frontalis* venom. Components were purified using multiple steps of RP-HPLC. Molecular masses were determined by MALDI-TOF and ESI ion-trap mass spectrometry. The amino acid sequences of toxins were determined by sequencing of overlapping proteolytic fragments by Edman degradation and by *De novo* sequencing. The three-finger toxins were named Frontoxin (FTx) I-VI. The amino acid sequences of FTx I, II, III and VI predict 4 conserved disulphide bonds and structural similarity to previously reported short-chain α -neurotoxins. FTx IV and V each contained 10 conserved cysteines and share high similarity with long-chain α -neurotoxins. At the frog neuromuscular junction FTx II, III and IV reduced miniature endplate potential amplitudes in a time- and concentration-dependent manner suggesting Frontoxins block nicotinic acetylcholine receptors. Fragments of isolated PLA2 were determined and share high similarity scores with PLA2 from other Elapids. The waprin member possesses four conserved disulfide bonds and showed high identity with waprin from *Naja nigricollis* venom. Because of the significant sequence similarity with WAPs, the molecule was named Miwaprin. Due the insufficient amount of purified FTx I, V, VI, PLA2s and Miwaprin, these toxins were not submitted to the biological assays. These are the first complete primary structure characterization of *M. frontalis* snake venom toxins.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Serpentes e venenos

As serpentes fazem parte da Classe Reptilia, Ordem Squamata e Subordem Ophidia ou Serpentes. Provavelmente originada no período Cretáceo, a maioria das serpentes teve seu maior desenvolvimento no Cenozóico. Apesar de algumas controvérsias sobre seu ancestral, admite-se que possam ter derivado de lagartos de vida subterrânea que, por adaptação, sofreram o alongamento do corpo, redução das patas e os olhos semi-atrofiados (Lee, 1997; Franco, 2003). Cerca de 3.000 espécies são conhecidas, as quais variam desde espécies escavadoras diminutas até grandes constritoras. Devido à sua dependência de calor externo para realizar a termorregulação, as serpentes habitam principalmente regiões temperadas e tropicais (Melgarejo, 2003).

Além da forma alongada do corpo e da ausência de membros locomotores, as serpentes caracterizam-se por possuir o corpo coberto com escamas epidérmicas, pela ausência de pálpebras móveis, de ouvido externo e médio e apresentam grande elasticidade nos movimentos cranianos. O sistema circulatório das serpentes difere daquele dos demais répteis por possuir um maior número de vasos sanguíneos, irrigação de sangue mais eficiente. Os órgãos pares como pulmões, rins, testículos e ovários, além de muito alongados, assumem uma disposição assimétrica, estando os do lado direito na frente do esquerdo. O tubo digestivo distende-se bastante no esôfago e estômago e intestino é curto. O fígado é bem desenvolvido e alongado, com a vesícula biliar separada, localizada posteriormente junto ao baço e o pâncreas. Os ofídios não possuem bexiga e as excretas, junto com as fezes e os órgãos genitais, desembocam numa cavidade comum, a cloaca. O hemipênis, órgão copulador dos machos, está em número par e encontra-se invaginado na cauda. Como nos lagartos e outros répteis, as serpentes trocam a pele com certa periodicidade, a qual se desprende numa peça única, a começar pela borda dos lábios. São consideradas míopes, assim a detecção de movimentos é mais eficiente do que de formas. A percepção olfativa é realizada pelo órgão de Jacobson, uma estrutura quimiorreceptora especializada revestida por epitélio sensorial, situada na região anterior do céu da boca (Kardong, 1998; Melgarejo, 2003).

A superfamília Colubroidea, considerada a mais diversa dentre as serpentes, sofreram consideráveis mudanças morfológicas as quais resultaram no aparecimento de um dos mais especializados aparatos de alimentação entre os vertebrados, o

aparelho inoculador de peçonha. Este aparato é composto pela glândula de Duvernoy desenvolvida (glândula de veneno) onde a peçonha é produzida e estocada, ligada por ductos a dentes inoculadores (Jackson, 2003). Com o objetivo de otimizar a eficiência na inoculação da peçonha, as serpentes são categorizadas segundo seus aparelhos inoculadores e tradicionalmente podem ser divididas em:

- Áglifas: não possuem presas nem aparelho inoculador de peçonha. A glândula supra-labial presente produz secreção destinada a lubrificar o alimento. Os representantes mais importantes pertencem às famílias Boidae e Colubridae (Figura 1A);
- Opistóglifas: possuem um par de presas sulcadas na extremidade posterior da arcada superior. São típicas da família Colubridae (Figura 1B);
- Proteróglifas: possuem um par de presas profundamente sulcadas na região anterior do maxilar reduzido e móvel. São comumente presentes nos elapídeos (Figura 1C);
- Solenóglifas: possuem um par de presas grandes, muito desenvolvidas, retráteis em uma bainha mucosa com canal central, o qual se comunica com o canal excretor da glândula de veneno. O maxilar é móvel e muito reduzido. São encontrados na família Viperidae (Figura 1D) (Kardong, 1983).

Os venenos das serpentes são considerados produtos resultantes de diversas fases evolutivas, revelando assim uma formidável capacidade adaptativa desses animais. Esses venenos são misturas complexas contendo, entre outros componentes, altas concentrações de proteínas, muitas delas com propriedades tóxicas (Stocker, 1990). Os componentes tóxicos podem ter ações rápidas e seletivas muito potentes, capazes de interferir em mecanismos fisiológicos, celulares e moleculares específicos. Segundo Jorge da Silva e Aird (2001), cada veneno apresenta uma ação peculiar de cada espécie de serpente, decorrente das classes de toxinas que o compõem e do tipo de presa específico a que é dirigido. No entanto, o veneno também pode agir de forma eficaz em outros alvos diferentes da sua dieta (Urdaneta *et al.*, 2004).

A família Elapidae forma o principal grupo de serpentes venenosas. Estes animais, amplamente distribuídos por toda a faixa intertropical do planeta, são agrupados em duas importantes subfamílias Hydrophiinae e Elapinae (Slowiski *et al.*, 1997; Keogh, 1998).

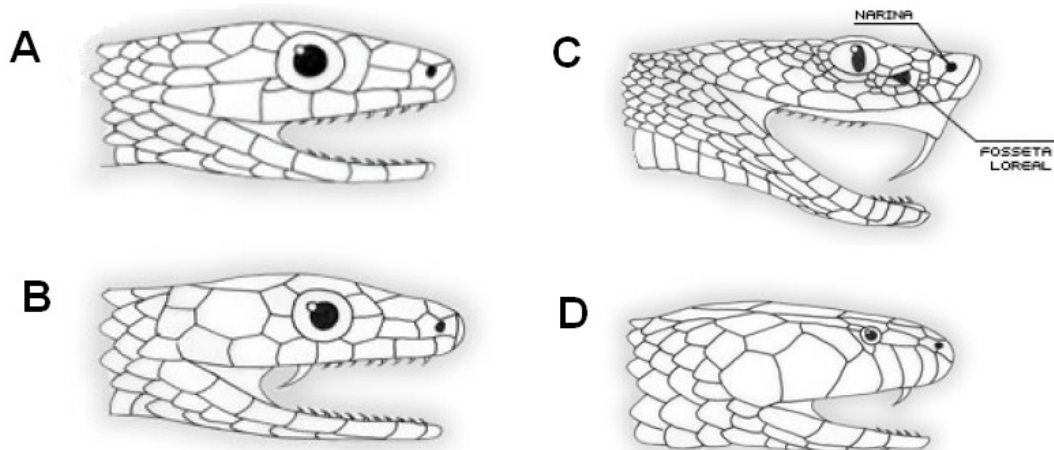


Figura 1. Tipos de dentição das serpentes. **A.** Áglifa, sem dente inoculador de veneno; **B.** Opistóglifa, dentes inoculadores de veneno na região posterior do maxilar; **C.** Solenóglifa, dentes inoculadores de veneno muito desenvolvido na região anterior do maxilar; **D.** Proteróglifa, dentes inoculadores pouco desenvolvidos situados na região anterior do maxilar. Adaptado de Alma R.W.L.Romano-Hoge.

A subfamília Hydrophiinae inclui as serpentes marinhas encontradas nas águas tropicais da Índia e do Oceano Pacífico Oeste. Estas serpentes possuem uma série de adaptações anatômicas e comportamentais como o corpo comprimido lateralmente com cauda bastante desenvolvida, a pele pouco permeável e a presença de glândula de sal ao redor da língua que funciona como regulador osmótico (Campbell e Lamar, 1994).

A subfamília Elapinae contém todos os elapídeos terrestres encontrados nos trópicos e eventualmente nos subtropicais de algumas regiões, tais como as serpentes dos gêneros *Bungarus* (*kraits*), *Ophiophagus* (*cobra-rei*), *Naja*, *Dendroaspis* (*mambas*) no Velho Mundo e os gêneros *Micrurus*, *Leptomicrurus* e *Micruroides* (*cobras corais verdadeiras*) no Novo Mundo. Também fazem parte desta subfamília as serpentes marinhas do gênero *Laticauda* (*Sea kraits*). Os animais desta subfamília fazem parte grupo dos mais perigosos e temidos do mundo (Campbell e Lamar, 1994).

1.2. Composição dos venenos

A composição dos venenos de serpentes é influenciada por uma série de fatores como a origem geográfica, a sazonalidade, a idade, o sexo, além de ser presa-específica (Jorge da Silva e Aird, 1991 e 2001). Em geral, a peçonha das serpentes contém cerca de 25% de sólidos totais, dos quais cerca de 70 a 90% são proteínas e

polipeptídeos com relativamente elevada massa molecular. O restante (10-30%) corresponde a substâncias de baixa massa molecular como carboidratos, lipídeos, aminas biogênicas, peptídeos, aminoácidos, nucleotídeos, compostos inorgânicos e íons (Jorge da Silva e Bucarechi, 2003). Basicamente são encontradas cinco classes de enzimas nos venenos de serpentes: as oxidoredutases, as hidrolases, as glicosidases, as proteases e as lipases, fazendo parte desta última classe as fosfolipases e as acetilcolinesterases (Iwanaga *et al.*, 1976 e Kini, 1997).

As peçonhas elapídicas apresentam grande quantidade de componentes tóxicos e são caracterizadas por causarem paralisia flácida, podendo levar a óbito por parada respiratória (Bolaños, 1984) e exercerem pequena atividade proteolítica (Vital Brazil, 1980). As mais importantes e abundantes toxinas elapídicas se classificam principalmente como toxinas estruturalmente similares a fosfolipases A2 e em forma de três dígitos. Além dessas toxinas são descritos também proteases, inibidores de proteases, serinoproteases, metaloproteases, proteínas ricas em cisteínas, lectinas e waprinas que em conjunto com as PLA2 e α -neurotoxinas contribuem para a atividade biológica tóxica e letal dos elapídeos (Birrel *et al.*, 2007).

1.2.1. Toxinas de Três-dígitos

As toxinas de três-dígitos (*three-finger proteins*) são polipeptídeos com 60-74 resíduos de aminoácidos, ricos em ligações dissulfeto desprovidos de atividade enzimática (Endo e Tamiya, 1987). Estas toxinas recebem o nome de três-dígitos, pois estruturalmente todos os membros conhecidos são organizados em três alças (*loops*) ricas em estruturas secundárias com motivos do tipo folhas β -pregueadas, que emergem de um núcleo formado por 4 ligações dissulfeto (Figura 2). A forma é discoidal achatada, apresentando um lado côncavo e um convexo. São extremamente resistentes às variações físicas ambientais, são termoestáveis, facilmente absorvidas e se distribuem rapidamente nos tecidos das presas (Tsetlin, 1999).

Apesar do padrão estrutural altamente conservado, essas toxinas têm diversos alvos específicos causando diferentes ações farmacológicas (Figura 3). Os membros desta família incluem: α -neurotoxinas (Figura 2A e 2B), que antagonizam os receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR); κ -bungarotoxinas (Figura 2D), que reconhecem os receptores nicotínicos neuronais; toxinas muscarínicas (Figura 2G), que atuam seletivamente nos receptores muscarínicos; fasciculinas (Figura 2F), que são inibidores de acetilcolinesterases; calciseptinas, que bloqueiam os canais de

cálcio do tipo L; *cardiotoxinas* ou citotoxinas (Figura 2C) que formam poros na membrana celular e *dendroaspinas* (Figura 2I) que antagonizam vários processos de adesão celular (Kini, 2002). De acordo com Fry *et al.*, (2003a), as toxinas de três-dígitos são utilizadas pelas serpentes como suporte para diferentes combinações de grupamentos funcionais, gerando uma variedade de alvos específicos.

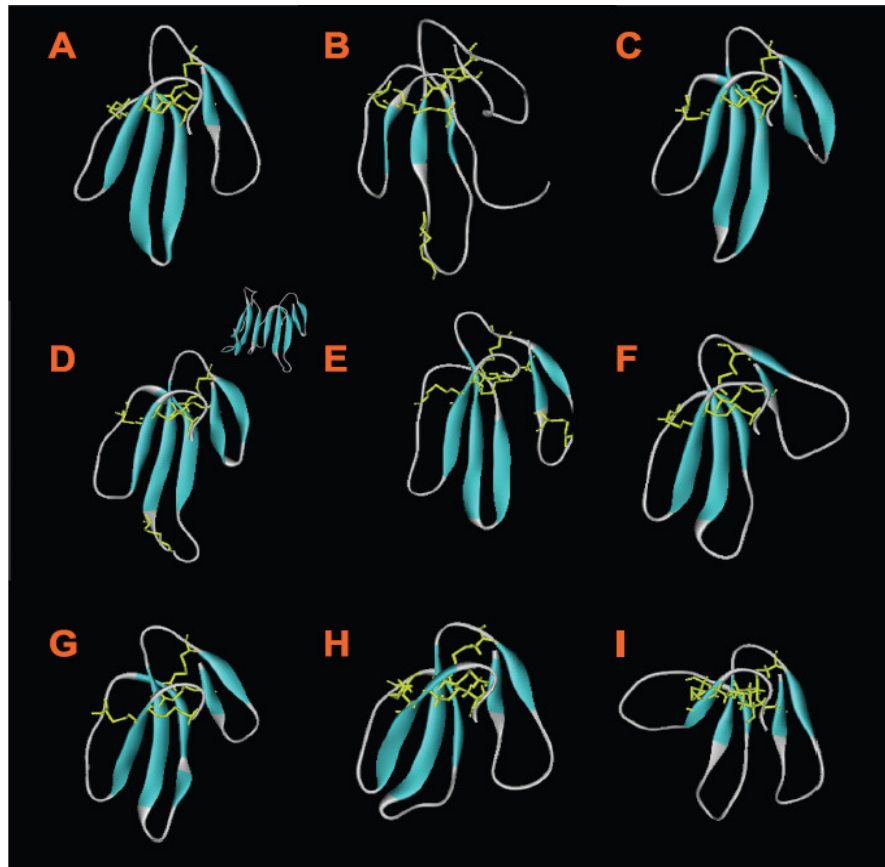


Figura 2. Similaridade estrutural entre as toxinas de três-dígitos. (A) Erabutoxina a; **(B)** α -bungarotoxina; **(C)** Cardiotoxina V4; **(D)** κ -bungarotoxina; **(E)** Candoxina; **(F)** Fasciculina; **(G)** Toxina muscarínica; **(H)** Toxina FS2; **(I)** Dendroaspina. (Kini, 2002).

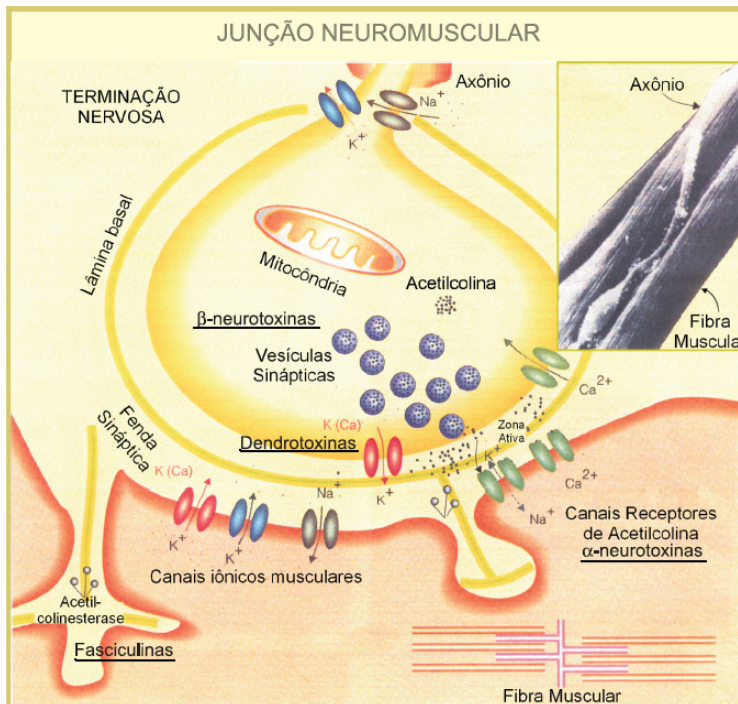


Figura 3. Alvos das toxinas em três dígitos de serpentes. As α -neurotoxinas atuam nas junções neuromusculares bloqueando os receptores musculares de acetilcolina. As fasciculinas atuam inibindo a acetilcolinesterase e as dendrotoxinas formam poros na membrana celular (Prieto da Silva, 2002).

Os venenos elapídicos possuem vários polipeptídeos do tipo α -neurotoxinas, que atuam no sistema nervoso periférico provavelmente por não conseguirem atravessar a barreira hematoencefálica. Geralmente, agem como agonistas ou antagonistas dos receptores de acetilcolina, promovendo alterações na transmissão nervosa (Tu, 1998).

A acetilcolina (ACh), principal neurotransmissor na junção neuromuscular de vertebrados, é sintetizada a partir dos precursores colina e acetilcoenzima A. Aproximadamente 80% deste neurotransmissor são estocados nas terminações nervosas e o restante é liberado no axoplasma. A vesícula se funde espontaneamente com a membrana pré-sináptica liberando pequena quantidade de acetilcolina, resultando em despolarizações diminutas e transitórias na membrana pós-juncional (MEPP; *miniature end-plate potential*) que não são suficientes para gerar uma contração. Entretanto, como resposta ao potencial de ação, a despolarização na terminação nervosa promove liberação de quantidades de acetilcolina suficientes para produzir um potencial de placa terminal (EPP, *end-plate potential*) e

consequentemente a contração. A acetilcolina, liberada espontaneamente ou por despolarização da terminação nervosa, se liga a uma região específica do receptor nicotínico da membrana pós-sináptica antes de ser degradada enzimaticamente por acetilcolinesterase.

O receptor nicotínico do músculo esquelético é uma proteína heteropentamérica formada por subunidades de membrana com a estequiometria de $2\alpha 1, 1\beta 1, 1\gamma$ e 1δ (Figura 4) (Sáez-Briones *et al.*, 1999, Paterson e Nordberg, 2000). O receptor consiste de dois sítios de ligação para acetilcolina localizados na interface entre as cadeias $\alpha 1$ e γ e $\alpha 1$ e δ (Sáez-Briones *et al.*, 1999; Bowman 2006). Dado que estes sítios de ligação interagem de uma maneira cooperativa positiva, por ocupar um ou ambos os sítios, as neurotoxinas de serpentes inibem a abertura do canal iônico associada ao receptor em resposta aos agonistas colinérgicos (Paterson e Nordberg, 2000).

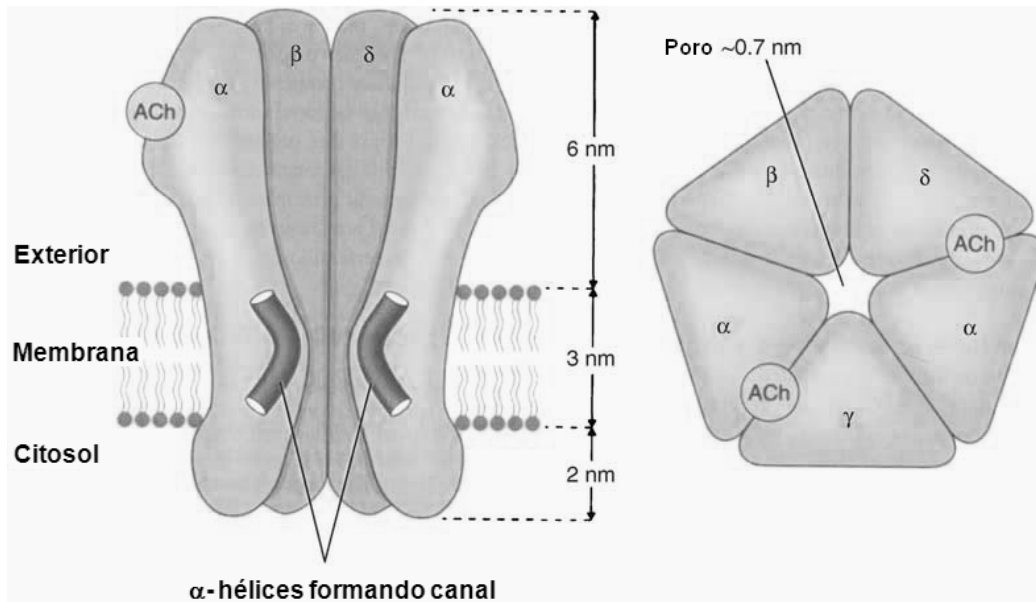


Figura 4. Estrutura do receptor nicotínico de acetilcolina muscular. Vista lateral (esquerda) e vista frontal (direita) (Bowman, 2006).

As α -neurotoxinas ligam-se aos receptores colinérgicos da placa terminal produzindo bloqueio da transmissão nervosa no músculo esquelético e causam a paralisia da presa. Assim, atuam de modo semelhante ao alcalóide curare, porém com maior afinidade ao receptor e menor reversibilidade. Devido ao seu mecanismo de ação, as α -neurotoxinas são também conhecidas como toxinas curaremiméticas ou toxinas pós-sinápticas (Nirthanan e Gwee, 2004). Além de serem encontradas na peçonha dos elapídeos, as α -neurotoxinas estão presentes também no veneno dos

moluscos marinho do gênero *Conus*, sendo chamadas de α -conotoxinas, as quais podem promover a inibição dos nAChR musculares ou o bloqueio de AchR neuronais (Tsetlin, 1999; Tsetlin e Hucho, 2004).

De acordo com a seqüência de aminoácidos e/ou estrutura terciária, as toxinas curaremiméticas podem ser classificadas em α -neurotoxinas de cadeia curta, α -neurotoxinas de cadeia longa e neurotoxinas de três-dígitos não convencionais (Nirthanan *et al.*, 2003a). O alvo molecular principal das α -neurotoxinas parece ser o nAChR muscular, no entanto, algumas toxinas interagem com nAChR neuronal e existe ainda a possibilidade de possuírem alvos moleculares ainda desconhecidos, o que demonstra que as α -neurotoxinas não formam um grupo funcionalmente homogêneo (Nirthanan e Gwee, 2004).

As α -neurotoxinas de cadeia curta são formadas por cadeias polipeptídicas de 60-62 resíduos de aminoácidos e quatro ligações dissulfeto conservadas. Ligam-se com alta afinidade aos nAChR (α 1) β 1 γ δ da musculatura esquelética de mamífero ou do peixe elétrico *Torpedo marmorata*. As α -neurotoxinas longas tem de 66 a 75 resíduos de aminoácidos e cinco ligações dissulfeto dentre elas, quatro são conservadas, sendo a ligação extra localizada na ponta da segunda alça (loop II). Em comparação com as α -neurotoxinas de cadeia curta, a primeira alça é mais curta devido à deleção de alguns resíduos e possuem uma cauda C-terminal. Além de se ligarem à subunidade α 1 do nAChR muscular, as α -neurotoxinas longas se ligam com alta afinidade aos receptores neuronais do tipo homopentaméricos, α 7, α 8 e α 9 (Servent *et al.*, 1997; 2000; Antil *et al.*, 1999; Antil-Delbeke *et al.*, 2000). Segundo Servent *et al.* (1997), a quinta ligação dissulfeto na extremidade da segunda alça é essencial para a ligação aos receptores neuronais.

As neurotoxinas de três dígitos não convencionais são também conhecidas como toxinas homólogas das α -neurotoxinas longas, ou toxinas do tipo melanoleuca (Joubert e Taljaard, 1980) ou neurotoxinas fracas. Possuem entre 62 a 68 resíduos de aminoácidos e são estruturalmente relacionadas às α -neurotoxinas longas, diferindo pela localização da quinta ligação dissulfeto na extremidade da primeira alça. Estas neurotoxinas são chamadas de fracas, pois são biologicamente menos tóxicas que as α -neurotoxinas convencionais. Devido a baixa afinidade aos nAChR musculares, acredita-se que as neurotoxinas fracas podem ter outros alvos moleculares ainda não identificados (Nirthanan e Gwee, 2004).

1.2.2. Fosfolipases do tipo A2 (PLA2)

As fosfolipases são enzimas que catalizam a hidrólise dos glicerofosfolipídeos e são separadas em várias classes, de acordo com o sítio de hidrólise, em fosfolipases do tipo A1, A2, B, C e D. As fosfolipases do tipo A2 (fosfatidil-acil-hidrolases, EC3.1.1.4), presentes no pâncreas de mamíferos e em venenos de origem animal, hidrolisam os 3-sn-fosfoglicerídeos na posição 2 da ligação acil-éster liberando ácidos graxos e lisofosfolipídeos (Kini, 1997).

As PLA2 elapídicas geralmente possuem 120 resíduos de aminoácidos, seis ou sete ligações dissulfeto e são compostas por cinco α -hélices e duas estruturas em folhas β pregueadas curtas (Arni e Ward, 1996). Estas PLA2 compartilham grande similaridade estrutural com as PLA2 encontradas em mamíferos. No entanto, são mais tóxicas e capazes de induzir um amplo espectro de efeitos farmacológicos tais como neurotoxicidade, miotoxicidade, cardiotoxicidade, efeito coagulante, atividades hemolítica, convulsionante, edematogênica e hipotensora (Kini, 1997).

Os efeitos farmacológicos observados em decorrência da ação das PLA2 não são necessariamente causados apenas pela hidrólise de fosfolipídeos de membranas biológicas. As PLA2 parecem apresentar sítio(s) farmacológico(s) distinto(s) do catalítico (YANG, 1994). Kini (2003) propõe que as PLA2 procedentes de veneno de serpentes possuam uma habilidade de se unir a um sítio específico, devido à sua alta afinidade em ligar-se a proteínas específicas que atuam como receptores ou aceptores. Essa ligação específica da PLA2 se dispõe pela presença de um sítio farmacológico em sua superfície, que é independente do sítio catalítico. A alta afinidade de interação da PLA2 com seu acceptor (proteína alvo) deve-se provavelmente à complementaridade de carga, de hidrofobicidade e de forças de Van der Waals, que ocorre entre o sítio farmacológico e o alvo na superfície do receptor protéico ou acceptor.

Algumas das toxinas mais potentes desta classe não apresentam nenhuma atividade enzimática, possivelmente por terem um resíduo de ácido aspártico na posição 49 (sítio de ligação ao Ca^{2+}) substituído por um resíduo de carga positiva, como a lisina (Mora *et al.*, 2005). No entanto, nos casos onde o efeito farmacológico é independente da atividade enzimática, a atividade catalítica pode aumentar a potência da atividade farmacológica.

Dentre as diversas atividades farmacológicas atribuídas às PLA2, a neurotoxicidade tem atraído particular atenção (Kini, 1997). As PLA2 com atividade neurotóxica também conhecidas como β -neurotoxinas, são comumente encontradas

nos venenos das famílias *Crotalidae*, *Elapidae*, *Hydrophiidae* e *Viperidae* e atuam sobre alvos específicos nas junções neuromusculares inibindo a liberação de neuromediadores (Figura 3) (Kini, 1997).

A atividade neurotóxica pré-sináptica das PLA2 decorre do fato de se ligarem à membrana nervosa e catalisarem a hidrólise fosfolipídica com a produção de lisofosfolipídios e ácidos graxos (Rosseto *et al.*, 2006). Segundo Pungercar e Krizaj (2007) a hidrólise apenas na porção externa da membrana plasmática neural não é suficiente para desencadear a ação pré-sináptica completa. Assim, as β -neurotoxinas devem também interagir com as proteínas intracelulares das vesículas sinápticas. Os lisofosfolipídios e ácidos graxos alteram a conformação da membrana aumentando sua permeabilidade ao Ca^{2+} , o qual, em quantidades excessivas, parece desempenhar um importante papel na degeneração das organelas celulares e também da própria terminação nervosa (Tedesco *et al.*, 2009). A elevada liberação de palmitato e de ácido araquidônico também está relacionada atividade pré-sináptica das PLA2, uma vez que o palmitato desempenha importante papel no processo de acetilação de proteínas e o ácido araquidônico participa dos eventos de transdução de sinais (Kattah *et al.*, 2002).

Em preparações neuromusculares isoladas, a atividade pré-sináptica se caracteriza por um efeito trifásico na liberação do neurotransmissor. A primeira fase é curta e caracterizada por uma redução na liberação de ACh, seguida por um aumento transitório na liberação desta na segunda fase e por último um bloqueio completo e irreversível da neurotransmissão (Montecucco e Rosseto, 2000).

1.2.3. Proteases

Os venenos de serpentes possuem proteases que afetam a cascata de coagulação sanguínea e auxiliam também na digestão das presas. Este grupo de moléculas é comumente encontrado nos venenos de serpentes das famílias *Crotalidae* e *Viperidae*, mas também são presentes nos elapídeos australianos (Birrel *et al.*, 2007). As proteases são divididas em metaloproteases e serinoproteases.

As metaloproteases são moléculas com massa molecular entre 60 e 80 kDa que geralmente estão envolvidas no processo hemorrágico, na formação de edema, hipotensão, na hipovolemia, bem como na inflamação e necrose (Fox e Serrano, 2005). Normalmente apresentam três domínios diferentes específicos. O primeiro, denominado domínio proteolítico, é conservado e caracterizado pela presença de um sítio catalítico responsável pela ligação de um íon metálico, em geral o Zn^{2+} . O

segundo é um domínio do tipo desintegrina (RGD), capaz de se ligar às integrinas de plaquetas ou de células endoteliais, e o terceiro é um domínio rico em cisteínas, com função pouco conhecida (Marcinkiewicz, 2005).

As serinoproteases são proteínas com cerca de 35 kDa que contém 12 resíduos de cisteína e quantidades variáveis de sítios de glicosilação. Em viperídeos, as serinoproteases atuam como enzimas similares à tripsina e nos elapídeos terrestres agem como proteínas do tipo Fator X (Kini, 2005). As serinoproteases atuam sobre os componentes de degradação e ativação sanguíneos que estão envolvidos na coagulação e na fibrinólise, ativando o sistema calicreína/cinina ou afetando a agregação plaquetária (Hung e Chiou, 2001).

1.2.4. L-Aminoácido Oxidase (LAAO)

As L-aminoácido oxidase são flavoenzimas que atuam sobre os L-aminoácidos convertendo-os em cetoácidos com liberação de peróxido de hidrogênio e amônia. Este grupo é o mais comum e o mais estudado entre os venenos e é responsável pela coloração amarelada dos venenos (Nathan *et al.*, 1982; Du e Clemetson, 2002). No quadro de envenenamento, a ação desta enzima ainda é desconhecida. No entanto, *in vitro*, as LAAOs exercem papel em diversas atividades biológicas tais como atividade citotóxica (Souza *et al.*, 1999), antitumoral (Vieira Santos *et al.*, 2008), apoptótica (Suhr e Kim, 1996), hemorrágica, inibição da agregação plaquetária (Tonismagi *et al.*, 2008) e antimicrobiana (Lu *et al.*, 2002).

1.2.5. Fator de crescimento neural (NGF)

As proteínas NGF dos venenos se apresentam como complexos homodiméricos geralmente associados por ligações não covalentes e atuam como agonistas com baixa afinidade de receptores tirosina-cinase, ao competir pela ligação ao receptor com o NGF endógeno, influenciando no desenvolvimento de neurônios colinérgicos. Os NGF desempenham importante papel na ontogênese e regulam o desenvolvimento e a manutenção de neurônios derivados de neurônios sensoriais embrionários e de células nervosas. Além destes, participam também de efeitos não neuronais, como a indução de extravasamento plasmático e a liberação de histamina das células sanguíneas (Kashima *et al.*, 2002). Nos casos de envenenamento, os NGF provavelmente atuam deixando o local da picada mais susceptível a outros componentes e favorecendo uma distribuição ótima de substâncias que dificilmente poderiam se infiltrar no tecido alvo (Kostiza e Meier, 1996).

1.2.6. Peptídeos natriuréticos

Os peptídeos natriuréticos formam uma classe de peptídeos caracterizada por uma estrutura em anel composta por 17 resíduos de aminoácidos e uma ligação dissulfeto conservada. Biologicamente, atuam na regulação do balanço eletrólito/água e conseqüentemente atuam sobre a pressão arterial e na homeostase do volume plasmático (Atlas e Maack, 1992). Os principais tipos de peptídeos natriuréticos são: peptídeo natriurético atrial (ANP), peptídeo natriurético cerebral (BNP) e peptídeo natriurético tipo C (CNP). Os peptídeos natriuréticos encontrados nos venenos de serpentes compartilham propriedades estruturais e funcionais com os três tipos (Schweitz *et al.*, 1992) apresentando efeito sobre a vasodilatação, promovendo o relaxamento da musculatura lisa (Fry *et al.*, 2005) bem como o aumento da permeabilidade capilar, auxiliando na rápida difusão das toxinas no local da picada (Ho *et al.*, 1997). Segundo St Pierre *et al.* (2006), os peptídeos natriuréticos constituem as menores proteínas descritas até o momento nos venenos dos elapídeos da Austrália, com 35 a 39 resíduos de aminoácidos.

1.2.7. Snacles (Snake venom C-type lectins)

As lectinas do tipo C presentes nos venenos de serpentes foram recentemente renomeadas para Snacles pelo Comitê Científico de Padronização da Sociedade Internacional de Trombose e Hemostasia (Clemetson *et al.*, 2009). As Snacles são proteínas desprovidas de atividade enzimática que normalmente podem ser homo ou heterodiméricas com cadeias alfa e beta relacionadas estruturalmente e com as subunidades unidas por ligações dissulfeto. Em alguns casos, podem formar complexos a partir da agregação entre 4 ou 5 unidades diméricas (Doley e Kini, 2009).

As lectinas do tipo C “verdadeiras” (CTL) se ligam a carboidratos na presença de Ca^{2+} e iniciam uma diversidade de processos biológicos como adesão, aglutinação, endocitose, neutralização do patógeno (Ogawa *et al.*, 2005) e agregação plaquetária (Clemetson *et al.*, 2001).

Algumas lectinas parecem ter perdido a capacidade de ligação à carboidratos, formando assim o grupo de proteínas do tipo lectinas (CLRP), por ter em comum características estruturais com as CLTs. Este grupo induz atividade anticoagulante a partir de sua ligação com a trombina (Arocas *et al.*, 1996) ou com os fatores IX e X da cascata de coagulação sanguínea (Atoda *et al.*, 1991). As CLRPs induzem também

agregação plaquetária por meio de sua ligação ao receptor de membrana das plaquetas (Li *et al.*, 2005).

1.2.8. Waprinas

As waprinas ou WAP (*Whey Acid Protein*) possuem aproximadamente 50 resíduos de aminoácidos com oito resíduos de cisteínas conservados formando quatro ligações dissulfeto. As regiões entre os resíduos de cisteínas são diferentes entre os membros desta família, conferindo assim uma diversidade de funções biológicas como inibição Na⁺K⁺ATPase (Araki *et al.*, 1989), inibidor de protease (elafina) (Francart *et al.*, 1997), atividade inibitória do crescimento (ps20) (Larsen *et al.*, 1998) e atividades bactericidas (St. Pierre *et al.*, 2008). Em mamíferos, as waprinas parecem estar relacionadas à maturação espermática no epidídimo (Simpson e Nicholas, 2002). Em serpentes, esta classe de moléculas já foi descrita nas famílias Colubridae e Elapidae, no entanto sua atividade biológica é ainda pouco caracterizada. Acredita-se que as waprinas apresentam atividade antimicrobiana específica na inibição do crescimento de bactérias Gram-positivas (Nair *et al.*, 2007).

1.3. Gênero *Micrurus*

O gênero *Micrurus* Wagler, 1824, juntamente com os gêneros *Leptomicrurus* Schmidt 1928 e *Micruroides* Schmidt 1937 são os representantes da família Elapidae nas Américas e são conhecidas como serpentes corais verdadeiras. De acordo com diferenças fenéticas (coloração e padrão de distribuição dos anéis pretos ao longo do corpo), as serpentes corais podem ser divididas em quatro grupos: monodal (sequência de faixas vermelha-amarela-preta-amarela-vermelha), triadal da América Central, triadal da América do Sul e as serpentes corais bicólores (Campbell e Lamar, 2004). O gênero *Micrurus* é o mais diverso, com 70 espécies que são encontradas desde a Argentina até o sul dos Estados Unidos (Campbell e Lamar, 2004; Di-Bernardo *et al.*, 2007).

As serpentes do gênero *Micrurus* (*micro* = pequeno e *urus* = cauda) caracterizam-se principalmente por sua coloração aposemática viva e contrastante, apresentam anéis completos em torno do corpo, de cores vivas, vermelhos, brancos ou amarelos e pretos, geralmente dispostos em tríades (preto-amarelo/branco-preto-amarelo/branco-preto-vermelho) (Roze, 1996). As serpentes corais são consideradas pequenas, 60 cm a 1,60 cm em espécimes adultos de maior porte. O corpo é recoberto por escamas lisas, a cauda é curta e roliça. A cabeça é oval, recoberta por placas simétricas, não apresentam fossetas loreais, possuem olhos pequenos, pretos,

quase sempre localizados numa faixa preta da cabeça e pupila elíptica vertical. O pescoço não é bem pronunciado, a musculatura cervical é bem desenvolvida e os ossos do crânio são bastante fortes, adaptados para escavação. A cinética craniana é limitada, onde a abertura bucal não ultrapassa o ângulo de 30º, o que repercute diretamente no tamanho das presas inoculadoras de veneno (cerca de 2,5 mm). A dentição das corais é proteróglifa, os dentes inoculadores são frontais com sulco anterior por onde escorre o veneno. A injeção de veneno é difícil e superficial, pois a maxila é fixa, não permitindo o deslocamento dos dentes inoculadores. As limitações anatômicas são compensadas por um hábito peculiar, o de morder a presa sem soltar, de forma que o período de inoculação seja prolongado (Melgarejo, 2003).

As corais são animais de hábitos fossoriais ou semi-fossoriais, habitando principalmente a camada superficial do solo, ou sob a serrapilheira que cobre o chão das matas. Eventualmente saem à superfície em busca de alimento ou para acasalar, ou ainda depois de fortes chuvas. Como estratégia de defesa utilizam sua coloração aposemática e o comportamento de contorcer bruscamente o corpo, esconder a cabeça e levantar a cauda enrolada, chamando desta forma a atenção do predador ou da presa para cauda (Melgarejo, 2003). Sua dieta é composta principalmente por serpentes e/ou anfisbenídeos (cobras-cega). No entanto, algumas espécies possuem hábitos alimentares bastante peculiares, podendo se alimentar de peixes ou onicóforos (Jorge da Silva *et al.*, 1991; Jorge da Silva e Aird, 2001).

No Brasil, o gênero *Micrurus* é representado por 20 espécies: *M. albicinctus*, *M. altirostris*, *M. averyi*, *M. brasiliensis*, *M. decoratus*, *M. filiformis*, *M. hemprichii*, *M. mipartitus*, *M. ornatissimus*, *M. paraensis*, *M. putumayensis*, *M. silviae*, *M. tricolor*, *M. waehnerorum*, *M. corallinus*, *M. frontalis*, *M. ibiboboca*, *M. lemniscatus*, *M. spixii* e *M. surinamenses*, onde as seis últimas correspondem às mais comuns e importantes do ponto de vista da saúde pública (Jorge da Silva e Sites 1999; Di-Bernardo *et al.*, 2007).

Os envenenamentos humanos causados por acidentes com serpentes corais são relativamente raros devido ao seu hábito semi-fossorial, seu comportamento não agressivo e suas limitações anatômicas e funcionais. No Brasil, foram responsáveis por 0,65% (n=486) dos 75.312 casos dos acidentes ofídicos notificados entre os anos de 2001 a 2004, sem nenhum caso de morte registrado (Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde do Brasil, 2005, dados não publicados). As regiões anatômicas mais frequentemente atingidas pelas picadas são as mãos (Bucarechi *et al.*, 2006), o que provavelmente reflete o manuseio inapropriado ou imprudente destas

serpentes, já que as mesmas necessitam de morder, prender e mastigar suas presas para que possam inocular a peçonha (Parrish e Kahn, 1967).

De acordo com as observações clínicas o acidente elapídico é caracterizado como neurotóxico. Os sintomas podem aparecer precocemente, em menos de 1h após a picada. O quadro clínico é caracterizado por discreta dor local geralmente acompanhada de parestesia, náusea, vômitos, sudorese, fraqueza muscular progressiva, ptose palpebral, dificuldade de acomodação visual, oftalmoplegia e anisocoria (*facies miastenica*), podendo surgir também dificuldades de manutenção da posição ereta, mialgia localizada ou generalizada e dificuldade de deglutição em virtude da paralisia do véu palatino. A paralisia flácida da musculatura respiratória compromete a ventilação, podendo haver evolução para insuficiência respiratória aguda e apnéia (Vital Brazil, 1987; Azevedo-Marques *et al.*, 2003).

Experimentalmente, o veneno de *Micrurus* apresenta um quadro maior de atividades. Segundo Vital Brazil (1987) a peçonha promove mudanças neurofisiológicas similares às induzidas pelas neurotoxinas pré e pós-sinápticas nas junções neuromusculares. São descritos também efeitos cardiotoxícos, hemolíticos e miotóxicos (Gutiérrez *et al.*, 1983, 1992).

A peçonha das serpentes do gênero *Micrurus* é conhecida por sua potente neurotoxicidade, a qual é mediada por neurotoxinas pré e/ou pós-sinápticas (Vital Brazil, 1965). Os venenos das serpentes corais sul-americanas *M. lemniscatus*, *M. frontalis* e *M. corallinus* atuam sobre a membrana de preparações neuromusculares sem alterar a força de contração muscular em resposta a estímulos diretos e o potencial de membrana (Vital Brazil e Fontana, 1983/1984). O veneno de *M. dumerelli carinicauda* é capaz de promover uma redução da amplitude e posterior extinção dos potenciais de placa terminal em miniatura (MEPPs) em preparação neuromuscular de mamífero, e também de inibir a resposta a acetilcolina em junção neuromuscular de ave, evidenciando assim uma atividade neurotóxica pós-sináptica (Serafim *et al.*, 2002). Comportamento semelhante é observado no veneno de *M. lemniscatus carvalhoi* que atua preferencialmente nos receptores nicotínicos pós-sinápticos, interferindo na transmissão neuromuscular sem afetar as membranas musculares adjacentes (Cecchini *et al.*, 2005). A atividade neurotóxica do veneno de *M. altirostris* é caracterizada por uma forte ligação de componentes do veneno a receptores nicotínicos, com bloqueio neuromuscular irreversível de ação predominantemente subsináptica e sem envolvimento de atividade enzimática (Abreu *et al.*, 2008). O bloqueio neuromuscular induzido pela peçonha de *M. frontalis* na preparação nervo

frênico-diafragma de rato pode ser revertido com o uso de neostigmina, o que faz com que o uso de drogas anticolinesterásicas possa ser utilizado como terapêutica alternativa ou complementar à soroterapia (Vital Brazil e Vieira, 1996).

Algumas sequências de aminoácidos de α -neurotoxinas de *Micrurus* já foram parcial ou completamente identificadas. *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus I* foi a primeira α -neurotoxina purificada e completamente sequenciada entre os elapídeos das Américas (Rosso *et al.*, 1996). Na peçonha desta mesma espécie foi identificado também o N-terminal de neurotoxinas de cadeia curta (Mnn-4 e Mnn-9) e de cadeia longa (Mnn-3 e Mnn-1A) (Alape-Girón *et al.*, 1996). Francis *et al.* (1997) descreveram o isolamento e a região N-terminal de uma provável isoforma de neurotoxina pós-sináptica do veneno de *M. frontalis*. Seis peptídeos, com motivos estruturais semelhantes ao das toxinas de três-dígitos, foram isolados e completamente identificados a partir do veneno de *M. surinamensis*. Estas neurotoxinas, testadas em sistema *in vitro* heterólogo, promoveram o bloqueio dos receptores nicotínicos de acetilcolina endógenos de peixes e mamíferos (Olamendi-Portugal *et al.*, 2008). A sequência completa de uma toxina de cadeia curta e o fragmento N-terminal de outras cinco α -neurotoxinas foram determinados a partir da peçonha de *M. pyrrhocryptus* (Dokmetjian *et al.*, 2009).

Várias α -neurotoxinas foram também caracterizadas a partir do veneno de *M. corallinus* com o auxílio de uma biblioteca de cDNA da glândula de veneno e posterior análise comparativa com os bancos de sequência de DNA e de proteínas (Oliveira *et al.*, 2000; Leão *et al.*, 2009).

A atividade neurotóxica pré-sináptica geralmente é conferida a PLA2, às quais podem atuar nas terminações nervosas axônicas, impedindo a liberação de acetilcolina na fenda sináptica da junção neuromuscular de nervos motores. Esta atividade é descrita em *M. corallinus* (Vital Brazil 1987; Oliveira *et al.*, 2000) e *M. nigrocinctus* (Goularte *et al.*, 1995). Dal Belo e colaboradores (2005a, b), caracterizaram estrutural e funcionalmente uma nova PLA2 pré-sináptica em *M. dumerelli carinicauda* (MiDCA1). A toxina, com baixa atividade enzimática, induz alteração trifásica na resposta contrátil e aumento da frequência dos potenciais de ação em miniatura. Além disso, o bloqueio neuromuscular é mediado pela ativação dos canais de Na⁺ complementado pelo bloqueio dos canais de K⁺, resultando em uma despolarização permanente da terminação nervosa, principalmente pré-sináptica.

Do veneno de *M. lemniscatus*, foram isoladas quatro PLA2 com atividade neurotóxica (Mlx-8, Mlx-9, Mlx-11 e Mlx-12) capazes de induzir distúrbios

comportamentais, eletroencefalográficos e degeneração neuronal em camundongos. As Mlx são potentes convulsivantes, porém com baixa atividade epileptogênica. Provavelmente essas toxinas ligam-se às membranas neuronais, catalisam a hidrólise de fosfolípidos que por sua vez causam distúrbios na conformação da membrana, gerando aumento da liberação de neurotransmissores (Oliveira *et al.*, 2008).

A ação miotóxica pode estar associada à ação neurotóxica, ou parcialmente mascarada por essa. Em camundongos, os danos musculares podem ser observados por meio de técnicas histológicas e dosagem do nível de creatino-cinase no plasma. A atividade mionecrótica experimental foi evidenciada nos venenos de *M. nigrocinctus*, *M. alleri*, *M. frontalis*, *M. dumerelli carinicauda*, *M. surinamensis* (Gutiérrez *et al.*, 1983), *M. altirostris*, *M. spixii*, *M. hemprichi orton*, *M. corallinus*, *M. albicinctus*, *M. ibiboboca* (Gutiérrez *et al.*, 1992), *M. averyi* e *M. lemniscatus* (Barros *et al.*, 1994).

Segundo Goularte *et al.* (1995), a mionecrose provocada pelo veneno de *M. nigrocinctus* ocorre principalmente no sarcolema, provocando elevação do Ca^{++} citosólico, causando hipercontração dos microfilamentos, danos mitocondriais e ativação de fosfolipases dependentes de Ca^{++} . Uma fosfolipase do tipo A2 com ação miotóxica foi isolada a partir deste veneno (Arroyo *et al.*, 1987), mostrando ação similar a outros venenos da família Elapidae (Mebs, 1986).

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) mostraram que os venenos de *Micrurus* oriundos da região Amazônica, exceto *M. surinamensis*, nas mesmas doses testadas por Gutiérrez, apresentam intensa atividade edematogênica. Cechini *et al.* (2005) comparando a atividade biológica e enzimática entre diferentes espécies de *Micrurus* brasileiras, relataram significativa formação de edema e miotoxicidade inclusive em *M. surinamensis*. Para Barros *et al.* (1994), as diferenças nas atividades miotóxica e edematogênica possivelmente ocorrem em virtude da variação geográfica entre os espécimes de *M. surinamensis*.

Segundo Lomonte *et al.* (1993), as PLA2 tóxicas agem direta ou indiretamente na formação do edema. A atividade edematogênica em *M. frontalis* comparável à de *Bothrops alternatus* e à de *Crotalus durissus* foi detectada por Sanchez *et al.* (1992). Após injeção subcutânea em camundongos, o veneno de *M. altirostris* também induziu intensa resposta edematogênica, quando comparado com os venenos de *M. lemniscatus*, *M. frontalis* e *M. ibiboboca* (Moraes *et al.*, 2003).

A atividade hemorrágica também é descrita experimentalmente em venenos de *Micrurus*. 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.*, 1997; Jorge da Silva e Bucarechi, 2003), o veneno de *M. fulvius* exibe intensa atividade hemorrágica em camundongos (Tan e Ponnudurai, 1992) e o veneno de *M. averyi* promove uma discreta hemorragia (Barros *et al.*, 1994).

A peçonha de *M. altirostris* apresenta intensa atividade hemolítica indireta em leucócitos humanos, provavelmente relacionada à presença das PLA2 (Moraes *et al.*, 2003). Outra evidência de alta atividade fosfolipásica é a ruptura de lipossomos. Os venenos de *M. nigrocinctus*, *M. lemniscatus*, *M. surinamenses* e *M. frontalis*, apresentam alta taxa de ruptura de lipossomos, sendo o último o de maior atividade fosfolipásica quando comparados entre si (Cechini *et al.*, 2005).

A ação cardiovascular é também observada nos venenos de *M. fulvius* (Francis *et al.*, 1993) e *M. frontalis* (Francis, *et al.*, 1997). Em *M. frontalis*, este efeito ocorre devido à presença de uma PLA2 com atividade hipotensora (HT) e hemorrágica, a qual ainda não possui sua estrutura determinada (Francis *et al.*, 1997).

Por meio de técnicas de clonagem, foi identificado um peptídeo natriurético na peçonha de *M. corallinus*, o qual deve desempenhar importante papel durante o envenenamento por causar vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (Ho *et al.*, 1997).

Estudos bioquímicos e farmacológicos com os venenos de *Micrurus* são escassos devido à grande dificuldade de coleta e a manutenção em cativeiro das serpentes bem como a pequena quantidade de veneno obtida em cada extração (Jorge da Silva e Bucarechi, 2003).

A composição dos venenos pode ser influenciada por fatores tais como a origem geográfica, sazonalidade, idade, sexo, modo de extração, genética e hábitos alimentares dos indivíduos (Daltry *et al.*, 1996). Diferenças interespecíficas foram determinadas em relação à composição, à concentração enzimática e à atividade miotóxica entre as peçonhas de *Micrurus* (Aird e Jorge da Silva, 1991; Gutiérrez *et al.*, 1992). De acordo com uma comparação entre 15 diferentes *taxa* de *Micrurus* realizada por Jorge da Silva e Aird (2001), o tipo de presa é um fator de grande relevância na composição enzimática dos venenos deste gênero.

Os venenos de algumas espécies de *Micrurus* exibem baixa atividade 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, exibindo dessa forma propriedades biológicas bastante similares aos venenos dos elapídeos da Ásia e África (Aird e Jorge da Silva, 1991; Tan e Ponnudurai, 1992).

Por meio de técnicas de clonagem, já foram identificados um peptídeo natriurético (Ho *et al.*, 1997), uma α -neurotoxina (Oliveira *et al.*, 2000) e uma fosfolipase básica (Oliveira *et al.*, 2003) a partir da glândula de veneno de *M. corallinus*.

1.4. *Micrurus frontalis*

A serpente *M. frontalis* é geograficamente distribuída do centro-sul do Brasil até a Argentina (Campbell e Lamar, 2004). Estas serpentes corais são morfologicamente caracterizadas por possuírem o focinho preto com a borda das escamas brancas. A cabeça e as escamas frontal, supraoculares e parietal são pretas. Ventralmente, a escama mental, as três primeiras infralabiais e em alguns casos, as geniais anteriores são brancas com ou sem manchas irregulares. As tríadas do corpo variam entre e 10 e 15 e podem seguir dois padrões: o anel preto mediano mais longo que os pretos externos ou anéis pretos e brancos semi-iguais (Figura5) (Jorge da Silva e Sites, 1999, Jorge da Silva, 2007).

Estudos com a peçonha de *M. frontalis* revelam uma composição bastante complexa. De acordo com separações cromatográficas por exclusão molecular (coluna Superose 12), o veneno deste elapídeo apresenta um número maior de frações (10) do que aquele das demais *Micrurus* investigadas (3 - 6 frações) (Jorge da Silva *et al.*, 1991). Francis *et al.* (1997), encontraram a mesma quantidade de frações (utilizando uma coluna Sephacryl S-200 HR), no entanto, quando a fração 5 foi recromatografada, foram encontradas cerca de 20 proteínas, dentre as quais foram identificadas uma fosfolipase hemorrágica/hipotensora e o N-terminal de uma neurotoxina de ação pós-sináptica. Algumas das demais frações não apresentaram atividade em camundongos, porém, não se descarta a hipótese de que as mesmas possam ser tóxicas para outros animais, uma vez que a serpente em estudo é ofiófaga, isto é, se alimentam de serpentes (Daltry *et al.*, 1996; Francis *et al.*, 1998).



Figura 5. Espécime de *Micrurus frontalis* procedente do estado de Goiás. Foto: Nelson Jorge da Silva Jr.

O veneno da serpente *M. frontalis* do estado de Goiás, apresenta alta toxicidade e significativa formação de edema além de atividade miotóxica (Cechini *et al.*, 2005). Em ratos, este mesmo veneno causa hemorragia visceral, pulmonar e subendocárdica e em camundongos provoca hipotensão (Francis *et al.*, 1997). No entanto, Sanchez e colaboradores (1992) não detectaram atividade miotóxica, hemorrágica, necrosante e proteolítica no veneno de *M. frontalis* procedente de Minas Gerais, o que pode ser uma evidencia de variação geográfica nos venenos desta espécie.

Alguns componentes dos venenos de *Micrurus* apresentam funções específicas na ação total do veneno, enquanto que outros se exercem alguma função, essa ainda não foi elucidada (Jorge da Silva e Bucarechi, 2003). Apesar de algumas atividades enzimáticas e biológicas já terem sido descritas e de algumas substâncias terem sido isoladas e parcialmente caracterizadas, ainda existe no veneno de *M. frontalis* uma grande quantidade de compostos desconhecidos. Até o momento, nenhum estudo com o veneno de *M. frontalis* foi realizado com profundidade.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo principal deste trabalho é identificar e caracterizar estruturalmente e bioquimicamente moléculas isoladas a partir do veneno da serpente coral *Micrurus frontalis*.

2.2. Objetivos Específicos

- Purificar e caracterizar estrutural e bioquimicamente os componentes protéicos, de maior absorvância em 216 nm, do veneno de *M. frontalis*;
- Determinar a estrutura primária, por sequenciamento *De novo* e degradação de Edman, dos componentes protéicos purificados;
- Identificar a atividade biológica dos componentes protéicos purificados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Veneno

O veneno de *M. frontalis*, foi gentilmente cedido pelo Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas (CEPB) da Universidade Católica de Goiás (UCG). A peçonha, proveniente de serpentes capturadas no Estado de Goiás (n=5), foi extraída segundo o procedimento descrito por Aird e Jorge da Silva (1991). O veneno foi coletado em tubos microcapilares de 25 a 70 μ L, imediatamente congelado, submetido à liofilização e mantido a -20°C até o momento de uso.

3.2. Purificação

A separação inicial dos componentes do veneno foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) (Class LC-10VP, Shimadzu Co., Japão). Dois miligramas do veneno foram diluídos em 500 μ L de água Milli-Q contendo ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% e aplicados em coluna de fase reversa semipreparativa C₄ (Vydac 214TP1010, Estados Unidos) (5 μ m; 10 x 250 mm). A coluna foi previamente lavada com solvente B (acetonitrila contendo 0,1 % TFA, ambos grau HPLC – TFA, v/v) e equilibrada com solvente A (água Milli-Q contendo 0,1 % de TFA, v/v). As frações foram eluídas durante 120 min sob gradiente linear de solvente B (99,9% acetonitrila + 0.1% TFA) variando de 5 a 95% com fluxo contínuo de 2.5 mL/min.

Outro fracionamento do veneno bruto foi realizado utilizando coluna do tipo μ RPC C₂C₁₈ ST 4,6/100 (Amersham Biosciences, Suécia). Nesta separação foram utilizadas diferentes concentrações de TFA nos solventes, solvente A' (água Milli-Q + 0,065% de TFA, grau HPLC) e solvente B' (acetonitrila + 0,05% TFA, ambos grau HPLC). A coluna foi previamente lavada com solvente B' e equilibrada com solvente A' sob gradiente isocrático em um fluxo de 0,08 mL/min. As frações foram eluídas sob gradiente de 5 a 80% de acetonitrila (com 0,05% TFA) em 60 min, com fluxo contínuo de 0,08 mL/min.

As frações contendo os componentes com maior absorvância no comprimento de onda de 216 nm foram recromatografadas utilizando colunas analíticas do tipo C₁₈ (Vydac 218TP54, Estados Unidos) (5 μ m, 4.6 x 250 mm) e/ou Source 5RPC ST 150 x 4,6 mm, (poliestireno/divinil benzeno) (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suécia) com fluxo de 1,0 mL/min. Para uma separação mais eficiente dos componentes do veneno

foi também utilizada cromatografia líquida ultra rápida de alta eficiência – UFLC (Prominence UFLC, Shimadzu Co., Japão) em coluna C₁₈ Shim-pack XR-ODS (3,0 x 50 mm) (Shimadzu Co., Japão) fluxo de 0,4 mL/min e temperatura controlada na faixa de 40 °C. Em todos os passos cromatográficos foram utilizados gradientes otimizados.

Todos os experimentos foram monitorados em dois comprimentos de onda 216 e 280 nm. As frações foram coletadas manualmente, congeladas, liofilizadas e mantidas a -20°C.

3.3. Análise da massa molecular

A pureza e a massa molecular dos polipeptídeos provenientes das cromatografias de fase reversa foram determinadas por espectrometria de massa do tipo electrospray (HCT – Ultra ETD II, Bruker Daltonics, Billerica, USA), por MALDI-TOF/MS equipado com laser SmartBeam™ (Ultraflex III, Bruker Daltonics, Billerica, MA) e MALDI Synapt HDMS (Waters Co. Manchester, UK).

Alíquotas das frações 5, 6, 10 e 12 provenientes da cromatografia com coluna semipreparativa C₄ e da fração 7 proveniente da cromatografia com coluna C₂C₁₈ foram diluídas em água Milli-Q, acrescentadas a uma solução saturada de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico na proporção de 1:3, aplicadas em placa de MALDI-TOF/TOF e cristalizadas à temperatura ambiente.

Os dados de MS obtidos em MALDI-TOF/TOF foram controlados pelo software FlexControl 3.0. Os espectros foram adquiridos nos modos linear e/ou refletido, utilizando calibração externa. Para o modo linear, a calibração ocorreu com um padrão compreendendo uma mistura de proteínas Bruker número 5 (insulina, ubiquitina, citocromo C, mioglobina, citocromo C [M+2H]⁺ e mioglobina [M+2H]⁺), enquanto que a calibração no modo refletido foi realizada com calibrante Bruker número 4 (bradicinina, angiotensinas I e II, substância P, bombesina, substrato renina, ACTH (1-17), insulina). Os espectros de massa foram adquiridos com 1000 disparos de laser, a uma frequência de 100 Hz e detecção de massa nas faixas de 2000-6000 Da e 6000-20000 Da para os modos refletido e linear, respectivamente.

Na identificação da massa molecular por ESI, as amostras foram diluídas em solução de acetonitrila 50% contendo ácido fórmico 0,1%. Os espectros foram adquiridos em modo W com a seleção de íons positivos. A voltagem do capilar foi ajustada para 1,7 kV e a do cone para 30 V. A detecção dos espectros foi realizada na faixa de massa m/z 300-3000 Da.

3.4. Quantificação dos resíduos de cisteína

O número de ligações dissulfeto foi obtido após redução das cisteínas e alquilação dos polipeptídeos nativos. A redução ocorreu em presença de DTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 50 mM ressuspensionado em bicarbonato de amônio 100 mM pH 8,0. A reação foi incubada por 1 h a 70 °C. Imediatamente após a redução, as amostras foram alquiladas, com o acréscimo de iodoacetamida 50 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e incubadas a 37 °C por 1h em ausência de luz. Após redução e alquilação, as amostras foram dessalinizadas por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna analítica C₁₈ (218TP54 Grace Vydac, USA) em gradiente linear de acetonitrila 5-95% em 120 minutos. A massa molecular das amostras reduzidas e alquiladas foi determinada por ESI e MALDI-TOF/MS.

O número de resíduos de cisteínas modificadas foi estimado pela fórmula:

$$Nc = \frac{Malq - Mnat}{57,1}$$

Onde:

Nc: número de resíduos de cisteína

Malq: massa molecular da amostra reduzida e alquilada

Mnat: massa molecular da amostra nativa

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

3.5. Tratamento enzimático

Para identificação da estrutura primária, as toxinas foram primeiramente reduzidas e alquiladas, como descritas anteriormente, e depois submetidas a tratamento enzimático. Cinco endoproteases diferentes foram utilizadas: Asp-N, Glu-C, Lys-C, quimotripsina e tripsina. Todas as clivagens enzimáticas foram realizadas de acordo com Aitken *et al.*, 1988.

- *Asp-N* (Roche Applied Science, Alemanha) – Nesta hidrólise enzimática a amostra foi diluída em fosfato de sódio 50 mM pH 8,0. Dez microlitros da enzima (ressuspensionada conforme instruções do fabricante) foram adicionados à amostra e incubados a 37 °C por 2 horas.

- *Glu-C* (Roche Applied Science, Alemanha) – Cerca de 20 µL da enzima, solubilizada segundo as instruções do fabricante, foram adicionados as amostras. Estas, foram diluídas em bicarbonato de amônio 0,1 M pH 8,0 numa concentração final de 10 mg/mL. A reação ocorreu a 37 °C *overnight*, sob constante agitação.
- *Lys-C* (Roche Applied Science, Alemanha) - No tratamento com *Lys-C* as amostras foram solubilizadas em bicarbonato de amônio 0,1 M em pH 8,0. Foram adicionados 20 µL da enzima e as soluções incubadas por 24 h a 37 °C sob agitação.
- *Quimotripsina* (Roche Applied Science, Alemanha) – Dez microlitros de enzima foram adicionados à amostra previamente dissolvida em Tris-HCl, pH 7,8. A reação ocorreu sob agitação a 37 °C *overnight*.
- *Tripsina* (Pierce Chemical, USA) – A tripsina imobilizada foi utilizada após sucessivas lavagens com bicarbonato de amônio 10 mM. As amostras foram ressuspendidas em bicarbonato de amônio 0,1 M em pH 8,0 e 10 µL de tripsina foram acrescentados a esta solução. A reação foi incubada a 37 °C por 3 h sob agitação constante.

Após os tratamentos, as amostras foram imediatamente levadas à cromatografia líquida em coluna analítica do tipo C₁₈ (218TP54 Grace Vydac, USA), para a separação dos peptídeos gerados pela digestão. As frações foram eluídas em gradiente linear de 5 a 95% de acetonitrila com TFA 0,1%, monitoradas em 216 e 280nm, coletadas manualmente e liofilizadas.

A massa molecular dos fragmentos digeridos foi determinada por ESI e MALDI-TOF/MS.

3.6. Sequenciamento da Estrutura Primária

3.6.1. Degradação de Edman

As frações purificadas nativas, reduzidas/alquiladas e os fragmentos gerados após o tratamento enzimático foram sequenciados automaticamente pelo método de degradação de Edman em um Sequenciador de Proteínas e Peptídeos PPSQ-23 (Shimadzu Co., Japão), conforme instruções do fabricante.

3.6.2. De novo

A sequência de alguns fragmentos gerados após o tratamento enzimático foi determinada por espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF. O modo MS/MS, visando à fragmentação dos íons precursores (TOF-TOF), foi realizado por meio de aceleração dos precursores de 8kV. A fragmentação dos íons ocorreu na célula de LIFT com aceleração de 19kV. A seqüência primária dos peptídeos foi interpretada manualmente por sequenciamento *De novo* dos espectros obtidos nas análises de MS/MS. Os espectros foram processados e visualizados utilizando o software FlexAnalysis 3.0.

3.7. Análise das sequencias primárias obtidas

As sequencias de aminoácidos das proteínas e peptídeos foram comparadas com outras sequencias disponíveis em bancos de dados por meio do programa MPsrch (<http://www.ebi.ac.uk/MPsrch/>). Os alinhamentos das sequencias foram realizados pela ferramenta de múltiplos alinhamentos *Clustal W* disponível no *software Bioedit v.7.0.4.1..*

3.8. Atividade Neurotóxica

Os experimentos eletrofisiológicos foram realizados em colaboração com o Dr. Paulo Sérgio Lacerda Beirão e a Dra. Lígia Araújo Naves Kushmerick, ambos da Universidade Federal de Minas Gerais. Os procedimentos utilizados nos testes foram de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram conduzidos segundo protocolos previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA – UFMG).

Rãs (*Rana catesbeiana*) de ambos os sexos, com peso entre 70 a 90 g foram utilizadas. Estes animais foram mantidos no Laboratório de Eletrofisiologia Celular da UFMG, em tanque com água corrente e alimentados com insetos uma vez por semana. As rãs foram sacrificadas por decapitação e o músculo peitoral cutâneo foi fixado, com auxílio de alfinetes entomológicos, em uma câmara de acrílico de 5,0 mL revestida de silicone (“Dow Corning Sylgard”, E.U.A.), contendo solução nutritiva de Ringer (NaCl 115 mM; KCl 2,5 mM; CaCl₂ 1,8 mM; e HEPES 5 mM) pH 7,4. A preparação foi mantida a temperatura ambiente (20 - 25 °C).

O potencial de placa terminal em miniatura (MEPP) foi medido utilizando a técnica de *current clamp*, que mensura o potencial de membrana. Os MEPPs foram

registrados por meio do empalamento intracelular de microeletrodos de borossilicato (preparados com auxílio do estirador de pipetas modelo PN-30, Narishige, Japão) na região terminal da placa motora da fibra muscular, com auxílio de micromanipulador (World Precision Instruments, Sarasota, E.U.A). Para conexão elétrica com o interior da célula, os microeletrodos foram preenchidos com KCl 3 M e foram confeccionados com resistência entre 5–15 MΩ.

A diferença de potencial transmembrana foi captada por um eletrodo de registro em relação ao eletrodo de aterramento, presente na solução. Os potenciais foram captados por intermédio de amplificador (10 vezes) de sinal (Dagan Co., Minneapolis, USA) e observados em osciloscópio (Tektronix, Oregon, E.U.A). O sinal foi adicionalmente amplificado 1000 vezes por um segundo amplificador (Ectron 750, Ectron Co., California, E.U.A). A digitalização dos dados foi realizada por um conversor A/D (LabMaster, Axon Instruments, California, E.U.A) acoplado a um computador munido de software para aquisição de dados (Strathclyde Electrophysiology Software, Glasgow, Escócia). Para análise dos dados foi utilizado o programa ClampFit versão 9.2.

Para verificar os efeitos das neurotoxinas do veneno de *M. frontalis* sobre os MEPPs, as neurotoxinas foram solubilizadas em água Milli-Q, alíquotadas em diferentes concentrações (0,5; 1,0 e 2,0 μM) e aplicadas diretamente no banho. Na tentativa de reversão do bloqueio provocado pelas toxinas na junção neuromuscular, a preparação foi submetida à lavagem com solução de Ringer por no mínimo 30 minutos a 5,0 mL/min. O tamanho dos potenciais em miniatura (MEPP) foi medido após correção com o potencial de membrana padrão de -90 mV, de acordo com método descrito por Katz e Thesleff (1957). Para avaliar a significância estatística no tamanho e frequência dos MEPPs, cada fibra foi seu próprio controle. Como controle foi registrado uma média de 100 MEPPs antes da aplicação das toxinas. Na presença das neurotoxinas na preparação, cerca de pelo menos 34 eventos foram registrados em diferentes intervalos de tempo (5 a 60 min). A d-tubocurarina, antagonista dos receptores nicotínicos de acetilcolina, foi utilizada como controle positivo.

Para cada experimento, foi calculada a média e os intervalos de confiança de 95%, de acordo com a distribuição de t de Student. Os dados foram considerados estatisticamente diferentes quando se apresentavam fora do intervalo de confiança.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização geral do veneno da serpente *M. frontalis*

O veneno bruto de *M. frontalis* foi inicialmente separado por cromatografia líquida em coluna C₄ semipreparativa (Figura 6A) e em coluna C₂C₁₈ (Figura 6B). Em ambas as metodologias, os componentes foram eluídos entre 20 e 60% de ACN + TFA 0,1% (Figura 6). As massas moleculares foram identificadas por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF em modo linear. As massas identificadas variaram entre 3000 e 60000Da, sendo que a maioria delas está entre a faixa de 6000 a 15000Da (Tabela 1).

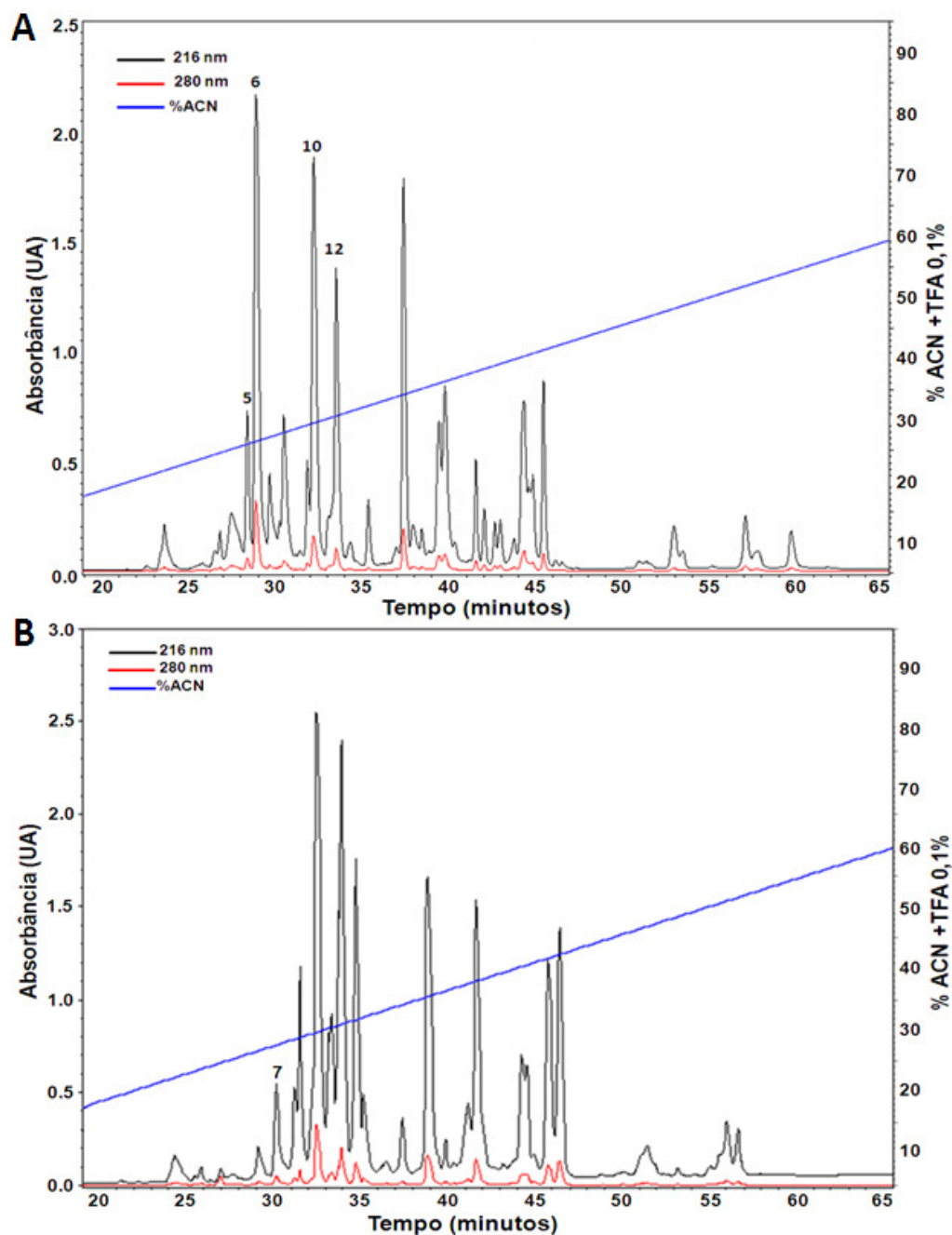


Figura 6. Perfis cromatográficos do veneno bruto da serpente *M. frontalis* em coluna semi-preparativa C₄ (A) e analítica C₂C₁₈ (B). O veneno, solubilizado em TFA 0,1%, foi eluído sob gradiente linear de acetonitrila (99,9% ACN + 0,1% TFA) por 100 min. A absorbância foi monitorada nos comprimentos de onda 216 e 280 nm. As frações 5, 6, 10, 12 (A) e 7 (B) foram selecionadas para posterior purificação e sequenciamento da estrutura primária.

Tabela 1. Lista das massas moleculares médias encontradas no veneno da serpente *Micrurus frontalis* adquiridas por MALDI-TOF-TOF em modo de aquisição linear.

Tempo de retenção	[M + H] ⁺						
23,75	6875,6	7021					
24,37	2168,7	2262,5	2291,8	2453,8	3316,9	3373	3385,2
	6785,7	6933,7	18576,4	20410,8	22217,9	23848,8	24993,1
	25782,3	27221,9	33154,2	34047,4	40363,5	40516	
27,39	6524,1	6566,3	6671	6952,1	7097,4		
27,93	17752,9	21198,3	24674,2	28191,7	31711,4	35286,5	38829,3
	46006,2	53229,8	60501,6				
28,86	3709,5	7261,3	7411,8				
29,16	3275,3	6508,3	6552	6588,3	6642,3	6697,4	6740,6
	7327,3	13098,2	19662,9	22946,1	26223,4	32783,3	39341,7
	45878,2	17765,8	21234,1	24693	28245,1	31740,3	35356
	38868,3	46047,2	53278,9				
30,35	3162,1	3177,8	3241,1	3276,9	3298,1	3369,2	3466,3
	6325,3	6357	6394,4	6538	6555,6	6592,6	17111,4
	19213,9	20556,8	22495,8	23798,2	25619,2	27370,6	30654,5
	32029,7	34299,6	37556,9	38440,9	44522,7	44853,9	51534,5
	58573,2						
31,13	3120,7	3168,7	3464,8	3570,3	3577,6	6242,7	6388,3
	6554,1	7157,3	17750,3	18708,3	18735,2	19654,7	19664,2
	20573	21492,3	23373,7	24341,2	24985,6	25309,7	25905,4
	26823,2	27743,9	31033	31236,8	32155,3	33074,1	
31,7	5750,6	6244,8	6316,1	6497,2	6556,6	6924,3	7159,7
	7173,8	7285,7	7415,2	7674,4			
32,08	7036,4	6552,2					
32,41	6644	6552,3	6757,8	6884			
32,94	3641,5	3705,5	5745,8	7280,6	7410,2		
33,8	2975,5	2976,5	3202,1	3440,8	3577,4	6406,6	6552,1
	6694,3	6744,8	6882	7026,6	7170,2	7410,9	19322,8
	26527,2	34063,6					
35,64	6731,6	6877,4	13459,2	18308,1	20199,2	20660,6	21852
	25428,2	26934,2	32666,8	33667,9	39994,6	40405,6	47391,5
38,55	6552,5	6723,5	6794,9	7097,9	7163,6	7519,8	12887,8
	13444,6	18361,9	18732,9	19139,7	20231	20585,4	20987,6
	22266,4	25453,6	26954,7	29374,5	33212,1	40035,6	40423,9
	47607,2	54850,1					
40,2	6553,5	6653,9	6771,2	6843,3	7189,6	11135,4	11169
	13103,3	13305	13538,8	20554,8	22339,8	22761	24686,2
	25144,6	26658	27649,7	34647,7	44624,8	49232,6	
41,43	5325,7	7141,6	7286,8	17704,5	18281,5	19599,1	20749,6

Tempo de retenção	[M + H]⁺						
	25312,7	25786,8					
42,34	5329,5	5345,4	6669,9	6742,7	13338,1	13483,1	18111,4
	18670,5	20007,6	24473,1	25168	26689,5	30861,8	32031,8
	32334,2	39596,4	40042,2	53406,2	54163,8		
42,9	5327,4	6641,6	6677,6	13279,5	13351,4	18101,4	18681,1
	19988,6	20871	22968,3	24613,1	25140,6	26660,8	30846,3
	39544,1	39879,6					
43,26	2107,9	2663,2	2882,8	4093,9	4446,9	4448,6	5327,1
	6152,1	6223,8	6673,1	6745,9	12301	12443,8	13344,2
	13489,4	17151	17630,3	18144,7	22969,7	24080,3	25192,1
	27931,2	37350,7	38508,3	39632,3			
43,62	5329,2	6675,5	6748,6	7954,5	13350,8	13495,9	15905,2
	17689,7	18888,5	19796,2	20047,2	21375,8	25205,9	25702,1
	26713,8	27984	29275,6	31034,4	34130,5	35043,2	36999,1
	37689,3						
45,03	6758,2	6871	13514,7	13741,5	18517	20194	20388,5
	25686,9	27174,1	29010	30231,4	33017,7	40400,3	40760
	43694,9	54267,2	55341,9				
45,39	6725,9	13450,8					
45,88	6754,4	6827,1	13512,8	18361,6	20253,8	20727,3	25510,4
	27019,2	32778,2	33784,7	40119,1	40541,3	54067,6	54987,9
	69977,3						
51,99	5700,8	6396,6	6555,7	6747,7	7643,3	11463,2	11601,2
	11781,5	15465,3	15694,5	21185,5	21467,2	21825,6	22930,3
	23071,2	23194,6	23544,5	30141,9	46437,4	47054,7	47289,6

4.2. Componentes identificados

4.2.1. Neurotoxinas

4.2.1.1. Isolamento e purificação das neurotoxinas

A separação inicial do veneno da serpente *M. frontalis* em coluna semi-preparativa C₄ e analítica C₂C₁₈ gerou cerca de 30 frações em cada método cromatográfico utilizado. As frações eluídas entre 30-35% de acetonitrila, com componentes de massa molecular entre 6000 – 8000 Da, foram analisadas mais detalhadamente, por apresentarem características, como massa molecular e tempo de retenção, semelhantes às neurotoxinas isoladas em elapídeos. As frações com absorvância acima de 0,75 UA e que não apresentavam componente molecular único foram selecionadas para posterior purificação (Figura 6A). A fração 7 da separação cromatográfica realizada em coluna C₂C₁₈ (Figura 6B), apesar de não ser muito abundante, foi também selecionada por apresentar um componente de massa molecular diferente dos encontrados na cromatografia semi-preparativa em coluna C₄.

Fração 5

A fração 5 da cromatografia semi-preparativa em coluna C₄ foi submetida a recromatografia analítica em coluna C₁₈. A completa separação dos componentes se deu com o uso do gradiente de eluição entre 20-30% de acetonitrila em 30 min (Figura 7). A pureza e a massa molecular de cada componente foram determinadas por espectrometria de massa com ionização do tipo *electrospray* (ESI). As massas moleculares monoisotópicas identificadas foram $[M+H]^+ = 7032,8$ (Figura 8) e $[M+H]^+ = 6548,9$.

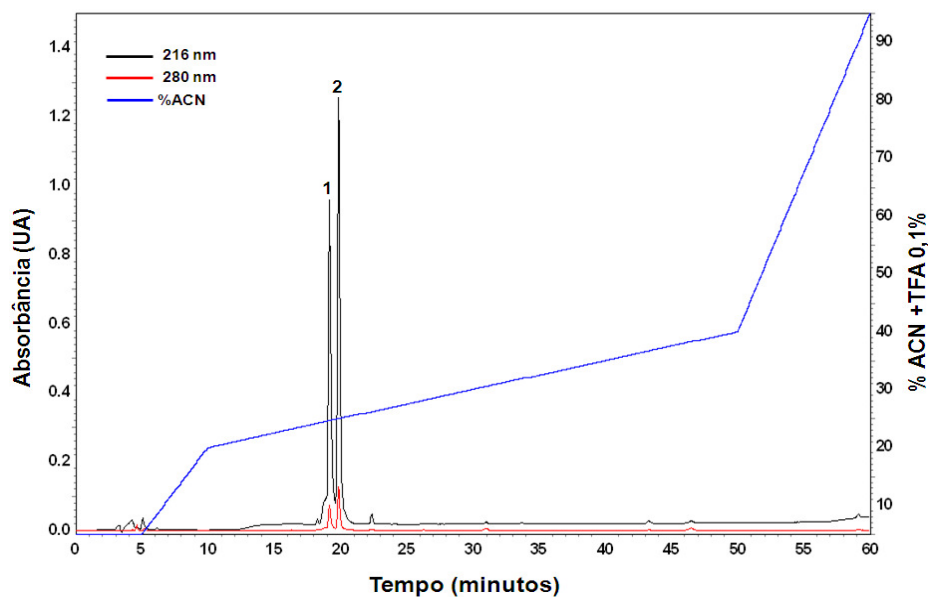


Figura 7. Perfil cromatográfico analítico da fração 5 do veneno de *M. frontalis*. A fração foi purificada em coluna C₁₈ analítica, fluxo 1,0 mL/min com gradiente otimizado entre 20-30% de acetonitrila contendo TFA 0,1%. A absorbância foi monitorada em dois comprimentos de onda, 216 e 280 nm.

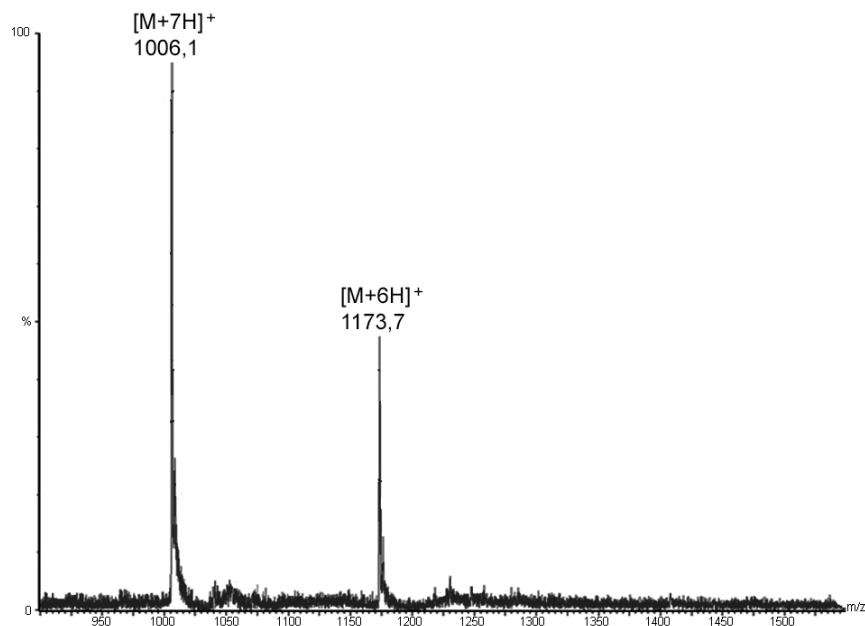


Figura 8. Espectro de massa molecular do componente 1 da fração 5 do veneno de *M. frontalis*. A série de íons multicarregados, mostra uma proteína com $[M+H]^+ = 7032,8$. O espectro de massa foi adquirido por ionização *electrospray* (ESI) em espectrômetro de massa Synapt MS System (Waters, Manchester, UK) operado em modo W a um fluxo de 2 μ L/min.

Fração 6

As duas sub-frações observadas após a recromatografia da fração 6 em coluna analítica C₁₈ (Figura 9A) foram eluídas no mesmo gradiente de acetonitrila utilizado anteriormente. A fração de maior absorbância, quando submetida ao teste de averiguação de pureza por espectrometria de massa, revelou a presença de três componentes diferentes. A completa separação das prováveis isoformas foi possível somente após um terceiro passo cromatográfico utilizando cromatografia líquida ultra-rápida (UFLC) em coluna analítica C₁₈ Shim-pack XR-ODS, sob temperatura controlada a 40 °C e fluxo 0,4 mL/min (Figura 9B). Foram identificadas, por ESI, a massa [M+H]⁺=6642,8 para o componente 1 e [M+H]⁺=6548,9 para o segundo componente (Figura 10). A subfração 2 das frações 5 e 6 correspondem ao mesmo componente e foram estudadas juntas.

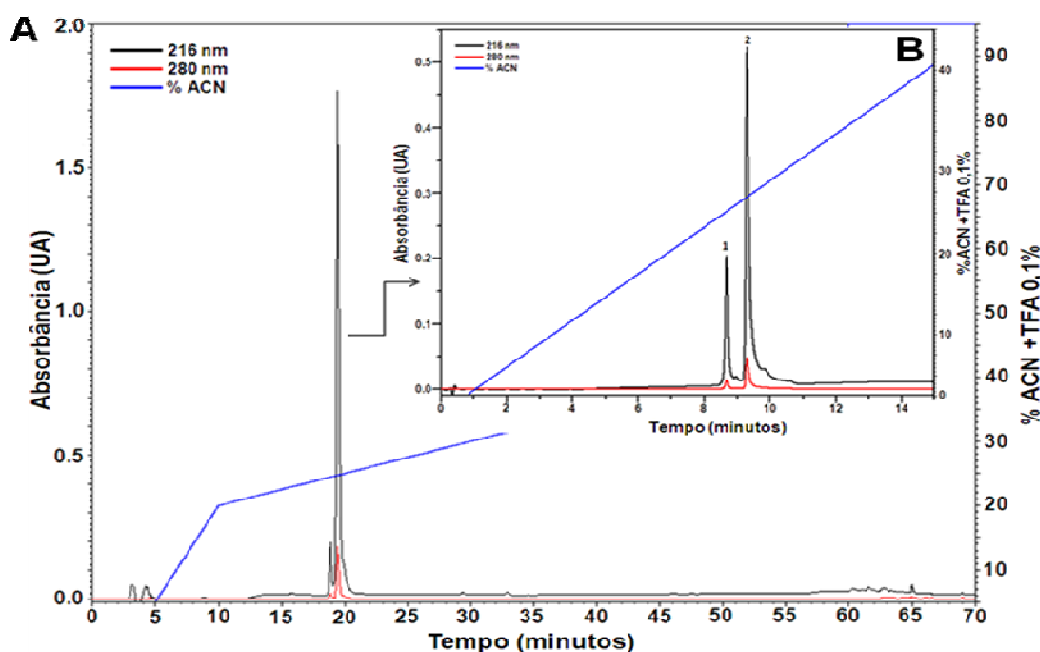


Figura 9. Purificação dos componentes presentes na fração 6 do veneno de *M. frontalis*. (A) A fração foi aplicada em coluna C₁₈ analítica, fluxo 1,0 mL/min com gradiente entre 20-30% de acetonitrila com TFA 0,1%. (B) O componente de maior absorbância foi submetido à cromatografia líquida ultra-rápida (UFLC) em coluna C₁₈ Shim-pack XR-ODS, a 40 °C, fluxo 0,4 mL/min. Nos dois passos cromatográficos a absorbância foi monitorada em 216 e 280 nm.

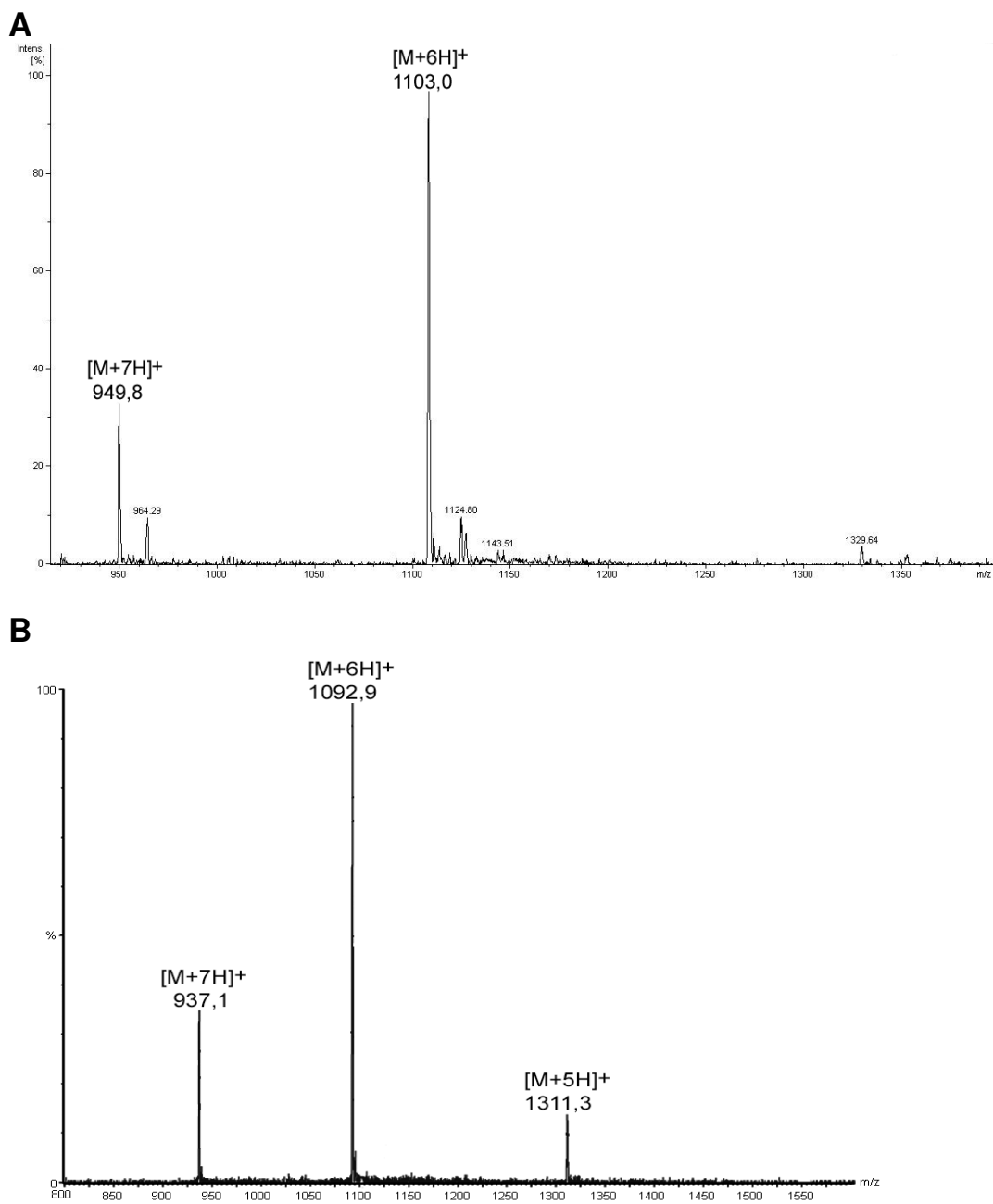


Figura 10. Massa molecular dos componentes 1 (A) e 2 (B) da fração 6 do veneno de *M. frontalis*. As séries de íons multicarregados, mostram proteínas com $[M+H]^+ = 6642,8$ (A) e $[M+H]^+ = 6548,9$ (B). Os espectros de massa foram adquiridos por ionização *electrospray* (ESI) em espectrômetro de massa HCT-Ultra ETD II (Bruker Daltonics, Billerica, EUA) (A) e Synapt MS System (Waters, Manchester, UK) (B).

Fração 10

A fração 10 da cromatografia semi-preparativa em coluna C_4 (Figura 6A) foi submetida a recromatografia analítica em coluna C_{18} (Figura 11A). Quatro prováveis isoformas foram encontradas nesta fração, no entanto, o componente majoritário pode ser purificado apenas com um segundo passo cromatográfico analítico com gradiente de eluição otimizado entre 25-35% de acetonitrila (Figura 11A). A pureza e a massa molecular foram determinadas por espectrometria de massa do tipo ESI em HCT-Ultra ETD II. A massa molecular identificada foi $[M+H]^+ = 7411,3$ (Figura 11B).

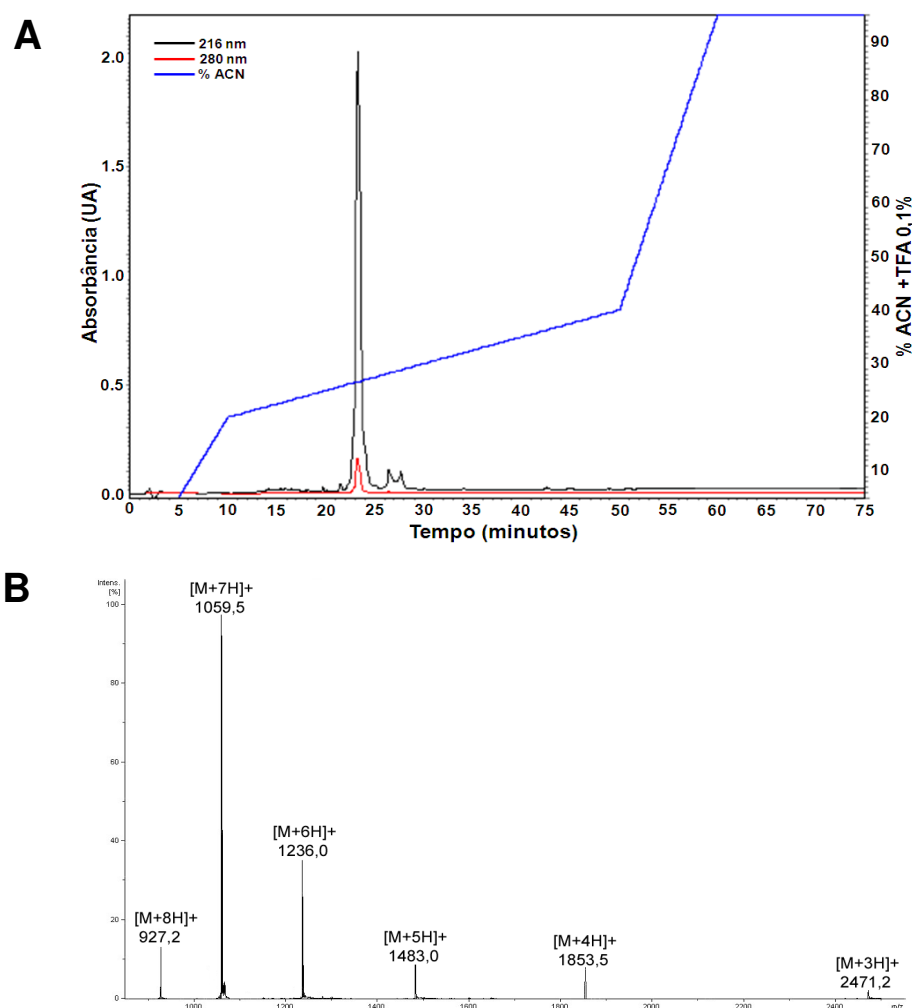


Figura 11. Perfil cromatográfico analítico e massa molecular da fração 10 do veneno de *M. frontalis*. (A) A fração foi purificada em coluna C_{18} analítica, fluxo 1,0 mL/min com gradiente entre 25-35% de acetonitrila contendo TFA 0,1%. A absorbância foi monitorada em 216 e 280 nm. (B) Série de íons multicarregados, mostrando uma proteína com massa molecular média de $[M+H]^+ = 7411,3$. O espectro de massa foi adquirido por ionização *electrospray* (ESI) em espectrômetro de massa HCT-Ultra ETD II (Bruker Daltonics, Billerica, EUA).

Fração 12

Para a completa purificação da fração 12, proveniente da cromatografia em coluna C₄ semi-preparativa (Figura 6A), foram necessários dois passos cromatográficos analíticos em colunas do tipo C₁₈ (Figura 12A) e Source 5RPC (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suécia) (Figura 12B) com gradiente de eluição entre 30 – 40% de acetonitrila. A massa molecular monoisotópica do componente majoritário, determinada por espectrometria de massa do tipo *electrospray* em espectrômetro Synapt MS System (HCT, Bruker), foi $[M+H]^+ = 7166,1$ (Figura 12C).

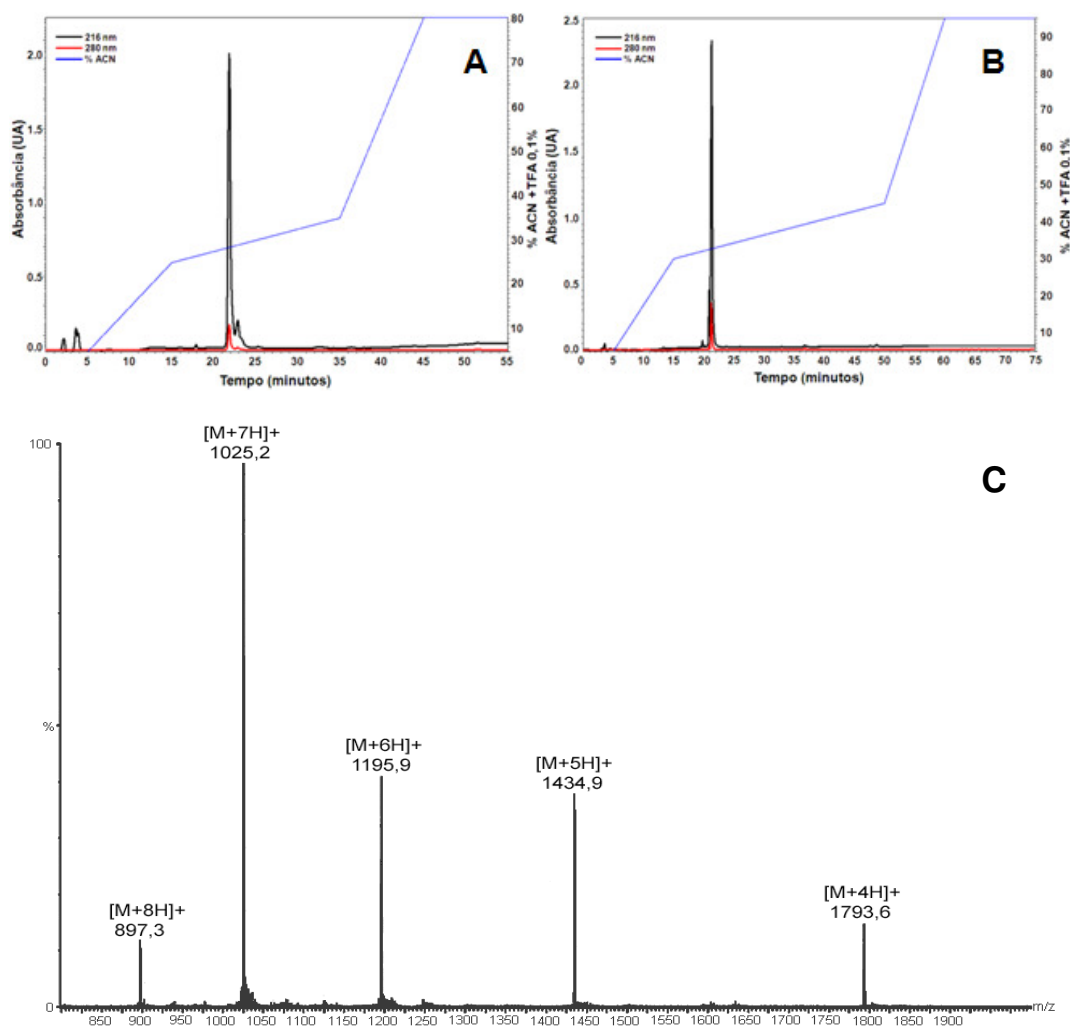


Figura 12. Purificação e massa molecular da fração 12 do veneno de *M. frontalis*. (A) A fração foi aplicada em coluna C₁₈ analítica, com gradiente entre 30-40% de acetonitrila com TFA 0,1%. (B) O componente mais intenso foi recromatografado em coluna Source 5RPC. Nos dois passos cromatográficos a absorbância foi monitorada em 216 e 280 nm e fluxo 1 mL/min. (C) Série de íons multicarregados, mostrando uma proteína com $[M+H]^+ = 7166,1$. O espectro foi adquirido por ionização *electrospray* em espectrômetro de massa Synapt MS System (Waters, Manchester, UK).

Fração 7

A fração 7 da cromatografia analítica em coluna $C_{2}C_{18}$ (Figura 6B) foi submetida a recromatografia analítica em coluna C_{18} . O componente mais intenso foi purificado após segundo passo cromatográfico analítico com gradiente de eluição otimizado entre 30-35% de acetonitrila contendo TFA 0,1% (Figura 13A). A pureza e a massa molecular foram determinadas por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF/MS (Ultraflex III, Bruker Daltonics, Billerica, MA). A massa molecular monoisotópica identificada foi $[M+H]^+ = 7327,3$ (Figura 13B).

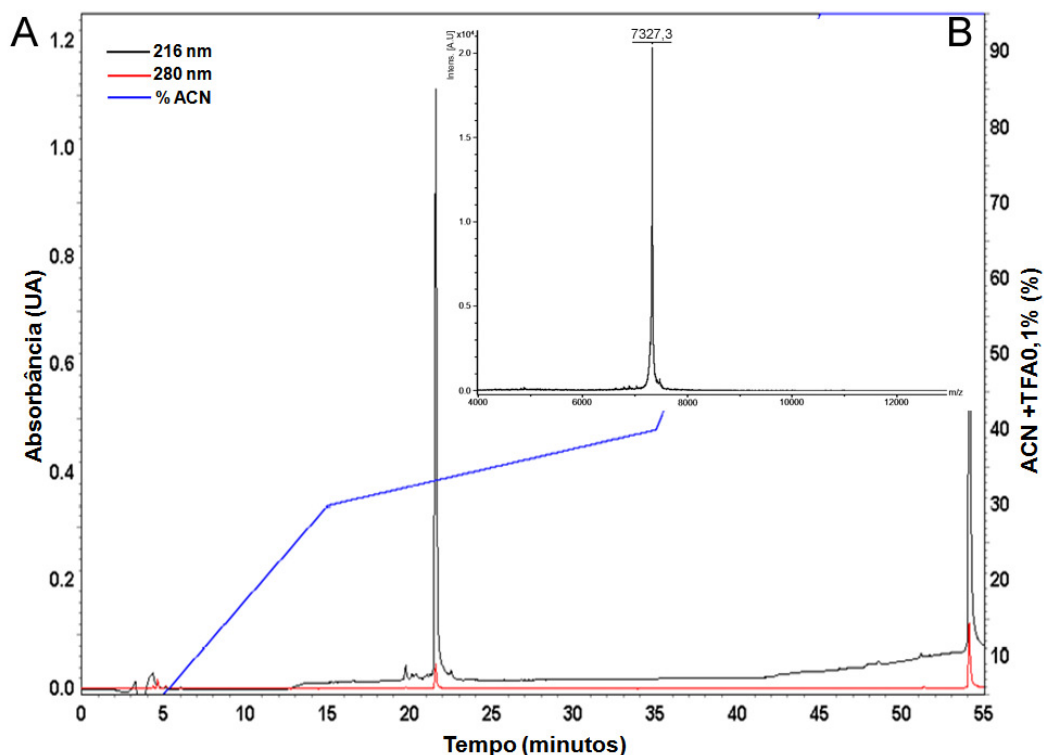


Figura 13. Perfil cromatográfico analítico e massa molecular da fração 7 do veneno de *M. frontalis*. (A) A fração foi purificada em coluna C_{18} analítica, fluxo 1,0 mL/min com gradiente entre 30-35% de acetonitrila contendo TFA 0,1%. A absorbância foi monitorada em 216 e 280 nm. (B) Espectro de massa molecular do componente majoritário da fração 7 adquirido em MALDI-TOF/MS equipado com laser SmartBeam™ (Ultraflex III, Bruker Daltonics, Billerica, MA).

4.2.1.2. Número de resíduos de cisteína

O número de resíduos de cisteínas das frações purificadas foi determinado após redução das ligações dissulfeto com DTT e alquilação das cisteínas com iodoacetamida. Os polipeptídeos modificados foram obtidos após purificação em coluna C₁₈ analítica (Figura 14A a 14F) e as massas moleculares foram determinadas por espectrometria de massa do tipo MALDI e/ou ESI. As frações 10 e 12 apresentaram 10 resíduos de cisteínas enquanto que as demais neurotoxinas mostraram um acréscimo de massa correspondente a 8 resíduos de cisteína alquilados com iodoacetamida. A massa molecular das toxinas nativas e reduzidas/alquiladas bem como o conteúdo de resíduos de cisteína estão na Tabela 2.

Tabela 2. Massa molecular monoisotópica e número de resíduos de cisteína das neurotoxinas purificadas a partir do veneno da serpente *M. frontalis*.

Fração	[M+H] ⁺ nativa	[M+H] ⁺ (Red_Alq)	Nº de resíduos de cisteína
5	7032,8	7496,2	8
6.1	6642,8	7098,8	8
6.2	6548,9	7013,2	8
10	7411,3	7996,6	10
12	7166,1	7746,4	10
7	7327,4	7790,8	8

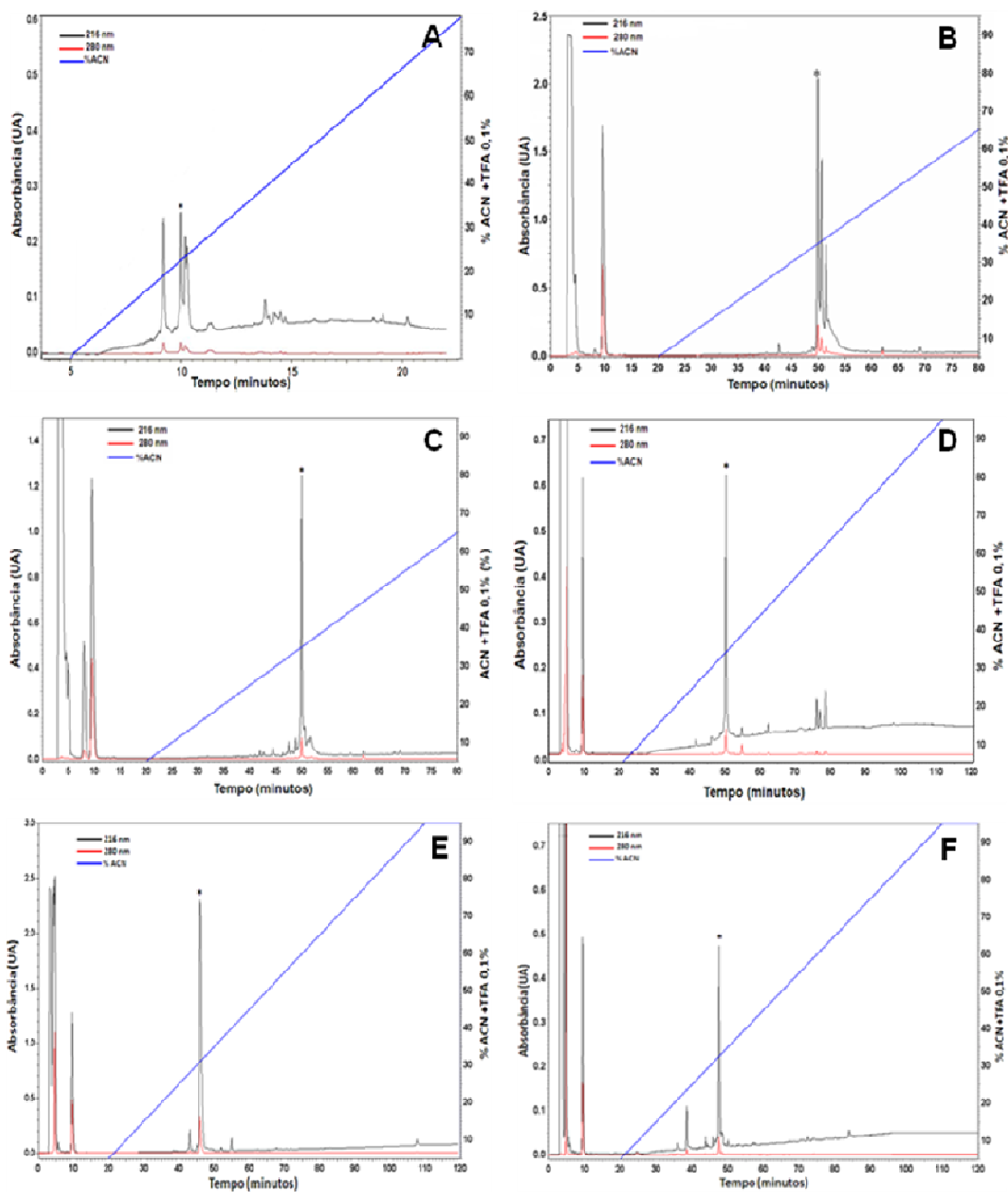


Figura 14. Purificação das frações 6.1 (A), 6.2 (B), 5 (C), 10 (D), 12 (E) e 7 (F) após redução e alquilação. As frações modificadas foram submetidas à cromatografia líquida analítica em coluna C_{18} sob gradiente linear de acetonitrila (99,9% ACN + 0,1% TFA) por 120 min. A fração 6.1 (A) foi purificada por cromatografia líquida ultra-rápida (UFLC) em coluna C_{18} Shim-pack XR-ODS, sob gradiente linear de acetonitrila, fluxo 0,4 mL/min. Em todos os experimentos a absorbância foi monitorada em 216 e 280 nm.

4.2.1.3. Determinação e análise da estrutura primária

A estrutura primária das toxinas foi determinada por meio de sequenciamento N-terminal automático por degradação de Edman e seqüenciamento por MS/MS. Em alguns casos, a sequência das proteínas só foi determinada após digestão enzimática. Os peptídeos gerados com a proteólise foram separados por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna C₁₈ sob as mesmas condições descritas para purificação dos polipeptídeos após redução e alquilação.

As toxinas identificadas apresentaram alta similaridade com neurotoxinas da família de três dígitos e receberam o nome de Frontoxinas (FTx) em menção à espécie de serpente da qual foram isoladas. Já a sequência numérica diz respeito à ordem de identificação de cada uma delas.

Fração 6.1 – Frontoxina I (FTx I)

A sequência parcial do componente 1 da fração 6 (Figura 9B) foi determinada após redução/alquilação e tratamento enzimático com endoproteinase Glu-C (Figura 16). Os 56 resíduos de aminoácidos iniciais foram confirmados por meio da sobreposição de três fragmentos gerados pela digestão enzimática (Figura 15). As massas moleculares, calculada e experimental, dos peptídeos gerados na proteólise estão apresentadas na Tabela 3.

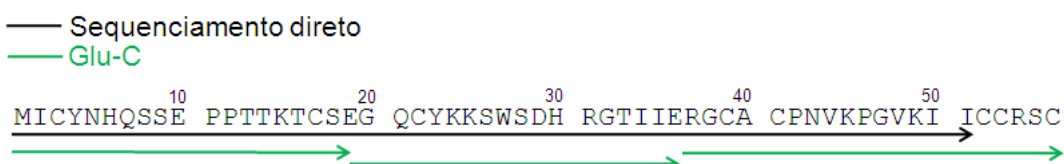


Figura 15. Estrutura primária parcial da FTx I. A sequência de aminoácidos foi obtida por degradação de Edman após redução, alquilação e tratamento enzimático com a endoproteinase Glu-C.

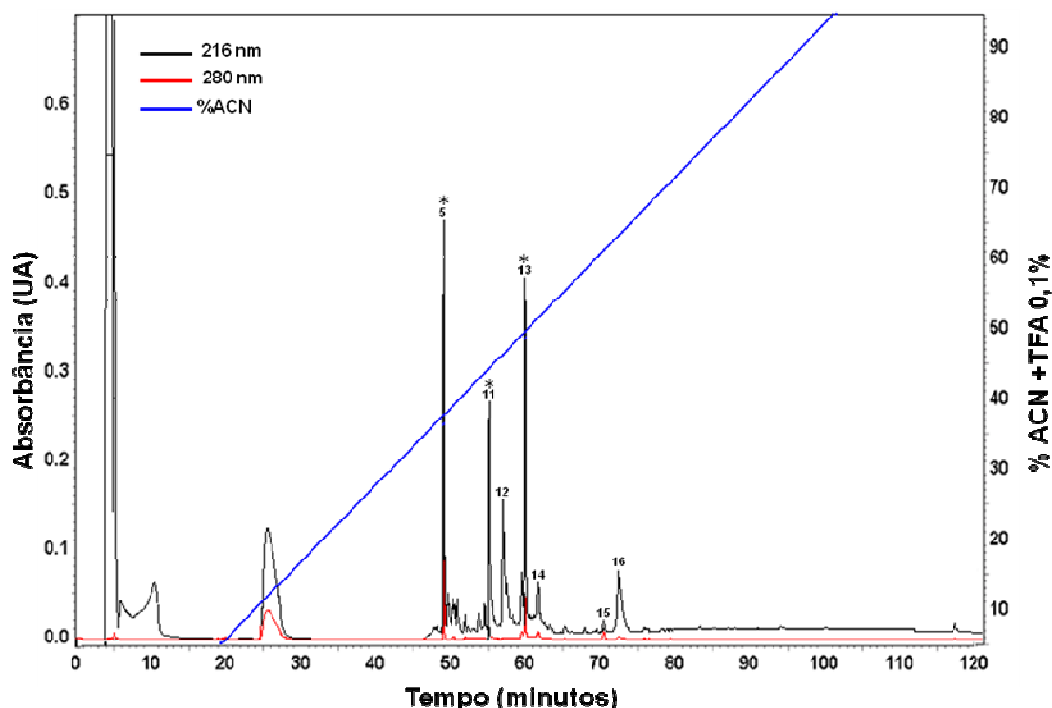


Figura 16. Purificação dos peptídeos oriundos da digestão enzimática da fração 6.1 com endoproteínase Glu-C. Após digestão enzimática com Glu-C, a fração 6.1 foi submetida à cromatografia líquida analítica em coluna C_{18} sob gradiente linear de acetonitrila (99,9% ACN + 0,1% TFA), fluxo 1,0 mL/min, por 120 min. A absorbância foi monitorada em 216 e 280 nm. Os picos marcados correspondem aos peptídeos utilizados no sequenciamento da neurotoxina.

Tabela 3. Fragmentos peptídicos provenientes do tratamento enzimático da fração 6.1 do veneno de *M. frontalis* com Glu-C. A massa molecular experimental foi obtida por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF.

Enzima de clivagem	Fração	Sequência	[M+H] ⁺ calculada*		[M+H] ⁺
			Nativa	Modificada	Exp.
Glu-C	5	RGCACPNVKPGVKIICCRSC	2107,0	2392,1	2392,3
Glu-C	11	EGQCYKKSWSDRGTIIE	2137,0	2194,0	2194,3
Glu-C	13	MICYNHQSSPEPTTKTCSE	2155,9	2269,9	2270,1

* A massa molecular calculada foi determinada *in silico*, utilizando o programa PeptideMass disponível na plataforma ExPASy (<http://www.expasy.org/tools/peptide-mass.html>).

Por degradação de Edman, os quatro últimos resíduos da região C-terminal foram detectados com ambigüidade devido à quantidade insuficiente de amostra e/ou interferência de subprodutos. Quando comparado com outras sequencias de neurotoxinas do gênero *Micrurus*, observou-se que a região considerada ambígua, era

conservada com a presença de dois resíduos de cisteína. Assim, esta região da sequência foi determinada por similaridade e necessita ainda de confirmação. O sequenciamento completo, bem como a confirmação dos últimos resíduos de aminoácidos, não foi realizado em virtude da falta de material (veneno bruto) e amostra purificada.

A sequência primária parcial da Frontoxina I apresentou alta identidade com neurotoxinas de cadeia curta da família de três dígitos presente em elapídeos (Figura 17). FTx I é 90% idêntica a neurotoxinas de cadeia curta de *M. surinamensis* (Olamendi-Portugal *et al.*, 2008) e *M. pyrrhocryptus* (Dokmetjian, *et al.*, 2009), 76% idêntica a α -neurotoxina de *M. nigrocinctus* (Rosso, *et al.*, 1996).

Francis *et al.* (1997) descreve uma porção N-terminal de neurotoxina de *M. frontalis* de 35 resíduos idêntica à FTx I. Este fragmento, não depositado nos bancos de dados, foi identificado por meio de metodologias de purificação e determinação da massa molecular diferentes daquelas utilizadas neste estudo. Em virtude desta parcial descrição previamente realizada, a toxina em estudo recebeu o número 1 após seu nome, sendo nomeada Frontoxina I.

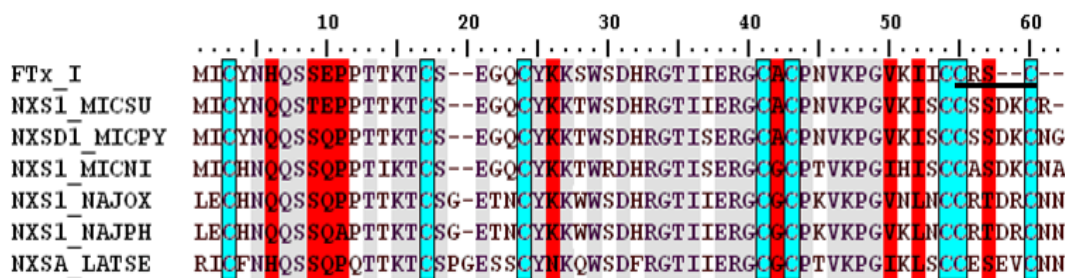


Figura 17. Similaridade entre Frontoxina I e outras neurotoxinas de elapídeos. O alinhamento foi realizado utilizando a ferramenta “Clustal W Multiple Alignment” disponível no software Bioedit v. 7.0.4.1. Em cinza destacam-se os resíduos idênticos, em vermelho os similares e em azul as cisteínas conservadas. Os resíduos sublinhados foram determinados por similaridade e Gaps (-) foram introduzidos para maximizar a similaridade entre os polipeptídeos. MICSU, *M. surinamensis*; MICPY, *M. pyrrhocryptus*; MICNI, *M. nigrocinctus*; NAJOX, *Naja oxiana*; NAJPH, *Naja philippinensis* e LATSE, *Laticauda semifasciata*.

Fração 6.2 – Frontoxina II (FTx II)

A FTx II (Figura 9B) de massa molecular $[M+H]^+ = 6548,9$, foi submetida a sequenciamento por degradação de Edman após redução e alquilação, o que possibilitou a determinação da sequência de resíduos de aminoácidos. Alguns

resíduos foram confirmados pelo sequenciamento e sobreposição dos peptídeos oriundos da digestão enzimática com as endoproteinases Asp-N, Glu-C, quimotripsina e tripsina (Figura 19). Os peptídeos utilizados na confirmação da estrutura primária da FTx II estão assinalados na Figura 18. As massas moleculares calculada e experimental dos peptídeos estão dispostos na Tabela 4.

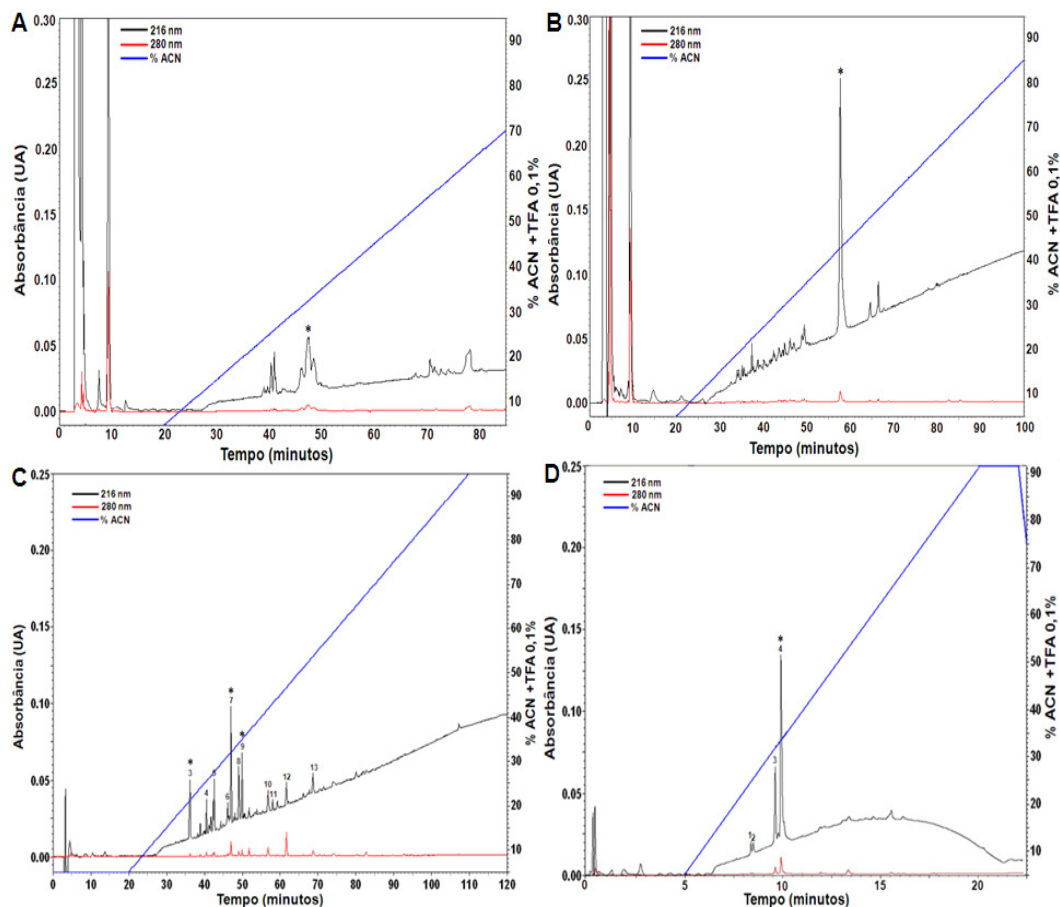


Figura 18. Purificação dos peptídeos oriundos da digestão enzimática da fração 6.2 com diferentes endoproteinases. Após digestão enzimática com Asp-N (A), Glu-C (B) e quimotripsina (C), a fração 6.2 foi submetida à cromatografia líquida analítica em coluna C₁₈ sob gradiente linear de acetonitrila (99,9% ACN + 0,1% TFA), fluxo 1,0 mL/min, por 120 min. Na clivagem com tripsina (D), os peptídeos foram purificados por cromatografia líquida ultra-rápida (UFLC) em coluna C₁₈ Shim-pack XR-ODS, sob gradiente linear de acetonitrila, fluxo 0,4 mL/min. A absorbância foi monitorada em 216 e 280 nm. Os picos marcados correspondem aos peptídeos utilizados no sequenciamento da FTx II.

Tabela 4. Fragmentos peptídicos provenientes do tratamento enzimático da fração 6.2 do veneno de *M. frontalis* com Asp-N, Glu-C, quimotripsina e tripsina. A massa molecular experimental foi obtida por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF.

Enzima de clivagem	Fração	Sequência	[M+H] ⁺ calculada*		[M+H] ⁺
			Nativa	Modificada	Exp.
Quimotripsina	3	LICY	511,2	568,2	568,3
Quimotripsina	9	YAVSASHTGHW	1362,6	1362,6	1362,9
Quimotripsina	7	DCTSTCHIGPYNVC	1512,5	1683,6	1683,7
Glu-C	8	KYAVSASHTGHWFYMYDCTSTCHIGPYNVC	3441,4	3612,5	3612,0
Asp-N	4	DGETATCPPGQKCEKYAVSASHTGHWFYMY	3364,4	3478,4	3478,2
Tripsina	4	YAVSASHTGHWFYMYD	1934,3	1934,3	1934,5

*A massa molecular calculada foi determinada *in silico*, utilizando o programa PeptideMass disponível na plataforma ExPASy (<http://www.expasy.org/tools/peptide-mass.html>).

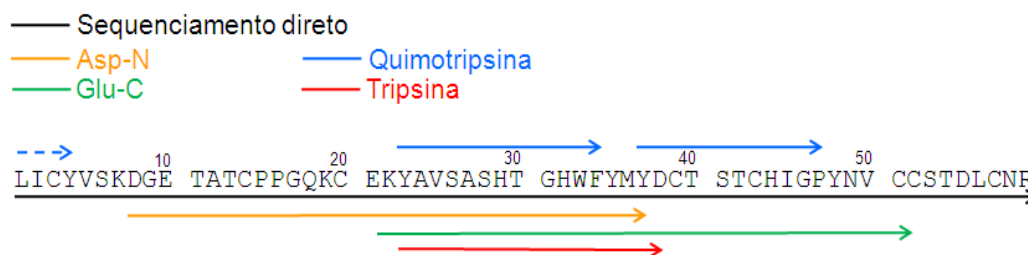


Figura 19. Estrutura primária completa da FTx II. A sequência de aminoácidos foi obtida por degradação de Edman (linha sólida) e *De novo* (linha tracejada) após redução, alquilação e tratamento enzimático com as endoproteínases Asp-N, Glu-C, quimotripsina e tripsina.

A análise da sequência de aminoácidos da FTx II mostrou similaridade com neurotoxinas de cadeia curta (8 resíduos de cisteína formando 4 ligações dissulfeto) da família de três dígitos. De acordo com o alinhamento realizado com outras neurotoxinas depositadas nos bancos de dados, a FTx II mostrou maior identidade (79%) com um fragmento de neurotoxina purificada a partir do veneno de *M. pyrrhocryptus* (Dokmetjian, *et al.*, 2009). FTx II, quando comparada com toxinas de cadeia curta de elapídeos de gênero diferente de *Micrurus*, apresentou baixa identidade (cerca de 40%) (Figura 20).

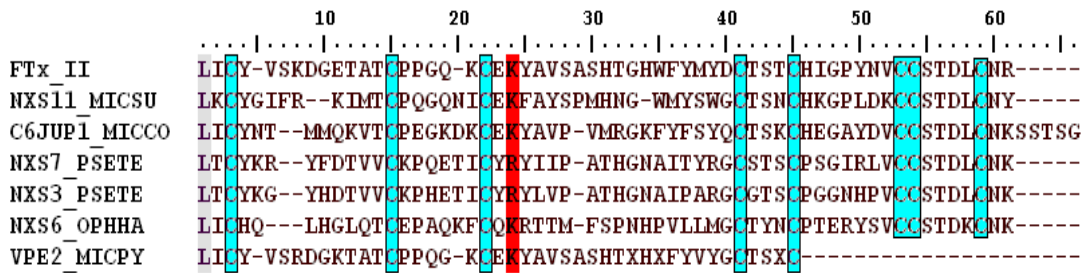


Figura 20. Alinhamento da Frontoxina II e outras neurotoxinas de elapídeos. O alinhamento foi realizado utilizando a ferramenta “Clustal W Multiple Alignment” disponível no software Bioedit v. 7.0.4.1. Em cinza destacam-se os resíduos idênticos, em vermelho os similares e em azul as cisteínas conservadas. Gaps (-) foram introduzidos para maximizar a similaridade entre os polipeptídeos. MICSU, *M. surinamensis*; MICPY, *M. pyrrhocryptus*; MICCO, *M. corallinus*; PSETE, *Pseudonaja textilis*; OPHHA, *Ophiophagus hannah*.

Fração 5 – Frontoxina III (FTx III)

Uma proteína da fração 5 (Figura 9B), purificada em cromatografia líquida em coluna analítica C₁₈, após redução e alquilação, foi submetida a seqüenciamento por degradação de Edman. Foram seqüenciados 51 resíduos de aminoácidos por seqüenciamento direto. A seqüência completa da fração 5, nomeada FTx III, foi determinada após o seqüenciamento direto e sobreposição dos peptídeos gerados após clivagem enzimática com endoproteínase Glu-C, Lys-C e tripsina (Figura 21) por degradação de Edman e seqüenciamento por MS/MS (Figura 22). As massas moleculares, experimental e calculada, dos peptídeos utilizados no seqüenciamento da FTx III estão na Tabela 5.

De acordo com a estrutura primária, FTx III é uma neurotoxina de 62 resíduos de aminoácidos com 4 ligações dissulfeto pertencente a família de toxinas de três dígitos de cadeia curta. O alinhamento com outras neurotoxinas mostrou que FTx III não se assemelha com as neurotoxinas já descritas para o gênero *Micrurus*, mas apresenta cerca de 55% de identidade com toxinas de três dígitos presentes nos veneno de elapídeos asiáticos do gênero *Naja*, *Acantophis* e da serpente marinha *Laticauda* (Figura 23).

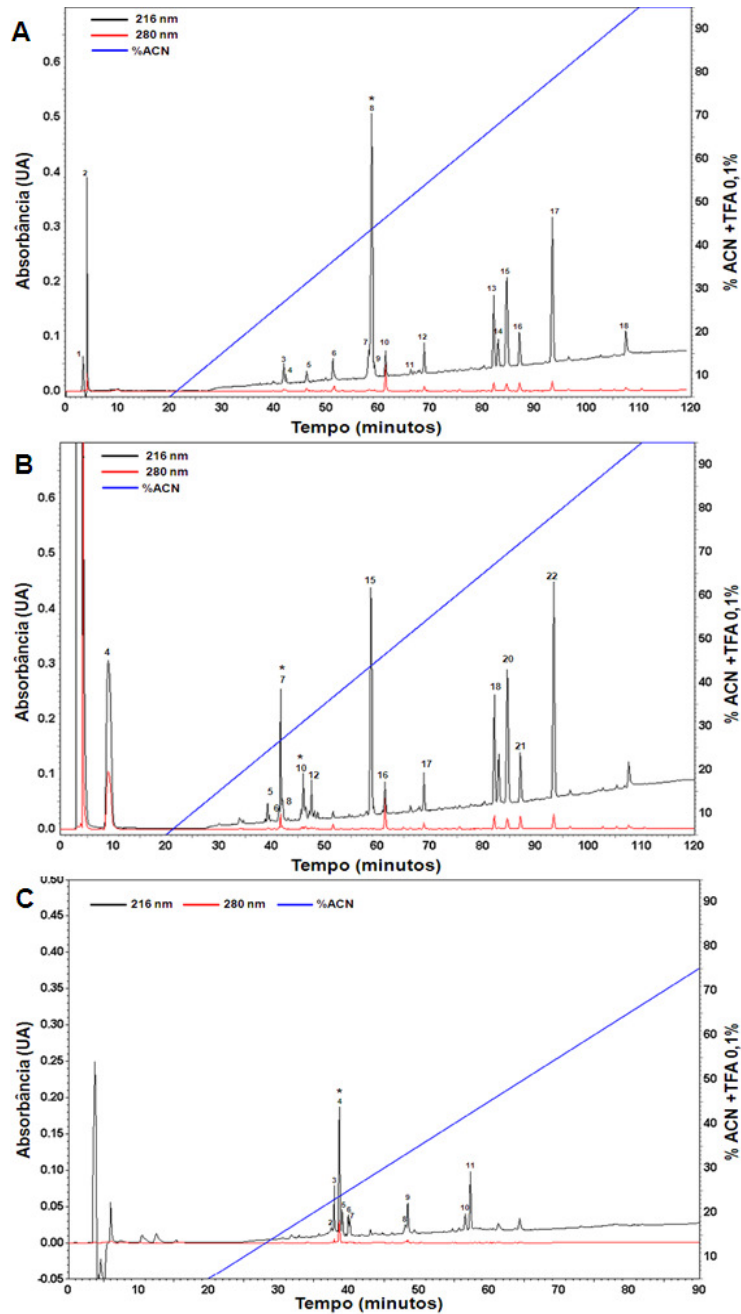


Figura 21. Purificação dos peptídeos oriundos da digestão enzimática da fração 5 com diferentes endoproteínases. Após digestão enzimática com Glu-C (A), Lys-C (B) e Tripsina (C), a fração 5 foi submetida à cromatografia líquida analítica em coluna C₁₈ sob gradiente linear de acetonitrila (99,9% ACN + 0,1% TFA), fluxo 1,0 mL/min, por 120 min. A absorbância foi monitorada em 216 e 280 nm. Os picos marcados com asteriscos correspondem aos peptídeos utilizados no sequenciamento da FTx III.

Tabela 5. Fragmentos peptídicos provenientes do tratamento enzimático da fração 5 do veneno de *M. frontalis* com Glu-C, Lys-C e tripsina. A massa molecular experimental foi obtida por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF.

Enzima de clivagem	Fração	Sequência	[M+H] ⁺ calculada*		[M+H] ⁺ Exp.
			Nativa	Modificada	
Glu-C	8	LTCFNDFSPTAHTVE	1681,7	1738,7	1738,1
Lys-C	7	LTCFNDFSPTAHTVEDCQRGITTCYMK	3081,3	3252,4	3252,4
Lys-C	10	TWRVHRETIVIGAGCNCPK	2027	2141	2141,3
Tripsina	4	LKCCTGNTCNY	1219,4	1390,5	1390,7

*A massa molecular calculada foi determinada *in silico*, utilizando o programa PeptideMass disponível na plataforma ExPASy (<http://www.expasy.org/tools/peptide-mass.html>).

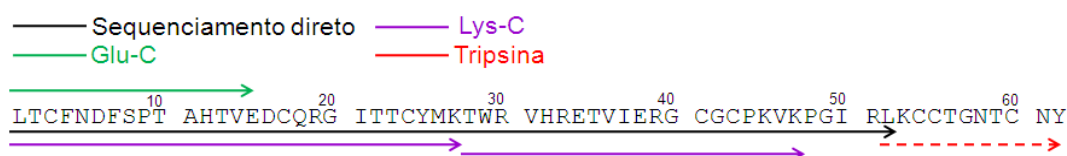


Figura 22. Estrutura primária completa da FTx III. A seqüência de aminoácidos foi obtida por degradação de Edman (linha sólida) e *De novo* (linha tracejada) após redução, alquilação e tratamento enzimático com as endoproteinases Glu-C, Lys-C e tripsina.

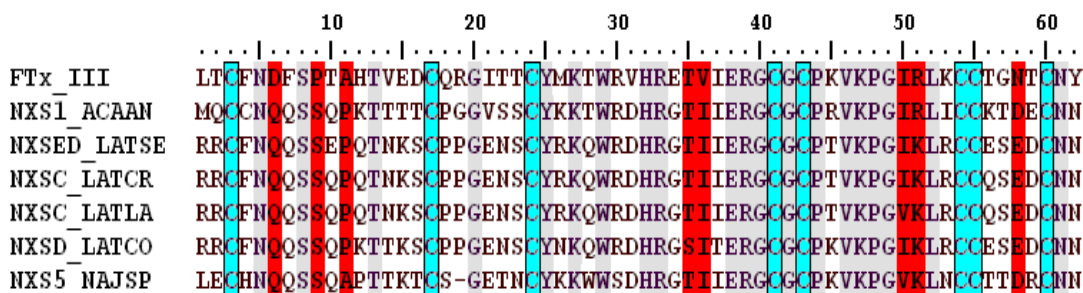


Figura 23. Alinhamento da Frontoxina III e outras neurotoxinas de elapídeos. O alinhamento foi realizado utilizando a ferramenta “Clustal W Multiple Alignment” disponível no software Bioedit v. 7.0.4.1. Em cinza destacam-se os resíduos idênticos, em vermelho os similares e em azul as cisteínas conservadas. ACAAN, *Acanthophis antarcticus*; LATSE, *Laticauda semifasciata*; LATCR, *L. crockeri*; LATLA, *L. laticaudata*; LATCO, *L. colubrina*; NAJSP, *Naja sputatrix*.

Fração 10 – Frontoxina IV (FTx IV)

A proteína isolada da fração 10 (Figura 9B), nomeada FTx IV, foi submetida a sequenciamento por degradação de Edman após redução e alquilação. A partir deste, foram identificados 62 resíduos de aminoácidos, os quais foram importantes na escolha das enzimas de clivagem para que a completa estrutura primária fosse determinada. As endoproteínases Glu-C e Lys-C foram selecionadas para a conclusão da sequência e também para a confirmação de alguns resíduos neste caso considerados duvidosos, como o triptofano na posição 29 (Figura 24). Os peptídeos gerados pela proteólise que auxiliaram na determinação da estrutura primária estão mostrados na Figura 25. A massa molecular, experimental e calculada, e a sequência correspondente aos fragmentos purificados após a clivagem enzimática estão na Tabela 6.

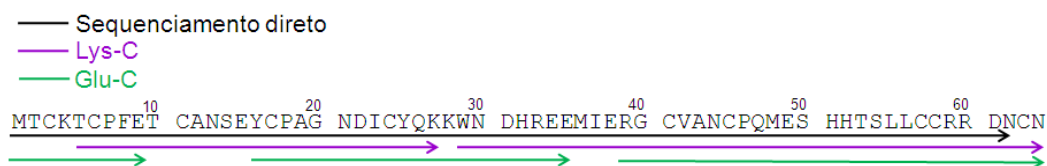


Figura 24. Estrutura primária completa da FTx IV. A sequência de aminoácidos foi obtida por degradação de Edman após redução, alquilação e tratamento enzimático com as endoproteínases Glu-C e Lys-C.

Tabela 6. Fragmentos peptídicos provenientes do tratamento enzimático da fração 10 do veneno de *M. frontalis* com Glu-C e Lys-C. A massa molecular experimental foi obtida por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF.

Enzima de clivagem	Fração	Sequência	[M+H] ⁺ calculada*		[M+H] ⁺ Exp.
			Nativa	Modificada	
Glu-C	2	MTCKTCPFE	1059,4	1173,4	1173,4
Lys-C	7	TCPFETCANSEYCPAGNDICYQK	2557	2785	2785,1
Glu-C	10	YCPAGNDICYQKKWNHREE	2600,1	2714,1	2714,1
Lys-C	5	WNDHREEMIERGCVANCPQMESHHTSLLCCRRDNCN	4414,8	4700	4701,9**
Glu-C	5	RGCVANCPQME	1207,5	1321,5	1321,5
Glu-C	7	SHHTSLLCCRRDNCN	1758,7	1929,8	1929,8

*A massa molecular calculada foi determinada *in silico*, utilizando o programa PeptideMass disponível na plataforma ExPASy (<http://www.expasy.org/tools/peptide-mass.html>).

** Diferença entre as massas calculada e a experimental decorrente da calibração do equipamento.

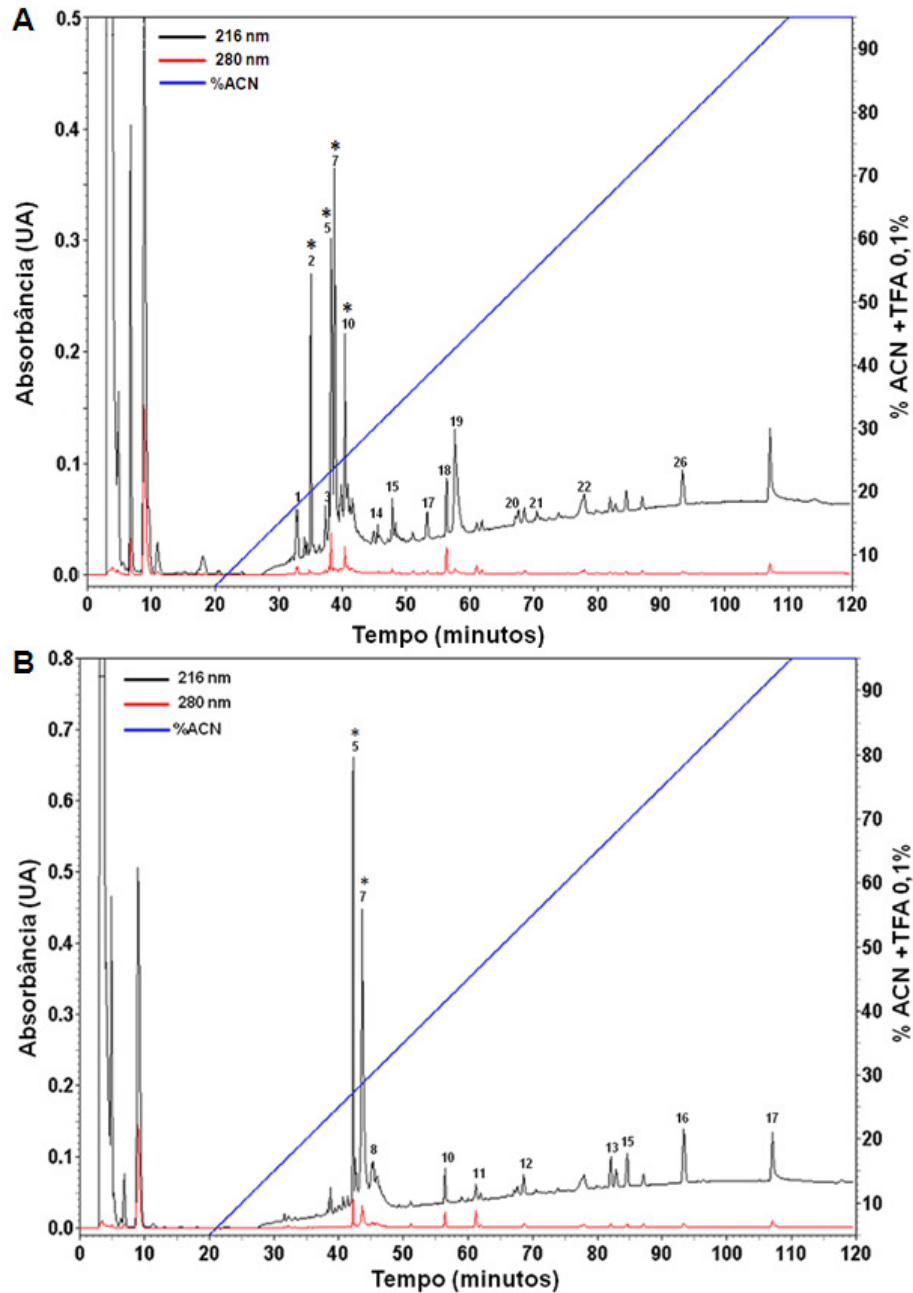


Figura 25. Purificação dos peptídeos oriundos da digestão enzimática da fração 10. Após digestão enzimática com Glu-C (A) e Lys-C (B), a proteína foi submetida à cromatografia líquida analítica em coluna C₁₈ sob gradiente linear de acetonitrila (99,9% ACN + 0,1% TFA), fluxo 1,0 mL/min, por 120 min. A absorbância foi monitorada em 216 e 280 nm. As frações marcadas correspondem aos peptídeos utilizados no sequenciamento da FTx IV.

A estrutura primária da FTx IV possui 64 resíduos de aminoácidos, dos quais 10 são resíduos de cisteína, que formam 5 pontes dissulfeto. A análise da sequência da FTx IV mostra 68-73% de identidade com neurotoxinas de cadeia longa de *M. surinamensis* (Olamendi-Portugal *et al.*, 2008) e cerca de 55% de identidade com toxinas longas de *Naja* e *Hemachatus* (Figura 26). Os resíduos de cisteína são conservados sendo que oito destes são também conservadas em α -neurotoxinas de cadeia curta. Por similaridade, a quinta ligação dissulfeto, provavelmente é formada entre os resíduos de cisteína das posições 6 e 11. Esta característica é comum em toxinas de cadeia longa também conhecida como toxinas fracas (“weak toxins”), que receberam este nome em virtude de sua baixa toxicidade quando comparada as demais α -neurotoxinas de cadeia longa, em que a ligação dissulfeto extra se localiza entre as posições 32 e 36.

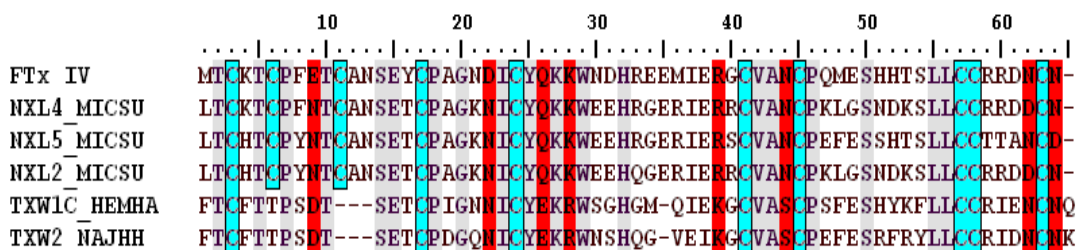


Figura 26. Alinhamento da Frontoxina IV com outras neurotoxinas de elapídeos. O alinhamento foi realizado utilizando a ferramenta “Clustal W Multiple Alignment” disponível no software Bioedit v. 7.0.4.1. Em cinza destacam-se os resíduos idênticos, em vermelho os similares e em azul as cisteínas conservadas. Gaps (-) foram introduzidos para maximizar a similaridade entre os polipeptídeos. MICSU, *M. surinamensis*; HEMMA, *Hemachatus haemachatus*; NAJHH, *Naja haje haje*.

Fração 12 – Frontoxina V (FTx V)

A proteína isolada da fração 12 (Figura 9B), nomeada FTx V, purificada por cromatografia líquida em coluna analítica C₁₈ e Source 5RPC, foi submetida à redução das pontes dissulfeto com DTT e alquilação com iodoacetamida. Após este tratamento, a estrutura primária completa pôde ser determinada por degradação de Edman.

A FTx V, assim como a FTx IV, é formada por uma cadeia polipeptídica de 64 resíduos de aminoácidos, dos quais 10 são resíduos de cisteína (Figura 27). As cisteínas são conservadas e formam 5 pontes dissulfeto. A posição conservada destes resíduos mostra que a FTx V pertence ao grupo de toxinas de três dígitos de cadeia

longa também conhecido como toxinas fracas. Apesar da grande similaridade entre as FTx IV e V, a última mostra maior identidade com neurotoxinas de cadeia longa de *M. surinamensis* (71-79%) (Olamendi-Portugal *et al.*, 2008) e 55% de identidade com neurotoxina longa de *M. corallinus* (Rosso, *et al.*, 1996) (Figura 28).

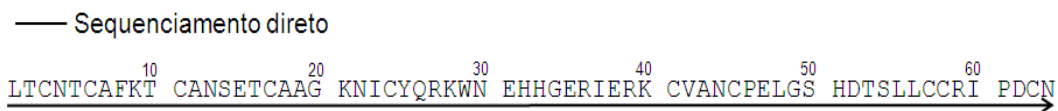


Figura 27. Estrutura primária completa da FTx V. A sequência de aminoácidos foi obtida por degradação de Edman após redução e alquilação.

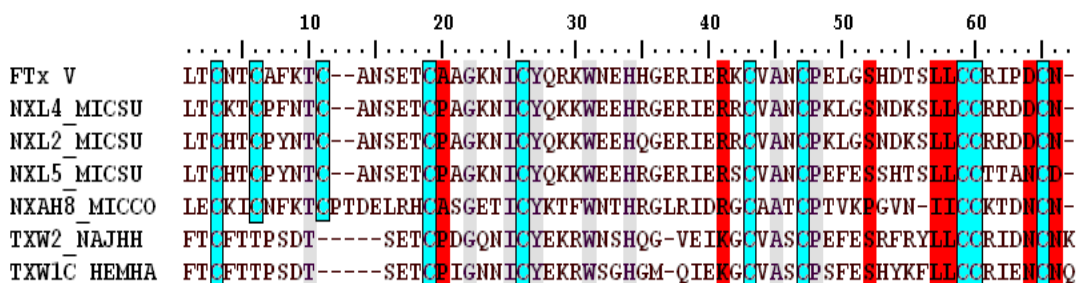


Figura 28. Alinhamento da Frontoxina V com outras neurotoxinas de elapídeos. O alinhamento foi realizado utilizando a ferramenta “Clustal W Multiple Alignment” disponível no software Bioedit v. 7.0.4.1. Em cinza destacam-se os resíduos idênticos, em vermelho os similares e em azul as cisteínas conservadas. Gaps (-) foram introduzidos para maximizar a similaridade entre os polipeptídeos. MICSU, *M. surinamensis*; MICCO, *M. corallinus*; HEMMA, *Hemachatus haemachatus*; NAJHH, *Naja haje haje*.

Fração 07 – Frontoxina VI (FTx VI)

A FTx VI, purificada a partir da fração 7 da cromatografia realizada em coluna C₂C₁₈, foi parcialmente sequenciada por degradação de Edman, após redução e alquilação. Dos 29 resíduos de aminoácidos sequenciados três são resíduos de cisteína (Figura 29). A porção N-terminal da FTx VI revelou ser 80% idêntica ao fragmento de uma neurotoxina de *M. pyrrhocryptus* e de *Bungarus fasciatus*, 56% de identidade com neurotoxina de cadeia curta de *M. surinamensis* e de *Ophiophagus hannah* (Figura 30). O cálculo do conteúdo de cisteínas (Tabela 2) e o alinhamento da estrutura parcial com outras sequências, indicam que FTx VI é uma α -neurotoxina de cadeia curta, com possível atividade sobre os receptores nicotínicos de acetilcolina.

— Sequenciamento direto

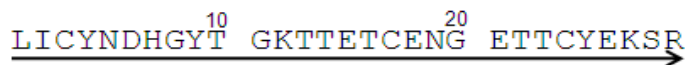


Figura 29. Sequência N-terminal da FTx VI. A sequência parcial de aminoácidos foi obtida por degradação de Edman após redução e alquilação.

Do fragmento determinado, os dois últimos resíduos (Ser-28, Arg-29) foram detectados com ambiguidade devido à grande interferência de subprodutos durante o sequenciamento por degradação de Edman, havendo assim a necessidade de serem confirmados. O sequenciamento completo, bem como a confirmação dos últimos resíduos de aminoácidos, não foi realizado em virtude da escassez de material purificado.

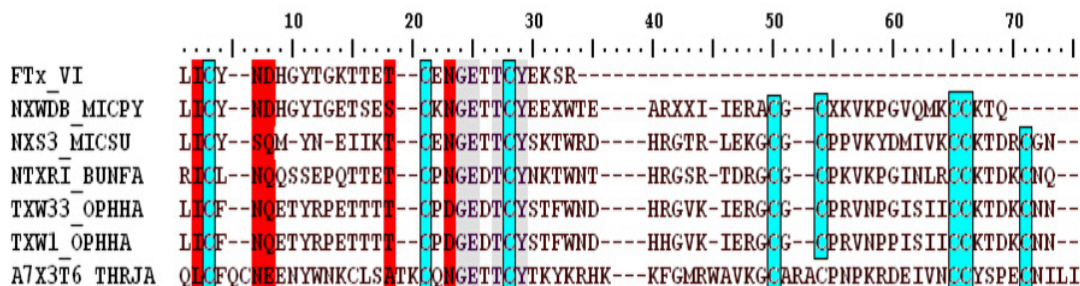


Figura 30. Alinhamento da porção N-terminal da Frontoxina VI com outras neurotoxinas de elapídeos. O alinhamento foi realizado utilizando a ferramenta “Clustal W Multiple Alignment” disponível no software Bioedit v. 7.0.4.1. Em cinza destacam-se os resíduos idênticos, em vermelho os similares e em azul as cisteínas conservadas. Gaps (-) foram introduzidos para maximizar a similaridade entre os polipeptídeos. MICPY, *M. pyrrhocryptus*; MICSU, *M. surinamensis*; BUNFA, *Bungarus fasciatus*; OPHHA, *Ophiophagus hannah*, THRJA, *Thrasops jacksonii*.

4.2.1.4. Atividade Biológica das Frontoxinas

A análise da estrutura primária das neurotoxinas identificadas no veneno de *M. frontalis* mostrou grande similaridade com α -neurotoxinas de cadeia curta e longa. Essas toxinas por sua vez, são biologicamente caracterizadas por se ligar e inibir os receptores nicotínicos de acetilcolina (AChR). Assim, foi verificada a atividade das Frontoxinas sobre o potencial de placa terminal em miniatura (MEPP) na junção neuromuscular de rãs, por ser esta uma sinapse colinérgica.

A pequena quantidade de amostra purificada foi o maior obstáculo tanto para a determinação da estrutura primária quanto para a realização dos testes biológicos. Desta forma, somente as FTx II, III e IV foram submetidas aos testes eletrofisiológicos.

Frontoxina II

A aplicação da FTx II (1 μ M) sobre a junção neuromuscular de rã (n=3-6) promoveu diminuição no tamanho dos potenciais de placa terminal em miniatura. Nos primeiros 15 minutos após a aplicação da FTx II foi observada uma redução significativa na amplitude dos MEPPs, os quais continuaram diminuindo, porém de maneira mais lenta, durante os 60 minutos de experimento. Foi verificada alteração estatisticamente significativa na frequência e na amplitude dos MEPPs semelhante ao observado após a aplicação da d-tubocurarina (Figura 31). Na concentração de 2 μ M, a FTx II aboliu completamente os MEPPs após 45 min (Figura 32) sugerindo assim bloqueio da neurotransmissão.

Frontoxina III

A FTx III (1 μ M) reduziu a amplitude dos potenciais de placa terminal em miniatura na junção neuromuscular de rã (n=3-6). A redução mais significativa ocorreu após 30 minutos de aplicação. Após este tempo de incubação, o tamanho dos MEPPs permaneceu estável. Na concentração de 0,5 μ M, não foi observada alteração significativa na frequência dos MEPPs quando comparado com o controle. Após 45 min, FTx III (2 μ M, n=3) aboliu os MEPPs de forma semelhante ao observado com a d-tubocurarina sugerindo o bloqueio da neurotransmissão (Figura 32).

Frontoxina IV

A amplitude dos potenciais de placa terminal em miniatura foi reduzida após incubação com FTx IV (1 μ M, n=3). Foi observada redução progressiva dos MEPPs, sendo esta mais significativa após 30 min da aplicação. Como verificado na FTx II, a FTx IV reduziu a frequência dos MEPPs (Figura 31C). Após 45 min de incubação, FTx IV (2 μ M, n=3) não aboliu os MEPPs, porém foi detectada progressiva redução da

amplitude dos mesmos após exaustiva lavagem com solução de Ringer, sugerindo assim irreversibilidade no bloqueio neuromuscular (Figura 32).

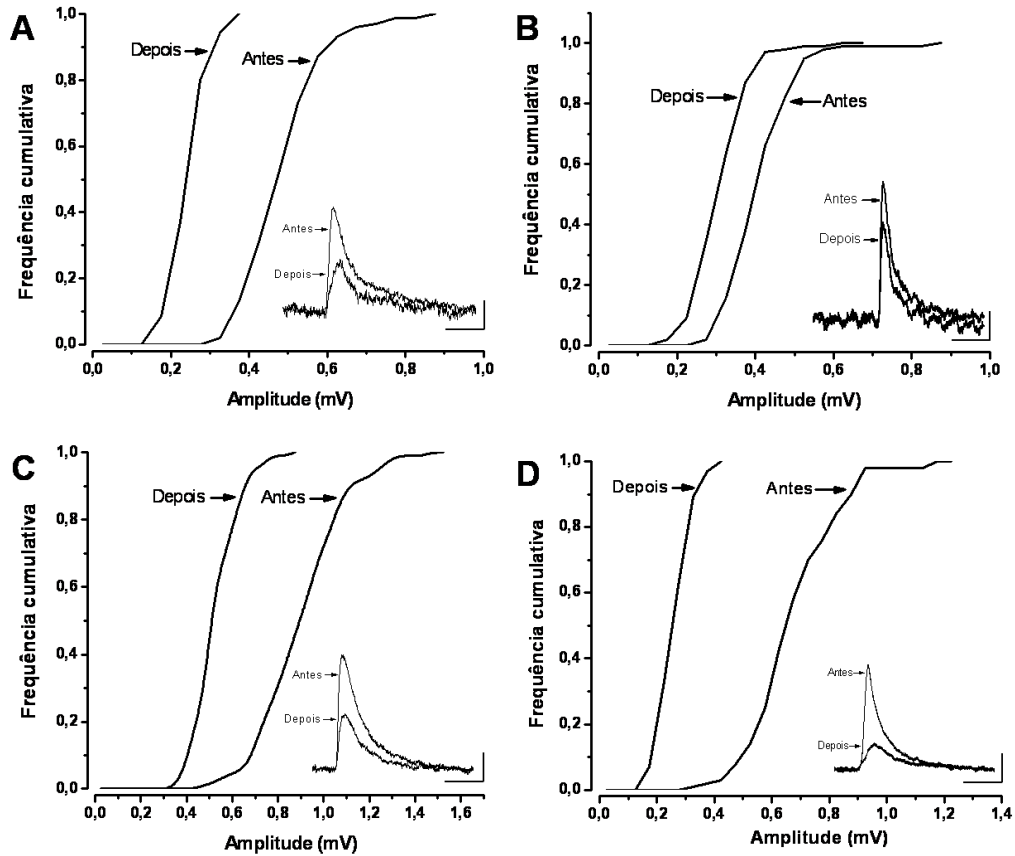


Figura 31. Efeito das Frontoxinas ($1 \mu\text{M}$) sobre a frequência e amplitude dos potenciais de placa terminal em miniatura em junção neuromuscular de rã. Frequência cumulativa de 100 MEPPs antes e após 45 min da aplicação das FTx II (A), FTx III (B), IV (C) e d-tubocurarina (D). Os inserts representam o efeito induzido pelas FTxs e pelo controle (D) sobre a amplitude dos MEPPs antes e após 45 min de incubação. Barra de calibração: 10 ms (horizontal), 0,1 mV (vertical).

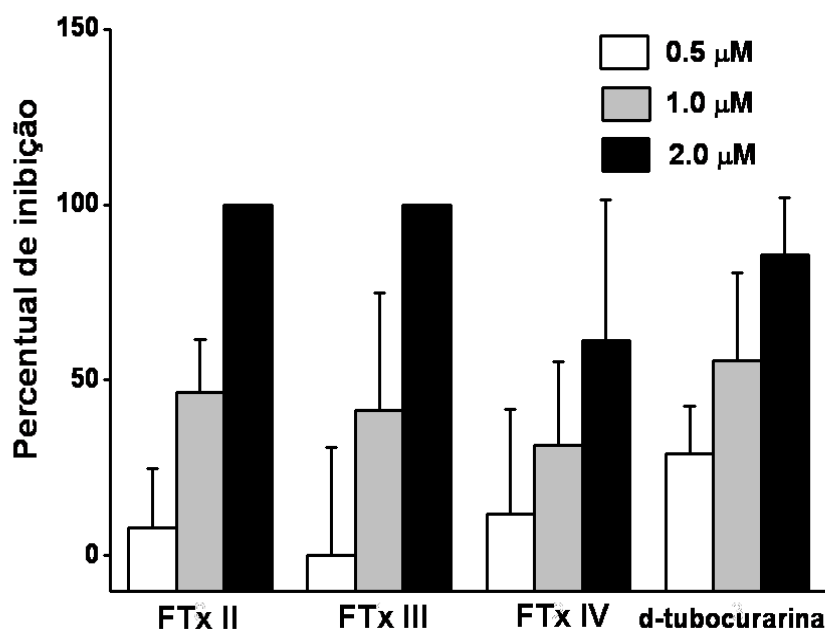


Figura 32. Inibição dose-dependente do tamanho dos MEPPs causada pelas Frontoxinas na junção neuromuscular de rã. Cada ponto representa a média do percentual de inibição obtido após 45 minutos de incubação com FTx II, III, IV ou d-tubocurarina. As barras correspondem \pm 95% de limite de confiança de cada média (N=3-6).

4.2.2. WAP - “Whey acid protein”

4.2.2.1. Isolamento

Duas classes de moléculas foram identificadas na fração 18 da cromatografia líquida em coluna do tipo C₄ semi-preparativa (Figura 33A). Para melhor separação, a fração foi recromatografada em coluna C₁₈ analítica sob gradiente linear de acetonitrila (Figura 33B). O componente eluído em 40% de acetonitrila apresentou massa molecular de 5336,7 Da.

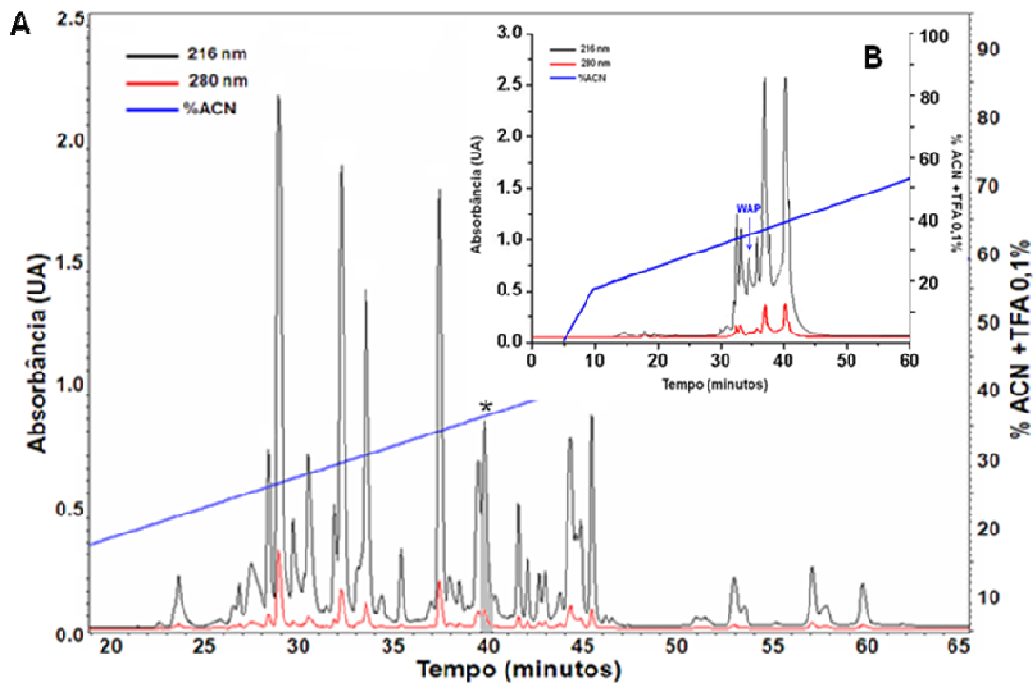


Figura 33. Separação dos componentes da fração 18 do veneno de *M. frontalis*. A fração 18 proveniente da cromatografia em coluna semi-preparativa C_4 (A) foi submetida à cromatografia analítica, eluída em coluna Vydac C_{18} , sob gradiente linear de acetonitrila, fluxo 1,0 mL/min e absorbância monitorada em 216 e 280nm (B).

4.2.2.2. Determinação e análise da estrutura primária

O componente de massa molecular de 5336,7 Da, parcialmente separado em cromatografia líquida em coluna analítica C_{18} , foi submetido a sequenciamento *De novo* por MS/MS. Foram seqüenciados 51 resíduos de aminoácidos por sequenciamento direto (Figura 34A). Alguns resíduos das porções C-terminal e N-terminal foram identificados por MS/MS, após redução, alquilação e digestão com tripsina (Figuras 34B e 34C). Os íons das séries *b* e *y* dos fragmentos correspondentes à porção N-terminal, a região interna e C-terminal, estão dispostos nas tabelas 7, 8 e 9 respectivamente.

Seqüenciamento direto

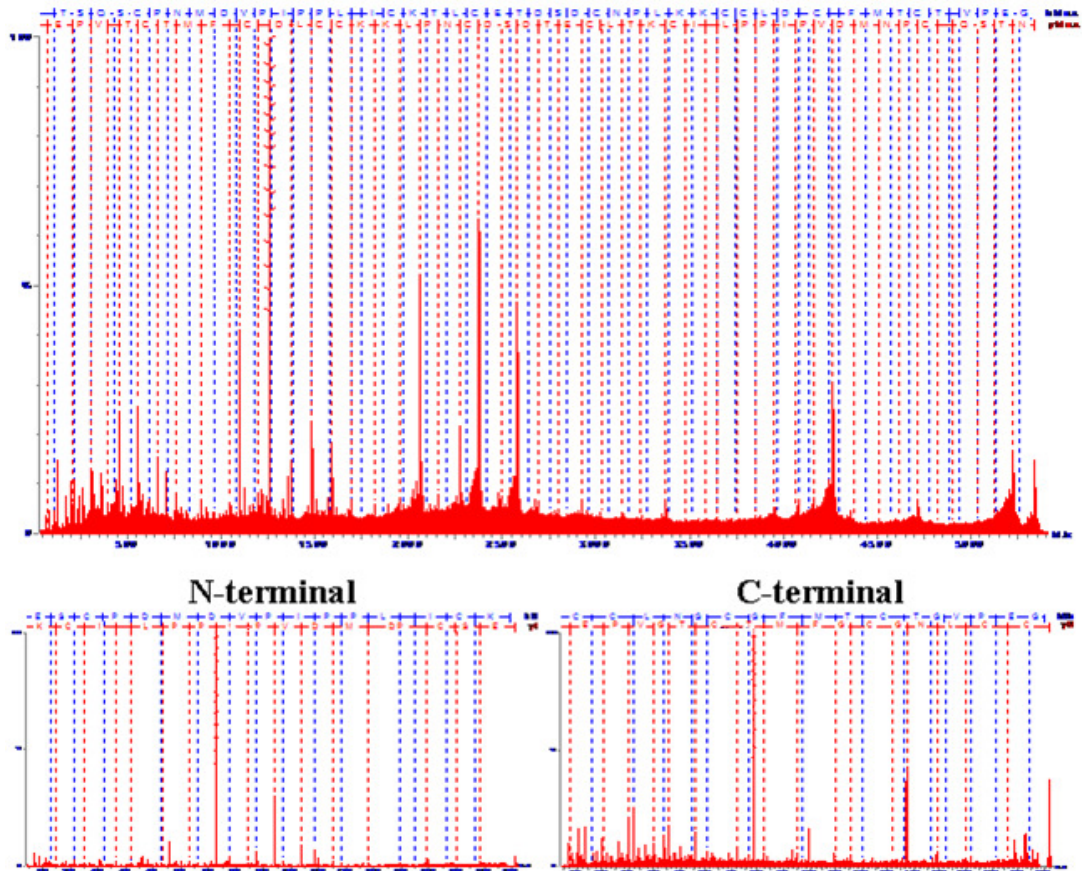


Figura 34. Seqüenciamento *de novo* da proteína com 5336,7 Da. A sequência foi obtida após redução e alquilação em MALDI-TOF/TOF utilizando o modo LIFT. Os fragmentos gerados permitiram o reconhecimento completo das séries de íons *y* (vermelho) e *b* (azul). As porções N- e C-terminais (B e C respectivamente) foram identificadas pelo seqüenciamento dos fragmentos obtidos após digestão enzimática com tripsina.

Tabela 7. Massa monoisotópica dos íons *b* e *y* observados na porção N-terminal da sequência de aminoácidos da proteína de 5336,7 Da.

Sequência	Íon	<i>b</i> exp.	<i>y</i> exp.	Íon
E	1	129,0 (-0,1)	1812,1	17
S	2	216,0	1685,1 (-0,3)	16
C	3	319,0 (0,1)	1597,2 (0,8)	15
P	4	416,1	1493,9 (-0,1)	14
D	5	531,0 (0,9)	-	13
M	6	662,1 (0,8)	1282,8 (-0,1)	12
D	7	777,2 (0,8)	1151,6	11
V	8	876,2 (0,9)	1036,7	10
P	9	973,3 (0,6)	937,6	9
I	10	1086,3 (0,8)	840,5	8
P	11	1183,4 (0,8)	727,4	7
P	12	-	630,3	6
L	13	1393,5 (0,6)	533,2	5
G	14	1450,5 (-0,6)	420,1	4
I	15	1563,6 (0,7)	365,2	3
C	16	1666,67(-0,5)	250,0	2
K	17	1794,5 (0,8)	147,0	1

Os números dentro dos parênteses correspondem às diferenças entre as massas experimental e calculada.

Tabela 8. Massa monoisotópica dos íons *b* e *y* observados na região interna da sequência de aminoácidos da proteína de 5336,7 Da.

Sequência	Íon	<i>b</i> exp.	<i>y</i> exp.	Íon
T	21	2199,5 (-0,4)	3242,7 (-0,1)	34
L	22	2311,5 (0,5)	3139,9 (0,7)	33
C	23	2414,6 (0,5)	3028,8 (0,2)	32
E	24	2543,9 (-0,2)	2924,4 (0,1)	31
T	25	2642,3 (-0,8)	2795,3 (0,1)	30
D	26	2756,5	2693,6 (0,8)	29
S	27	2844 (-0,5)	2579,3 (0,1)	28
D	28	2960,8 (0,5)	2492,1 (0,3)	27
C	29	3065,8 (-0,5)	2377,6 (-0,2)	26
N	30	3180,7	2274,5 (-0,1)	25
P	31	3275,1 (0,1)	2160,6 (-0,2)	24
L	32	3388,4 (0,6)	2062,4 (0,8)	23
K	33	3519,21 (0,6)	1949,4 (0,8)	22
K	34	3644,5 (0,1)	1821,04 (0,1)	21

Os números dentro dos parênteses correspondem às diferenças entre as massas experimental e calculada.

Tabela 9. Massa monoisotópica dos íons *b* e *y* observados na porção C-terminal da sequência de aminoácidos da proteína de 5336,7 Da.

Sequência	Íon	b_{exp.}	y_{exp.}	Íon
C	1	161,0	1919,8	17
C	2	320,9 (0,1)	1759,2 (0,4)	16
L	3	434,07	1600,6 (-0,9)	15
N	4	548,0 (0,1)	1487,6 (-0,1)	14
G	5	605,1	1372,61	13
C	6	766,2 (0,8)	1315,4	12
G	7	-	1155,8 (-0,3)	11
F	8	969,5 (0,1)	1098,5	10
M	9	1098,5 (0,1)	951,4	9
T	10	1202,6 (-0,2)	820,4	8
C	11	-	719,2	7
T	12	1462,6 (-0,1)	559,2	6
G	13	1521 (-0,5)	458,1 (0,1)	5
V	14	-	401 (0,1)	4
P	15	1713,8 (0,2)	302	3
E	16	1844,4 (0,2)	205	2
G	17	1901,4	75,38 (0,6)	1

Os números dentro dos parênteses correspondem às diferenças entre as massas experimental e calculada.

O componente sequenciado possui 8 resíduos de cisteínas conservados que formam 4 ligações dissulfeto. O alinhamento da sequência com as demais disponíveis nos bancos de dados mostrou alta identidade (60-74%) com WAPs encontradas em serpentes e similaridade com waprinas de mamíferos (Figura 37). Devido à grande similaridade com as waprinas, a proteína foi chamada de Miwaprina.

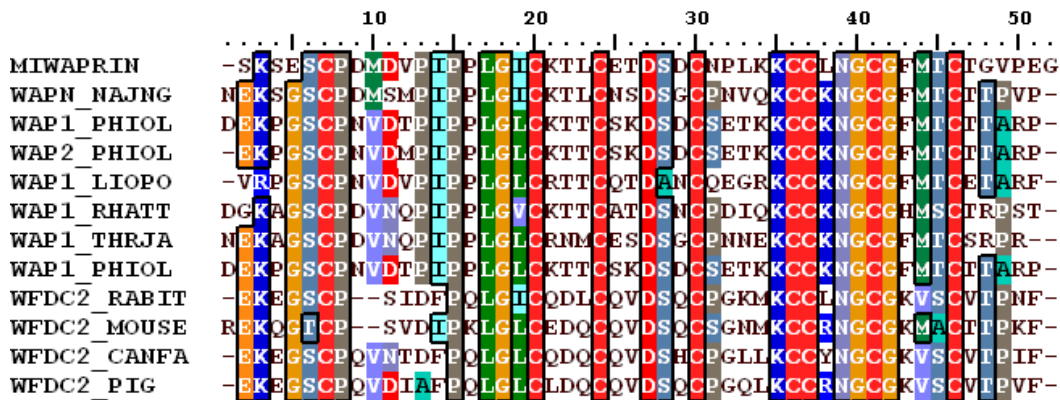


Figura 35. Alinhamento da sequência de aminoácidos da Miwaprin e similaridade com outras WAPs. O alinhamento foi realizado utilizando a ferramenta “Clustal W Multiple Alignment” disponível no software Bioedit v. 7.0.4.1. Gaps (-) foram introduzidos para maximizar as similaridades entre as seqüências. PHIOL, *Philodryas olfersii*; NAJNG, *Naja nigricollis*; LIOPO, *Liophis poecilogyrus*; RHATT, *Rhabdophis tigrinus*; THRJA, *Thrasops jacksonii*.

4.2.3. Fosfolipases A₂ (PLA2)

4.2.3.1. Isolamento e purificação das PLA2

As frações eluídas entre 40-50% de acetonitrila apresentaram componentes de massa molecular entre 5000 – 21000 Da. Foi observada uma grande quantidade de componentes com massa molecular entre 13000 e 14500 Da, os quais provavelmente seriam PLA2. Foram identificados por sequenciamento *De novo* e por degradação de Edman, alguns fragmentos correspondentes a esta classe de proteínas.

Fração 18

A fração 18 da cromatografia semi-preparativa em coluna C₄ (Figura 36A) foi submetida à recromatografia analítica em coluna C₁₈ (Figura 36B). A separação dos componentes ocorreu com gradiente de eluição linear de acetonitrila. A massa molecular monoisotópica de cada componente, determinada por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF/MS foi [M+H]⁺ = 13305,2 e [M+H]⁺ = 13586,4.

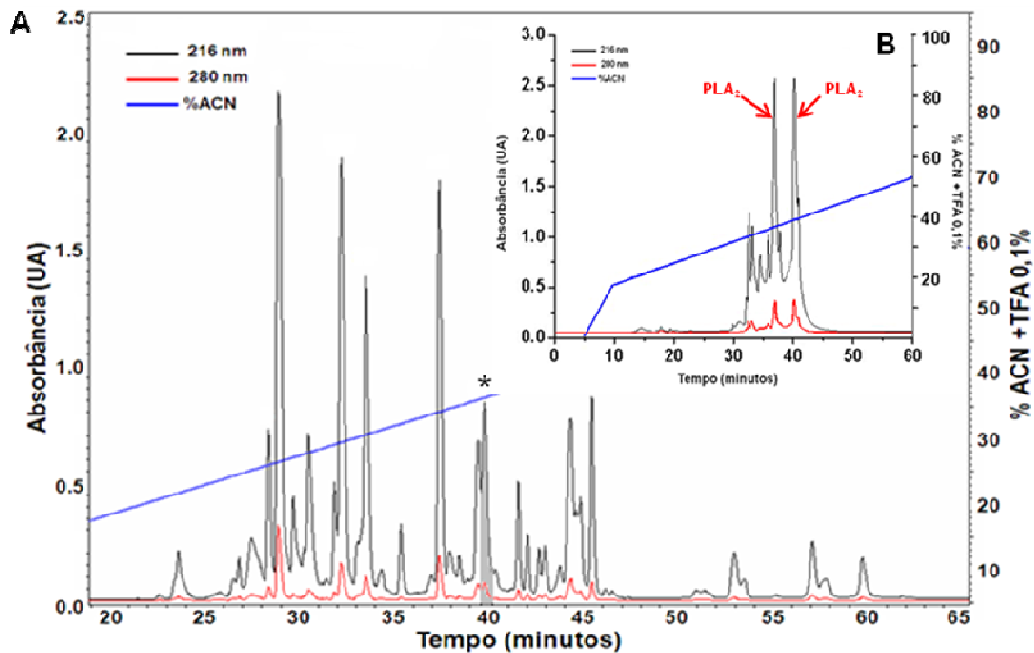


Figura 36. Separação analítica das PLA2 presentes na fração 18 do veneno de *M. frontalis*. A fração 18 proveniente da cromatografia semi-preparativa (A) foi submetida à cromatografia analítica, eluída em coluna Vydac C₁₈, sob gradiente linear de acetonitrila, fluxo 1,0 mL/min e absorbância monitorada em 216 e 280nm (B).

Após redução, alquilação e digestão com tripsina foram identificados dois fragmentos de PLA2 provenientes de cadeias polipeptídicas distintas por MS/MS, os quais foram chamados de MFRONT1 e MFRONT2. Na proteína MFRONT1 com $[M+H]^+ = 13305,2$ verificou-se um fragmento 83% idêntico a PLA2 de *Naja mossambica* e com 64% de identidade com PLA2 de *M. fulvius* (Figura 37). Na proteína MFRONT2 com $[M+H]^+ = 13586,4$ foi identificado fragmento altamente similar (75 – 85%) a PLA2 encontradas em elapídeos entre eles *M. fulvius* e *M. nigrocinctus* (Figura 48).

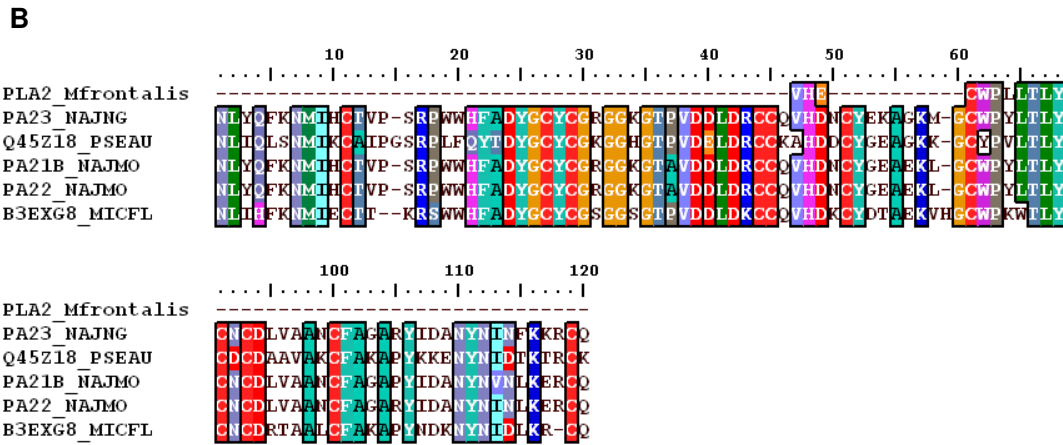
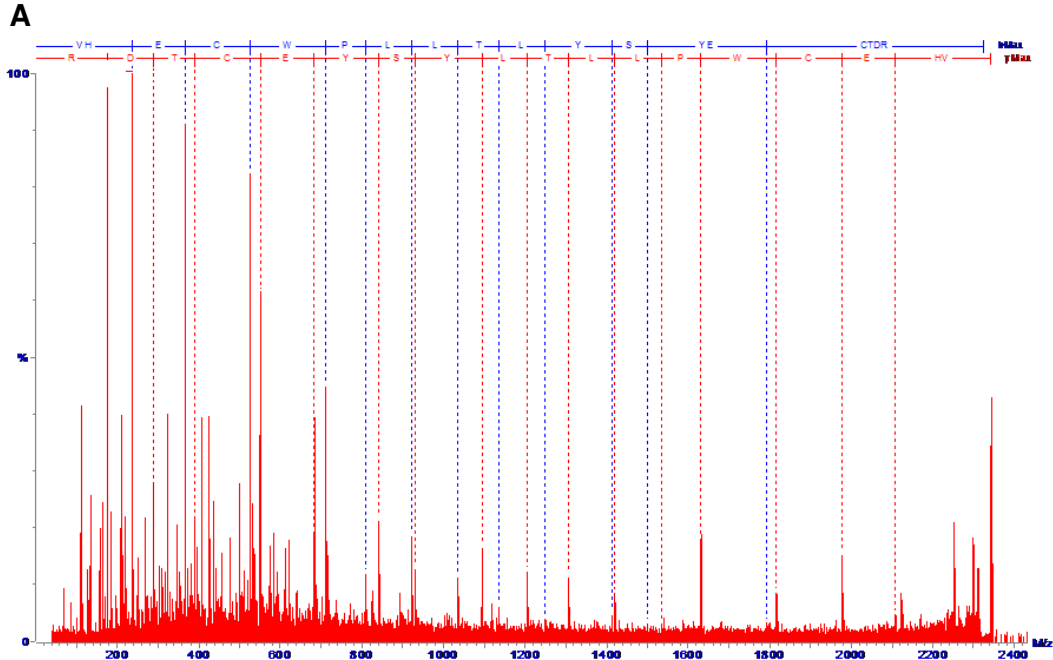


Figura 37. Sequenciamento *de novo* e alinhamento do fragmento tríptico da PLA2 com 13305,2 Da. A sequência do fragmento de 2342,5 Da foi obtida após redução, alquilação e digestão com tripsina em MALDI-TOF/TOF utilizando o modo LIFT (A). O alinhamento foi realizado com a ferramenta “Clustal W Multiple Alignment” disponível no software Bioedit v. 7.0.4.1. Gaps (-) foram introduzidos para maximizar as similaridades entre as sequências. NAJNG, *Naja nigricollis*; PSEAU, *Pseudechis australis*; NAJMO, *Naja mossambica*; MICFL, *M. fulvius* (B).

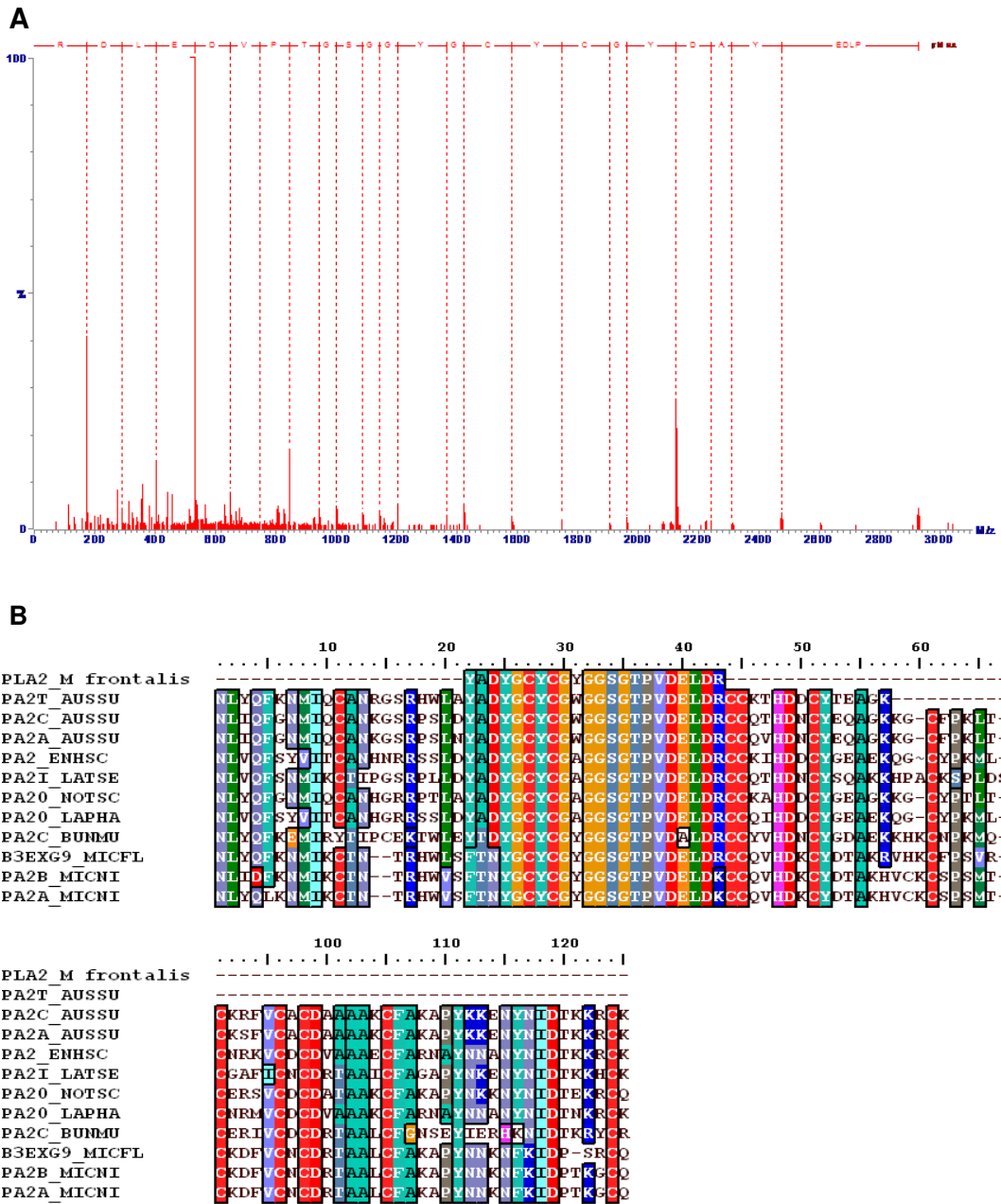


Figura 38. Sequenciamento *de novo* e alinhamento do fragmento triptico da PLA2 com 13486,4 Da. A sequencia do fragmento de 3497,1 Da foi obtida após redução, alquilação e digestão com tripsina em MALDI-TOF/TOF utilizando o modo LIFT (A). O alinhamento foi realizado com a ferramenta “Clustal W Multiple Alignment” disponível no software Bioedit v.7.0.4.1. Gaps (-) foram introduzidos para maximizar as similaridades entre as seqüências. AUSSU, *Austroleps superbus*; ENHSC, *Enhydrina schistosa*; LATSE, *Laticauda semifasciata*; NOTSC, *Notechis scutatus*; LAPHA, *Lapemis harwickii*; BUNMU, *Bungarus multicinctus*; MICFL, *M. fulvius*; MICNI, *M. nigrocinctus* (B).

Fração 25

A fração 25 proveniente da separação em coluna C4 semi-preparativa (Figura 39A) foi submetida a cromatografia líquida em coluna C₁₈ analítica (Figura 39B) e em seguida em coluna Source (5RTP) (Figura 39C). O componente desta fração com maior absorbância apresentou, em sua forma nativa, massa molecular de $[M+H]^+=13.491,2$ e após redução e alquilação $[M+H]^+=14.304,8$ (Figura 40), sugerindo assim a presença de 14 resíduos de cisteínas.

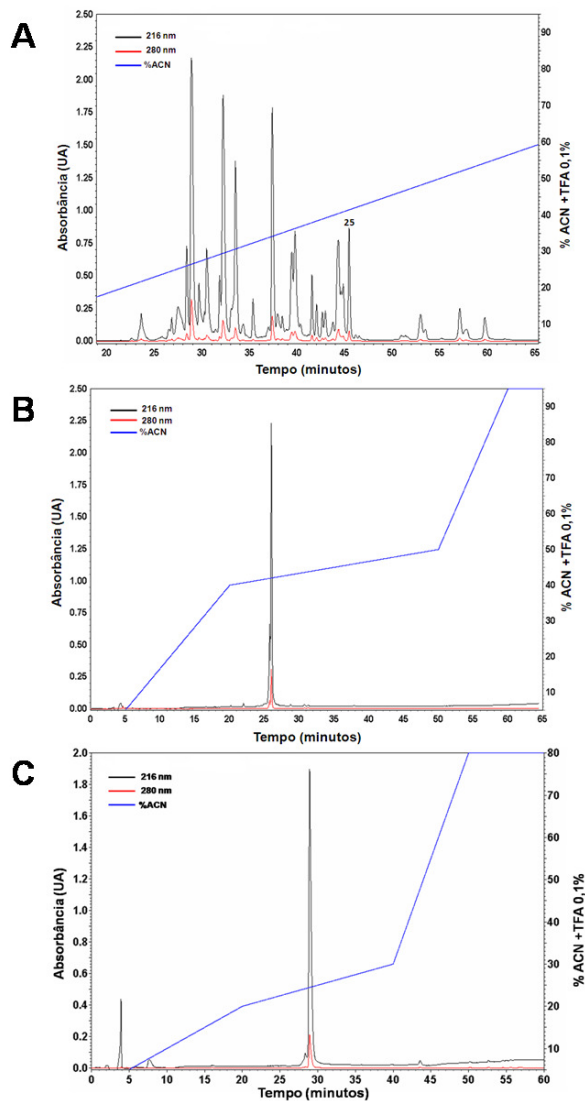


Figura 39. Purificação da fração 25 do veneno de *M. frontalis*. A fração 25 (A) foi aplicada em coluna C₁₈ analítica, com gradiente entre 40 – 50% de acetonitrila com TFA 0,1%(B). O componente mais intenso foi recromatografado em coluna Source 5RPC (C). Em todos os passos cromatográficos a absorbância foi monitorada em 216 e 280 nm e fluxo 1 mL/min.

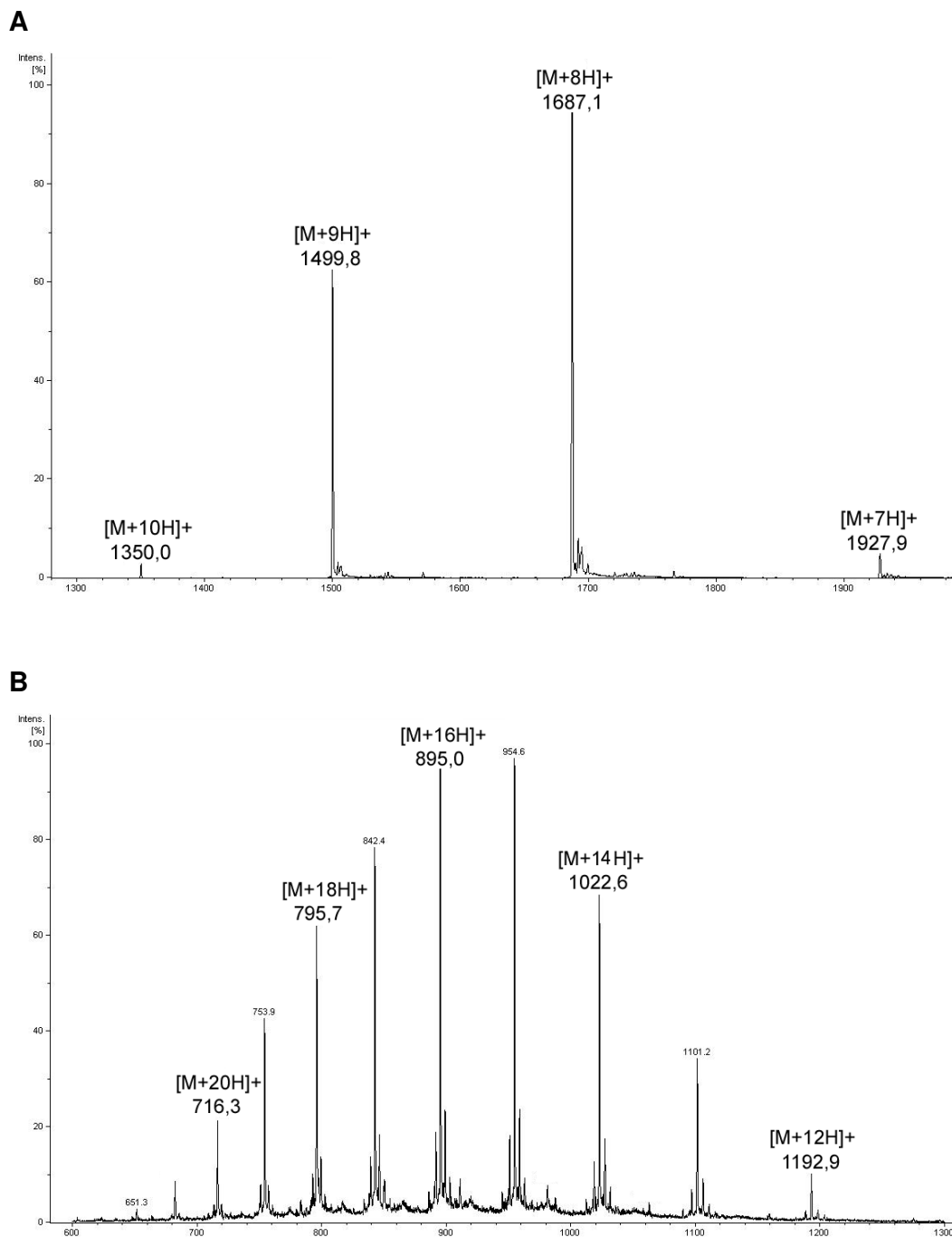


Figura 40. Espectro de massa molecular nativo (A) e reduzido e alquilado (B) do componente majoritário da fração 25. Série de íons multicarregados, mostrando proteína nativa com $[M+H]^+ = 13491,2$ Da e após redução e alquilação $[M+H]^+ = 14304,8$ Da. Os espectros de massa foram adquiridos por ionização eletrospray (ESI) em espectrômetro de massa HCT-Ultra ETD II (Bruker Daltonics, Billerica, EUA).

Após redução e alquilação, foi determinada por degradação de Edman a sequência N-terminal da molécula. Foram identificados 31 resíduos, dos quais 3 são cisteínas conservadas. Esta porção N-terminal mostrou mais de 80% de identidade com PLA2 encontradas nos venenos de elapídeos e foi chamada de MFRONT3 (Figura 41).

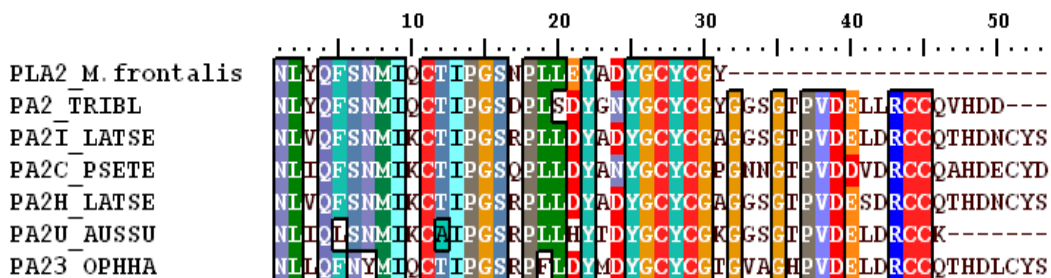


Figura 41. Alinhamento da PLA2 de *M. frontalis* com outras PLA2 de elapídeos. O alinhamento foi realizado utilizando a ferramenta “Clustal W Multiple Alignment” disponível no software Bioedit v. 7.0.4.1. Gaps (-) foram introduzidos para maximizar a similaridade entre os polipeptídeos. TRIBL, *Trimorphodon biscutatus*; LATSE, *Laticauda semifasciata*; PSETE, *Pseudonaja textilis*; AUSSU, *Austrelaps superbus*; OPHHA, *Ophiophagus hannah*.

Foi identificado também outro fragmento desta PLA2 após tratamento enzimático com endoproteínase Lys-C. Dos peptídeos gerados pela digestão enzimática, somente um mostrou sinal suficiente para sequenciamento por MS/MS. Os peptídeos purificados e a sequência de aminoácidos encontrada estão na Figura 42.

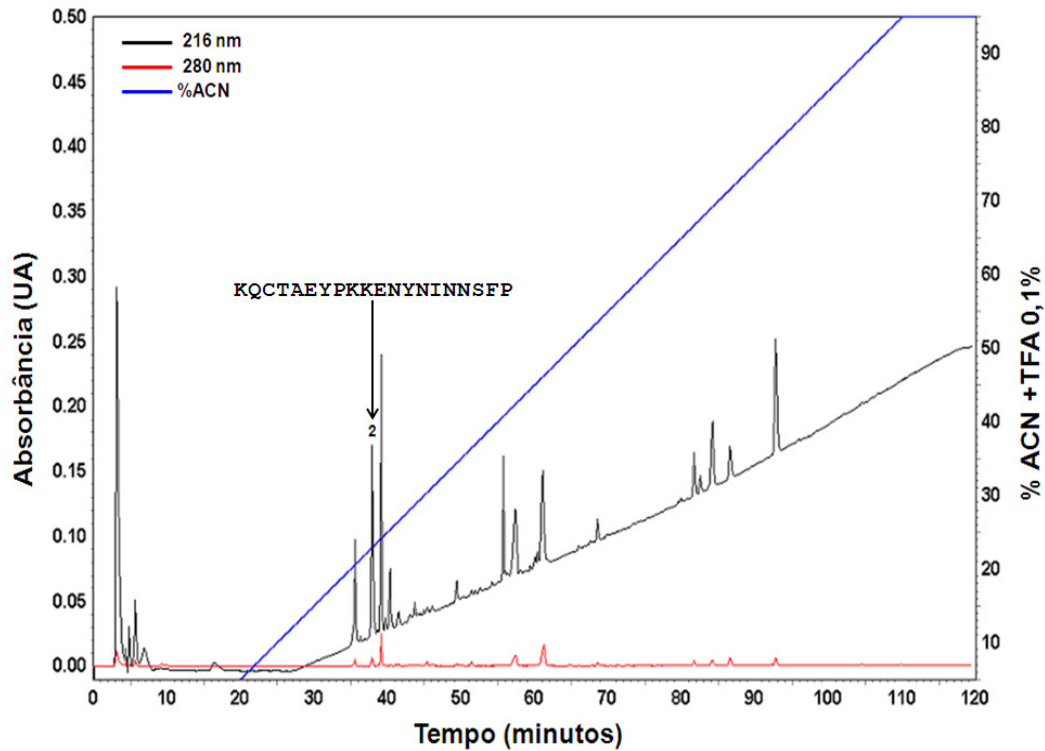


Figura 42. Purificação dos peptídeos oriundos da digestão enzimática da fração 25 com endoproteínase Lys-C. Após digestão enzimática com Lys-C a fração 25 foi submetida à cromatografia líquida analítica em coluna C_{18} sob gradiente linear de acetonitrila (99,9% ACN + 0,1% TFA), fluxo 1,0 mL/min, por 120 min. A absorbância foi monitorada em 216 e 280 nm. O fragmento foi sequenciado por MS/MS em MALDI-TOF/TOF utilizando o modo LIFT.

5. DISCUSSÃO

5.1. Caracterização geral do veneno da serpente *M. frontalis*

Os venenos das serpentes do gênero *Micrurus*, são pouco estudados devido à dificuldade de coleta das serpentes e a pequena quantidade de peçonha obtida em cada extração. A maioria dos estudos realizados descreve a atividade biológica e enzimática do veneno bruto, porém estudos sobre a composição das peçonhas ainda são escassos. Recentemente foram realizadas análises proteômicas dos venenos de *M. surinamensis* (Olamendi-Portugal *et al.*, 2008) e *M. pyrrhocryptus* (Dokmetjian *et al.*, 2009) e análise transcriptômica do veneno de *M. corallinus* (Leão *et al.*, 2009).

Os fracionamentos iniciais do veneno bruto da serpente *M. frontalis* em coluna C₄ e C₂C₁₈ permitiram a separação de 32 frações as quais foram eluídas sob gradiente linear entre 20-60% de acetonitrila. Aird e Jorge da Silva (1991), em estudo comparativo entre os perfis cromatográficos com os venenos de *Micrurus* brasileiras, consideraram o veneno de *M. frontalis* um dos mais complexos devido à maior quantidade de componentes observados. Em coluna analítica do tipo C₈, o veneno de *M. lemniscatus* foi separado em 19 frações (Oliveira *et al.*, 2008). O veneno de *M. nigrocinctus nigrocinctus*, após cromatografia líquida em coluna C₄ gerou aproximadamente 30 frações (Alape-Girón *et al.*, 1996) e o veneno de *M. surinamensis* gerou apenas 15 frações (Olamendi-Portugal *et al.*, 2008). O perfil cromatográfico do veneno de *M. dumerilli carinicauda* após separação analítica em coluna C₁₈ apresentou 22 frações (Dal Belo *et al.*, 2005). A técnica de exclusão molecular utilizada na separação inicial dos venenos de *M. frontalis* (Francis *et al.*, 1997) e *M. pyrrhocryptus* (Dokmetjian *et al.*, 2009), não foi utilizada no presente estudo pois requer uma maior quantidade de veneno que a fase reversa.

A análise por espectrometria de massa das frações oriundas da cromatografia em coluna C₄ do veneno de *M. frontalis* revelou componentes com massas moleculares entre 3000 e 60000 Da, sendo que a grande maioria apresenta massa molecular entre 6000 e 15000 Da. Os doze primeiros componentes eluídos apresentaram massas moleculares semelhantes às isoformas de α -neurotoxinas de cadeia curta e longa, corroborando a descrição para os venenos de *M. pyrrhocryptus* (Dokmetjian *et al.*, 2009), *M. surinamensis* (Olamendi-Portugal *et al.*, 2008) e *M. nigrocinctus* (Rosso *et al.*, 1996). Na faixa de 40-50% do gradiente de ACN+TFA 0,1%, a maioria dos componentes possui entre 13000 e 15000 Da, os quais provavelmente pertencem à família das PLA2. Outras massas moleculares também foram

identificadas. No entanto, os componentes mais abundantes (absorbância alta) comprovam que os venenos elapídicos são ricas fontes de neurotoxinas e PLA2.

A identificação dos componentes moleculares é importante, pois permite um rápido conhecimento da diversidade das substâncias presentes no veneno de *Micrurus*. No entanto, para uma melhor compreensão de como os componentes atuam na peçonha faz-se necessário o isolamento e a purificação dos componentes, bem como a determinação de suas estruturas primárias e de suas atividades biológicas.

5.2. Frontoxinas

A identificação das estruturas primárias das neurotoxinas encontradas no veneno de *M. frontalis* foi um processo lento, laborioso e que envolveu a reunião de diferentes tipos de cromatografia (RP-HPLC e UFLC), espectrometria de massa (ESI e MALDI-TOF) e sequenciamento da estrutura primária (degradação de Edman e MS/MS). A análise da sequência de aminoácidos das Frontoxinas revelou elevados índices de similaridade com α -neurotoxinas pertencentes à família de toxinas de três dígitos.

Todas as FTxs foram eluídas entre 25-35% de gradiente de acetonitrila, como descrito anteriormente para as neurotoxinas dos venenos de *M. nigrocinctus* (Rosso *et al.*, 1996), *M. surinamensis* (Olamendi-Portugal *et al.*, 2008) e *M. pyrrhocryptus* (Dokmetjian *et al.*, 2009). As FTxs foram purificadas até a homogeneidade após consecutivos passos de cromatografia líquida em diferentes tipos de colunas de fase reversa devido à grande quantidade de isoformas em cada fração. Davidson e Dennis (1990) sugerem que a diversidade de isoformas de toxinas nos venenos das serpentes tenha correlação direta com o tipo de presa específico para cada espécie, uma vez que a característica primária do veneno é a digestão da presa. A variação geográfica também é considerada um fator importante que pode influenciar na composição dos venenos (Daltry *et al.*, 1996). Gong e colaboradores (1999) sugerem que esta pressão seletiva possa ter favorecido a multiplicidade de isoformas de neurotoxinas de cadeia curta em *Pseudonaja textilis*. Assim pode-se sugerir que a riqueza de isoformas de neurotoxinas no veneno de *M. frontalis* possa ter relação direta com o tipo de presa e também com a localização geográfica dos animais em estudo.

As α -neurotoxinas são polipeptídeos desprovidos de atividade enzimática que contém de 60 a 75 resíduos de aminoácidos fixados por 4-5 ligações dissulfeto. Este grupo de toxinas é classificado, de acordo com a sua estrutura molecular, em neurotoxinas de cadeia curta (60-62 resíduos e 4 ligações dissulfeto) e neurotoxinas

de cadeia longa (66-74 resíduos e 5 ligações dissulfeto) (Endo e Tamiya, 1991; Servent *et al.*, 1997). As FTx I, III, VI, IV e V compartilham a maioria das características estruturais desta classificação, sendo as três primeiras consideradas neurotoxinas de cadeia curta e as duas últimas neurotoxinas de cadeia longa. No entanto, nem todas as neurotoxinas podem ser classificadas desta forma, por exemplo, as toxinas *Lc a* e *Lc b* do veneno da serpente marinha *Laticauda colubrina* que possuem 69 resíduos de aminoácidos e apenas quatro ligações dissulfeto (Endo e Tamiya, 1987). A FTx II possui 4 ligações dissulfeto e 59 resíduos de aminoácidos, contrariando a classificação geral das α -neurotoxinas. O alinhamento da FTx II com outras moléculas depositadas nos bancos de dados mostrou alta similaridade com neurotoxinas de cadeia curta presentes nos venenos de *M. surinamensis* (Olamendi-Portugal *et al.*, 2008), *M. pyrrhocryptus* (Dokmetjian *et al.*, 2009), *M. corallinus* (Leao *et al.*, 2009) e de outros elapídeos como *Pseudonaja textilis* (Gong *et al.*, 1999 e 2000) e *Ophiophagus hannah* (Chang *et al.*, 2002). Assim, consideramos a FTx II uma α -neurotoxina de cadeia curta.

As α -neurotoxinas são também conhecidas como curaremiméticas devido à sua capacidade de ligar-se aos receptores nicotínicos de acetilcolina, promovendo seu bloqueio sem induzir a abertura do canal iônico, alterando assim a transmissão nervo-músculo (Changeux, 1990; Grant *et al.*, 1997; Yee *et al.*, 2004). As toxinas de cadeia curta apresentam alta afinidade a receptores nicotínicos de acetilcolina do tipo muscular, enquanto que as neurotoxinas de cadeia longa além de se ligarem aos receptores musculares possuem afinidade também aos receptores nicotínicos neuronais do tipo $\alpha 7$ (Servent *et al.*, 1997 e 2000). A presença e a localização de alguns resíduos de aminoácidos na cadeia polipeptídica parecem desempenhar um importante papel funcional na afinidade pelo receptor de acetilcolina (Rydén *et al.*, 1973; Martin *et al.*, 1983; Pillet *et al.*, 1993; Trémeau *et al.*, 1995). A partir do alinhamento entre α -neurotoxinas curtas e longas com toxinas de três dígitos com ação farmacológica distinta como as cardiotoxinas, Rydén e colaboradores (1973) observaram a presença de resíduos conservados, os quais podem estar relacionados com a estruturação em três dígitos nestes dois grupos de moléculas. Foram identificados os seguintes resíduos invariantes: Ser/Thr-10; Gly-22; Tyr-27; Gly-46; Pro-52; Leu/Ile/Val/Tyr-59; Ser/Thr-66; Asp/Asn/Glu-68; Asp/Asn-71 e as cisteínas envolvidas nas quatro ligações dissulfeto (Cys-3 e 26; Cys-19 e 47; Cys-51 e 63; Cys-64 e 70). A Gly na posição 46 é conservada nas FTxs I e II e a Cys é conservada apenas na posição 3 de todas as FTxs, sugerindo assim que as FTxs apresentam uma estrutura em três dígitos diferente da observada nas cardiotoxinas.

Os resíduos Lys-29, Trp-31, Asp-33, His/Phe/Trp-35, Arg/Lys-39, Gly-40, Glu/Asp-44, Val/Ala-54, Lys/Arg-55 são conservados apenas entre as α -neurotoxinas (Tsernoglou *et al.*, 1978; Endo e Tamiya 1987 e 1991) e parecem estar envolvidos na função biológica das mesmas, sendo chamados de “resíduos funcionais invariantes” (Tsernoglou *et al.*, 1978). A FTx III de cadeia curta e as de cadeia longa FTx IV e V possuem apenas o resíduo Arg-39 conservado, sugerindo que as FTxs possam atuar de forma distinta no receptor de nicotínico de acetilcolina. As peculiaridades das FTxs de cadeia curta e longa serão discutidas com mais detalhes a seguir.

5.2.1. Frontoxinas de cadeia curta

As sequências primárias das FTxs I, II, III e VI serão comparadas com outras sequências de α -neurotoxinas de cadeia curta e principalmente com a *erabutoxina a*, neurotoxina de cadeia curta do elapídeo marinho *Laticauda semifasciata*, que teve seu sítio de ligação ao receptor muscular de acetilcolina totalmente delineado pela técnica de mutagênese dirigida.

Cerca de 80% das α -neurotoxinas de cadeia curta possuem a posição 4 da sequência representada pelo resíduos aromáticos por Phe ou Tyr (Prieto da Silva, 2001). As FTx I, II e VI possuem Tyr e a FTx III possui Phe nesta posição. Estes resíduos são também comumente encontrados conservados na maioria das neurotoxinas curtas de *M. surinamensis*, *M. pyrrhocryptus* e *M. corallinus*. Apesar de conservados, estes resíduos quando mutados não interferem na afinidade ao receptor (Trémeau *et al.*, 1995).

Os resíduos His-6, Gln-7, Ser-8, Ser-9, Gln-10 localizados na extremidade da primeira alça são estrutural e funcionalmente importantes em *erabutoxina a*. A His-6 é conservada na FTx I e aparece na posição 7 da FTx VI, mantendo positiva esta região da neurotoxina. Segundo Trémeau *et al.* (1995), quando a His-6 é substituída por resíduos neutros há uma pequena redução na afinidade ao AchR.

A posição 8 parece desempenhar papel crucial na ligação ao nAChR. A substituição de Ser-8 por Gly, por exemplo, causa decréscimo de até 176 vezes na afinidade pelo nAChR muscular (Pillet *et al.*, 1993). Alterações estruturais também foram observadas a partir da técnica de difração circular. A Ser-8 é conservada nas FTxs I e III. A FTx VI possui uma Gly-8, o que pode sugerir uma menor afinidade desta toxina ao receptor semelhante ao observado na estrutura e na atividade da atratoxina, α -neurotoxina de *Naja naja atra* (Tu *et al.*, 2002). A substituição da serina na posição 9

causou pequena redução da afinidade, realçando assim a maior importância da Ser-8 (Trémeau *et al.*, 1995).

A posição 10 também parece ser importante na afinidade de ligação ao AchR, uma vez que alterações do resíduo Gln-10 também reduziram a afinidade de interação ao AchR muscular (Trémeau *et al.*, 1995). Nas FTxs I e II este resíduo é conservado, já na FTx III a Gln-10 foi substituída por treonina. Este tipo de substituição é comumente descrito em α -neurotoxinas de cadeia curta e não causa grande alteração funcional (Afifiyan *et al.*, 1998).

Em boa parte das α -neurotoxinas curtas a posição 11 e/ou 12 é ocupada por prolina. Este resíduo pode estar distribuído em toda a cadeia polipeptídica, porém nesta posição está relacionado ao dobramento mais fechado da primeira alça, uma vez que a cadeia lateral deste resíduo é capaz de se ligar a cadeia polipeptídica principal e forçar o dobramento da proteína (Franks, 1993). Apesar deste importante papel estrutural, a Pro-11, em *erabutoxina a*, não afeta a afinidade ao AchR (Trémeau *et al.*, 1995). Apenas a FTx I possui conservada as Pro-11 e 12. Em FTx II a posição 11 é ocupada por Thr e em FTx III por Ala. Estas substituições, também encontradas nas neurotoxinas de *Naja naja sputatrix* (Afifiyan *et al.*, 1998), provavelmente causam uma maior flexibilidade no *loop* I da molécula podendo afetar a propriedade de interação da toxina ao receptor.

A Tyr-25 ou qualquer resíduo aromático homólogo (Phe-27/Trp-27) é conservada na maioria das neurotoxinas de cadeia curta. Estes resíduos são considerados importantes no dobramento da cadeia polipeptídica (Dufton e Hider, 1983; Antil *et al.*, 1999) e na manutenção da estabilidade da estrutura em folhas β -pregueadas antiparalelas das toxinas de três dígitos (Torres *et al.*, 2001; Nirathanan e Gwee, 2004). Curiosamente, a FTx II possui resíduos apolares nestas posições (Val-25 e Ala-27), sugerindo assim um possível dobramento diferenciado das demais toxinas de três dígitos de cadeia curta.

A posição 27 das FTxs III e VI é ocupada por lisina. Segundo Herve *et al.* (1992), a supressão da carga positiva da Lys-27 desestabiliza o complexo toxina-AchR. Pillet *et al.* (1993) consideram este resíduo de grande importância funcional para *erabutoxina a*, já que sua acilação diminui bastante a afinidade de ligação ao AchR muscular. Na FTx II, a alanina ocupa a posição 27. Substituição semelhante é descrita em α -bungarotoxina, neurotoxina de *Bungarus multicinctus*. Neste caso, a substituição implicou na diminuição em nove vezes na afinidade com o receptor (Rosenthal *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 2003).

O resíduo de triptofano na posição 29 é conservado em boa parte das toxinas elapídicas de cadeia curta com atividade pós-sináptica (Gong, *et al.*, 1999). De acordo com Pillet *et al.* (1993) o Trp-29, faz parte do grupo dos aminoácidos invariantes considerados essenciais para atividade curaremimética. Substituições por fenilalanina ou histidina diminuíram a afinidade da neurotoxina ao receptor (Pillet *et al.*, 1993). Esta posição é conservada apenas na FTx III. Nas demais frontoxinas há ausência deste resíduo nesta posição assim como encontrado nas neurotoxinas curtas de *Pseudonaja textilis* (Gong, *et al.*, 1999). A FTx II possui uma histidina nesta posição.

O ácido aspártico na posição 31 é também considerado resíduo invariante. Quando mutado em histidina, sua afinidade ao receptor reduziu 46 vezes (Pillet *et al.*, 1993). No entanto, quando substituído por alanina em α -bungarotoxina (Rosenthal *et al.*, 1999) ou asparagina em *erabutoxina a* (Pillet *et al.*, 1993) não foi identificada alteração funcional. Esta posição não é conservada nas FTxs.

A Ser-35 ou Thr-35 é um resíduo invariante exclusivo das neurotoxinas de cadeia curta. Nesta posição o resíduo forma um sítio alternativo de ligação ao receptor, aumentando assim a afinidade da toxina ao AchR (Endo e Tamiya, 1991). Em *erabutoxina a* mutação deste resíduo por alanina não alterou a afinidade em relação ao receptor (Trémeau *et al.*, 1995). Já em W-III (neurotoxina de cadeia curta de *Walterinnesia aegyptia*) a substituição da Thr-35 por lisina influenciou diminuindo a interação entre a toxina e o AchR (Samejima *et al.*, 1997). FTx III possui esta posição conservada com uma treonina. FTx I apresenta uma isoleucina e a FTx II uma tirosina, como observado nos venenos de *Naja naja atra* (Yang *et al.*, 1969), *Naja mossambica mossambica* (Gregoire e Rochat, 1977) e *Naja naja sputatrix* (Afifiyan *et al.*, 1998). A presença dos diferentes resíduos na posição 35 provavelmente produz um efeito distinto na afinidade ao nAChR.

A posição 47, de acordo com o tipo de resíduo, pode apresentar importância estrutural ou funcional. A Pro-47, observada em *erabutoxina b* e textilotoxinas, parece estar envolvida na estrutura da molécula, tornando a alça do terceiro dígito mais fechada e rígida (Gong *et al.*, 1999). Nas FTx I e II, a posição 47 é ocupada por prolina. FTx III apresenta uma Lys-47, semelhante a *erabutoxina a* e Nmml (α -neurotoxina de *Naja mossambica mossambica*) (Ackermann e Taylor, 1997). Pillet e colaboradores sugerem que Lys-47 está diretamente envolvida na interação entre a molécula e o receptor de acetilcolina muscular. Trémeau *et al.* (1995), consideram Lys-47 o resíduo funcional mais importante da terceira alça, já que sua substituição reduz a afinidade ao nAChR muscular.

A modificação química de alguns aminoácidos é uma estratégia utilizada na identificação de resíduos importantes para a manutenção estrutural da molécula e para a ligação ao receptor nicotínico de acetilcolina. Acredita-se que os resíduos invariáveis estejam envolvidos no dobramento e na integridade estrutural da cadeia polipeptídica (Nirthanan e Gwee, 2004) enquanto que os resíduos variáveis estão diretamente relacionados com a ligação aos receptores de acetilcolina específicos para cada tipo de presa (Trémeau *et al.*, 1995; Hodgson e Wickramaratna, 2002).

De todas as FTxs de cadeia curta, a FTx III é a que apresenta maior número de resíduos variáveis e invariáveis conservados. Já a FTx II é a que menos apresenta estes resíduos conservados. A combinação de semelhanças e diferenças sugere que as Frontoxinas podem apresentar estrutura e funcionalidade diferenciada das demais α -neurotoxinas já descritas.

5.2.2. Frontoxinas de cadeia longa

Em geral as toxinas de cadeia longa são caracterizadas por apresentarem 66-74 resíduos, cinco ligações dissulfeto e são capazes de se ligar aos receptores de acetilcolina muscular e neuronal (Endo e Tamiya, 1991; Servent *et al.*, 1997). A afinidade ao receptor nicotínico de acetilcolina neuronal do tipo $\alpha 7$ é atribuída à presença da quinta ponte dissulfeto (Servent *et al.*, 1997).

Para o reconhecimento do receptor de acetilcolina muscular ($\alpha 1$) $_2\beta 1\gamma\delta$ ou de *Torpedo marmorata* as neurotoxinas de cadeia longa e curta compartilham sítio de ligação composto por resíduos aromáticos (Trp-29 e Phe-32) e com carga positiva (Lys-27, Asp-31, Arg-33 e Lys-47). Além desses, estão envolvidos também os resíduos específicos para o reconhecimento do receptor de cada toxina. Em *erabutoxina a* os resíduos da extremidade da primeira alça são considerados funcionalmente importantes na ligação com o receptor muscular, enquanto que em α -cobratoxina (α -neurotoxina de cadeia longa de *Naja kaouthia*) a porção carboxi-terminal tem maior relevância (Servent *et al.*, 2000). Em α -bungarotoxina (toxina de cadeia longa de *Bungarus multicinctus*) os resíduos Lys-26 e Arg-36 contribuem significativamente para a interação toxina-nAChR muscular de camundongos e de *Torpedo*. A Arg-36 simula a carga positiva da acetilcolina e direciona a toxina para o receptor (Rosenthal *et al.*, 1999).

Para o reconhecimento dos receptores muscular $\alpha 1$ e neuronal $\alpha 7$, a α -cobratoxina utiliza os resíduos Trp-25, Asp-27 e Arg-33. Além desses, são também

utilizados os resíduos Ala-28, Lys-35 e as Cys-26 e 30 para o reconhecimento do receptor neuronal e Lys-23, Lys-49 para o receptor muscular (Antil *et al.*, 1999). A estrutura cíclica formada pela quinta ponte dissulfeto na extremidade da segunda alça da α -cobratoxina é considerada essencial para a ligação ao receptor neuronal (Antil-Delbeke *et al.*, 2000).

As FTx IV e V possuem conservados a maioria dos resíduos considerados importantes para a ligação ao receptor muscular comum nas toxinas curtas e longas. Entretanto, as FTxs apresentam a quinta ligação dissulfeto no *loop 1*, assemelhando-se estruturalmente as neurotoxinas de três dígitos não convencionais ou fracas (“*weak neurotoxins*”). Esta classe de neurotoxinas era exclusivamente isolada a partir dos venenos da família Elapidae como *Naja kauthia* (Utkin *et al.*, 2001), *Bungarus candidus* (candoxina) (Nirthanan *et al.*, 2002), *M. surinamensis* (Olamendi-Portugal *et al.*, 2008), *M. pyrrhocryptus* (Dokmetjian *et al.*, 2009), *M. corallinus* (Leao *et al.*, 2009) entre outros. Porém, já foi descrita em colubrídeos asiáticos não venenosos como *Coelognathus radiatus* (α -colubrotóxina) (Fry *et al.*, 2003) e *Boiga dendrophila* (denmotóxina) (Pawlak *et al.*, 2006).

Os resíduos Lys-27, Asp-31, Arg-33 e Trp-29 são importantes na ligação ao AchR muscular em *erabutoxina a* e α -cobratoxina. A Arg-33 é considerada crucial para a ligação ao receptor neuronal $\alpha 7$ na toxina fraca de *Bungarus candidus* (candoxina), κ -bungarotoxina (Chiappinelli *et al.*, 1996) e nas α -neurotoxinas (Antil-Dalbeke *et al.*, 2000). As FTx IV e V possuem todos estes resíduos conservados. Além disso, as frontoxinas de cadeia longa possuem uma maior quantidade de resíduos na primeira alça quando comparados com a α -cobratoxina e não apresentam a porção C-terminal muito longa, semelhante à candoxina, o que pode influenciar na atividade biológica dessas toxinas (Nirthanan *et al.*, 2002). WTX, neurotoxina fraca de *Naja kaouthia* (Utkin *et al.*, 2001a) e Wntx-5, neurotoxina sintética de *Naja sputatrix* (Poh *et al.*, 2002) se ligam fracamente aos receptores muscular e neuronal de acetilcolina em concentrações micromolares. Em concentrações nanomolares, a candoxina, se liga reversivelmente aos receptores muscular $\alpha 1$ e de forma irreversível ao receptor neuronal $\alpha 7$ de Ach (Nirthanan *et al.*, 2002).

Mordvintsev *et al.* (2007a), a partir de estudos com modelagem computacional, explicam que a grande diferença na afinidade entre WTX e candoxina aos diferentes AchRs ocorre porque a quinta ligação dissulfeto localizada na primeira alça apenas direciona a toxina para o sítio de ligação, não atuando diretamente na interação toxina-AchR. Além disso, as neurotoxinas fracas podem atuar em diferentes alvos

moleculares, como a WTX (*Naja kauthia*) que atua nos receptores nicotínicos e muscarínicos de acetilcolina (Mordvintsev *et al.*, 2007b e 2009).

5.2.3. Inibição do potencial de placa em miniatura

As α -neurotoxinas se ligam e bloqueiam os receptores nicotínicos de acetilcolina no final da placa motora sem induzir a abertura do canal iônico alterando a transmissão nervosa em membranas pós-sinápticas (Grant *et al.*, 1997; Yee *et al.*, 2004). Para identificar se determinada substância atua como agonista ou antagonista do receptor nicotínico, as preparações musculares *in vitro* são bastante utilizadas em virtude de ser esta uma sinapse colinérgica (Hodgson e Wickramaratna, 2002).

A aplicação direta de 1 μ M de FTxs II e III sobre o músculo de rã foi suficiente para reduzir a amplitude e a frequência dos MEPPs em 50%. A concentração de 2 μ M aboliu completamente os MEPPs, sugerindo assim, que as FTxs de cadeia curta, bloqueiam irreversivelmente a transmissão neuromuscular de rã. A neurotoxina de cadeia curta de *Oxyuranus scutellatus*, Os SNTX-1, também reduz a amplitude e frequência dos MEPPs em junção neuromuscular de rã, no entanto, são necessários 5 μ M para bloquear irreversivelmente a transmissão nervosa (St Pierre, *et al.*, 2007).

A FTx IV de cadeia longa, na concentração de 2 μ M, quando aplicada diretamente sobre a junção neuromuscular de rã não aboliu os MEPPs, mas foi observado uma progressiva redução na amplitude dos mesmos após exaustiva lavagem com solução de Ringer, sugerindo assim irreversibilidade no bloqueio neuromuscular. Neste mesmo tipo de preparação, a NNA2 (toxina fraca de *Naja naja atra*) causa bloqueio na transmissão neuromuscular irreversível porém em concentração mais alta (1-4 μ M) (Chang *et al.*, 2000) do que a observada em FTx IV (1-2 μ M).

O bloqueio neuromuscular pós-sináptico reversível ou parcialmente reversível em preparações neuromusculares isoladas é observado em LSIII (*Laticauda semifasciata*; Maeda e Tamiya, 1974), pseudonajatoxina b (*Pseudonaja textilis*; Tyler *et al.*, 1987), candoxina (*Bungarus candidus*; Nirthanan *et al.*, 2002 e 2003) nas neurotoxinas homólogas CM10, CM12 (*Naja haje annulifera*) e S5C10 (*Dendroaspis jamesoni*; Harvey *et al.*, 1984) e Ms1, Ms2, Ms3, Ms11 (*M. surinamensis*; Olamendi-Portugal *et al.*, 2008).

A reversibilidade das α -neurotoxinas nas junções neuromusculares nem sempre está relacionada com a sua afinidade de ligação ao receptor. Harvey e Rodger (1978)

sugerem que a ação reversível pode também estar associada com uma área específica de interação da molécula distinta do sítio de reconhecimento do receptor. Para Harvey *et al.* (1984) a ausência do ácido aspártico na posição 31 pode estar associada à fácil reversibilidade do bloqueio neuromuscular produzido pelas toxinas fracas LSIII, CM10, CM12 e candoxina (Nirthanan *et al.*, 2002). É interessante ressaltar que a FTx IV possui Asp-31 e inibe de forma irreversível a frequência e a amplitude dos MEPPs, corroborando a hipótese de Harvey.

5.3. Miwaprina

A Miwaprina é integrante de uma nova classe de moléculas identificada recentemente nos venenos de elapídeos e colubrídeos, a WAP (*Whey Acid Protein*) ou waprinas. Os membros da família WAP possuem aproximadamente 50 resíduos de aminoácidos sendo oito resíduos de cisteína conservadas formando quatro ligações dissulfeto. Os segmentos entre os resíduos de cisteína conservados são variáveis entre as WAPs, o que confere a esta classe de proteínas uma diversidade de funções já descritas, como inibição Na⁺K⁺ATPase (Araki *et al.*, 1989), inibidor de proteinase com atividade antimicrobiana (elafina) (Francart *et al.*, 1997), atividade inibitória do crescimento (ps20) (Larsen *et al.*, 1998) e atividades antibacterianas (St. Pierre *et al.*, 2008). A maioria das proteínas de domínio WAP já descritas está envolvida no sistema imune inato (Nair *et al.*, 2007).

A primeira waprina ofídica foi isolada a partir do veneno *Naja nigricollis*, e recebeu o nome de Nawaprina. A Nawaprina possivelmente não apresenta atividade inibidora de proteases por apresentar diferenças estruturais significativas quando comparada à elafina, sugerindo uma atividade diferente em venenos de serpentes (Torres *et al.*, 2003). Devido à pequena quantidade encontrada nas peçonhas de serpentes, a atividade biológica das waprinas é pouco caracterizada. Apenas a Omwaprín (*Oxyuranus microlepidotus*) tem sua funcionalidade conhecida, possui atividade antimicrobiana específica para bactérias Gram-positivas (Nair *et al.*, 2007).

A seqüência primária da Miwaprina possui similaridade com waprinas do colubrídeo *Philodryas olfersii* (Waprín-Phi1 e Waprín-Phi2) e do elapídeo *Naja nigricollis*. O alinhamento entre Miwaprina e Nawaprina revelou que além dos resíduos de cisteína, resíduos como glicina, lisina e prolina são conservadas ao longo da cadeia. Levando-se em consideração que os resíduos de prolina e cisteína são determinantes para o dobramento da proteína, pode-se sugerir que Miwaprín e Nawaprín provavelmente possuem estruturas tridimensionais similares.

Leão e colaboradores (2009) identificaram a presença de waprina no veneno de *M. corallinus* a partir de análises transcriptômicas. No entanto, foi determinada apenas parte da estrutura primária. Assim, a Miwaprina descrita no presente estudo é a primeira WAP dos venenos das cobras corais completamente sequenciada. Devido sua pequena quantidade na peçonha, não foi possível determinar sua atividade biológica.

5.4. Fosfolipase A2

As fosfolipases do tipo A2 são encontradas na maioria dos venenos e são classificadas em duas categorias: classe I, comumente encontrada em elapídeos; classe II, comum nos venenos de viperídeos. Geralmente as PLA2 possuem 120 aminoácidos com seis ou sete ligações dissulfeto, composta por α -hélices e algumas estruturas em folhas β (Dufton e Hider, 1983). Segundo esta classificação as três PLA2 (MFRONT 1, 2 e 3) aqui isoladas e parcialmente sequenciadas, provavelmente fazem parte da classe I.

Nos venenos de serpentes, as PLA2 apresentam várias isoformas que, apesar de sua grande similaridade na sequência primária, demonstram funções biológicas e especificidades diversas que ocorrem independentemente da atividade enzimática. Além da função clássica de digestão de lipídeos, as PLA2 podem também desempenhar: atividade neurotóxica (pré- e pós-sináptica), miotóxica, cardiotoxica, hemolítica, convulsivante, hipotensora, edematogênica, coagulante, inibidora de agregação plaquetária (Kini, 2003). Análises das sequências de aminoácidos revelaram que grupos de aminoácidos específicos são importantes no desempenho de cada uma dessas atividades.

Nas PLA2 elapídicas, é comum a posição 11 da cadeia de aminoácidos ser ocupada por um resíduo de cisteína, à qual mantém uma ligação dissulfeto com a Cys-80 (Renetseder *et al.*, 1985). A MFRONT3 possui a Cys-11, que também é descrita nas PLA2 de *M. nigrocinctus* (Alape-Girón *et al.*, 1996), *M. dumerelli carinicauda* (Dal Belo *et al.*, 2005a) e *M. pyrrhocryptus* (Dokmetjian *et al.*, 2009).

Os resíduos Tyr-3, Trp-64 e Phe-66 são considerados importantes para a dimerização e para a atividade enzimática (Singh *et al.*, 2001). A ausência desses resíduos promoveu a perda das atividades enzimática e miotóxica em MiDCAI (PLA2 de *M. d. carinicauda*) (Dal Belo *et al.*, 2005 a). Arg-15, Val-190, Ala-103 e Ans-110 correspondem aos resíduos cruciais para a atividade miotóxica (Alape-Girón *et al.*,

1996). A região N-terminal da MFRONT3 possui conservada a Tyr-3 e a posição 15 é ocupada por glicina, o que pode sugerir ausência ou baixa atividade miotóxica.

A atividade neurotóxica pré-sináptica é descrita para PLA2 isoladas a partir dos venenos de *M.d.carinicauda* (Dal Belo *et al.*, 2005b) e *M. lemniscatus*. Francis *et al.* (1997) isolaram, mas não sequenciaram, uma PLA2 com atividade hemorrágica e hipotensora em *M. frontalis*. MFRONT 1, 2 e 3 não tiveram sua atividade biológica, bem como suas sequências completamente identificadas, devido a pequena quantidade de amostra purificada.

A escassez de veneno das serpentes do gênero *Micrurus*, bem como a reduzida quantidade de amostra purificada são os fatores limitantes para a realização de ensaios biológicos. A coleta de animais e conseqüentemente mais veneno para isolar as amostras seria necessária. No entanto, *M. frontalis* além de ser uma serpente difícil de ser encontrada, está prestes a entrar para a lista de animais vulneráveis de extinção (Jorge da Silva, 2007). A síntese química é uma alternativa inviável uma vez que as cadeias polipeptídicas aqui determinadas possuem mais de 50 resíduos de aminoácidos e são ricas em ligações dissulfeto. Uma possível solução para a elucidação da atividade biológica dos componentes seria a expressão heteróloga a partir de proteínas já seqüenciadas como as descritas no presente estudo. Assim, estes componentes poderiam ser utilizados também como ferramentas farmacológicas.

6. CONCLUSÕES

O presente estudo caracterizou estruturalmente alguns componentes isolados a partir da peçonha da serpente *Micrurus frontalis*. A união de técnicas como cromatografia líquida, espectrometria de massa e sequenciamento por degradação de Edman e *De novo*, possibilitou traçar o perfil polipeptídico da peçonha, o qual se mostrou rico em moléculas com massas moleculares entre 6 e 15 kDa.

Os componentes majoritários eluídos entre 30-35% em gradiente de acetonitrila são neurotoxinas da família de três-dígitos, que causam o bloqueio da transmissão neuromuscular, atuando provavelmente nos receptores nicotínicos de acetilcolina pós-sinápticos. Estas neurotoxinas foram nomeadas de Frontoxinas e correspondem as primeiras toxinas completamente sequenciadas a partir do veneno da serpente *M. frontalis*.

A peçonha de *M. frontalis* possui uma grande quantidade de isoformas com massa molecular entre 13-14 kDa. Os fragmentos com esta faixa de massa sequenciados mostraram alta similaridade com segmentos encontrados em fosfolipases do tipo A2, confirmando a presença desta classe de proteínas no veneno.

Uma nova família de proteínas pouco abundante nos venenos ofídicos, as waprinas, foi identificada no veneno de *M. frontalis*. A Miwaprina é a primeira waprina dos venenos das serpentes do gênero *Micrurus* completamente sequenciada.

O veneno da serpente coral *M. frontalis* possui uma riqueza polipeptídeos pouco conhecidos, provavelmente em virtude da dificuldade de coleta dos animais, da pequena quantidade de veneno obtida em cada extração e da laboriosa purificação e identificação dos componentes. O presente estudo contribui para o conhecimento de parte dos componentes deste veneno e abre perspectivas não só para a identificação dos demais componentes, como também do provável papel dos mesmos na captura de presas e nos envenenamentos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, V.A., LEITE, G.B., OLIVEIRA, C.B., HYSLOP, S., FURTADO, M.F.D., SIMIONI, L.R., 2008. Neurotoxicity of *Micrurus altirostris* (Uruguayan coral snake) venom and its neutralization by commercial coral snake antivenom and specific antiserum raised in rabbits. *Clinical Toxicology*. V.46, p.519-527.
- ACKERMANN, E.J. E TAYLOR, P., 1997. Non-identity of the α -neurotoxin binding sites on the nicotinic acetylcholine receptor revealed by modification in α -neurotoxin and receptor structures. *Biochemistry*. V.36, p.12836-12844.
- AFIFIYAN, F., ARMUGAM, A., GOPALAKRISHNAKONE, P., TAN, N.H., TAN, C.H., JEYASEELAN, K., 1998. Four new postsynaptic neurotoxins from *Naja naja sputatrix* venom: cDNA cloning, protein expression, and phylogenetic analysis. *Toxicon*. V. 36, p.1871-1885.
- AIRD, S.D., JORGE DA SILVA JR., N., 1991. Comparative enzymatic composition of Brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms. *Comp.Biochem.Physiol*. V. 99B, p.287-294.
- 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 nigrocinctus*. *FEBS Lett*. V.380, p.29-32.
- ANTIL, S., SERVENT, D., MENEZ, A., 1999. Variability among the sites by which curaremimetic toxins bind to torpedo acetylcholine receptor, as revealed by identification of the functional residues of alpha-cobratoin. *J.Biol.Chem*. V.274 (49), p.34851-34858.
- ANTIL-DELBEKE, S., GAILLARD, C., TAMIYA, T., CORRINGER, P.J., CHANGEUX, J.P., SERVENT, D., MÉNEZ, A., 2000. Molecular determinants by which a long chain toxin from snake venom interacts with the neuronal alpha 7-nicotinic acetylcholine receptor. *J.Biol.Chem*. V. 275 (38), p. 29549-29601.
- ARAKI, K., KUROKI, J., ITO, O., KUWADA, M., TACHIBANA, S., 1989. Novel peptide inhibitor (SPA1) of Na⁺K⁺-ATPase from porcine intestine. *Biochem.Biophys.Res.Commun*. V. 164, p. 496-502.
- ARNI, R.K., WARD, R.J., 1996. Phospholipase A2: A structural review. *Toxicon*. V. 34, p. 327-841.

- AROCAS, V., ZINGALI, R.B., GUILLIN, M.C., BON, C., JANDROT-PERRUS, M., 1996. Bothrojaracin: a potent two-site-directed thrombin inhibitor. *Biochemistry*. V. 35, p. 9083–9089.
- 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*. V. 87, p. 949-952.
- ATLAS, S.A., MAACK, T., 1992. Atrial natriuretic factor. In Handbook of physiology: renal physiology. Oxford Press, New York, p. 1577-1673.
- ATODA, H., HYUGA, M., MORITA, T., 1991 The primary structure of coagulation factor IX/factor X-binding protein isolated from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. Homology with asialoglycoprotein receptors, proteoglycan core protein, tetranectin, and lymphocyte Fc epsilon receptor for immunoglobulin. *Eur.J Biol Chem*. V. 266, p. 14903–14911.
- AZEVEDO_MARQUES, M.M., CUPO, P., HERING, S.E., 2003. Acidentes por animais peçonhentos: serpentes peçonhentas. *Medicina Ribeirão Preto*. V. 36, p. 480-489.
- 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*. V. 32, p. 445-452.
- BIRREL, G.W., EARL, S.T.H., WALLIS, T.P., MASCI, P.P., JERSEY, J., GORMAN, J.J., LAVIN, M.F., 2007. The diversity of bioactive proteins in Australian snake venom. *Mol.Cell.Proteom*. V. 6, p. 973-983.
- BOWMAN, W.C., 2006. Neuromuscular block. *Br.J.Pharmacol*. V. 147, p. 277-286.
- BUCARETCHI, F., HYSLOP, S., VIEIRA, R.J., TOLEDO, A.S., MADUREIRA, P.R., CAPITANI, E.M., 2006. Bites from coral snakes (*Micrurus spp.*) in Campinas, state of São Paulo, southeastern Brazil. *Rev.Inst.Med.Trop.São Paulo*. V. 48(3), p. 141-145.
- CAMPBELL, J.A., LAMAR, W.W., 2004. The Venomous Reptiles of Western Hemisphere: Coral snakes and sea snakes, Elapidae Family. Cornell University Press, Ithaca, NY.
- CECCHINI, A.L., MARCUSSI, S., SILVEIRA, L.B., BORJA-OLIVEIRA, C.R., RODRIGUES-SIMIONI, L., AMARA, 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.A Mol.Integr.Physiol*. V. 140, p. 125-134.

- CHANG, L., LIN, S., WANG, J., HU, W.P., WU, B., HUANG, H., 2000. Structure-function studies on Taiwan cobra long neurotoxin homolog. *Biochim.Biophys.Acta*. V. 1480, p. 293-301.
- CHANG, L., LIOU, J., LIN, S., HUANG, H., 2002. Purification and characterization of neurotoxin from the venom of *Ophiophagus hannah* (King cobra). *Biochem.Biophys.Res.Commun.* V. 294 (3), p. 574-578.
- CHANG, L., CHUNG, C., LIOU, J., CHANG, C., YANG, C., 2003. Novel neurotoxins from Taiwan banded krait (*Bungarus multicinctus*) venom: purification, characterization and gene organization. *Toxicon*. V. 42, p. 323-300.
- CHANGEUX, J.P., 1990. The nicotinic acetylcholine receptor: an allosteric protein prototype of ligand-gated ion channels. *Trends Pharmacol.Sci.* V. 11, p. 485-492.
- CHIAPPINELLI, V.A., WEAVER, W.A., MCLANE, K.E., CONTI-FINE, B.M., FIORDALISI, J.J., GRANT, G.A., 1996. Binding of native κ -neurotoxins and site-directed mutants to nicotinic acetylcholine receptors. *Toxicon*. V. 34, p. 1243-1256.
- CLEMETSON, K.J., NAVDAEV, A., DORMANN, D., DU, X.Y., CLEMETSON, J.M., 2001. Multifunctional snake C-type lectins affecting platelets. *Haemostasis*. V. 31, p. 148-154.
- CLEMETSON, K.J., MORITA, T., KINI, R.M., 2009. Scientific and standardization committee communications: classification and nomenclature of snake venom C-type lectins and related proteins. *J Thromb Haemost* V. 7(2), p.360.
- DAL BELO, C.A., TOYAMA, M.H., TOYAMA, D.O., MARANGONI, S., MORENO, F.B., CAVADA, B.S., FONTANA, M.D., HYSLOP, S., CARNIERO, E.M., BOSCHERO, A.C., 2005a. Determination of the amino acid sequence of a new phospholipase A₂ (MIDCA1) isolated from *Micrurus dumerilli carinicauda* venom. *Prot.J.* V. 24, p. 147-153.
- DAL BELO, C.A., LEITE, G.B., TOYAMA, M.H., MARANGONI, S., CORRADO, A.P., FONTANA, M.D., SOUTHAN, A., ROWAN, E.G., HYSLOP, S., RODRIGUES-SIMIONE, L., 2005b. Pharmacological and structural characterization of a novel phospholipase A₂ from *Micrurus dumerilli carinicauda* venom. *Toxicon*. V.46, p. 736-750.
- DALTRY, J.C., WÜSTER, W., THORPE, R.S., 1996. Diet and snake venom evolution. *Nature*. V. 379, p. 537-540.
- DI-BERNARDO, M., BORGES-MARTINS, M., JORGE DA SILVA, N., 2007. A new species of coralsnake (*Micrurus*:Elapidae) from southern Brazil. *Zootaxa*. V. 1447, p. 1-26.

- DOKMETJIAN, J.C., CANTO, S., VINZÓN, S., BONINO, M.B.J., 2009. Biochemical characterization of the *Micrurus pyrrhocryptus* venom. *Toxicon*. V. 53, p. 375-382.
- DOLEY, R., KINI, R.M., 2009. Protein and complexes in snake venom. *Cell.Mol.Life Sci*. V. 66, p. 2851-2871.
- DU, X. CLEMETSON, K.J., 2002. Snake venom L-amino acid oxidases. *Toxicon*. V. 40, p. 659-665.
- DUFTON, M.J. E HIDER, R.C., 1983. Conformational properties of the neurotoxins and cytotoxins isolated from elapid snake venoms. *CRC Crit.Rev.Biochem*. V. 14(2), p. 113-171.
- ENDO, T. E TAMIYA, N., 1987. Current view on the structure-function relationship of postsynaptic neurotoxins from snake venoms. *Pharmacol.Ther*. V. 34, p. 403-451.
- ENDO, T. E TAMIYA, N., 1991. Structure-function relationship of postsynaptic neurotoxins from snake venoms. In Snake Toxins. Pergamon Press, NY.
- FOX, J.W., SERRANO, S.M., 2005. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. *Toxicon*. V. 45, p. 969-985.
- FRANCART, C., DAUCHEZ, M., ALIX, A.J.P., LIPPENS, G., 1997. Solution structure of R-elafin, a specific inhibitor of elastase. *J.Mol.Biol*. V. 268, p. 666-677.
- 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*. V. 31, p. 447-458.
- FRANCIS, B.R., JORGE DA SILVA, N., SEEBART, C., CASAIS E SILVA, L.L., SCHMIDT, 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*. V. 35, p. 1193-1203.
- FRANCIS, B.R., JORGE DA SILVA, 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.
- FRANCO, F.L., 2003. Origem e diversidade das serpentes. In: Animais Peçonhentos no Brasil. Cardoso, J.L.C. *et al.*, São Paulo: Sarvier, 33-61.
- FRANKS, F., 1993. Solution properties of proteins. In Protein biotechnology, isolation, characterization and stabilization. Humana Press, Totowa, NJ, 133-189.

- FRY, B.G., WÜSTER, W., KINI, R.M., BRUSIC, V., KHAN, A., VENKATARAMAN, D., ROONEY, A.P., 2003a. Molecular evolution and phylogeny of elapid snake venom three-finger toxins. *J.Mol.Evol.* V. 57, p. 110-129.
- FRY, B.G., LUMSDEN, N.G., WUSTER, W., WICKRAMARATNA, J.C., HODGSON, W.C., KINI, R.M., 2003b. Isolation of a neurotoxin (α -colubritoxin) from a nonvenomous colubrid: Evidence for early origin of venom in snakes. *J.Mol.Evol.* V. 57, p. 446-452.
- FRY, B. G., WICKRAMARATANA, J. C., LEMME, S., BEUVE, A., GARBERS, D., HODGSON, W. C., AND ALEWOOD, P., 2005. Novel natriuretic peptides from the venom of the Inland Taipan (*Oxyuranus microlepidotus*): isolation, chemical and biological characterisation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 327, p. 1011–1015.
- GONG, N., ARMUGAN, A., JEYASEELAN, K., 1999. Postsynaptic short-chain neurotoxins from *Pseudonaja textilis*. *Eur.J.Biochem.* V. 265, p. 982-989.
- GONG, N., ARMUGAN, A., JEYASEELAN, K., 2000. Molecular cloning, characterization and evolution of the gene encoding a new group of short-chain α -neurotoxins in an Australian elapid *Pseudonaja textilis*. *Febs Letters.* V. 473, p. 303-310.
- GOULARTE, F.C., CRUZ-HÖFLING, M.A., COGO, J.C., GUTIÉRREZ, J.M., RODRIGUES-SIMIONI, L., 1995. The ability of specific antivenom and low temperature to inhibit the myotoxicity and the neuromuscular block induced by *Micrurus nigrocinctus* venom. *Toxicon.* V. 33, p. 679-689.
- GRANT, G.A., AL-RABIEE, R., XU, X.L., ZHANG, Y., 1997. Critical interactions at the dimer interface of kappa-bungarotoxin, a neuronal nicotinic acetylcholine receptor antagonist. *Biochemistry.* V. 33, p. 3353-3358.
- GREGOIRE, J. E ROCHAT, H., 1977. Amino acid sequences of neurotoxin I and III of the elapidae snake *Naja mossambica mossambica*. *Eur.J.Biochem.* V. 80, p. 283-293.
- GUTIÉRREZ, J.M., LOMONTE, B., PORTILLA, E., CERDAS, L., ROJAS, E., 1983. Local effects induced by coral snake venom: evidence of myonecrosis after experimental inoculations of venoms from five species. *Toxicon.* V. 26, p. 777-783.
- GUTIÉRREZ, J.M., ROJAS, G., JORGE DA SILVA JR., N., NUÑEZ, J., 1992. Experimental myonecrosis induced by the venoms of South American *Micrurus* (coral snakes). *Toxicon.* V. 30, p. 1299-1302.

- HARVEY, A.L. E RODGER, I.W., 1978. Reversibility of neuromuscular blockade produced by toxins isolated from the venom of the sea snake *Laticauda semifasciata*. *Toxicon*. V. 16, p. 219-255.
- HARVEY, A.L., HIDER, R.C., HODGES, S.J., JOUBERT, F.J., 1984. Structure-activity studies of homologues of short chain neurotoxins from Elapid snake venoms. *Br.J.Pharmacol*. V. 82, p. 709-716.
- HO, P.L., SOARES, M.B., MAACK, T., GIMENEZ, I., PUORTO, G., FURTADO, M.F.D., RAW, I., 1997. Cloning of na unusual natriuretic peptide from South American coral snake *Micrurus corallinus*. *Eur.J.Biochem*. V. 250, p. 144-149.
- HODGSON, W.C., WICKRAMARATNA, J.C., 2002. *In vitro* neuromuscular activity of snake venom. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol*. V. 29 (9), p. 807-814.
- HUNG, C.C., CHIOU, S.H., 2001. Fibrinogenolytic proteases isolated from the snake venom of *Taiwan habu*: serine proteases with kallikrein-like and angiotensin-degrading activities. *Biochem.Biophys.Res.Commun*. V. 281, p. 1012-1018.
- IWANAGA S, OHSHIMA G, SUZEK L. 1976. Proteinase from the venom of *Agkistrodon*. In Lorand L. *Methods in Enzimology*. NY Academic Press.
- JACKSON, K., 2003. The evolution of venom-delivery systems in snakes. *Zool.J.Linnean Soc.*, V. 137, p. 337-354.
- JORGE DA SILVA, N., GRIFFIN, P.R., AIRD, S.D., 1991. Comparative chromatography of Brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms. *Comp. Biochem. Physiol. B*. V. 100B, p. 117-126.
- JORGE DA SILVA, N., SITES, J.W., 1999. Revision of the *Micrurus frontalis* complex (Serpentes: Elapidae). *Herpetological Monographs*. V.13, p. 142-194.
- JORGE DA SILVA, N., AIRD, S.D., 2001. Prey specificity, comparative lethality and compositional differences of coral snake venoms. *Comp. Biochem. Physiol. C*. V. 128, p. 425-456.
- JORGE DA SILVA, N., BUCARETCHI, F. 2003. Mecanismo de ação do veneno elapídico e aspectos clínicos dos acidentes. In: *Animais Peçonhentos no Brasil*. Cardoso, J.L.C. *et al.*, São Paulo: Sarvier, 99-107.
- JORGE DA SILVA, N., 2007. Novas ocorrências de *Micrurus brasiliensis* Roze, 1967 (Serpentes:Elapidae) em áreas de tensão ambiental no centro-oeste brasileiro. *Estudos*. V. 34(11/12), p. 931-956.

- JOUBERT, F.J., TALJAARD, N., 1980. The amino acid sequences of two Melanoleuca-Type toxins. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* V. 360, p. 1075-1090.
- KARDONG, K.V., 1983. The evolution of the venom apparatus in snakes from colubrids to viperids and elapids. *Mem. Inst. Butantan.* V. 46, p. 105-118.
- KARDONG, K. V. 1998. *Vertebrates: comparative anatomy, function, evolution.* 2 ed. WCB/McGraw-Hill.
- KASHIMA, S., SOARES, A.M., ROBERTO, P.G., PEREIRA, J.O., ASTOLFI-FILHO, S., CINTRA, A.O., FONTES, M.R.M., GIGLIO, J.R., FRANÇA, S.C., 2002. cDNA sequence and molecular modeling of a nerve growth factor from *Bothrops jararacussu* venomous gland. *Biochemie.* V. 84, p. 675-680.
- KATTAH, L.R., FERRAZ, V., SANTORO, M.M., CAMARGOS, E.R.S., DINIZ, C.R., DE LIMA, M.E., 2002. Analysis of fatty acids released by crotoxin in rat brain synaptosomes. *Toxicon.* V. 40, p. 43-49.
- KATZ, B., THESLEFF, S., 1957. On the factors which determine the amplitude of the miniature end-plate potential. *J. Physiol.* V. 137, p. 267-278.
- KEOGH, J.S., 1998. Molecular phylogeny of elapid snakes and a consideration of their biogeographic history. *Biol. J. Linnean Soc.* V. 63, p. 177-203.
- KINI, R.M. 1997. *Venom phospholipases enzymes.* Chichester: John Willey & Sons, 269-282.
- KINI, R.M., 2002. Molecular moulds with multiple missions: functional sites in three-finger toxins. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* V. 29, p. 815-822.
- KINI, R.M., 2003. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzyme. *Toxicon.* V.42, p. 827-840.
- KINI, R.M., 2005. Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake venoms. *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* V. 34 (4-5), p. 200-204.
- KOSTIZA, T., MEIER, J., 1996. Nerve growth factors from snake venoms: chemical properties, mode of action and biological significance. *Toxicon.* V. 34, p. 787-806.
- LARSEN, M., RESSLER, S.J., LU, B., GERDES, M.J., MCBRIDE, L., DANG, T.D., ROWLEY, D.R., 1998. Molecular cloning and expression of ps20 growth inhibitor: a novel WAP-type "four-disulfide core" domain protein expressed in smooth muscle. *J. Biol. Chem.* V. 273, p. 4574-4584.

- 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*. V. 10, p.112-126.
- LEE, M.S.Y., 1997. The phylogeny of varanoid lizards and the affinities of snakes. *Phil.Trans.R.Soc.London*. V. 352, p. 53-91.
- LI, W.F., CHEN, L., LI, X.M., LIU, J., 2005. A C-type lectin-like protein from *Agkistrodon acutus* venom binds to both platelet glycoprotein Ib and coagulation factor IX/factor X. *Biochem.Biophys.Res.Commun*. V. 332, p. 904–912.
- 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 model. *Inflammation*. V.17, p. 93-105.
- LU, Q.M., WEI, Q., JIN, Y., WEI, J.F., WANG, W.Y., XIONG, Y.L., 2002. L-amino acid oxidase from *Trimeresurus jerdonii* snake venom: purification, characterization, platelet aggregation-inducing and antibacterial effects. *J.Nat.Toxins*. V. 11, p. 345–352.
- MAEDA, N. E TAMIYA, N., 1974. The primary structure of toxin *Laticauda semifasciata* III, a weak and reversibly acting neurotoxin from the venom of a sea snake *Laticauda semifasciata*. *Biochem.J*. V. 141, p. 389-400.
- MARCINKIEWICZ, C., 2005. Functional characterization of snake venom disintegrins: potential therapeutic implication. *Curr.Pharm. Des*. V. 11, p. 815–827.
- MARTIN, B.M., CHIBBER, B.A., MAELICKE, A., 1983. The sites of neurotoxicity in α -cobratoxin. *J.Biol.Chem*. V. 258(14), p. 8714-8722.
- MEBS, D., 1986. Myotoxic activity of phospholipase A2 isolated from cobras venoms: neutralization by polyvalent antivenoms. *Toxicon*. V. 24, p. 1001-1008.
- MELGAREJO, A.R., 2003. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: *Animais Peçonhentos no Brasil*. Cardoso, J.L.C. *et al.*, São Paulo: Sarvier, 33-61.
- MÉNEZ, A. 1998. Functional architectures of animal toxins: A clue to drug design? *Toxicon*. V. 36, p. 1557–1572.
- MONTECUCCO, C., ROSSETTO, O., 2000. How do presynaptic PLA2 neurotoxins block nerve terminals? *TIBS*. V. 25, p. 266-270.
- MORA, R., VALVERDE, B., DÍAZ, C., LOMONTE, B., GUTIÉRREZ, J.M., 2005. A Lys49 phospholipase A2 homologue from *Bothrops asper* snake venom induces

- proliferation, apoptosis and necrosis in a lymphoblastoid cell line. *Toxicon*. V. 45, p. 651-660.
- 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.
- MORDVINTSEV, D.Y., POLYAK, Y.L., KUZMIN, D.A., LEVTSOVA, O.V., TOURLEIGH, Y.V., UTKIN, Y.N., SHAITAN, K.V., TSETLIN, V.I., 2007a. Computer modeling of binding of diverse weak toxins to nicotinic acetylcholine receptors. *Comput.Biol.Chem.* V. 31, p. 72-81.
- MORDVINTSEV, D.Y., RODIONOV, MAKAROVA, M.V., KAMENSKY, A.A., LEVITSKAYA, N.G., OGAY, A.Y., RZHEVSKY, D.I., MURASHEV, A.N., TSETLIN, V.I., UTKIN, Y.N., 2007b. Behavioural effects in mice and intoxication symptomatology of weak neurotoxin from cobra *Naja kaouthia*. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. V. 100, p. 273-278.
- MORDVINTSEV, D.Y., POLYAK, Y.L., RODIONOV, D.I., JAKUBIK, J., DOLEZAL, V., KARLSSON, E., TSETLIN, V.I., UTKIN, Y.N., 2009. Weak toxin WTX from *Naja kaouthia* cobra venom interacts with both nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors. *FEBS J.* V. 276, p. 5065-5075.
- NAIR, D.G., FRY, B.G., ALEWOOD, P., KUMAR, P.P., KINI, R.M., 2007. Antimicrobial activity of omwaprin, a new member of waprins family of snake venom proteins. *Biochem.J.* V. 402, p. 93-104.
- NATHAN, I., DVILANSKY, A., YIRMIYAHU, T., AHARON, M., LIVNE, A., 1982. Impairment of platelet aggregation by *Echis colorata* venom mediated by L-amino acid oxidase or H₂O₂. *Tromb.Haemost.* V. 48(3), p. 277-282.
- NIRTHANAN, S., CHARPANTIER, E., GOPALAKRISHNAKONE, P., GWEE, M.C.E., KHOO, H.E., CHEAH, L.S., BERTRAND, D., KINI, R.M., 2002. Candoxin, a novel toxin from *Bungarus candidus*, is a reversible antagonist of muscle (alpha 7) nicotinic acetylcholine receptors but a poorly reversible antagonist of neuronal alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors. *J.Biol.Chem.* V. 277 (20), p. 17811-17820.
- NIRTHANAN S., GOPALAKRISHNAKONE, P., GWEE, M.C.E., KHOO, H.E., KINI, R.M., 2003a. Non-conventional toxins from *Elapid* venoms. *Toxicon*. V. 41, p. 397-407.
- NIRTHANAN, S., CHARPANTIER, E., GOPALAKRISHNAKONE, P., GWEE, M.C.E., KHOO, H.E., CHEAH, L.S., KINI, R.M., BERTRAND, D., 2003b. Neuromuscular effects of candoxin,

- a novel toxin from the venom of Malayan krait (*Bungarus candidus*). *Br. J. Pharmacol.* V. 139, p. 832-844.
- NIRTHANAN, S. E GWEE, M.C.E., 2004. Three-finger α -neurotoxins and nicotinic acetylcholine receptor, forty years on. *J.Pharmacol.Sci.* V. 94, p. 1-17.
- OGAY, A., RZHEVSKY, D.I., MURASHEV, A.N., TSETLIN, V.I., UTKIN, Y.N., 2005. Weak neurotoxin from *Naja kaouthia* cobra venom affects haemodynamic regulation by acting acetylcholine receptors. *Toxicon.* V. 45, p. 83-99.
- OGAWA, T., CHIJIWA, T., ODA-UEDA, N., OHNO, M., 2005. Molecular diversity and accelerated evolution of C-type lectin-like proteins from snake venom. *Toxicon.* V. 45, p. 1–14.
- 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, 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.*, V. 267(3), p. 887:891
- OLIVEIRA, U.C., ASSUI, A., SILVA, A.R.B.P., OLIVEIRA, J.S., HO, L.P., 2003. Cloning and characterization of a basic phospholipase A2 homologue from *Micrurus corallinus* (coral snake) venom gland. *Toxicon.* V. 42, p. 249-255.
- OLIVEIRA, F.A., SILVEIRA, P.E., LOPES, M.J., KUSHMERICK, C., NAVES, L.A., 2007. Angiotensin II increases evoked release at the frog neuromuscular junction through a receptor sensitive to A779. *Brain Research.* V.1175, p. 48-53.
- OLIVEIRA, D.A., HARASAWA, C., SEIBERT, C.S., CASAIS E SILVA, L.L., PIMENTA, D.C., LEBRUN, I., SANDOVAL., M.R.L., 2008. Phospholipase A2 isolated from *Micrurus lemniscatus* coral snake venom: Behavioral, electroencephalographic, and neuropathological aspects. *Brain Research Bulletin.* V. 75, p. 629-639.
- PARRISH, H.M., KHAN, M.S., 1967. Bites from coral snakes: report of 11 representative cases. *Amer.J.Med.Sci.* V. 253, p. 561-568.
- PATERSON, D., NORDBERG, A., 2000. Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Prog. Neurobiol.* V. 61, p. 75-111.

- PAWLAK, J., MACKESSY, S.P., FRY, B.G., BHATIA, M., MOURIER, G., FRUCHARD-GAILLARD, C., SERVENT, D., MÉNEZ, R., STURA, E., MÉNEZ, A., KINI, R.M., 2006. Denmotoxin, a three-finger toxin from the colubrid snake *Boiga dendrophila* (Mangrove catsnake) with bird-specific activity. *J.Biol.Chem.* V. 281 (39), p. 29030–29041.
- PILLET, L., TREMEAU, O., DUCANCEL, F., DREVET, P., ZINN-JUSTIN, S., PINKASFELD, S., BOULAIN, J.C., MÉNEZ, A., 1993. Genetic engineering of snake toxins. Role of invariant residues in the structural and functional properties of a curaremimetic toxin, as probed by site directed mutagenesis. *J.Biol.Chem.* V. 268 (2), p. 909–916.
- PRIETO DA SILVA, A.R.B., 2001. Clonagem, expressão e estudo de alguns cDNAs codificando proteínas estruturalmente relacionadas às alfa neurotoxinas da glândula de veneno da cobra coral *Micrurus corallinus* (Serpentes, Elapidae). Tese de doutorado. Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo.
- POH, S.L., MOURIER, G., THAI, R., ARMUGAM, A., MOLGÓ, J., SERVENT, D., JEYASEELAN, K., MÉNEZ, A., 2002. A synthetic weak neurotoxin binds with low affinity to *Torpedo* and chicken $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *Eur.J.Biochem.* V. 269, p. 4247-4256.
- PUNGERČAR, J., KRIŽAJ, I., 2007. Understanding the molecular mechanism underlying the presynaptic toxicity of secreted phospholipases A2. *Toxicon.* V. 50, p. 871-892.
- RENETSEDER, R., BRUNI, S., DIJKSTRA, B.W., DRENTH, J., SIGLER, P.B., 1985. A comparison of the crystal structure of phospholipase A2 from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom. *J.Biol.Chem.* V. 260, p.11627-11634.
- ROSENTHAL, J.A., LEVANDOSKI, M.N., CHANG, B., POTTS, J.F., SHI, Q.L., HAWROT, E., 1999. The functional role of positively charged amino acid residues in α -bungarotoxin revealed by site directed mutagenesis of a His-tagged recombinant protein. *Biochemistry.* V. 38, p. 7847-7855.
- ROSSETTO, O., MORBIATO, L., CACCIN, P., RIGONI, M., MONTECUCCO, C., 2006. Presynaptic enzymatic neurotoxins. *J.Neurochem.* V. 97, p. 1534-1545.
- ROSSO, J.P., VARGAS-ROSSO, O., GUTIÉRREZ, J.M., ROCHAT, H., BOUGIS, E.P., 1996. Characterization of alpha-neurotoxin and phospholipase A2 activities from *Micrurus* venoms. *Eur.J.Biochem.* V. 238, p. 231-239.

- ROZE, J.A., 1996. Coral snakes of the Americas. Biology, identification and venoms. Struik Publishing Co., Malabar, FL.
- RYDÉN, L., GABEL, D., EAKER, D., 1973. A model of three-dimensional structure of snake venom neurotoxins based on chemical evidence. *Int.J.Pept.Protein Res.* V. 5 (4), p. 261-273.
- SAEZ-BRIONES, P., KRAUSS, M., DREGER, M., HERMANN, A., TSETLIN V., HUCHO, F. 1999. How do acetylcholine receptor ligands reach their binding sites? *Eur. J. Biochem.* V. 265, p. 902-10.
- SAMEJIMA, Y., AOKI-TOMOMATSU, Y., YANAGISAWA, M., MEBS, D., 1997. Amino acid sequence of two neurotoxins from the venom of the Egyptian black snake (*Walterinnesia aegyptia*). *Toxicon.* V. 35, p. 151-157.
- SANCHEZ, E.F., FREITAS, T.V., FERREIRA-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.* V. 30, p. 95-103.
- SCHWEITZ, H., VIGNE, P., MOINIER, D., FRELIN, C., LAZDUNSKI, M., 1992. A new member of the natriuretic peptide family is present in the venom of the Green Mamba (*Dendroaspis angusticeps*). *J.Biol.Chem.* V. 267, p. 13928-13932.
- SERAFIM, F.G., REALI, M., CRUZ-HÖFLING, M.A., FONTANA, M.D., 2002. Action of *Micrurus dumerilli carinicauda* coral snake venom on the mammalian neuromuscular junction. *Toxicon.* V. 40, p. 167-174.
- SERVENT, D., WINCKLER-DIETRICH, V., HU, H,Y., KESSLER, P., DREVET, P., BERTRAND, D., MÉNEZ, A., 1997. Only snake curaremimetic toxins with fifth disulfide bond have high affinity for the neuronal α -7 nicotinic receptor. *J. Biol. Chem.* V. 272 (39), p. 24279–24286.
- SERVENT, D., ANTIL-DELBEKE, S., GAILLARD, C., CORRINGER, P., CHANGEUX, J.P., MÉNEZ, A., 2000. Molecular characterization of the specificity of interactions of various neurotoxins on two distinct nicotinic acetylcholine receptors. *Eur.J.Biochem.* V. 393, p. 197-204.
- SIMPSON, K.J., NICHOLAS, K.R., 2002. The comparative biology of whey proteins. *J.Mammary Gland Biol.Neioplasia.* V.7(3), p. 313-326.

- SINGH, G., GOURINATH, S., SHARMA, S., PARAMASIVAM, M., SRINIVASAN, A., SINGH, T.P., 2001. Sequence and crystal structure determination of basic phospholipase A2 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.
- SLOWINSKI, J.S., KNIGHT, A., ROONEY, A.P., 1997. Inferring species trees from gene trees: a phylogenetic analysis of the Elapidae (Serpentes) based on the amino acid sequences of venom proteins. *Mol. Phylogenet. Evol.* V. 10(1), p. 349-362.
- SOUZA, D.H., EUGENIO, L.M., FLETCHER, J.E., JIANG, M.S., GARRATT, R.C., OLIVA, G., SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S., 1999. Isolation and structural characterization of a cytotoxic L-amino acid oxidase from *Agkistrodon contortrix laticinctus* snake venom: preliminary crystallographic data. *Arch. Biochem. Biophys.* V. 368, p. 285–290
- STOCKER, K.F., 1990. Composition of snake venom. In: Medical use of snake venom proteins. Stocker, K.F., CRC Press, Florida. 33-57.
- ST PIERRE, L., FLIGHT, S., MASCI, P. P., HANCHARD, K. J., LEWIS, R. J., ALEWOOD, P. F., DE JERSEY, J., AND LAVIN, M. F., 2006. Cloning and characterization of natriuretic peptides from the venom glands of Australian elapids. *Biochimie (Paris)* V. 88. p. 1923–1931.
- ST PIERRE, L., FISCHER, H., ADAMS, D.J., SCHENNING, M., LAVIDIS, N., DE JERSEY, J., MASCI, P.P, LAVIN, M.F., 2007. Distinct activities of novel neurotoxins from Australian venomous snakes for nicotinic acetylcholine receptors. *Cell. Mol. Life Sci.* V. 64, p. 2829-2840.
- ST. PIERRE, L., EARL, S.T., FILIPPOVICH, I., SOROKINA, N., MASCI, P.P., DE JERSEY, J., LAVIN, M.F., 2008. Common evolution of waprin and kunitz-like toxin families in Australian venomous snakes. *Cell. Mol. Life Sci.* V. 65, p. 4039-4054.
- SUHR, S.M., KIM, D.S., 1996. Identification of the snake venom substance that induces apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 224, p. 134–139.
- TAN, N.H., PONNUDURAI, G., 1992. The biological properties of venoms of some American coral snakes (Genus *Micrurus*). *Comp. Biochem. Physiol. B.* V. 101, p. 471-474.
- TEDESCO, E., RIGONI, M., CACCIN, P., GRISHIN, E., ROSSETTO, O., MONTECUCCO, C., 2009. Calcium overload in nerve terminals of cultured neurons intoxicated by alpha-latrotoxin and snake PLA2 neurotoxins. *Toxicon.* V. 54, p. 138-144.

- TONISMAGI, K., SAMEL, M., TRUMMAL, K., RONNHOLM, G., SIIGUR, J., KALKKINEN, N., SIIGUR, E., 2006. L-amino acid oxidase from *Vipera lebetina* venom: isolation, characterization, effects on platelets and bacteria. *Toxicon*. V. 48, p. 227–237.
- TORRES, A.M., KINI, R.M., NIRTHANAN, S., KUCHEL, K.W., 2001. NMR structure of bucandin, a neurotoxin from the venom of the Malayan krait (*Bungarus candidus*). *Biochem.J.* V. 360, p. 539-548.
- TRÉMEAU, O., LEMAIRE, C., DREVET, P., PINKASFELD, S., DUCANCEL, F., BOULAIN, J.C., MENEZ, A., 1995. Genetic engineering of snake toxins. The functional site of Erabutoxin a, as delineated by site-directed mutagenesis, includes variant residues. *J.Biol.Chem.* V. 270 (16), p. 9362–9369.
- TSENOGLOU, D., PETSKO, G.A., HUDSON, R.A., 1978. Structure and function of snake venom curarimimetic neurotoxins. *Mol.Pharmacol.* V. 14, p. 710-716.
- TSETLIN V. 1999. Snake venom alpha-neurotoxins and other 'three-finger' proteins. *Eur. J.Biochem.* V. 264, p. 281–286.
- TSETLIN, V., HUCHO, F., 2004. Snake and snail toxins acting on nicotinic acetylcholine receptors: fundamental aspects and medical applications. *Febs Letters*. V. 557, p. 9-13.
- TU, X., HUANG, Q., LOU, X., TENG, M., NIU, L., 2002. Purification, N-terminal sequencing, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of atratoxin, a new short-chain α -neurotoxin from the venom of *Naja naja atra*. *Acta Cryst.* V. 58, p. 839-842.
- TYLER, M.I., SPENCE, I., BARNETT, D., HOWDEN, M.E.H., 1987. Pseudonajatoxin b: unusual amino acid sequence of a lethal neurotoxin from the venom of the Australian common brown snake, *Pseudonaja textilis*. *Eur.J.Biochem.* V. 166, p. 139-143.
- URDANETA, A.H., BOLAÑOS, F., GUTIÉRREZ, J.M., 2004. Feeding behavior and venom toxicity of coral snake *Micrurus nigrocinctus* (Serpentes:Elapidae) on its natural prey in captivity. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 138, 485-492.
- UTKIN, Y.N., KAUKHTINA, V.V., KRYUKOVA, V., CHIODINI, F., BERTRAND, D., METHFESSEL, C., TSETLIN, V.I., 2001a. "Weak Toxin" from *Naja kaouthia* is a nontoxic antagonist of $\alpha 7$ and muscle-type nicotinic acetylcholine receptors. *J.Biol.Chem.* V. 276 (19), p. 15810–15815.

- UTKIN, Y.N., KAUKHTINA, V.V., MASLENNIKOV, I.V., ELETISKY, A.V., STARKOV, V.G., WEISE, C., FRANKE, P., HUCHO, F., TSETLIN, V.I., 2001b. First tryptophan-containing weak neurotoxin from cobra venom. *Toxicon*. V.39, p. 921-927.
- VIEIRA SANTOS, M.M., SANT'ANA, C.D., GIGLIO, J.R., DA SILVA, R.J., SAMPAIO, S.V., SOARES, A.M., FECCHIO, D., 2008. Antitumoral effect of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. *Basic Clin.Pharmacol.Toxicol*. V. 102, p. 533–542.
- VITAL BRAZIL, O., 1965. Ação neuromuscular da peçonha de *Micrurus*. *O Hospital*. V. 68, p. 183-224.
- VITAL-BRAZIL, O., FONTANA, M.D., 1983/1984. Ações pré-juncionais e pós-juncionais da peçonha da cobra coral *Micrurus corallinus* na junção neuromuscular. *Mem.Inst.Butantan*, V. 47/48, p. 13-26.
- VITAL-BRAZIL, O., 1987. Coral snake venoms: mode of action and pathophysiology of experimental envenomation. *Rev.Inst.Med.Trop.São Paulo*. V. 29 (3), p. 119-126.
- VITAL BRAZIL, O., 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* V. 38 (1), p. 61-67.
- YANG, C.C., YANG, H.G., HUANG, J.S., 1969. The amino acid sequence of Cobrotoxin. *Biochim.Biophys.Acta*. V. 188, p. 65-77.
- YANG, C. C., 1994. Structure-function relationship of phospholipase A2 from snake venoms. *J.Toxicol*. V. 13, p. 125-77.
- YEE, J.S.P., NANLING, G., AFIFIYAN, F., DONGHUI, M., LAY, P.S., ARMUGAN, A., JEYASEELAN, K., 2004. Snake postsynaptic neurotoxins: gene structure, phylogeny and applications in research and therapy. *Biochimie* V. 86, p. 137-149.

8. ANEXO

Artigo aceito pela revista **Toxicon**

Ms. Ref. No.: TOXCON-D-09-00541R1

Title: Frontoxins, three-finger toxins from *Micrurus frontalis* venom, decrease miniature endplate potential amplitude at frog neuromuscular junction

Toxicon

Dear Carlos,

I am pleased to confirm that your paper "Frontoxins, three-finger toxins from *Micrurus frontalis* venom, decrease miniature endplate potential amplitude at frog neuromuscular junction" has been accepted for publication in *Toxicon*.

Comments from the Editor and Reviewers can be found below.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards,

Alan Harvey
Editor in Chief
Toxicon

Comments from the Editors and Reviewers:

Dear Dr Bloch

MS 09-541

I am pleased to tell you that your paper has been accepted for publication in *Toxicon*. It has been sent to the publishers and you will receive proofs in due course.

Yours sincerely

Alan Harvey

**Frontoxins, three-finger toxins from *Micrurus frontalis* venom,
decrease miniature endplate potential amplitude at frog neuromuscular
junction**

MOREIRA, K.G.^{1,2}, PRATES, M.V.², ANDRADE, F.A.C.³, SILVA, L.P.²,
BEIRÃO, P.S.L.⁴, KUSHMERICK, C.³, NAVES, L.A.³, BLOCH Jr., C.²,

¹ *Universidade de Brasília – Pós-graduação em Biologia Animal, Brasília-DF, Brazil;* ²
EMBRAPA - Recursos Genéticos e Biotecnologia – Laboratório de Espectrometria de Massa,
Brasília-DF, Brazil; ³*Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Fisiologia e*
Biofísica, Belo Horizonte, MG, Brazil; ⁴*Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento*
de Bioquímica e Imunologia Belo Horizonte, MG, Brazil

ABSTRACT

Neurotoxicity is a major symptom of envenomation caused by Brazilian coral snake *Micrurus frontalis*. Due the small amount of material that can be collected, no neurotoxin has been fully sequenced from this venom. In this work we report six new three-finger like toxins isolated from the venom of the coral snake *M. frontalis* which we named Frontoxin (FTx) I-VI. Toxins were purified using multiple steps of RP-HPLC. Molecular masses were determined by MALDI-TOF and ESI ion-trap mass spectrometry. The complete amino acid sequence of FTx II, III, IV and V were determined by sequencing of overlapping proteolytic fragments by Edman degradation and by *de novo* sequencing. The amino acid sequences of FTx I, II, III and VI predict 4 conserved disulphide bonds and structural similarity to previously reported short-chain α -neurotoxins. FTx IV and V each contained 10 conserved cysteines and share high similarity with long-chain α -neurotoxins. At the frog neuromuscular junction FTx II, III and IV reduced miniature endplate potential amplitudes in a time-and concentration-dependent manner suggesting Frontoxins block nicotinic acetylcholine receptors.

Keywords: *Micrurus frontalis*, neurotoxin, three-finger toxins, nicotinic acetylcholine receptor

Corresponding Author:
Carlos Bloch Jr
Telephone: 55 61 3448 4636
Fax: 55 61 3340 3624

1. Introduction

Snake venoms are a mixture of pharmacologically active proteins and polypeptides fundamentally important for the capture and digestion of prey, and for defense against predators (Hodgson and Wickramaratna, 2002). Elapid snake venoms are rich in three-finger scaffold neurotoxins. This toxin family adopts a flat, leaf-like shape formed by three adjacent loops that emerge from a small globular core, which is the location of four conserved disulphide bonds (Menez, 1998; Tsetlin, 1999). Three-finger toxins bind with high affinity and selectivity to nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) affecting cholinergic synaptic transmission (Antil-Delbeke et al., 2000; Nirthanan et al., 2002). Neurophysiological alterations similar to those induced by α -neurotoxins are observed in coral snakes venoms (genera *Micrurus*, *Leptomicrurus* and *Micruroides*) (Serafim et al., 2002).

The *Micrurus* genus is the major representative elapid in the Americas, with more than 70 species distributed in southwestern United States, Central and South America (Roze 1996; Campbell & Lamar 2004). These elapids are relatively small, non aggressive animals with aposematic coloration, that generally live underground. *Micrurus* venoms have been little studied because these animals are difficult to capture and to keep in captivity, have restricted and specialized diets, and produce limited amount of venom.

Reports of snake bite by *Micrurus* are rare, but can be quite severe depending on the amount of venom injected and the age of victims. In severe cases, *Micrurus* bites can result in death due to respiratory arrest (Vital Brazil et al., 1987), probably as a result of a progressive blockade at neuromuscular endplate. Experimental studies suggest that *Micrurus* venoms cause neurophysiologic changes, cardiotoxic, haemolytic and myotoxic effects (Aird and Jorge da Silva, 1991; Gutiérrez et al., 1992; Francis et al., 1997; Cecchini et al., 2005).

Micrurus venom toxins block neuromuscular transmission and may be classified according to their mechanism of action. *M. corallinus* for example was classified as having both presynaptic and postsynaptic actions, because it causes reduction in the response to exogenously applied acetylcholine (post-synaptic action, presumably on muscle isoforms of the nicotinic receptors) as well as an increase of spontaneous release (a presynaptic action, possibly mediated by alpha-7 containing nicotinic receptors). On the other hand, *M. frontalis* and *M. lemniscatus* demonstrated only

postsynaptic activity (Vital Brazil, 1983). To date, individual toxins from *M. frontalis* venom have not been studied separately.

Although coral snakes have been studied as sources of neurotoxins, only a few complete toxin sequence data have been gathered from *M. corallinus* (Oliveira et al., 2000; Leão et al., 2009), *M. nigrocinctus* (Rosso et al., 1996), *M. surinamensis* (Olamendi-Portugal et al., 2008) and *M. pyrrhocryptus* (Dokmetjian et al., 2009) venoms. Presently there are few studies with neurotoxins from Brazilian coral snake venoms. Three-finger neurotoxins from *M. corallinus* were recently identified by transcriptomic analysis, based on close similarities of the amino acid sequences deduced from complementary DNA cloning (Leão et al., 2009). N-terminal amino acid sequence of a postsynaptic action toxin from *M. frontalis* was partially sequenced by peptide purification (Francis et al., 1997). In this study we describe the isolation, molecular mass determination, complete and partial amino acid sequencing of short and long -chain three-finger toxins isolated from *M. frontalis* (Brazilian coral snake) venom and tested their ability to block miniature endplate potentials at the neuromuscular junction.

2. Material and Methods

2.1. Venom

The venom of *Micrurus frontalis* was obtained by manual gland compression using glass micropipettes, lyophilized and stored at -80 °C. The pool of *M. frontalis* venom was extracted from adult specimens (n=5), which were kindly donated by Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas at Universidade Católica de Goiás, (Brazil).

2.2. Purification

Aliquots from the pool of crude venom were initially fractionated by semi-preparative reverse phase chromatography using a C₄ column (204TP510 Grace Vydac, USA) on a Class VP chromatographer from Shimadzu Co. (Japan). All fractions eluted during the 120 minutes linear acetonitrile gradient (0.1% TFA to 95% acetonitrile containing 0.1% TFA) with 2.5 mL/min flow rate were submitted to further purification steps on analytical columns and Ultra Fast Liquid Chromatography on an UFLC Prominence system using Shim-pack XR-ODS (Shimadzu Co., Japan) from Shimadzu Co (Japan). The HPLC fractions containing neurotoxins were purified up to mass

spectrometry grade using a C₁₈ (218TP54 Grace Vydac, USA) and/or Source 5RPC (150 x 4.6 mm, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden) columns with optimized gradients of acetonitrile over 60 minutes for each molecule. All experiments were monitored at 216 and 280nm and each fraction was collected manually, frozen in liquid nitrogen, lyophilized and stored at -20 °C.

2.3. Purity, Molecular Masses and Cysteine Content Determinations

The purity and accurate molecular mass determination of each purified molecule were determined by ESI HCT-Ultra ETD II (Bruker Daltonics, Billerica, USA), MALDI Synapt HDMS (Waters Co. Manchester, UK) and on an UltraFlex III (Bruker Daltonics, Billerica, USA) according to the best possible signal/noise relation for each individual molecule.

Under electrospray ionization, the samples were reconstituted with 100-300 µL of solvent (50 % acetonitrile containing 0.1 % formic acid). The MS scans were performed in the range of m/z 300-3000 Da. For MALDI-TOF/MS experiments, the selected fractions were dissolved in Milli-Q water, mixed with a saturated matrix solution of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (1:3), spotted onto a MALDI-TOF plate and dried at room temperature. The MS spectra were generated in linear and reflector modes with external standard calibrations provided by Bruker Daltonics.

2.4. Toxins Reduction and Alkylation

Disulphide bonds reductions and S-alkylation of each native polypeptide were achieved by incubation with 50-fold DTT (dithiothreitol, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) excess in 100 mM ammonium bicarbonate solution pH 8.0 buffer, for 1 h at 70 °C followed by the addition of 50 mM iodoacetamide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) at 37 °C during 1h, in the dark. The reduced and alkylated polypeptides were purified by RP-HPLC using an analytical C₁₈ column (218TP54 Grace Vydac, USA) eluted with linear gradient (5-95% ACN). ESI-IonTrap/MS, ESI-Q-TOF/MS and MALDI-TOF/MS experiments were performed to determine average and accurate monoisotopic molecular masses of the reduced and S-alkylated samples.

2.5. Enzymatic cleavages

Five different proteolytic enzymes (sequencing-grade proteases Asp-N, chymotrypsin, endopeptidase Glu-C, endopeptidase Lys-C and trypsin) were used to obtain suitable peptide sequence overlaps for unambiguous complete primary structure determination of each one of the *M. frontalis* neurotoxins.

Asp-N (Roche Applied Science, Germany) - The reduced and alkylated sample was dissolved in 50 mM sodium phosphate pH 8.0 and digested at an enzyme to substrate concentration of 1:100 (w/w) for 2h at 37°C.

Chymotrypsin (Roche Applied Science, Germany) - This enzymatic hydrolysis was performed dissolving each sample in 100 mM Tris-HCl, pH 7.8. Ten microliters of the enzyme were added and incubated with intermittent agitation overnight at 37 °C.

Glu-C (Roche Applied Science, Germany) – The samples were dissolved in 0.1 M ammonium bicarbonate pH 8.0 at a concentration of 10 mg/mL and added 2% (w/w) enzyme to substrate. The enzymatic reaction was incubated at 37 °C for 24 h.

Lys-C (Roche Applied Science, Germany) – In the treatment with endoprotease Lys-C the samples were dissolved in 0.1 M ammonium bicarbonate pH 8.0, to which 20 µL of enzyme were added and incubated with agitation for 24 h at 37 °C.

Trypsin (Pierce Chemical, USA) - The immobilized TPCK Trypsin was prepared for use by washing successively with 10mM ammonium bicarbonate solution. Samples were dissolved in 0.1 M ammonium bicarbonate pH 8.0 and the enzyme solution was added to a final concentration of 2% (w/w). The reaction was incubated for 2 h at 37 °C with intermittent agitation.

In all enzymatic treated toxins the resulting peptides were separated by RP-HPLC on a Vydac 218TP54 C₁₈ analytical column using a linear gradient (5-95% ACN) and their grades of purity, molecular masses and parent ion fragmentations were obtained by a number of specific mass spectrometry experiments.

N-terminal amino acid sequencing of the intact and the S-alkylated neurotoxins were performed by the automatic Edman Degradation in a PPSQ-23 Sequencer (Shimadzu Co. Japan). Sequence similarity searches and alignments were performed using the MPsrch (<http://www.ebi.ac.uk/MPsrch/>) and Clustal W multiple alignment tool available on Bioedit v. 7.0.4.1 software.

2.6. Electrophysiological Assay

All experiments were carried out using protocols approved by the institutional animal care and use committee of Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA - UFMG). The experiments were performed at room temperature using cutaneous pectoralis muscle from *Rana catesbeiana*. The animals were sacrificed by decapitation and the muscle was pinned onto a bed of Sylgard (Dow Corning, USA) in a 4 mL chamber containing Ringer solution with the following composition (in mM): NaCl 115; KCl 2.5; CaCl₂ 1.8; and N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid] (HEPES) 5, pH 7.4. Miniature end-plate potentials (MEPPs) were recorded by intracellular impalement of the end plate region of muscle fibers with 5–15 M Ω microelectrodes filled with 3 M KCl. Details of our methods are described in Oliveira et al (2007). The toxins were added directly to the bath. For recovery conditions, the preparation was washed with toxin free Ringer solution (5 mL/min) for at least 30 minutes. Quantal size was measured and corrected to a standard membrane potential of -90 mV using the method of Katz and Thesleff (1957). We measured MEPP amplitude as the mean of 100 MEPPS in control conditions and at least 30 MEPPS at the various times studied after toxin application. To evaluate the statistical significance of changes in MEPP size and frequency, each neuromuscular junction served as its own control. For each experiment, we calculated the mean and 95% confidence limits for these ratios based on Student's distribution. When the range defined by mean \pm 95% confidence limit did not contain the value 1.0, we considered the effect statistically significant.

3. Results and Discussion

3.1 Isolation and Purification of *M. frontalis* venom components

Fractionation of *M. frontalis* venom by RP-HPLC on a semipreparative C₄ and an analytical C₂C₁₈ column yielded more than 30 different components (Fig. 1). The major neurotoxin-rich fractions could be separated at the early stages of the acetonitrile gradient as four intense UV absorbance peaks revealing a number of polypeptides with molecular masses ranging from 6 to 8 kDa. The five most abundant toxins eluted between 30-35% acetonitrile were submitted to further purification steps and later named Frontoxins (FTx). Fraction 7 from analytical C₂C₁₈ chromatography (Fig. 1B) was also rechromatographed although it was not an intense UV absorbance fraction.

Less abundant fractions FTx together with PLA2-like proteins, L-amino acid oxidase and whey acid protein (WAP) broadly identified and characterized during this work do not belong to the objectives of the present manuscript but they will be reported elsewhere. Nevertheless, it is of great importance to point out that each semi-preparative fraction of *M. frontalis* venom was highly populated with a consistent number of distinct isoforms of the major polypeptides purified which imposed a skillful and laborious effort in the optimization of the protein separation techniques available not only to reach the levels of purity required but also to obtain a suitable amount of material required for every FTx isolated.

The polypeptide content of fraction 6 (Fig.1A) was submitted to two chromatographic steps. The first step was performed using a C₁₈ analytical RP-HPLC and the resulting fractions were subsequently applied to a high performance Shim-Pack XR-ODS column on an Ultra Fast Liquid Chromatography (UFLC) with a flow rate of 0.4 mL/min at 50 °C. Frontoxin I (FTx I) and Frontoxin II (FTx II) showing molecular mass values of [M+H]⁺ = 6642.8 and 6548.9 Da respectively (Fig. 2A1 and A2) were isolated as major components among at least four other less abundant isoforms. Similar purification strategies were used with fractions 5, 10 (Fig.1A) and 7 (Fig.1B) yielding Frontoxin III (FTx III), Frontoxin IV (FTx IV) and Frontoxin VI (FTx VI) (Fig. 2B, C and E) with corresponding molecular mass values of [M+H]⁺ = 7032.8, 7411.3 and 7327.4 Da. An additional step of purification, using a Source 5RTP column, was performed to isolate fraction 10, which resulted on Frontoxin V (FTx V), showing a molecular mass of [M+H]⁺ = 7166.1 Da. Mass spectrometry data of all native Frontoxins are shown in Fig. S1(Supplementary Material).

3.2. Frontoxins Primary Structure Determinations

The half-cystine content of the isolated Frontoxins was evaluated after reduction and S-alkylation. The number of S-alkylated cysteine residues was obtained by comparisons of the molecular mass values of the iodoacetamide treated DTT reduced neurotoxins and their respective native mass forms, divided by the mass increased by alkylation of one thiol group (57.1 Da). The obtained mass value differences indicated the presence of eight half-cystine residues in FTx I, II, III and VI and ten in FTx IV and V (Table 1). Mass spectrometry data of S-alkylated FTx are shown in Fig.S2 (Supplementary Material).

Native and S-alkylated Frontoxins (I-VI) were submitted to N-terminal sequencing by automatic Edman Degradation. Five different proteases (Asp-N, chymotrypsin, Glu-C, Lys-C and trypsin) were used to confirm the complete primary structure of five neurotoxins isolated from *M. frontalis* and the first twenty nine N-terminal residues of FTx VI (Fig. 3). After proteolysis of each Frontoxin, the resulting peptides were separated by RP-HPLC, mass analyzed and sequenced by CID fragmentation experiments and Edman Degradation (Table 2). The results were compared with other protein sequences at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database using the MProch (<http://www.ebi.ac.uk/MProch/>) and BLAST (Fig. 4). Sequence alignments based on the conserved cysteine residues for all Frontoxins and neurotoxins from available *Micrurus* species (Fig. 3) revealed that these proteins belong to the alpha-neurotoxins, non-enzymatic polypeptides rich in disulphide bonds (4 or 5) with similar pattern of protein folding with three-stranded loops extending from a central core containing four conserved disulphide bonds (Menez, A. 1998; Tsetlin, V. 1999). Frontoxins I, II and III belong to the short-chain neurotoxin family (Fig. 4A). Correspondingly, Frontoxins IV and V have high similarity scores with the long-chain neurotoxins (Fig. 4B). Long-chain toxins have five disulphide bonds, which bind to both muscle type and neuronal $\alpha 7$ nicotinic receptor. Generally the additional disulphide bond is located in loop II and it appears to be essential for the acetylcholine receptors binding (Servent et al., 1997). By similarity it is feasible to propose that FTx IV and FTx V might possess a fifth disulfide bond located in the loop I (Cys-6 – Cys-11). Proteins with this structural characteristic are classified as weak toxins or long neurotoxin homologs (Utkin et al., 2001a, b) which are capable of interacting with muscle and neural nicotinic acetylcholine receptors like long-chain neurotoxins with varying degree of affinity (Ogay et al., 2005). Only Trp-29 was conserved in *M. frontalis* long-chain toxins reinforcing the point that each type of toxin utilizes specific residues for receptor recognition. A conserved residue, therefore, even if it is functionally important in one toxin member, may not necessarily be critical in all members of the toxin family (Antil, et al., 1999).

The first 35 amino acid residues of FTx I were 100% identical with the partial amino acid sequence of the short-chain neurotoxin of *M. frontalis* published by Francis et al. (1997), suggesting that the two results may refer to the same polypeptide. Due to insufficient amounts of protein in the studied venom, Frontoxin VI was partially N-terminal sequenced (Fig. 3) and disulphide content determination indicated the presence of 8 half-cystines in the sequence (Table 1). These results strongly suggest

that FTx VI could be considered the fourth short-chain neurotoxin present in the *Micrurus frontalis* venom.

The protein sequence data reported in this paper will appear in the UniProt Knowledgebase under the accession number(s) P86420, P86421, P86422, P86423, P86424 and P86425.

3.3. Inhibition of miniature endplate potentials

FTxs showed high sequence similarity to α -neurotoxins, which block the nAChRs. We therefore tested their effect on miniature endplate potential. Our results show that after 45 min application, 1 μ M FTx II, III and IV decreased MEPP amplitudes by approximately 50% (Figs. 5 and 6). In addition, there was a reduction of approximately $48 \pm 29\%$ (mean in $\pm 95\%$ confidence limits) in MEPP frequency for the three toxins tested. The effect on the frequency was probably due to disappearance of the smaller MEPPs into the baseline noise. The same concentration of d-tubocurarine inhibited MEPP amplitude by $55 \pm 25\%$ (Fig.5 and 6), and reduced MEPP frequency by $78 \pm 35\%$. At 2 μ M, the short-chain neurotoxins FTx II and III completely abolished MEPPs whereas at this dose FTx IV inhibited MEPPs by only $61 \pm 40\%$ (mean $\pm 95\%$ confidence limits) (Fig. 6). MEPP amplitudes did not recover even after extensive washing (>20 min) with toxin-free Ringer solution (data not shown).

Although the short-chain toxins FTx II and FTx III exhibit similar potency on frog muscle preparation (Fig. 6) they possess very different primary structures, having in common just the conservative Cys residues. Although FTx III contains some of the amino acid residues postulated to be important on nAChR binding, FTx II does not. Clearly, our knowledge of the structural requirements for nicotinic receptor blockade is incomplete.

FTx IV belongs to the superfamily of three-fingered toxins with five disulphide bonds located in the first loop, that can bind to muscle ($\alpha 1$) and to neuronal ($\alpha 7$) nAChRs. These toxins, also called weak toxins, typically have lower toxicity than α -neurotoxins and are at least partially reversible (Kini, 2002). However, weak toxins do not appear to be functionally homogeneous class of toxins since both reversible and irreversible inhibition of muscle and neural AChRs has been reported (Servent et al., 2000). It has been postulated that the absence of Asp-31 may be associated with easy reversibility of neuromuscular blockade (Nirthanan, et al., 2003). Our data corroborate

this hypothesis because FTx IV assayed in this study contains an Asp-31 in primary structure and irreversibly inhibited MEPP amplitudes and frequency.

The great variability observed in the primary sequence of neurotoxins within a single species has been attributed to the diversity, availability and susceptibility of prey (Daltry et al., 1996). In Australian elapids may have arisen as response to the variation in AChR targets presented by a wide range of target prey organisms including mammals, amphibians and other reptiles (St Pierre et al., 2007). Coral snakes often have restricted and specialized diets, feeding almost exclusively on other small snakes and/or amphisbaenians. Previous studies of coral snake venoms have suggested a strong predator-prey selective regime as an important determinant of venom composition (Jorge da Silva and Aird, 2001). However, *M. frontalis* venom shows high diversity of three-finger toxins as observed in *M. surinamensis* proteome (Olamendi-Portugal et al., 2008), *M. corallinus* venom gland transcriptome (Leão et al., 2009) and *M. pyrrhocryptus*. (Dokmetjian et al., 2009).

4. Conclusion

This study reports the isolation and characterization of Frontoxins, the first three-finger neurotoxins full primary sequences identified from Brazilian coral snake *Micrurus frontalis* venom. Frontoxins I, II, III and VI are short chain toxins with 4 disulphide bonds while FTx IV and V displayed long-chain neurotoxin. Both produces neuromuscular blockage by interaction with postsynaptic nicotinic acetylcholine receptors, probably playing a role in the immobilization of prey. Due the insufficient amount of purified FTx I, V and VI, these toxins were not submitted to the biological assay.

Acknowledgments

The authors wish to express their gratitude to Dr Richard H. Valente for invaluable technical assistance. We also are grateful to the University of Brasília, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, UFMG, CAPES and Marta Regina Magalhães from Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas – PUC GO.

Conflict of Interest

The authors do not recognize any conflict of interest regarding any information and/or data presented in this work.

References

- Aird, S.D., Jorge da Silva Jr., N., 1991. Comparative enzymatic composition of Brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms. *Comp.Biochem.Physiol.* 99B, 287-294.
- Antil, S., Servent, D., Menez, A., 1999. Variability among the sites by which curaremimetic toxins bind to torpedo acetylcholine receptor, as revealed by identification of the functional residues of alpha-cobratoxin. *J. Biol. Chem.* 274 (49), 34851-34858.
- Antil-Delbeke, S., Gaillard, C., Tamiya, T., Corringer, P.J., Changeux, J.P., Servent, D., Ménez, A., 2000. Molecular determinants by which a long chain toxin from snake venom interacts with the neuronal alpha 7-nicotinic acetylcholine receptor. *J.Biol.Chem.* 275 (38), 29549-29601.
- Campbell, J.A., Lamar. W.W., 2004. The Venomous Reptiles of Western Hemisphere: Coral snakes and sea snakes, Elapidae Family. Cornell University Press, Ithaca, NY.
- Cecchini, A.L., Marcussi, S., Silveira, L.B., Borja-Oliveira, C.R., Rodrigues-Simioni, L., Amara, 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.A Mol.Integr.Physiol.* 140, 125-134.
- Daltry, J.C., Wüster, W., Thorpe, R.S., 1996. Diet and snake venom evolution. *Nature* 379, 537-540.
- Dokmetjian, J.C., Canto, S., Vinzón, S., Bonino, M.B.J., 2009. Biochemical characterization of the *Micrurus pyrrhocryptus* venom. *Toxicon* 53, 375-382.
- Francis, B.R., Jorge da Silva, N., Seebart, C., Casais e Silva, L.L., Schmidt, 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.
- Gutiérrez, J.M., Rojas, G., Jorge da Silva Jr., N., Nuñez, J., 1992. Experimental myonecrosis induced by the venoms of South American *Micrurus* (coral snakes). *Toxicon* 30, 1299-1302.
- Hodgson, W.C., Wickramaratna, J.C., 2002. *In vitro* neuromuscular activity of snake venom. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.* 29 (9), 807-814.
- Jorge da Silva, N., Aird, S.D., 2001. Prey specificity, comparative lethality and compositional differences of coral snake venoms. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 128, 425-456.

- Katz, B., Thesleff, S., 1957. On the factors which determine the amplitude of the miniature end-plate potential. *J. Physiol.* 137, 267-278.
- Kini, R.M., 2002. Molecular moulds with multiple missions: functional sites in three-finger toxins. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.* 29, 815-822.
- 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.
- Menezes, A. 1998. Functional architectures of animal toxins: A clue to drug design? *Toxicon*; 36, 1557–1572.
- Nirthanan, S., Charpantier, E., Gopalakrishnakone, P., Gwee, M.C.E., Khoo, H.E., Cheah, L.S., Bertrand, D., Kini, R.M., 2002. Candoxin, a novel toxin from *Bungarus candidus*, is a reversible antagonist of muscle (alpha-bungarotoxin) but a poorly reversible antagonist of neuronal alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors. *J.Biol.Chem.* 277 (20) 17811-17820.
- Nirthanan, S., Charpantier, E., Gopalakrishnakone, P., Gwee, M.C.E., Khoo, H.E., Cheah, L.S., Kini, R.M., Bertrand, D., 2003. Neuromuscular effects of candoxin, a novel toxin from the venom of Malayan krait (*Bungarus candidus*). *Br. J. Pharmacol.* 139, 832-844.
- Ogay, A., Rzhnevsky, D.I., Murashev, A.N., Tsetlin, V.I., Utkin, Y.N., 2005. Weak neurotoxin from *Naja kaouthia* cobra venom affects haemodynamic regulation by acting acetylcholine receptors. *Toxicon* 45, 83-99.
- 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
- Oliveira, F.A., Silveira, P.E., Lopes, M.J., Kushmerick, C., Naves, L.A., 2007. Angiotensin II increases evoked release at the frog neuromuscular junction through a receptor sensitive to A779. *Brain Research* 1175, 48-53.
- 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* 8, 1919-1932.
- Rosso, J.P., Vargas-Rosso, O., Gutiérrez, J.M., Rochat, H., Bougis, E.P., 1996. Characterization of alpha-neurotoxin and phospholipase A2 activities from *Micrurus* venoms. *Eur. J. Biochem.* 238, 231-239.
- Roze, J.A., 1996. Coral snakes of the Americas. Biology, identification and venoms. Struik Publishing Co., Malabar, FL.
- Serafim, F.G., Reali, M., Cruz-Höfling, M.A., Fontana, M.D., 2002. Action of *Micrurus dumerilli carinicauda* coral snake venom on the mammalian neuromuscular junction. *Toxicon* 40, 167-174.

- Servent, D., Winckler-Dietrich, V., Hu, H.Y., Kessler, P., Drevet, P., Bertrand, D., Ménez, A., 1997. Only snake curaremimetic toxins with fifth disulfide bond have high affinity for the neuronal $\alpha 7$ nicotinic receptor. *J. Biol. Chem.* 272 (39), 24279–24286.
- Servent, D., Antil-Delbeke, S., Gaillard, C., Corringer, P., Changeux, J.P., Ménez, A., 2000. Molecular characterization of the specificity of interactions of various neurotoxins on two distinct nicotinic acetylcholine receptors. *Eur. J. Biochem.* 393, 197-204.
- St Pierre, L., Fischer, H., Adams, D.J., Schenning, M., Lavidis, N., de Jersey, J., Masci, P.P., Lavin, M.F., 2007. Distinct activities of novel neurotoxins from Australian venomous snakes for nicotinic acetylcholine receptors. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 2829-2840.
- Tsetlin V. 1999. Snake venom alpha-neurotoxins and other 'three-finger' proteins. *Eur. J. Biochem.* 264, 281–286.
- Utkin, Y.N., Kaukhtina, V.V., Kryukova, V., Chiodini, F., Bertrand, D., Methfessel, C., Tsetlin, V.I., 2001a. "Weak Toxin" from *Naja kaouthia* is a nontoxic antagonist of $\alpha 7$ and muscle-type nicotinic acetylcholine receptors. *J. Biol. Chem.* 276 (19), 15810–15815.
- Utkin, Y.N., Kaukhtina, V.V., Maslennikov, I.V., Eletsky, A.V., Starkov, V.G., Weise, C., Franke, P., Hucho, F., Tsetlin, V.I., 2001b. First tryptophan-containing weak neurotoxin from cobra venom. *Toxicon* 39, 921-927.
- Vital-Brazil, O., Fontana, M.D., 1983/1984. Ações pré-juncionais e pós-juncionais da peçonha da cobra coral *Micrurus corallinus* na junção neuromuscular. *Mem.Inst.Butantan*, 47/48, 13-26.
- Vital-Brazil, O., 1987. Coral snake venoms: mode of action and pathophysiology of experimental envenomation. *Rev.Inst.Med.Trop.São Paulo* 29 (3), 119-126.

Fig. 1. Chromatographic profile of *M. frontalis* crude venom in a semipreparative C₄ (A) and analytical C₂C₁₈ (B) columns. The venom was eluted with trifluoroacetic acid (TFA) (0.1%) (Solvent A) and acetonitrile (95% + 0,1% TFA) (Solvent B), under a linear gradient of solvent B for 100 min. The absorbance was monitored at 216 and 280 nm in arbitrary units (A.U.). Fractions 5, 6, 10, 12 (A) and 7 (B) were further purified for amino acid sequencing.

Fig. 2. Isolation of FTxs, neurotoxins from *M. frontalis* venom. (A) FTx I and II were purified after a C₁₈ reverse-phase chromatography (A1) followed by Ultra Fast Liquid Chromatography using a Shimpack-XR-ODS column under a linear gradient of acetonitrile at a flow rate of 0.4mL/min (A2). FTx III (B), IV (C) and VI (E) were purified after previous chromatographic steps using a shallow gradient of acetonitrile (25-35% over 20-60 min) (blue line) on a C₁₈ reverse-phase column. FTx V (D) was purified by reverse-phase HPLC on C₁₈ column under a shallower gradient of acetonitrile (20-35% over 60 min) (D1) and a final reverse phase chromatography using a Source 5RTP column under the same conditions used on C₁₈ reverse-phase (D2). In all purifications the absorbance was measured at 216 (black line) and 280 nm (red line).

Fig. 3. Determination of the complete primary sequence of FTx II, III, IV and V and parcial sequence of FTx I and VI. The sequences were determined after reduction, alkylation and in some cases after enzymatic cleavage with Asp-N, Lys-C, Glu-C, trypsin and chymotrypsin. The fragments of peptides were purified by HPLC and identified by Edman degradation (solid lines) and MS/MS (dashed lines).

Fig. 4. Amino acid sequence comparison of Frontoxins with neurotoxins from *Micrurus* venom. (A) FTx I, II and III were compared with short-chain neurotoxins. (B) FTx IV and V were compared with long-chain neurotoxins. Gaps (-) have been inserted to maximize similarity. Conserved cysteine residues are shaded. The sequence data were obtained from National Center for Biotechnology Information (NCBI) protein data base. MICNI, *Micrurus nigrocinctus*; MICSU, *Micrurus surinamensis*; MICPY, *Micrurus pyrrhocryptus*; MICCO, *Micrurus corallinus*.

Fig. 5. Frontoxins decrease miniature endplate potentials (MEPPs) at frog neuromuscular junction. Shown are the distributions in MEPP amplitude before and 45 min after application of 1 μ M FTx II (A), 1 μ M FTx IV (B), or 1 μ M d-tubocurarine (C). Insets: Average MEPP waveforms before and after treatment. Calibration bars: 10 ms (horizontal), 0.1 mV (vertical).

Fig. 6. Dose-dependent inhibition of MEPP size by Frontoxins at the frog neuromuscular junction. Each point represents the mean of the percentage of inhibition obtained after 45 minutes incubation with FTx II, III, IV or d-tubocurarine. Error bars are the 95% confidence limits of each mean (N=3 to 6).

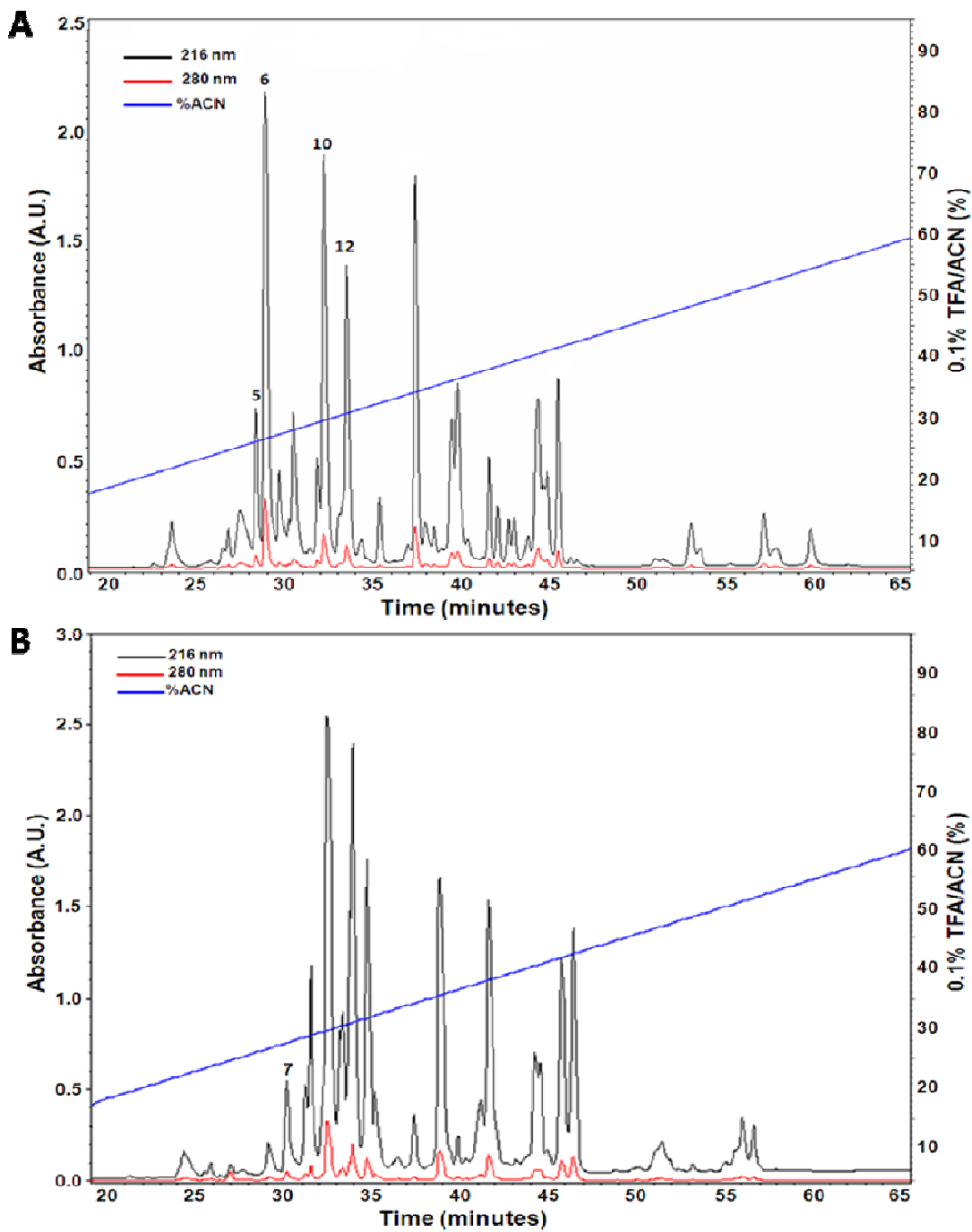


Figure 1

Figure 2

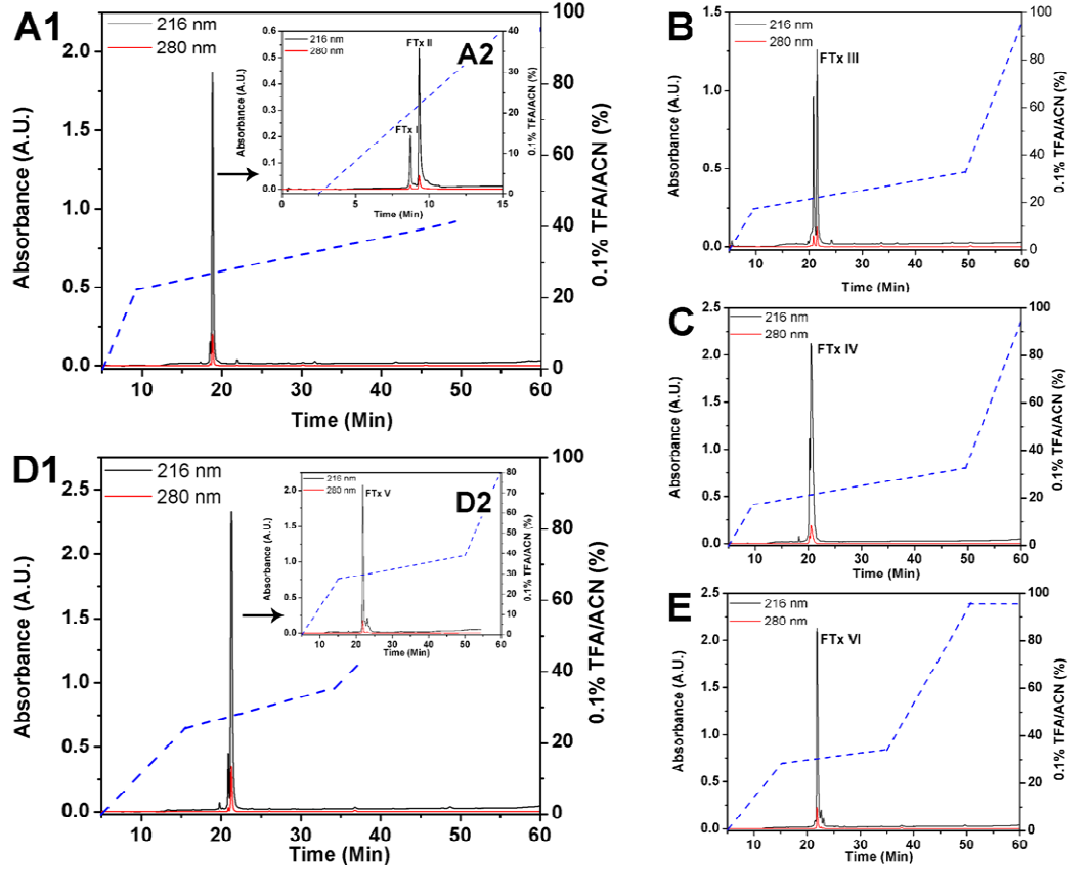


Figure 3

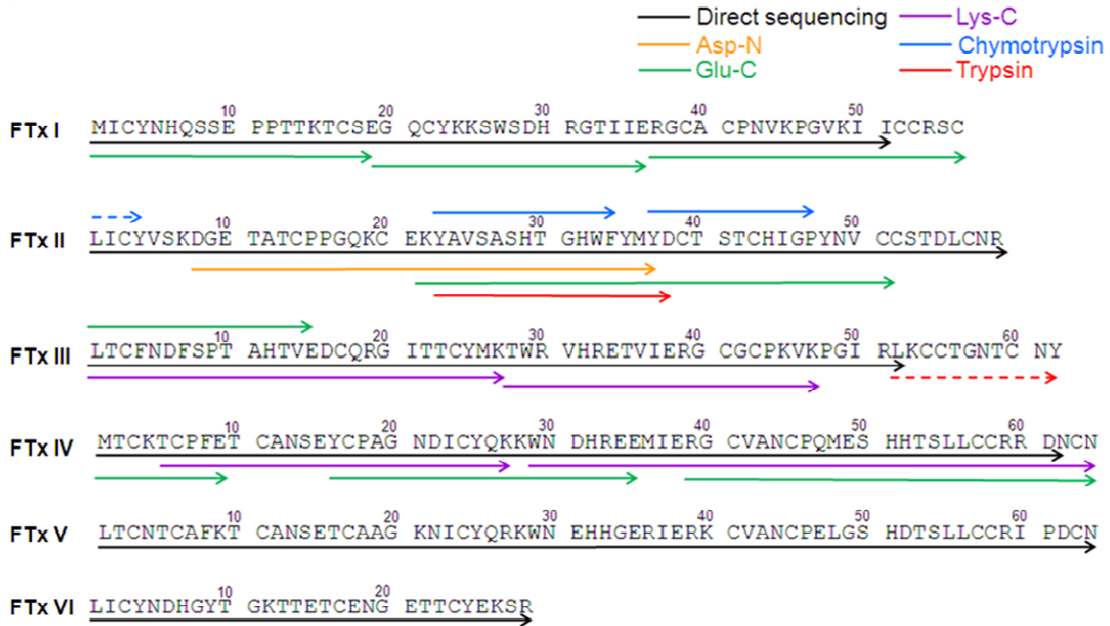


Figure 4

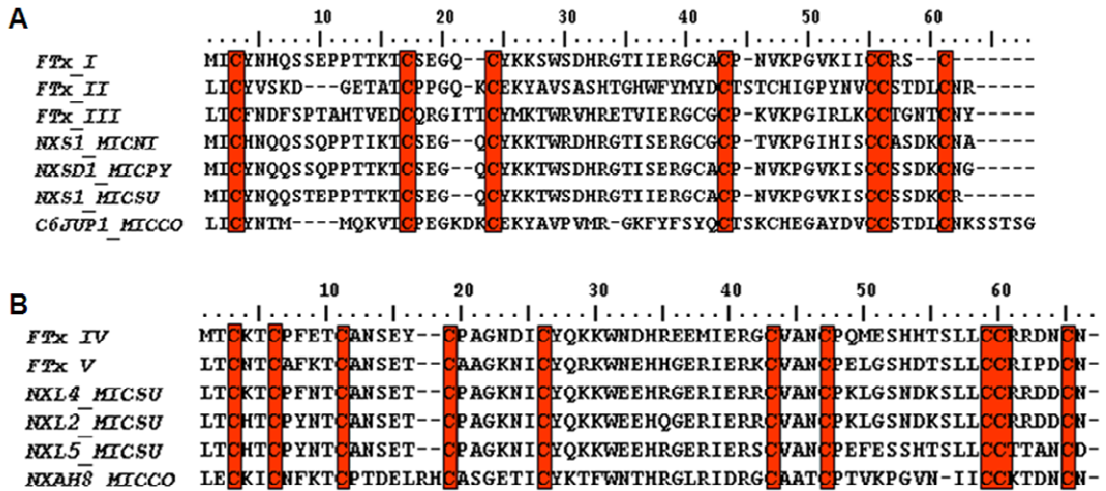


Figure 5

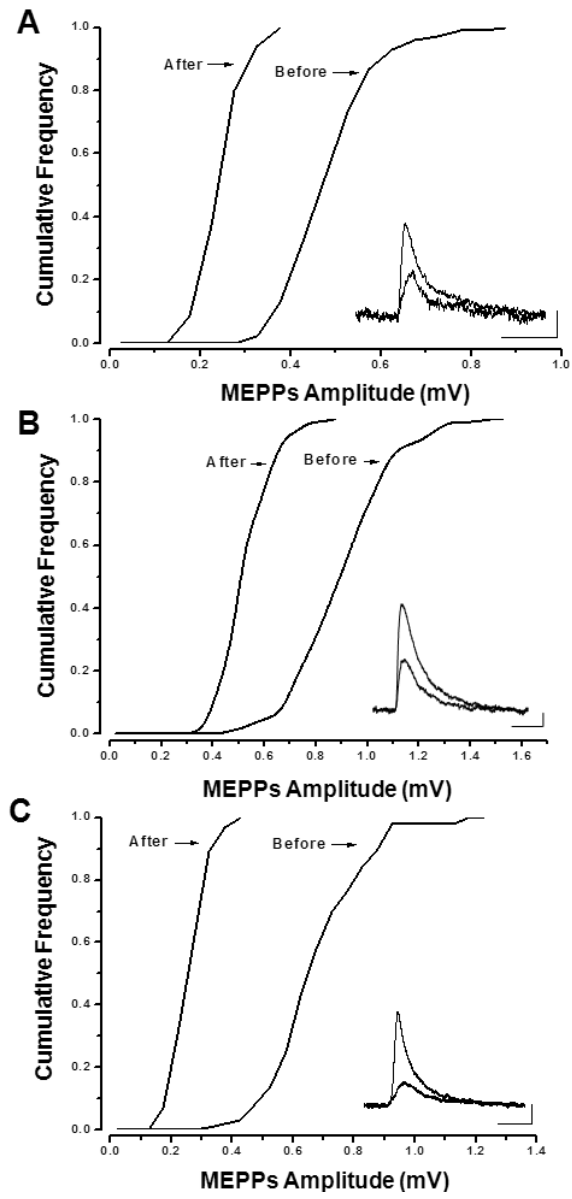


Figure 6

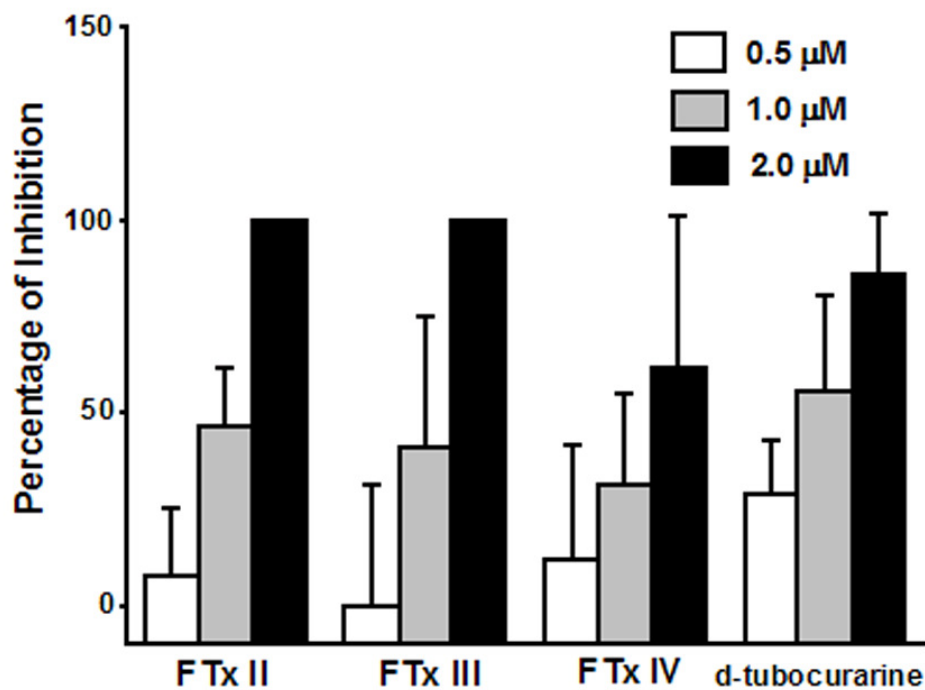


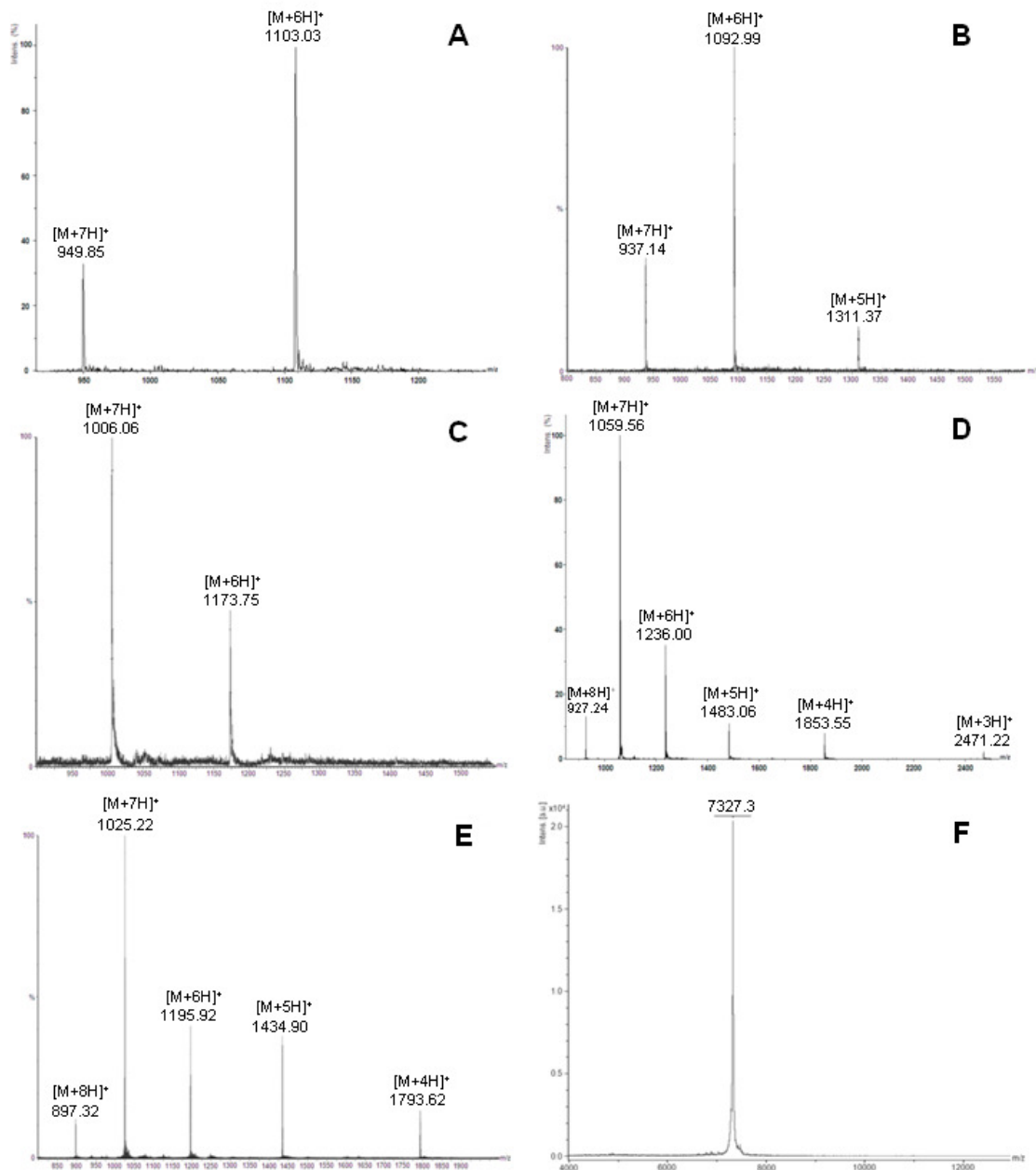
Table 1. Molecular mass and number of cysteine residues of purified components of *M. frontalis* venom.

FTx	MM (native) (Da)	MM (Red_Alk) (Da)	Number Cys residues
I	6642.8	7098.8	8
II	6548.9	7013.2	8
III	7032.8	7496.2	8
IV	7411.3	7996.6	10
V	7166.1	7746.4	10
VI	7327.4	7790.8	8

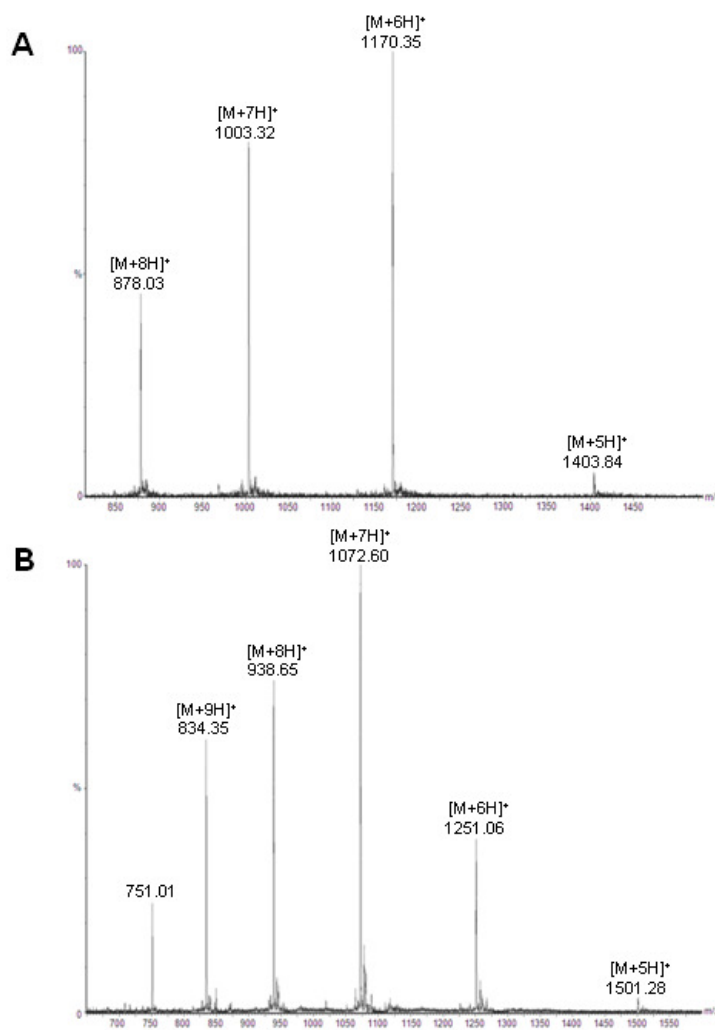
Table 2. Molecular mass and localization in the sequence of peptides obtained from the enzymatic treatment of Frontoxins with different endoproteases. Molecular masses were determined by MALDI-TOF/MS, using an UltraFlex III instrument.

Sample	Enzyme cleavage	Peptide position	Molecular mass		Experimental
			Calculated* Native	Red-Alk	
FTx I	Glu-C	1-19	2155.9	2269.9	2270.6
	Glu-C	20-36	2137.0	2194.0	2194.3
	Glu-C	37-56	2107.0	2392.1	2392.3
FTx II	Chymotrypsin	1-4	511.2	568.2	568.3
	Asp-N	8-37	3364.4	3478.4	3478.2
	Glu-C	22-51	3441.4	3612.5	3614.5
	Chymotrypsin	23-34	1362.6	1362.6	1362.9
	Trypsin	23-38	1934.3	1934.3	1934.5
	Chymotrypsin	38-47	1512.5	1683.6	1684.7
FTx III	Glu-C	1-15	1681.7	1738.7	1738.1
	Lys-C	1-27	3081.3	3252.4	3252.4
	Lys-C	28-47	2127.0	2241.1	2238.4
	Trypsin	52-62	1219.4	1390.5	1390.7
FTx IV	Glu-C	1-9	1059.4	1173.4	1173.4
	Lys-C	5-27	2557.0	2785.0	2785.1
	Glu-C	16-35	2600.1	2714.1	2714.1
	Lys-C	29-64	4414.8	4700.0	4701.9
	Glu-C	39-49	1207.5	1321.5	1321.5
	Glu-C	50-64	1758.7	1929.8	1929.8

*Calculated molecular mass values were determined by PeptideMass program available on ExPASy (<http://www.expasy.org/tools/peptide-mass.html>).



Supplementary material S1. Molecular mass spectra of Frontoxins. Electrospray ion trap mass spectra were determined by HCT-Ultra ETD II (FTx I (A) and IV (D)) and by MALDI Synapt HDMS (FTx II (B), III (C) and V (E)). The spectra show a series of multiple charged ions, corresponding to proteins with $[M+H]^+=6642.81$ (A), $[M+H]^+=6548.91$ (B), $[M+H]^+=7032.89$ (C), $[M+H]^+=7411.38$ (D) and $[M+H]^+=7166.18$ (E). (F) MALDI-TOF/MS mass spectrum of FTx VI, in an UltraFlex III.



Supplementary material S2. Representative mass spectra of FTx II (**A**) and FTx III (**B**) after cysteine reductions and S-alkylation. The spectra shows a series of multiple charged ions, corresponding to proteins with $[M+H]^+=7013.23$ (**A**) and $[M+H]^+=7496.26$ (**B**). ESI mass spectra were determined by MALDI Syn aptHDMS.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)