



Abordagens sistêmicas em toxinologia: Perspectivas e implicações de metodologias ômicas no estudo de toxinas de venenos de serpentes

Systemic approaches in toxinology: Perspectives and implications of omic methodologies on the study of snake venom toxins

André Zelanis^[a]

Resumo

Na última década, a utilização de técnicas de sufixo “oma” em toxinologia tem se intensificado e possibilitado o entendimento da complexidade dos proteomas dos venenos de diversas espécies de serpentes, bem como do transcriptoma de glândulas de veneno. As abordagens sistêmicas (proteômica e transcriptômica), quando utilizadas em conjunto, apresentam um grande impacto na pesquisa toxinológica, sobretudo no que diz respeito aos diversos aspectos bioquímicos e funcionais dos venenos, bem como no entendimento da sua inerente variabilidade. Nesse contexto, um dos principais desafios é o baixo número de proteínas de venenos de serpentes disponíveis nos bancos de dados atuais. O recente reconhecimento do envenenamento ofídico como uma doença tropical negligenciada denota a importância dos estudos sistêmicos em toxinologia. Dessa maneira, o conhecimento do proteoma estrutural e funcional dos venenos fornece importantes informações que podem servir de base para o aperfeiçoamento dos soros antiofídicos, um dos principais desafios dos países em desenvolvimento.

Palavras-chave: *Bothrops jararaca*. Espectrometria de massas. Proteômica. Transcriptômica. Veneno de serpente.

Abstract

On the last decade the use of omic techniques has been intensified and allowed the understanding of the complexity of the venom proteome from different snake species. When combined, systemic approaches (proteomics and transcriptomics) have a remarkable impact on toxinological research, mainly in respect to the biochemical and functional aspects of snake venoms, as well as in the understanding of their inherent variability. In this context, one of the main challenges is the low number of protein entries available in current public databases. The recent recognition of snake envenoming as a neglected tropical disease denotes the significance of systemic studies in toxinology. Thus, the knowledge of structural and functional snake venom proteomes can serve as basis for anti-venom improvement, one of the main challenges in developing countries.

Keywords: *Bothrops jararaca*. Mass spectrometry. Proteomics. Transcriptomics. Snake venom.

^[a] Pós-doutorando na University of British Columbia (UBC), Canadá, doutor em Ciências (Bioquímica) pelo Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP - Brasil. Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada (CAT/Cepid), Instituto Butantan, São Paulo, SP - Brasil, e-mail: azelanis@butantan.gov.br

Recebido: 06/05/2012

Received: 05/06/2012

Aprovado: 18/07/2012

Approved: 07/18/2012

Introdução

A toxilogia ocupa um importante lugar na biologia contemporânea e foi responsável por descobertas de grande impacto na fisiologia e medicina do século XX. Nesse contexto, o Brasil reúne características estratégicas: uma biodiversidade tão vasta quanto seu território e uma abundância de matéria-prima para qualquer toxologista: as serpentes e os seus venenos.

Foi no fim da década de 40 do século XX que Maurício Rocha e Silva e colaboradores, estudando a patofisiologia do tratamento experimental de cães com o veneno da serpente *Bothrops jararaca*, descobriram a bradiginina, um peptídeo de ação hipotensora responsável pela estimulação da musculatura lisa, levando a um quadro de hipotensão nos animais observados (Rocha e Silva, Beraldo & Rosenfeld, 1949). A descoberta da bradiginina foi o passo inicial para o desenvolvimento dos agentes hipotensores atuais, muitos dos quais têm como protótipo os peptídeos potenciadores de bradiginina isolados de veneno de serpentes (Camargo, Ianzer, Guerreiro & Serrano, 2012). Ensaios com veneno de serpente também levaram o bioquímico Stanley Cohen a importantes descobertas: os fatores de crescimento de nervos e epidermal (NGF e EGF, respectivamente), trabalho que lhe conferiu o prêmio Nobel em Medicina em 1986 (Cohen, 1960; Cohen, 2004).

Esses são apenas dois exemplos que denotam a importância do estudo de moléculas bioativas encontradas nos venenos de serpentes. Numa perspectiva histórica, a toxilogia teve como alicerce a utilização de técnicas bioquímicas e farmacológicas tradicionais que ainda hoje são amplamente empregadas em diversas áreas da biologia. Contudo, na última década, a utilização de técnicas de sufixo “oma” em toxilogia tem se intensificado e possibilitado o entendimento da complexidade dos venenos das mais diferentes espécies (Calvete, Juárez & Sanz, 2007; Fox & Serrano, 2008). Nesse contexto, o conjunto de proteínas dos venenos (proteoma) e a população de transcritos (transcriptoma) presentes nas glândulas de venenos ocupam lugar de destaque nas abordagens ômicas atuais. O termo *snake venomics* (do inglês, “venômica de venenos de serpentes”) foi recentemente criado para designar os estudos que empregam espectrometria de massas como uma das principais abordagens metodológicas (Calvete, et al. 2007). Uma das grandes vantagens desse tipo de abordagem é a possibilidade de se

realizar análises em uma escala incomparavelmente maior do que métodos tradicionais de isolamento e identificação de biomoléculas, como proteínas, DNA ou RNA, por exemplo (Cloonan & Grimmond, 2008; Mann & Kelleher, 2008; Mitchell, 2010; Yates, Ruse & Nakorchevsky, 2009; Zhong, Gerstein, Snyder, 2009).

Abordagens sistêmicas em toxilogia

Com o advento recente de metodologias para a análise de genomas, transcriptomas e proteomas em larga escala, a abundância de dados biológicos aumentou significativamente, propiciando uma abordagem holística em toxilogia como alternativa a uma abordagem cartesiana baseada no isolamento e identificação de toxinas e de suas funções. Como consequência, duas abordagens gerais evoluíram para o entendimento de sistemas biológicos em toxilogia. Uma delas se refere a estudos correlatos, nos quais se infere relacionamentos entre genes ou proteínas e seus módulos de função. Esses estudos podem também incluir a anotação de genes e seus produtos por uma abordagem “*guilt-by-association*”, na qual a informação detalhada sobre a função de um gene, proteína, ou sistema, está disponível e é transferida para outros com características semelhantes. A outra abordagem se refere a estudos causais em que funções de biomoléculas ou suas interações são diretamente detectadas e documentadas, permitindo a formulação de mecanismos de atividade ou de ação. Apesar de essas duas abordagens parecerem contrastantes, com o avanço das tecnologias ômicas em genética e bioquímica, elas têm se mesclado nos estudos biológicos sistêmicos mais recentes, possibilitando o entendimento de complexos processos biológicos sob uma perspectiva integrada. Nos últimos 60 anos, foi notório o crescimento das publicações em ciências biológicas que tiveram venenos de serpentes como foco ou ferramenta de investigação (Figura 1). A projeção para esse crescimento é exponencial e, inevitavelmente, possui estreita relação com a utilização de abordagens sistêmicas.

Embora os venenos de serpentes sejam compostos por poucas classes de toxinas, uma dificuldade técnica frequentemente relatada nos estudos proteômicos é a baixa quantidade de sequências de proteínas de venenos de serpentes nos bancos de dados atuais (Calvete, Juárez & Sanz, 2007; Fox & Serrano, 2008). Por esse motivo, a interpretação

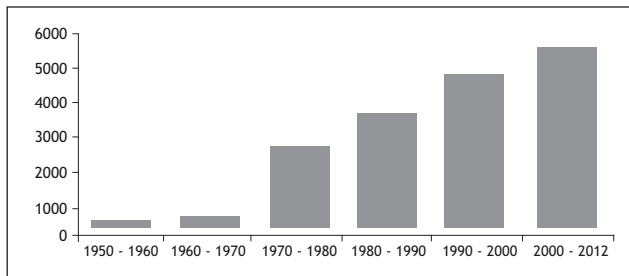


Figura 1 - Retrospectiva dos últimos 62 anos de publicações contendo as palavras-chave “snake venom”

Fonte: National Center for Biotechnology Information, 2012.

manual dos espectros de massas correspondentes a peptídeos de veneno de serpentes é frequentemente adotada por pesquisadores na área de toxicologia (Calvete, et al. 2007; Calvete, Sanz, Angulo, Lomonte, & Gutiérrez, 2009). A Tabela 1 apresenta um levantamento recente do número de entradas (sequências de proteínas) correspondentes a proteínas de serpentes e proteínas de venenos de serpentes disponíveis em dois dos bancos de dados mais utilizados em proteômica: o banco “não redundante” do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, Estados Unidos) e o *Universal Protein Resource Knowledgebase* (UniProtKB, uma colaboração entre institutos de pesquisa do Reino Unido, Suíça e Estados Unidos).

Embora não figure na Tabela 1, quando o identificador utilizado é a palavra *serpentes*, a maioria das proteínas presentes nos bancos de dados analisados não são correspondentes a toxinas, mas a outras proteínas de serpentes, como hemoglobina, citocromo C, proteínas envolvidas em processos metabólicos, dentre outras. Um refinamento da busca utilizando as palavras *snake venom* resulta em pouco mais de 4.100 entradas no NCBI e quase 2.150 no UniProtKB. Esse baixo número, em comparação com aquele verificado para vertebrados considerados “espécies-modelo” da ciência, como camundongos (*Mus musculus*, 268.032 sequências-NCBI; 84.057 sequências- UniProtKB) e o chimpanzé (*Pan troglodytes*, 44.606 sequências-NCBI; 75.338 sequências-UniProtKB; acesso em 03/05/2012), associado ao desconhecimento do genoma completo de alguma espécie de serpente, denota a importância de estudos referentes ao transcriptoma da glândula de veneno, bem como do proteoma dos correspondentes venenos.

Tabela 1 - Número de entradas (sequências de proteínas) correspondentes a proteínas de serpentes ou veneno de serpentes presentes nos bancos de dados NCBI e UniProtKB

Identificador*	Banco de dados	
	NCBI	UniProtKB†
Serpentes	28.065	16.452 (2.130)
Snake venom	4.104	2.148 (1.405)

Fonte: NCBI, 2012; UniProtKB, 2012.

Legenda: * Palavra-chave utilizada na busca; † O UniProtKB compreende uma compilação de dois grandes bancos: o TrEMBL e o Swiss-Prot. Os valores representam o número de sequências cuja anotação é automática e não revisada (TrEMBL database). Os valores entre parênteses representam o número de sequências cuja anotação é manual e revisada (Swiss-Prot database).

Aplicações e implicações de abordagens sistêmicas em toxicologia

O envenenamento ofídico foi recentemente reconhecido como uma doença tropical negligenciada (Williams, Gutiérrez, Harrison, Warrel, White, Winkel, et al. 2010). É considerado uma doença ocupacional, acometendo diversos trabalhadores rurais, principalmente em países em desenvolvimento, onde o acesso ao soro antiofídico é precário ou até mesmo inexistente (Warrell, 2010). Considerando a mortalidade dos casos (que varia de 20 a 125 mil por ano no mundo), o envenenamento ofídico chega a figurar entre as doenças tropicais negligenciadas de maior mortalidade (Williams, et al. 2010), o que denota sua grande importância no âmbito da saúde pública. Nesse cenário, o estudo dos venenos ofídicos é de extrema importância, pois fornece os subsídios para o entendimento dos alvos-moleculares das toxinas, aspectos fisiopatológicos do envenenamento, além de auxiliar no desenvolvimento dos correspondentes antivenenos.

A síntese proteica na glândula de veneno está sujeita a complexos processos de regulação da expressão gênica/proteica inerentes aos sistemas eucarióticos. Além dos processos bioquímicos responsáveis pela geração de diversidade proteômica/transcriptômica, há que se considerar também a influência de outros fatores, como a idade do animal, o sexo, a distribuição geográfica, a dieta, dentre outros. Pode-se atribuir a esse conjunto de fatores a base molecular

da variabilidade verificada nos venenos das mais diversas espécies de serpentes.

Um exemplo recente da aplicação de metodologias ômicas em toxinologia pode ser verificado numa série de trabalhos resultantes dos estudos de caracterização funcional, proteoma e peptidoma do veneno e transcriptoma da glândula de veneno da serpente sul-americana *Bothrops jararaca* (Zelanis, Andrade-Silva, Rocha, Furtado, Serrano, Junqueira-Azevedo, et al. 2012a; Zelanis, Serrano, Reinhold & Vernon, 2012b; Zelanis, Tashima, Pinto, Paes-Leme, Stuginski, Furtado, et al. 2011; Zelanis, Serrano, Reinhold & Vernon, 2010).

A mudança de dieta que ocorre durante a ontogenia de *B. jararaca* já havia sido investigada extensivamente por herpetólogos brasileiros (Martins, Marques & Sazima, 2002), contudo pouco se conhecia sobre o proteoma dos venenos nessas duas fases ontogenéticas tão distintas. Utilizando metodologias complementares em proteômica e espectrometria de massas, associadas à catalogação da população de transcritos presentes na glândula de veneno de filhotes e adultos de *B. jararaca*, nosso grupo demonstrou que existe um evidente rearranjo no proteoma dos venenos que acompanha as alterações no tipo de dieta consumida pelos animais em fases distintas de vida. É pertinente mencionar, ainda, que o veneno dessa espécie compõe 50% do *pool* de imunização dos cavalos na produção do soro antitoxinotrópico nacional produzido pelo Instituto Butantan, entretanto, não há a participação do veneno de filhotes nessa mistura de imunógenos. Em um trabalho recente, Antunes, Yamashita, Barbaro, Saiki e Santoro (2010) mostraram o baixo título de anticorpos do soro antitoxinotrópico produzido pelo Instituto Butantan contra proteínas do veneno de filhotes de *B. jararaca* em comparação ao veneno de adultos.

Considerações finais

Embora uma descrição detalhada das diversas formas de análise de dados em biologia sistêmica fuja do escopo deste ensaio, cabe salientar que um dos atuais desafios é equilibrar a velocidade de geração de dados com a de sua interpretação, uma tarefa nem sempre trivial. Nesse processo crítico e minucioso de análise ou, ainda, de “mineração” dos dados, a relevância dos achados se torna evidente apenas quando se conhece o contexto biológico no qual o modelo

estudado está inserido; caso contrário, os dados encontrados por meio de abordagens ômicas podem fatalmente constituir apenas catálogos de proteínas ou transcritos. Embora os mais diversos equipamentos e programas computacionais de análises de dados tenham uma participação indiscutível em biologia sistêmica, ainda cabe ao pesquisador o julgamento e a interpretação dos resultados à luz da biologia.

Agradecimentos

À Dra. Solange M. T. Serrano, diretora do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada (Instituto Butantan, São Paulo) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp, processos n. 06/60486-0 e 07/54626-7).

Referências

- Antunes, T. C., Yamashita, K. M., Barbaro, K. C., Saiki, M., & Santoro, M. L. (2010). Comparative analysis of newborn and adult *Bothrops jararaca* venoms. *Toxicon*, 56(8), 1443-1458. doi:10.1016/j.toxicon.2010.08.011.
- Calvete, J. J., Juárez, P., & Sanz, L. (2007). Snake venomomics. Strategy and applications. *Journal of Mass Spectrometry*, 42(11), 1405-1414. doi:10.1002/jms.1242.
- Calvete, J. J., Sanz, L., Angulo, Y., Lomonte, B., & Gutiérrez, J. M. (2009). Venoms, venomomics, antivenomics. *FEBS Letters*, 583(11), 1736-1743. doi:10.1016/j.febslet.2009.03.029.
- Camargo, A. C., Ianzer, D., Guerreiro, J. R., & Serrano, S. M. (2012). Bradykinin-potentiating peptides: Beyond captopril. *Toxicon*, 59(4), 516-523. doi: 10.1016/j.toxicon.2011.07.013.
- Cloonan, N., & Grimmond, S. M. (2008). Transcriptome content and dynamics at single-nucleotide resolution. *Genome Biology*, 9(9). doi:10.1186/gb-2008-9-9-234.
- Cohen, S. (2004). Origins of growth factors: NGF and EGF. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1038, 98-102. doi:10.1196/annals.1315.017.
- Cohen, S. (1960). Purification of a nerve-growth promoting protein from the mouse salivary glands and its neuro-cytotoxic antiserum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 46(3), 302-311. doi:10.1073/pnas.46.3.302.

- Fox, J. W., & Serrano, S. M. (2008). Exploring snake venom proteomes: Multifaceted analyses for complex toxin mixtures. *Proteomics*, 8(4), 909-920. doi:10.1002/pmic.200700777.
- Schuett, G. W., Höggren, M., Douglas, M. E., & Greene, H. W. (Ed.) *Biology of the vipers*. (pp. 307-328). Eagle Mountain: Eagle Mountain Publishing.
- Mann, M., & Kelleher, N. L. (2008). Precision proteomics: The case for high resolution and high mass accuracy. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 105(47), 18132-18138. doi:10.1073/pnas.0800788105.
- Marques, O. A. V., Martins, M., & Sazima, I. (2002). A new insular pitviper from Brazil, with comments on the evolutionary biology and conservation of the *Bothrops jararaca* group (Serpentes, Viperidae). *Herpetologica* 58, 303-312.
- NCBI – National Center for Biotechnology Information (2012). Recuperado em 3 Maio 2012, de www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/3www.uniprot.org/downloads.
- Rocha e Silva, M., Beraldo, W. T., & Rosenfeld, G. (1949). Bradykinin hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulins by snake venoms and by trypsin. *American Journal of Physiology*, 156(2), 261-273. PMID:18127230.
- Yates, J. R., Ruse, C. I., & Nakorchevsky, A. (2009). Proteomics by mass spectrometry: Approaches, advances, and applications. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 11, 49-79. doi:10.1146/annurev-bioeng-061008-124934.
- Zhong, W., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, 10(1), 57-63. doi:10.1038/nrg2484.
- Mitchell, P. (2010). Proteomics retrenches. *Nature Biotechnology*, 28(7), 665-670. doi:10.1038/nbt0710-665.
- Zelanis, A., Andrade-Silva, D., Rocha, M. M., Furtado, M. F., Serrano, S. M., Junqueira-de-Azevedo, I. L. et al. (2012a). A transcriptomic view of the proteome variability of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 6(3), e1554. doi:10.1371/journal.pntd.0001554.
- Zelanis, A., Serrano, S. M., & Reinhold, V. N. (2012b). N-glycome profiling of *Bothrops jararaca* newborn and adult venoms. *Journal of Proteomics*, 75(3), 774-782. doi:10.1016/j.jprot.2011.09.017.
- Zelanis, A., Tashima, A. K., Pinto, A. F., Paes-Leme, A. F., Stuginski, D. R., Furtado, M. F. et al. (2011). *Bothrops jararaca* venom proteome rearrangement upon neonate to adult transition. *Journal of Proteomics*, 11(21), 4218-4228. doi:10.1002/pmic.201100287.
- Zelanis, A., Tashima, A. K., Rocha, M. M., Furtado, M. F., Camargo, A. C., Ho, P. L. et al. (2010). Analysis of the ontogenetic variation in the venom proteome/peptidome of *Bothrops jararaca* reveals different strategies to deal with prey. *Journal of Proteomics*, 9(5): 2278-2291. doi:10.1021/pr901027r.
- Warrell, D. A. (2010). Snake bite. *The Lancet*, 375 (9708), 77-88. doi:10.1016/S0140-6736(09)61754-2.
- Williams, D., Gutiérrez, J. M., Harrison, R., Warrel, D.A., White, J., Winkel, K.D. et al. (2010). The global snake bite initiative: An antidote for snake bite. *The Lancet*, 375(9708), 89-91. doi:10.1016/S0140-6736(09)61159-4.