

Mariana Laranjeiro Gouveia Santos

# Potencialidades terapêuticas dos venenos

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas,  
orientada pelo Professor Doutor Rui Barbosa e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho de 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Mariana Laranjeiro Gouveia Santos, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2011156846, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular de estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os direitos de autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 15 de julho de 2016

---

(Mariana Laranjeiro Gouveia Santos)

Ao Professor Doutor Rui Barbosa, por toda a disponibilidade e ajuda.

À equipa da Farmácia Central, por me terem acolhido da melhor maneira possível.

Aos farmacêuticos do CHUC, por terem sido um exemplo para mim.

Ao NEF/AAC e à APEF, por me terem ajudado a crescer.

Aos meus melhores amigos: à Cristiana Pinheiro, Sérgio Filho, Leonor Bruçó, Rita Pessoa, Rafael Fernandes, João Durães, Mariana Rolo, Anita Calado, Laura Ferreira, David Ramos, Margarida Viola, Diana Jordão e Diogo Teixeira, por serem a minha segunda família.

Ao Luís Cruz, pelo apoio incondicional.

À minha família: aos meus avós, tios, pais e irmãos, especialmente à minha mãe, por tudo o que me deram.

*"We all have a thirst for wonder. It's a deeply human quality. Science and religion are both bound up with it. What I'm saying is, you don't have to make stories up, you don't have to exaggerate. There's wonder and awe enough in the real world. Nature's a lot better at inventing wonders than we are."*

– Carl Sagan, Contact

## LISTA DE ABREVIATURAS

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar (*complementary DNA*)

DNA – Ácido desoxirribonucleico (*desoxirribonucleic acid*)

ED – Degradação de Edman (*Edman degradation*)

ESI – Ionização por electrospray (*electrospray ionization*)

ESTs - *Expressed Sequence Tags*

HPLC – Cromatografia líquida de alta pressão (*high pressure liquid chromatography*)

IST – Sociedade Internacional de Toxicologia (*International Society on Toxinology*)

kDa – kilo-Dalton

LC-MS – Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa

MALDI - *matrix-assisted laser desorption/ionization*

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro (*messenger RNA*)

MS – Espectrometria de massa (*mass spectrometry*)

NGF - Fator de crescimento neuronal (*neuronal growth factor*)

NGS – Sequenciação de 2ª geração (*next-generation sequencing*)

RACE – Amplificação rápida de cDNA (*rapid amplification of cDNA ends*)

RMN – Ressonância magnética nuclear

RNA – Ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*)

SDS-PAGE - Electroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) usando dodecil sulfato de sódio (SDS (*polyacrylamide gel electrophoresis, with sodium dodecyl sulfate*))

UHPLC – *Ultra-high pressure liquid chromatography*

## RESUMO

Os venenos animais têm demonstrado o seu valor enquanto uma enorme fonte de novos compostos. O exemplo mais popular será o captopril (criado através de um peptídeo de víbora). No entanto, para que estes recursos possam ser transpostos para a Medicina moderna de uma maneira eficaz e rentável, a indústria farmacêutica pede métodos de bioanálise de alto rendimento. Este trabalho pretende resumir estas técnicas de uma maneira geral, assim como todas as problemáticas inerentes aos estudos venómicos. Por fim, apresentar-se-á o maior caso de sucesso neste campo: o Projeto europeu Venomics.

**Palavras-chave:** bioanálise, dendrotoxina, ómica, veneno, venómica

## ABSTRACT

*Animal venoms have demonstrated their value as an enormous source of new compounds. The most popular example would be captopril (created from a viper peptide). However, for these resources to be translated into modern medicine in an effective and profitable way, the pharmaceutical industry asks for high-throughput analysis methods. This work aims to review these techniques and the several problematic issues associated with the venomic studies. At last, the largest success case in this field will be presented: the Venomics European Project.*

**Keywords:** analysis, dendrotoxin, omics, venom, venomics

## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OS VENENOS COMO <i>POOL</i> DE NOVOS COMPOSTOS .....	3
3. AS DENDROTOXINAS .....	6
4. BIOANÁLISE: A ABORDAGEM VENÓMICA .....	9
4.1. GENÓMICA.....	11
4.2. TRANSCRIPTÓMICA.....	11
4.3. PROTEÓMICA .....	14
4.4. BIOINFORMÁTICA .....	16
5. PERSPETIVAS FUTURAS.....	17
6. O PROJECTO VENOMICS.....	18
7. BIBLIOGRAFIA .....	22

## ÍNDICE DE FIGURAS

1. <i>Figura 1</i> .....	3
2. <i>Figura 2</i> .....	4
3. <i>Figura 3</i> .....	5
4. <i>Figura 4</i> .....	6
5. <i>Figura 5</i> .....	7
6. <i>Figura 6</i> .....	10
7. <i>Figura 7</i> .....	18
8. <i>Figura 8</i> .....	19

## I. INTRODUÇÃO

“*Dosis sola facit venenum.*”

- Paracelsus, 1538: a dose faz o veneno.

Os venenos animais provocaram a morte de cerca de cinquenta e sete mil pessoas em todo o mundo, em 2013. (1) Contêm alguns dos compostos mais tóxicos conhecidos: muitas vezes, apenas uma ínfima dose é o suficiente para causar efeitos nocivos ou até a morte. Os animais que os produzem estão distribuídos por praticamente todos os filos: vertebrados (peixes, anfíbios, répteis, pássaros, mamíferos) e invertebrados (moluscos, artrópodes, anelídeos, esponjas e cnidários, entre outros). (2)

Esta área tem despertado interesse desde tempos muito remotos. Os primeiros traços da documentação das suas propriedades remetem-nos até Aristóteles (384-322). (2)

Inicialmente, o estudo dos venenos focava-se em compreender a toxicidade e neutralizá-la – no entanto, ao longo dos últimos tempos tem-se observado uma mudança de paradigma. A perspetiva tem mudado de uma abordagem anti-venómica para uma abordagem *drug discovery* – isto é, as toxinas começaram a ser usadas para salvar vidas.

Isto porque elas têm propriedades que as tornam candidatas bastante promissoras para a Medicina: enorme potência, seletividade, afinidade, baixa imunogenicidade, estabilidade e eficácia *in vivo*. (3)

Os venenos animais constituem *cocktails* complexos de compostos, na sua maioria peptídicos. O seu **efeito** geral pode ser atribuído à ação específica de algumas moléculas, como aos efeitos sinérgicos de muitas outras. Estas moléculas ligam-se com grande afinidade, estabilidade e seletividade aos seus diferentes alvos (enzimas, recetores, canais iónicos). Acabam assim por produzir uma miríade de efeitos adversos que permitem ao animal venenoso capturar, lesar e/ou matar um outro.



A **eficácia** destes venenos advém do seu aperfeiçoamento contínuo pela seleção natural e constitui um exemplo de evolução convergente, ou seja, de um traço homoplástico, entre diversos *taxa*. (2)

Os animais produzem o seu veneno permanentemente ou temporariamente, em glândulas ou tecidos, e introduzem-nos no alvo com recurso ou não a uma estrutura anatómica especializada. (2) Estes aspetos introduzem variabilidade na composição de cada *cocktail*; para além disto, poderá haver alterações consoante a idade, sexo, dieta, biótopo e distribuição geográfica do animal (entre outros aspetos). Para além disto, tem sido observada a existência de isoformas de cada composto dentro de um só veneno, tornando-o num sistema ainda mais dinâmico do que o previamente pensado. (4)

Sendo a **composição** do *cocktail* maioritariamente peptídica/proteica, poderemos distinguir aqui duas fações - a componente proteica não enzimática e a enzimática. A primeira destina-se principalmente à imobilização da presa, e a enzimática terá o propósito de debilitar e lesar o alvo, assim como de iniciar o processo digestivo. (5) A percentagem restante inclui compostos orgânicos (DNA, mRNA, açúcares, etc.) e inorgânicos (cofatores como o zinco e cálcio) (6) assim como moléculas destinadas a preservar o veneno (ex. inibidores de proteases, agentes estabilizantes e *house-keeping proteins*). (7)

## 2. OS VENENOS COMO POOL DE NOVOS COMPOSTOS

Existem cerca de 170 000 espécies de animais venenosos, cada uma produzindo 100 a 500 toxinas. (3) Tendo também em conta a variabilidade intra-espécie e as isoformas, estes venenos acabam por constituir uma *pool* de mais de **40 milhões de peptídeos**, e apenas 5000 são conhecidos. (4)

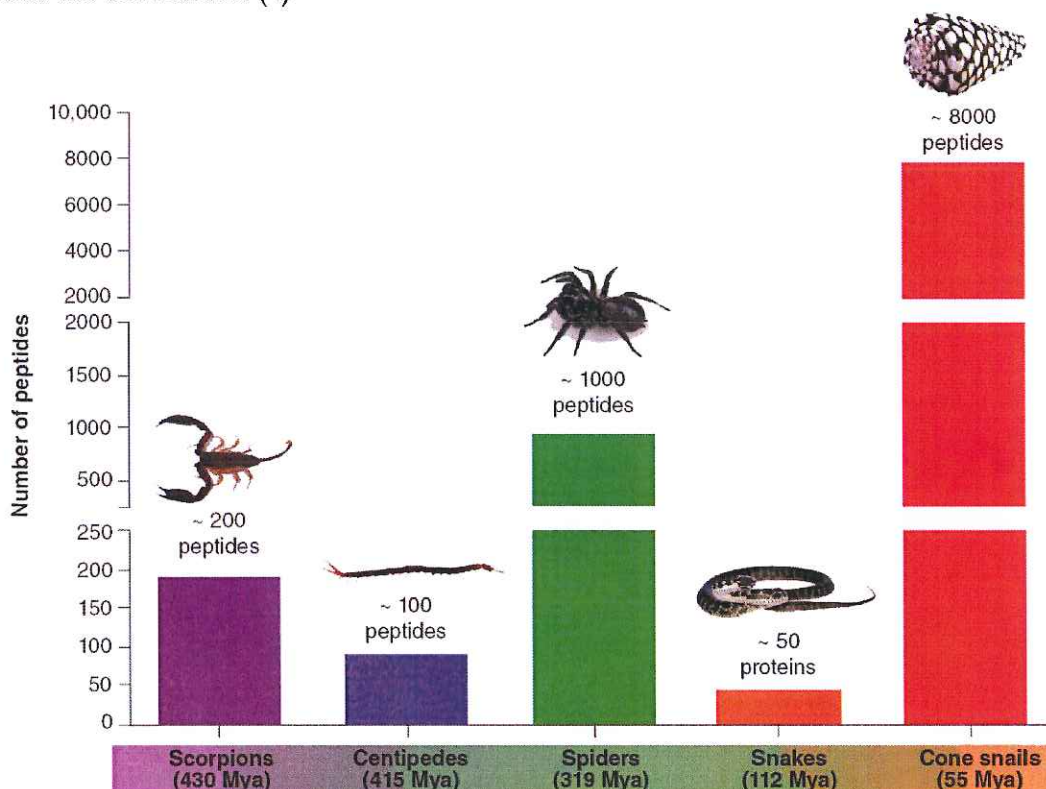


Figura 1: Geralmente existem 50 a 200 peptídeos por espécie, mas as aranhas e os caracóis de cone podem chegar a produzir centenas de peptídeos (8)

A investigação e a farmacologia têm aqui, então, uma enorme fonte inexplorada de novos compostos. Dada a sua especificidade e afinidade para certos alvos, e de maneira quase catártica, os venenos podem atuar como ferramentas básicas de investigação, diagnóstico, tratamento, ou até como base para síntese de novos fármacos.

Isto torna-se imensamente importante para a indústria farmacêutica, que tem visto a sua área de Investigação & Desenvolvimento a estagnar ao longo dos últimos tempos. Houve um decréscimo na introdução de novos princípios ativos no mercado de 80% desde 1950,

apesar dos inúmeros avanços biotecnológicos. (8) A procura de novos *drug leads* tem-se focado, então, nos compostos biológicos. Dando uma perspetiva geral, nos últimos anos introduziu-se no mercado um número aproximado de 50 peptídeos terapêuticos, 100 proteínas naturais e 100 proteínas modificadas. (4)

Os venenos demonstraram já o seu valor em diversos campos. Quanto aos fármacos poderemos tomar o anti-hipertensor **captopril** como referência. Este, para além de representar um caso de enorme sucesso, é um exemplo de *design* racional de compostos. Inicialmente foi descoberto que o veneno da *Bothrops jararaca*, uma serpente originária do Brasil, continha vários peptídeos que potenciavam a ação vasodilatadora da bradicinina através da inibição da sua metabolização. (5) Através do estudo da estrutura destes peptídeos, foi possível sintetizar um composto novo que conseguia inibir eficazmente a enzima que degrada a bradicinina. Esta enzima degrada também a angiotensina-I (vasodilatadora), transformando-a em angiotensina-II (vasoconstritora), tendo consequentemente uma ação hipertensora. Aperfeiçoando o composto e desenvolvendo novos sucessores com propriedades melhoradas, foi possível criar uma nova classe de fármacos anti-hipertensores: os inibidores da enzima conversora da angiotensina-I.



Figura 2: exemplos de medicamentos formulados a partir do peptídeo potenciador da ação da bradicinina: ramipril, captopril, perindopril, enalapril e lisinopril (5)

A este exemplo sucederam-se alguns outros, como é o caso do **eptifibatide** e **tirofiban** – ambos sintetizados a partir de componentes dos venenos de serpentes e ambos anticoagulantes. (9)

A capacidade terapêutica não se limita, obviamente, às serpentes – os caracóis marinhos de cone, por exemplo, contêm um veneno maioritariamente neurotóxico que já originou um fármaco aprovado (**ziconotide**, analgésico).

Também não se limitará exclusivamente a servir de base ao desenvolvimento de fármacos propriamente ditos. A **apamina** (um peptídeo proveniente do veneno das abelhas) e o seu análogo inofensivo podem penetrar a barreira hemato-encefálica, assim como a **clorotoxina** (de veneno de escorpião) e o seu análogo. Podem ser então usados como *shuttles* e/ou marcados com fluorescência, permitindo a passagem de outros compostos para o cérebro ou a visualização de marcadores de doença. Foi também desenvolvido um novo adesivo cirúrgico de **fibrina** utilizando componentes de veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*, que mostrou ser uma boa alternativa às suturas tradicionais. (2) Os venenos podem também proporcionar métodos de diagnóstico – a **botrocetina**, uma proteína produzida pela serpente *Bothrops jararaca*, é usada em prática corrente para diagnosticar a síndrome de von Willebrand (anomalia de coagulação sanguínea mais comum).

Encontram-se de momento em curso vários ensaios clínicos correspondentes a variadas e promissoras toxinas, com aplicações em diversos campos da medicina.

Enquanto ferramentas de **investigação biomédica**, os venenos têm permitido estudar os mais diversos processos fisiológicos. A **fosfodiesterase** proveniente da serpente *Agkistrodon piscivorus* permitiu aos cientistas Stanley Cohen e Rita Levi-Montalcini descobrirem o fator de crescimento neuronal (NGF), tendo-lhes sido atribuído o Prémio Nobel da Fisiologia e Medicina por este trabalho em 1986. A descoberta da **dendrotoxina** (isolada inicialmente a partir da serpente *Dendroaspis angusticeps*) e a elucidação do seu mecanismo de ação têm permitido estudar as funções e estruturas dos canais iónicos onde ela atua. (5)

É com a dendrotoxina e as suas particularidades que se prende o capítulo seguinte. Esta toxina facilita a libertação do neurotransmissor acetilcolina, podendo ter aplicações no estudo da estrutura ou de doenças relacionadas com a junção neuro-muscular.



Figura 3: Rita Levi-Montalcini a receber o Prémio Nobel da Fisiologia e Medicina, 1986 (5)

### 3. AS DENDROTOXINAS

O caso da dendrotoxina constituiu uma das primeiras situações em que a observação fenotípica dos efeitos do veneno levou à descoberta de uma toxina. Alan Harvey recebeu a mais alta honra da *International Society on Toxinology* (IST) – o prémio Redi – pelo seu trabalho com esta toxina. A dendrotoxina representa um perfeito exemplo tanto da especificidade tão característica das toxinas animais, como do uso das mesmas como ferramentas de investigação. (5) Para além disso, são produzidas pelo animal mais tradicionalmente associado aos venenos: as serpentes. Neste caso, as quatro mambas africanas.

Existem cerca de 3400 espécies de serpentes catalogadas; no entanto, as mais comumente mencionadas no contexto da venómica são as víboras (*Viperidae*) e as elápides (*Elapidae*). (10)

As elápides são uma família de serpentes extremamente venenosas. Compreendem as serpentes de coral, as cobras, mambas, serpentes marinhas, taipans, entre outras. Estão largamente distribuídas pela América do Sul, Norte, África, Ásia, Austrália e Ilhas do Pacífico. Como as víboras, injetam o veneno através de duas presas ocas fixas na mandíbula superior. (11)

As mambas africanas (género *Dendroaspis*) reúnem uma série de características que as tornam nas serpentes mais perigosas do mundo.

Conseguem atingir velocidades de 20 km/h, sendo as serpentes mais rápidas alguma vez registadas, e atacam repetida e agressivamente as suas presas, maximizando assim a dose de veneno injetada.

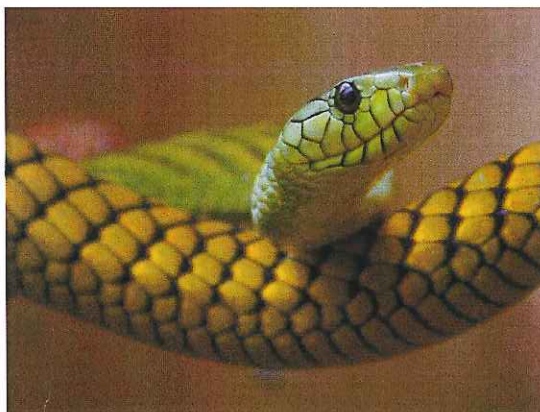


Figura 4: *Dendroaspis Viridis* (12)

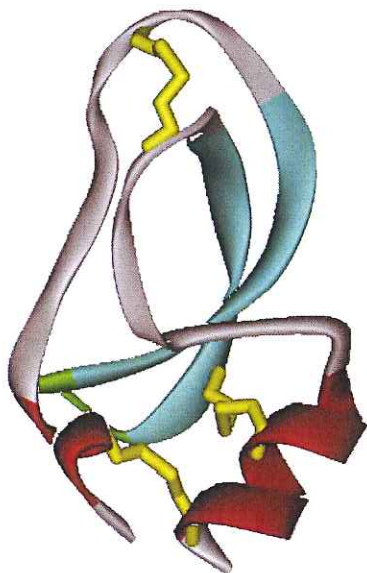
Têm um tamanho considerável, podendo atingir quatro metros e meio de comprimento, e o seu veneno altamente neuro e cardiotoxico consegue provocar a morte

de um humano em cerca de 20 minutos. Existem numa grande parte do continente africano, e as mortes relacionadas com as mambas ainda são um acontecimento relativamente frequente apesar de já existir um antídoto. (13)

Estão catalogadas quatro espécies. A mamba-de-Jameson (*D. jamesoni*), a mamba-verde-oriental (*D. angusticeps*), a mamba-verde-ocidental (*D. viridis*) e a mamba-negra (*D. polylepis*). (14)

As dendrotoxinas são o componente mais relevante do veneno destas serpentes. No entanto, neste estão incluídos muitos outros compostos que exercem efeitos sinérgicos: por exemplo, contêm fasciculinas (que bloqueiam as acetilcolinesterases) e calcicludina (que bloqueia os canais de cálcio). (15)

O veneno das mambas captou a atenção de Alan Harvey e John Barrett, através de uma observação fenotípica (os ratinhos tinham uma “aparência inchada”) e experimental (nenhum dos componentes isolados era letal, mas a sua conjugação sim). Ao procederem a ensaios com preparações de músculo esquelético, notaram que o veneno induzia um bloqueio das contrações. No entanto, a concentrações mais baixas, este aumentava o limiar de resposta do músculo; Harvey e Barret acabaram por demonstrar que o veneno facilitava a libertação de acetilcolina na junção neuromuscular, potenciando a sua ação. (5)



O composto responsável por esta função é denominado de **dendrotoxina** e bloqueia seletivamente os canais de  $K^+$  dependentes de voltagem nos neurónios.

Posteriormente descobriram-se vários subtipos de dendrotoxinas: por exemplo, a  $\alpha$ -dendrotoxina (*D. angusticeps*) bloqueia os canais Kv1.1, Kv1.2 e Kv1.6; a dendrotoxina-K bloqueia preferencialmente o canal Kv1.1.

Figura 5 – estrutura tridimensional da  $\alpha$ -dendrotoxina (5)

As dendrotoxinas são constituídas por 57 a 60 aminoácidos numa única cadeia; a estrutura é imposta por três pontes de dissulfureto. A sua estrutura e sequência são homólogas às dos inibidores da Kunitz serina protease (*Kunitz serine protease inhibitors*), que

inibem a tripsina. (16) No entanto, são inibidores muito fracos da tripsina (17), e os inibidores Kunitz não bloqueiam os canais de  $K^+$ . A diferença crucial está em alguns resíduos-chave de lisina e num resíduo hidrofóbico no terminal-N. (16)

A dendrotoxina exerce o seu **efeito** porque leva a que os neurónios periféricos libertem quantidades excessivas de acetilcolina para a junção neuromuscular. Os neurónios controlam os seus impulsos através da alteração da concentração de iões (sódio e potássio) à volta das suas membranas; o efluxo de potássio é extremamente importante na medida em que permite à célula manter um potencial de repouso. Este corresponde à voltagem da membrana quando esta não está a transmitir um impulso (potencial de ação). A dendrotoxina liga-se, então, aos canais de potássio dependentes de voltagem, impedindo o ião de sair da célula. No entanto, o  $Na^+$  pode ainda passar a membrana; portanto, criar-se-á um potencial de ação. Como a saída do  $K^+$  está limitada, torna-se mais difícil para a célula voltar a um estado de repouso: isto traduz-se num estado de excitação prolongado e numa maior facilidade em gerar potenciais de ação. Ao gerarem-se mais impulsos, haverá maior libertação de neurotransmissores nas sinapses e junções neuromusculares. (18,19)

A ação da dendrotoxina nos neurónios periféricos leva a convulsões, arritmia cardíaca e respiratória, paralisia flácida (perda de função e sensibilidade nos membros) e náuseas. As convulsões são causadas por ligação das dendrotoxinas aos neurónios motores e a paralisia causada pela ligação aos neurónios inibitórios do sistema nervoso autónomo. A variação nestes sintomas baseia-se na diferente distribuição dos subtipos de canais de  $K^+$  pelos variados tipos de neurónios. (18) Como a toxina não passa a barreira hemato-encefálica, a vítima permanece consciente durante todo o processo.

Do ponto de vista do mecanismo, ainda não foi esclarecido se a toxina atua bloqueando o canal ou se apenas afeta a sua cinética. A inibição do canal também não é total, havendo ainda uma corrente residual causada pelo fluxo dos iões de  $K^+$ . (17)

O uso da  $\alpha$ -dendrotoxina enquanto ferramenta de investigação mostrou que o canal de  $K^+$  é formado por quatro subunidades proteicas transmembranares ( $\alpha$ ), com quatro subunidades acessórias ( $\beta$ ).

A elucidação da distribuição destes canais pelo SNC foi feita usando dendrotoxinas ligadas a radioisótopos, e mostrou-se que a marcação era mais intensa em áreas ricas em sinapses. Também se demonstrou que algumas doenças autoimunes podem estar relacionadas com a produção de anticorpos contra determinados tipos de canais de  $K^+$  nos

neurónios motores. Colocou-se também a hipótese de estes canais estarem associados à proliferação de células cancerígenas: ao serem incubadas células cancerígenas com baixas concentrações de dendrotoxina, a taxa de proliferação diminuiu. (17)

#### 4. BIOANÁLISE: A ABORDAGEM VENÓMICA

A maioria dos estudos com a dendrotoxina foi baseada em estudos *bioassay-guided*, ou seja, orientados para bioensaios. Ao ser um componente abundante do veneno das mambas, esta toxina foi facilmente detetável o que facilitou os estudos. Atualmente, quando se tratam de venenos completamente desconhecidos e produzidos por animais muito pequenos, esta abordagem já não é viável. A análise é, de momento, direcionada para as sequências presentes na amostra – sequências de peptídeos, de mRNA e DNA.

Por exemplo, como no caso da *Dendroaspis*, o estudo de um veneno começaria com o fracionamento do veneno seguido de purificação. Seguindo este tipo de abordagem tradicional, a posterior caracterização dos compostos é feita através de *assays* direcionados para certos alvos; isto limita o número de amostras que podem ser testadas e aumenta a quantidade de veneno necessária para obter resultados. Ora, tendo em conta o tamanho, abundância e leis de conservação de algumas espécies animais, os *bioassays* tornaram-se inviáveis. (4, 20) Por extensão natural ao desenvolvimento tecnológico e científico, têm surgido novos métodos analíticos baseados na proteómica e transcriptómica, nascendo uma nova análise – o conceito da venómica.

Esta abordagem engloba muitas estratégias integradas entre si, esquematizadas na figura seguinte.



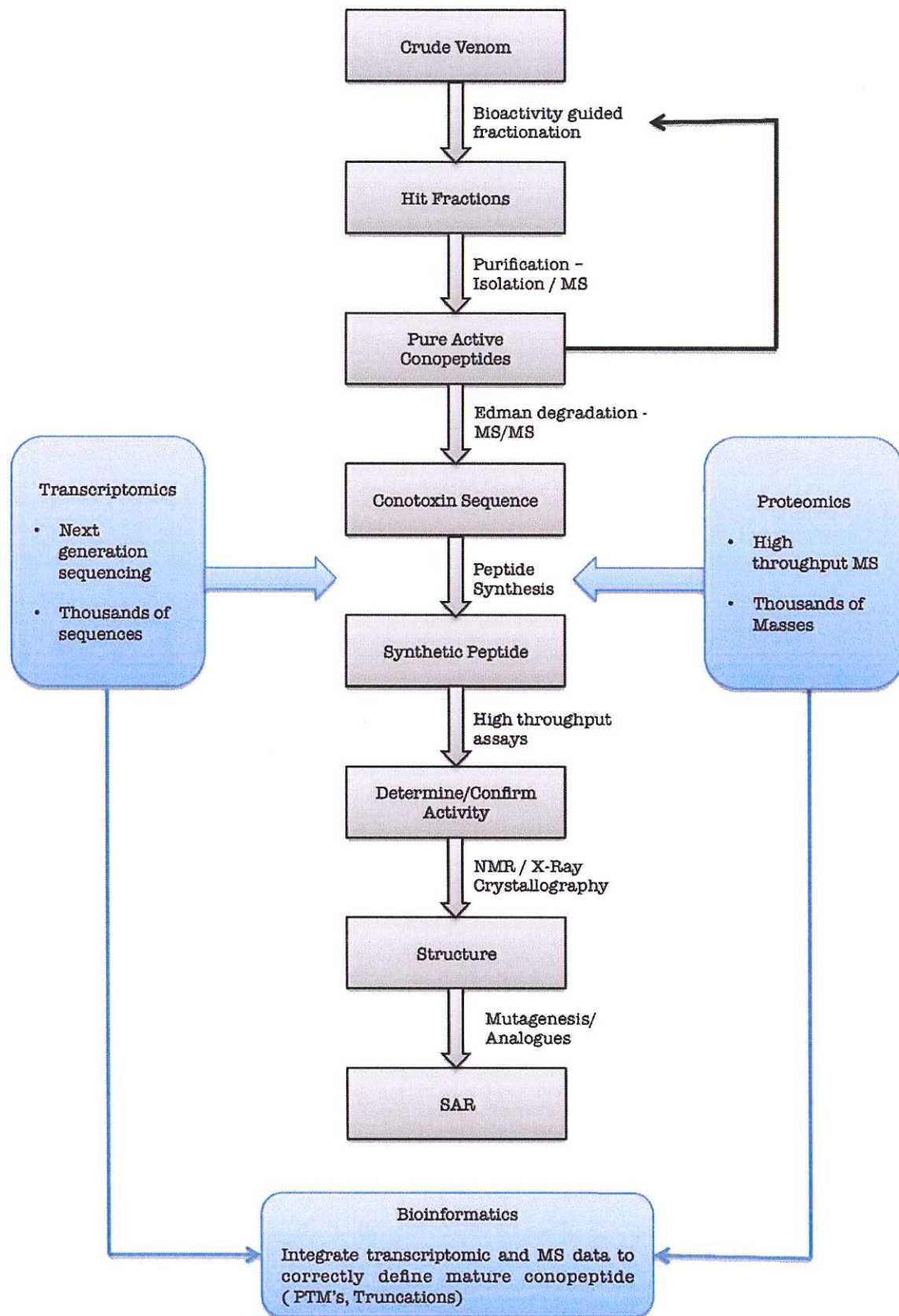


Figura 6: estrutura típica de uma abordagem venómica (23)

## 4.1. GENÓMICA

Poderemos começar a dissecar os métodos de bioanálise dos venenos pela sequenciação do genoma. Isto é importante na medida em que permitirá perceber como funcionam todos os sistemas inerentes à produção de veneno, a regulação e organização genética dos mesmos, para além de nos mostrar se as diferentes espécies animais têm algum tipo de similaridades genéticas e, se sim, como evoluíram ao longo do tempo. Existem **duas opções** para prosseguir com os estudos do genoma: sequenciar o genoma completo do animal em questão, ou sequenciar apenas regiões que apresentem genes com assinaturas típicas de peptídeos ou proteínas do veneno. A primeira opção, apesar de fornecer mais informação, torna-se bastante dispendiosa e morosa considerando o tamanho de alguns genomas. Apesar dos avanços tecnológicos, não existem muitos centros de investigação em todo o mundo capazes de processar completamente estes dados; atualmente, apenas estão a ser sequenciados cerca de 10 genomas de animais venenosos. (7) A segunda opção parece a mais viável, apesar de não fornecer muita informação sobre a evolução deste traço homoplástico no Reino Animal.

As **assinaturas** referenciadas correspondem a padrões de cisteínas detetados nas proteínas e peptídeos do veneno. Estes resíduos de cisteína ligam-se entre si (ligações dissulfureto) estabilizando as estruturas tridimensionais das toxinas – assim, o número e disposição destes resíduos leva a padrões de estrutura (e, conseqüentemente, de função) nas toxinas. (21) No entanto, estes padrões também existem em proteínas não tóxicas. Levantam-se então várias questões: por exemplo, existe algum tipo de regulação genética que determina que uma proteína inicialmente não tóxica se transforme numa toxina, através de alterações estruturais ou pós-translacionais numa glândula venenosa. (7)

## 4.2. TRANSCRIPTÓMICA

A transcriptómica é definida como o estudo da expressão génica numa célula, tecido ou órgão, e baseia-se na sequenciação de RNA. (22)

A nível tecnológico e económico, a análise transcriptómica dos venenos é mais vantajosa que a genómica. (21) Tem sido feita a sequenciação dos percursores dos venenos,

ou seja, das moléculas de mRNA. Geralmente cada toxina tem apenas um precursor de mRNA correspondente (sequências monocistrónicas); no entanto, por vezes algumas sequências são policistrónicas e codificam diferentes toxinas ou várias isoformas da mesma toxina. (4) A clonagem dos percussores permite também obter as toxinas sem utilizar maiores quantidades do veneno original. Os mRNAs presentes no veneno são denominados de **Expressed Sequence Tags (ESTs)**; são convertidos em cDNA, e este é posteriormente sequenciado através do método de Sanger. (23)

Esta tecnologia é útil para encontrar rapidamente diferenças nos transcritos (sequências diferentes) – deteção de isoformas entre espécies, e de formas transversais a várias espécies. Permite apenas um estudo geral dos padrões de expressão génica dos tecidos venenosos. Foi usada inicialmente para detetar diferenças nestes padrões em várias espécies de caracóis de cone de modo a perceber como é que elas tinham evoluído. Desde então, já permitiu a deteção de novas isoformas de proteínas já conhecidas e de certas categorias de compostos transversais a todas as espécies de animais venenosos. Também foram descobertas certas moléculas específicas dos venenos, que não faziam parte de nenhuma base de dados de ESTs. No entanto, esta técnica apresenta algumas **limitações**: para além de ser dispendiosa, só nos dá uma informação geral acerca dos genes expressados, e não consegue processar sequências longas de mRNA. (4)

Entretanto, a questão das limitações associadas ao método de Sanger foi resolvida pelo desenvolvimento da pirosequenciação. Esta técnica assenta na “deteção da libertação do pirofosfato aquando da incorporação de nucleótidos, em vez da terminação de cadeias usando dideoxinucleótidos”. Em conjunto com outras metodologias mais recentes, a pirosequenciação originou o termo **Next-Generation Sequencing (NGS)** – englobando todos estes procedimentos. (24)

Neste campo, a NGS é usada para sequenciar os cDNAs obtidos através dos transcritos (mRNA) presentes nos venenos. (4) As leituras destes cDNAs (*reads*) são então articuladas, formando uma sequência maior chamada *contig*. (24) A isto chama-se uma *bottom-up sequencing strategy*: parte-se de um fragmento (*bottom*) para o genoma (*up*). Comparando o gene *contig* com outros já estudados, são previstas as suas funções e identificam-se quais os *contigs* que podem ou não dar origem a um precursor de uma toxina. Toda esta informação é de seguida depositada em bases de dados acessíveis à comunidade científica. (21)

A NGS consegue proporcionar uma visão muito mais alargada de todos os transcritos presentes no veneno do que as tecnologias antigas, com uma relação custo/benefício mais razoável. No entanto, os sequenciadores usados têm uma taxa de erro maior. Isto acontece porque a NGS consegue processar um grande número de sequências à custa do tamanho das *reads* geradas – ou seja, as *reads* acabam por ser mais pequenas, apesar de serem em maior número. (20) A agregação destas *reads* em *contigs* só pode ser feita às cegas, ou seja, *de novo*, sem um genoma-referência. Como se tratam de transcritos muito semelhantes entre si (pertencentes a famílias de genes), para além de pequenos, a sua leitura e agregação pode estar sujeita a erros. Criam-se então *contigs* quiméricos, ou seja, formados por fragmentos que não fazem parte do mesmo gene. (21) Outro fator de erro é a tecnologia usada; apesar de ultrapassarem os sequenciadores Sanger em rendimento e custo, as metodologias novas acabam por apresentar uma taxa de erro maior devido aos métodos de sequenciação e *assembly* usados. Também diferenciam entre si quando ao comprimento das *reads* geradas, sendo que a escolha do sequenciador deve ser feita tendo em conta o fim a que a sequenciação se destina. Para uma *assembly de novo* em *contigs* como acontece na análise transcriptómica de venenos, a escolha mais popular são os sequenciadores 454 por produzirem *reads* maiores (apesar de serem mais dispendiosos). (25) A tecnologia *Illumina* é mais económica, mas produz *reads* menores; no entanto, hoje em dia já existem ferramentas bioinformáticas que permitem a *assembly* com este tipo de *reads*. (22)

Apesar de ser desafiante, a NGS apresenta inúmeras **vantagens**. Ao detetar mais sequências do que os métodos anteriores, mostrou que a diversidade de compostos presentes nos venenos é muito maior que o previamente pensado. Também possibilita a elucidação dos mecanismos pós-translacionais, bem como a descoberta de novas isoformas de toxinas. Foi ainda observado um grande número de variações nas sequências e nos perfis de expressão entre animais da mesma espécie. Confirmando o que se constatou com a tecnologia das ESTs, a NGS leu sequências sem qualquer correspondência em qualquer uma das bases de dados – sem dúvida, estas poderão ser os percursos de uma enorme quantidade de compostos até agora por analisar. (15) O problema inerente a estas **sequências novas** e diferentes assenta no facto de que não podem ser comparadas com homologia com outros genes, e, conseqüentemente, não podem ser previstas as suas funções. Assim, foram desenvolvidos métodos de *profiling* que se baseiam na deteção de determinados padrões ou características nos peptídeos traduzidos e que permitem classificá-los como toxinas. Estes padrões podem assentar, por exemplo, no número de resíduos de

cisteína e do comprimento das sequências entre estes resíduos. (21) A disposição destes resíduos condiciona a estrutura da proteína e, naturalmente, a sua função.

Temos então um cruzamento de dados entre a transcriptómica e a proteómica.

### 4.3. PROTEÓMICA

A proteómica visa caracterizar o proteoma, ou seja, o conteúdo peptídico ou proteico de um meio biológico, seja este uma cultura celular, um tecido, plasma, ou veneno. (22) O estudo da proteómica dos venenos pode combinar uma série de metodologias, incluindo cromatografia, eletroforese, espectrometria de massa (MS), degradação de Edman (ED), digestão enzimática, entre outros. (21) As abordagens são variadas. Podem-se usar variações destas metodologias, complementar umas com outras, e o uso de ferramentas bioinformáticas é indispensável.

Antes de se proceder ao estudo do proteoma, as amostras dos venenos têm de passar por alguns procedimentos prévios. As toxinas têm, antes de tudo, de ser “desdobradas”: as pontes de dissulfureto são removidas e bloqueadas por redução e alquilação (respetivamente). Isto aumenta a eficácia da sequenciação da cadeia peptídica. Se as moléculas forem pequenas, podem então seguir diretamente para a separação cromatográfica. Se a sua massa molecular for maior que 5 kDa, terão de sofrer digestão enzimática até terem um tamanho apropriado. (22)

A complexidade da matriz de um veneno obriga à utilização de métodos de alta resolução: geralmente utiliza-se a **cromatografia líquida de elevada pressão** (HPLC: *high pressure liquid chromatography*) de fase reversa, acoplada a um espectrómetro de massa. Obtém-se então a massa e tempo de eluição de quase todos os peptídeos. (23)

A UHPLC (*ultra high pressure liquid chromatography*) contém ainda mais resolução que a HPLC, por usar partículas na fase estacionária de diâmetro inferior a 2  $\mu\text{m}$ . (26) Também pode ser adaptada a pequenos volumes de amostra (nano-UPLC), sendo uma ferramenta muito útil ao estudo de venenos provenientes de insetos. (22)

A **espectrometria de massa (MS)** é uma técnica instrumental fundamental à análise dos venenos. Os detetores de espectrometria de massa procedem à ionização dos compostos a analisar e separam-nos em função da sua relação massa/carga; depois estes iões

são detetados dentro de um certo intervalo de leitura. Os dados são por fim apresentados na forma de um espectro de massa.

A precisão, aqui, traduz-se como a capacidade de medir a relação massa/carga corretamente, assim como a resolução se traduz pela capacidade de distinguir entre iões de massa ou carga semelhantes. (27)

Existem vários **métodos de fragmentação** na MS, e vários modelos de espectrómetros – em particular, podemos indicar a espectrometria MALDI-TOF (espectrómetro *Time Of Flight*, com a técnica integrada MALDI - *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) e a ESI (*Electrospray Ionization*) como técnicas que permitiram um enorme desenvolvimento na análise da proteómica dos venenos. (23)

O passo seguinte será utilizar os dados obtidos na LC-MS para **reconstruir a sequência peptídica** das toxinas.

Tradicionalmente, isto poderia ser feito com recurso a uma variedade de métodos, como, por exemplo, a degradação de Edman, SDS-PAGE (electroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) usando dodecil sulfato de sódio (SDS)) ou 2DE, sequenciação do terminal-N, determinação da percentagem de resíduos de cisteína por MS, RACE (amplificação rápida de cDNA). (28)

Atualmente, esses métodos podem ser usados integralmente ou de forma complementar a diversas técnicas de MS.

Para a reconstrução das sequências a MS pode ser utilizada para a **sequenciação de novo**, que corresponde à interpretação dos fragmentos por algoritmos especializados até se chegar a uma sequência final. (20) Esta técnica pode tornar-se muito morosa; por isso, a comparação do espectro gerado com outros espectros de peptídeos conhecidos, disponíveis em **bases de dados**. A grande desvantagem deste método assenta no facto de que só apresenta sequências já documentadas; sequências completamente novas só poderão ser descobertas manualmente. (22) Este problema poderá ser parcialmente contornado com o auxílio de dados transcriptómicos – a partir do transcriptoma da amostra, poder-se-ão prever as sequências peptídicas presentes na mesma. (20)

Aplicada aos transcritos, a MS permite-nos perceber a extensão das modificações pós-translacionais – compara a massa prevista dos mRNAs com a massa efetivamente observada. (23) Também pode indicar a relação entre os mRNAs expressos e os mRNAs

efetivamente traduzidos: algumas toxinas que se prevê que existam (com base nos dados transcriptómicos) não são detetadas no veneno, assim como se observam toxinas no proteoma que não têm nenhum transcrito identificável. (21)

A integração dos dados transcriptómicos com os proteómicos também ajuda a elucidar os mecanismos das modificações pós-translacionais (compara o peptídeo obtido com o seu precursor de mRNA). (23)

#### 4.4. BIOINFORMÁTICA

Todos estes estudos geram uma grande quantidade de informação: cada amostra gera, no mínimo, 12 Gb de informação (incluindo biliões de *reads*). (3)

Surgiu então a necessidade de criar bibliotecas e ferramentas bioinformáticas que conseguissem integrar e processar os dados obtidos de maneira eficaz. Existem, por exemplo, variadas bases de dados de sequências nucleotídeas e peptídicas, que depois são ligadas a outras plataformas de informação sobre estruturas 3D ou 2D, bem como a ferramentas de classificação de compostos. Também existem repositórios direcionados para alguns géneros animais, como o ConoServer (que comporta informação sobre as sequências e estruturas dos conopeptídeos produzidos pelos caracóis de cone).

Estas bibliotecas são denominadas métodos de ***data management***; posteriormente, teremos os métodos de ***data analysis*** que permitem inferir sobre a informação não tratada. Ou seja: algoritmos que procedem a análises filogenéticas, verificação de estruturas, estudos de homologia, estudo da ligação a variados recetores, previsão de funções, etc. (23)

Estas plataformas tornam-se também importantes na medida em que auxiliam a classificação das toxinas recém-descobertas. Geralmente, são caracterizadas de acordo com os padrões dos resíduos de cisteína, em termos da sua atividade farmacológica, ou em superfamílias de genes. (19)

## 5. PERSPETIVAS FUTURAS

Apesar de os venenos providenciarem uma fonte imensa de novos compostos com grande potencial terapêutico, é difícil assegurar a rentabilidade destes estudos. A dificuldade não está em encontrar produtos com boa atividade farmacológica *in vitro*, mas sim em transportar com sucesso esse composto através de ensaios pré-clínicos, clínicos, até a um uso comprovado ausente de efeitos adversos graves. (9)

Um dos primeiros desafios no uso terapêutico de peptídeos assenta nas **características** dos mesmos: digestão por proteases (comprometendo a via de administração oral), incapacidade de passar a barreira hemato-encefálica (comprometendo a atuação no Sistema Nervoso Central), e perfis de absorção, distribuição, metabolismo e excreção desfavoráveis levando a um baixo tempo de meia vida *in vivo*. Ou seja, quase todas as toxinas requerem **manipulação química** para contrariar estes aspetos. Isto aumenta os custos e tempo inerentes ao desenvolvimento. (8) Temos, como exemplo, o peptídeo sintético ShK-186 (derivado do ShK produzido por uma anémone), cujo desenvolvimento chegou à fase dos ensaios clínicos. O peptídeo modificado é mais específico que o original, e consegue bloquear os canais de potássio Kv1.3 que modulam a ativação das células T em doenças autoimunes. (29)

A química medicinal também é usada com o objetivo de determinar exatamente qual é a porção do peptídeo responsável pelo seu efeito (o farmacóforo), para que seja possível reduzir a estrutura até à molécula mais pequena possível. (8)

A característica mais notável das toxinas também poderá ser a que limita o seu uso: a sua elevada **especificidade** para determinados alvos. A sua utilização só será relevante se este alvo for determinante para a progressão de uma dada patologia. Para além disto, a maioria das doenças não envolve só um mecanismo – apesar de o alvo ser relevante, pode não desempenhar um papel suficientemente importante e que influencie a doença no geral. Este alvo também tem de ser específico do processo patológico, ou seja, não deve fazer parte de outros processos fisiológicos ou poderá ser responsável por efeitos adversos.

Este problema levou à falha de um enorme número de ensaios clínicos baseados em toxinas. Temos, por exemplo, os estudos focados na  $\omega$ -conotoxina e na  $\alpha$ -conotoxina. O



ziconotide despertou o interesse noutros conopeptídeos com potenciais efeitos terapêuticos, mas no entanto estes últimos revelaram-se pouco eficazes ou demasiado tóxicos em certas concentrações. Ambas ficaram aquém do esperado durante os ensaios clínicos, e os estudos foram suspensos.

No entanto, o contrário também pode acontecer: a especificidade da toxina pode ser precisamente a solução para o problema. Por exemplo, o gene *SNC9A* codifica uma subunidade do canal de sódio  $Na_v1.7$ , bloqueado seletivamente por um peptídeo (*Ssm6a*) isolado de um centípede. Este canal está associado à percepção da dor, e o uso do *Ssm6a* enquanto analgésico tem mostrado efeitos promissores em modelos animais.

Os venenos têm ainda de combater, segundo Harvey, o chamado problema “**melhor que os Beatles**”. Ou seja, os novos fármacos em desenvolvimento têm de competir com outros medicamentos já largamente estudados e usados, com elevada taxa de eficiência e eficácia *in vivo*, para além de já estarem bem integrados no mercado.

A dimensão que estes estudos atingem, as implicações e os potenciais usos terapêuticos exigem um **plano estruturado** de abordagem e um grande financiamento. Várias pequenas empresas focadas nestes estudos acabaram por fechar, deixando os estudos incompletos: a Teralpha, Cognetix, Ophidia Products, entre outras. (9)

## 6. O PROJECTO VENOMICS

O projeto **Venomics** foi criado precisamente com o propósito de ultrapassar esta lacuna organizacional, identificada e discutida pela *International Society on Toxinology* (IST) ao longo de vários anos. Implicou a colaboração de laboratórios académicos e de indústrias de biotecnologia distribuídas por todo o mundo, assim como a criação da Fundação do Projeto Venomics de modo a obter os fundos necessários. (30)

O projeto tinha de passar por todas as áreas já mencionadas: genómica, proteómica, transcriptómica, bioensaios e bases de dados. Também não foi feito com o propósito de se centrar apenas num filo ou género – o objetivo era



Figura 7: logotipo do projeto Venomics

construir a maior e mais variada coleção *in vitro* de peptídeos venenosos, e, ainda, que essa coleção fosse feita de maneira a poder ser sujeita a *screening* de possíveis *drug leads*.

O projeto foi dividido em quatro fases:

- Recolha das amostras de veneno pela CEA (*French Alternative Energies and Atomic Energy Commission*)
- Construção da base de dados de sequências peptídicas, através da junção da análise transcriptómica (pela *Sistemas Genómicos*, em Espanha) com a proteómica (pela *Universidade de Liège*, na Bélgica)
- Obtenção da coleção de peptídeos através de síntese química (pela CEA) e recombinação génica (*NZYTech*, em Portugal, e *Universidade de Marseille*, em França)
- *Drug development* baseado no *screening* dos peptídeos retirados da base de dados (pela *Zealand Pharma* na Dinamarca, pela *Universidade Católica de Leuven* na Bélgica e pela CEA em França) (3)

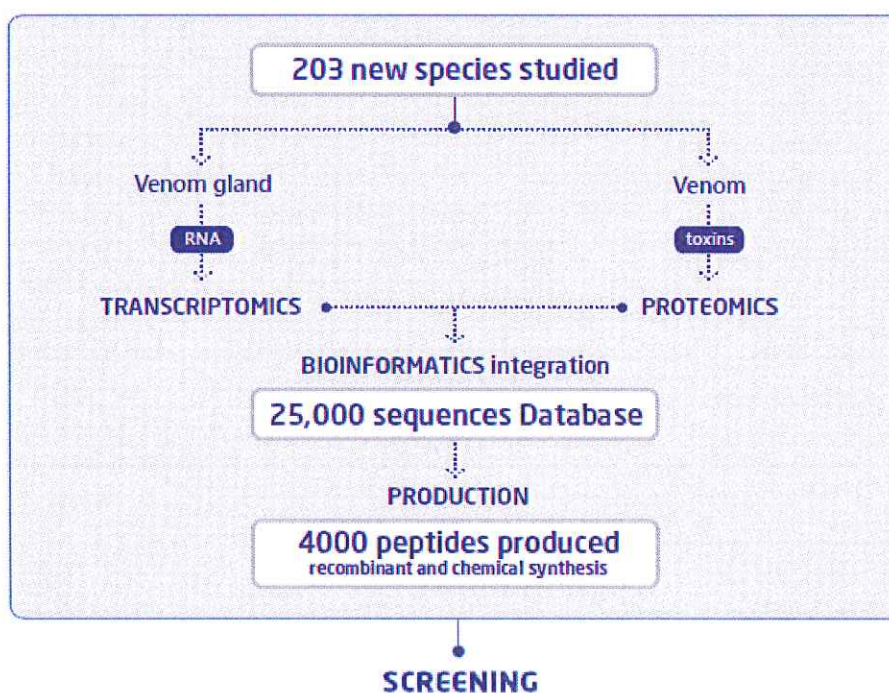


Figura 8: esquema geral do projeto Venomics (33)

Os animais estudados incluíram serpentes, escorpiões, aranhas, caracóis de cone, alforrecas, anémonas, peixes, formigas, lagartos, polvos, abelhas, etc.

As **abordagens clássicas** ao estudo dos venenos - apoiadas em bioensaios e de baixo rendimento (*low-throughput*) - foram completamente abandonadas. Para além de não conseguirem englobar a complexidade dos venenos, eram apropriadas apenas para o estudo

dos venenos de animais relativamente grandes. Cerca de 90% dos animais venenosos tem menos de 1 cm de comprimento – para os estudar, era necessário usar as metodologias de *high-throughput* brevemente descritas nesta monografia. (30)

Foi necessário adaptar **diferentes protocolos** para essas metodologias de modo a conseguir analisar corretamente tanto toxinas pequenas (provenientes de caracóis de cone, insetos e aranhas) como toxinas maiores (serpentes e escorpiões). Da mesma maneira, também tiveram de ser adaptados consoante o tamanho das amostras.

Dois anos e meio após o início do projeto em 2011, já tinham sido feitas 90 análises transcriptómicas e 30 análises proteómicas, num total de 120 venenos analisados. (3)

No final, obteve-se uma **base de dados** de sequências peptídicas validadas tanto por análises transcriptómicas como por proteómicas.

A estrutura primária não traz qualquer informação sobre a atividade da proteína – era necessário sintetizar *in vitro* os peptídeos codificados para se poder inferir sobre a sua atividade a partir da sua estrutura e de ensaios.

Foi usada a síntese química para as toxinas pequenas (menos de 35 aminoácidos), e a recombinação genética (de colónias de *Escherichia coli*) para as toxinas maiores. (30)

A **produção** em grande escala, para além de ser um desafio em si, envolvia o problema das modificações pós-translacionais e de como assegurar que a estrutura 3D ativa dos peptídeos era construída da maneira correta. Assim, foram selecionadas apenas as toxinas com menos de 120 aminoácidos e ligadas por 1 a 9 pontes de dissulfureto. Os métodos de síntese e de *folding* foram adaptados para cada um dos grupos de estruturas proteicas, e validados com estratégias de controlo de qualidade implementadas em cada passo.

A síntese química foi feita através da técnica de **síntese peptídica em fase sólida**, usando um sintetizador automático. De seguida, procedeu-se à maturação (formação de ligações dissulfureto) e *folding* das estruturas primárias geradas. Estes protocolos foram adaptados ao número de aminoácidos e de ligações dissulfureto de cada peptídeo/proteína.

A **síntese por recombinação génica** começa com a produção sintética de genes que codifiquem os peptídeos desejados. Este passo foi feito em Portugal, pela NZYTech. De seguida, estes codões são otimizados e adaptados à expressão por *Escherichia coli*. Após serem organizados em vetores de expressão (juntamente com codões que promovem, por

exemplo, a formação de pontes dissulfureto no citoplasma), procede-se à transformação das bactérias. As sequências de DNA são analisadas para deteção de erros e todo o processo é automatizado. Este protocolo tem uma taxa de sucesso de 55%, sendo atualmente o mais rápido no mundo para este propósito.

Estando todas estas moléculas devidamente identificadas, caracterizadas, e a sua produção em formas ativas e estáveis assegurada, torna-se então mais fácil começar um **screening** direcionado para certos alvos terapêuticos. Isto tem como objetivo detetar *hits* primários, a serem confirmados por estudos posteriores. O *screening* foi feito, principalmente, através de vários ensaios de *screening* fenotípico de culturas celulares, assim como ensaios de *screening* baseado em alvos moleculares (como canais iónicos ou recetores acoplados à proteína G).

Abordaram-se os seguintes **alvos**: inflamação, obesidade, alergias e diabetes. Executaram-se 10 400 ensaios, a partir dos quais foram identificados 318 *hits* (sucesso de 3%). Destes 318, 88% foram confirmados. Esta percentagem é extremamente alta, comparada com os *screenings* de bibliotecas peptídicas normais: sucesso de 0,04% com confirmação de 50%. Aqui, a coleção construída pelo projeto Venomics demonstrou ser 100 vezes mais eficiente do que as coleções usuais. Os *hits* confirmados irão prosseguir com o processo de desenvolvimento, esperando-se que atinjam resultados favoráveis.

Para além disto, a biblioteca poderá ser explorada por empresas privadas, mostrando aqui conter bastante potencial comercial. Também representa uma enorme inovação a nível académico, sendo uma oportunidade única para o estudo de proteínas e sequências previamente desconhecidas para além de poder ajudar a elucidar os processos evolutivos associados aos animais venenosos.

Aquando da sua apresentação final em outubro de 2015, em Paris, o projeto Venomics constituía a maior e mais completa base de dados em todo o mundo – englobando 203 animais venenosos, 218 transcriptomas e 170 proteomas completos, gerando um banco de 25 000 sequências de toxinas animais. A coleção de cerca de 3600 toxinas produzidas é a maior e mais diversificada no mundo, incluindo proteínas de diversas famílias, tamanhos, conteúdo em cisteína e diversidade de modificações pós-translacionais. (22)

Em 2014, em Lisboa, a citação seguinte terminou uma das muitas apresentações do projeto Venomics: “na natureza existem muitas chaves que podem ajudar a descobrir o

Santo Graal da *Drug Discovery* do século XXI: e será no veneno dos animais que se espera encontrar a solução para otimizar a saúde do Homem num futuro próximo”. (3)

## 7. BIBLIOGRAFIA

- (1) Global , regional , and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death , 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013 - **Europe PMC Funders Group**. 385:9963 (2015) 117–171. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61682-2.Global.
- (2) UTKIN, YURI - Animal venom studies: Current benefits and future developments. 6:2 (2015) 28–34. doi: 10.4331/wjbc.v6.i2.28.
- (3) ALMENDRAL, GRAZIELLA; BENTUÉ, MELANIA - Animal's venoms to improve human health: A new approach , promising results. **PRESENTATION OF THE EUROPEAN VENOMICS PROJECT RESULTS**. 2014).
- (4) DURBAN, Jordi; DUCANCEL, Frédéric; VERDNAUD, Marion - Transcriptomics and venomics- implications for medicinal chemistry. 6:2014) 1629–1643.
- (5) MCCLEARY, Ryan J. R.; KINI, R. Manjunatha - Non-enzymatic proteins from snake venoms : A gold mine of pharmacological tools and drug leads. **Toxicon**. . ISSN 0041-0101. 62:2013) 56–74. doi: 10.1016/j.toxicon.2012.09.008.
- (6) VYAS, Vivek Kumar *et al.* - Therapeutic potential of snake venom in cancer therapy : current perspectives. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. . ISSN 2221-1691. 3:2 (2013) 156–162. doi: 10.1016/S2221-1691(13)60042-8.
- (7) ‘ Venomics ’ or The venomous systems genome project - **Toxicon** 47. 47:2006) 255–259. doi: 10.1016/j.toxicon.2005.12.010.
- (8) BRUST, Andreas; JIN, Ai-hua; LEWIS, Richard J. - Cone Snail venomics: from novel biology to novel therapeutics. 6:2014) 1659–1675.
- (9) HARVEY, Alan L. - Toxins and drug discovery. **Toxicon**. . ISSN 0041-0101. 92:2014) 193–200. doi: 10.1016/j.toxicon.2014.10.020.

- (10) ITIS - Integrated Taxonomic Information System - **Taxonomy and Nomenclature: Serpentes** [Em linha] [Consult. 29 jun. 2016]. Disponível em WWW:<URL:[http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=174118](http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=174118)>.
- (11) ITIS - Integrated Taxonomic Information System - **Taxonomy and Nomenclature: Elapidae** [Em linha] [Consult. 29 jun. 2016]. Disponível em WWW:<URL:[http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=174348](http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=174348)>.
- (12) COIN, Patrick - *Dendroaspis viridis*. [s.d.].
- (13) The National Geographic Society - **The Black Mamba** [Em linha] [Consult. 30 jun. 2016]. Disponível em WWW:<URL:<http://animals.nationalgeographic.com/animals/reptiles/black-mamba/>>.
- (14) ITIS - Integrated Taxonomic Information System - **Taxonomy and Nomenclature: Dendroaspis** [Em linha] [Consult. 30 jun. 2016]. Disponível em WWW:<URL:[http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=700211](http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=700211)>.
- (15) OSIPOV, Alexey; UTKIN, Yuri - Effects of Snake Venom Polypeptides on Central Nervous System. 2012) 315–328.
- (16) HARVEY, Alan L. - Twenty years of dendrotoxins. 39:2001).
- (17) HARVEY, A. L.; ROBERTSON, B. - Dendrotoxins : Structure-Activity Relationships and Effects on Potassium Ion Channels. 2004) 3065–3072.
- (18) ANDERSON, A. J.; HARVEY, A. L. - Effects of the potassium channel blocking dendrotoxins on acetylcholine release and motor nerve terminal activity. 1985:September 1985 (1988) 215–221.
- (19) STOCKER, Martin - **Molecular Neurobiology of Potassium Channels** [Em linha] [Consult. 13 jul. 2016]. Disponível em WWW:<URL:<https://www.ucl.ac.uk/npp/research/ms>>.
- (20) PINEDA, Sandy S. *et al.* - Spider venomics: implications for drug discovery. 6:2014) 1699–1714.

- (21) KAAS, Quentin; CRAIK, David J. - *Bioinformatics-Aided Venomics*. 2015) 2159–2187. doi: 10.3390/toxins7062159.
- (22) GILLES, Nicolas - *VENOMICS Report Summary*. [s.d.] 1–12.
- (23) PRASHANTH, Jutty Rajan; LEWIS, Richard J.; DUTERTRE, Sébastien - Towards an integrated venomomics approach for accelerated conopeptide discovery. 60:2012) 470–477. doi: 10.1016/j.toxicon.2012.04.340.
- (24) **Glossário (Nature)** - [Em linha] [Consult. 11 jun. 2016]. Disponível em WWW:<URL:[http://www.nature.com/nrg/journal/v6/n11/glossary/nrg1709\\_glossary.html](http://www.nature.com/nrg/journal/v6/n11/glossary/nrg1709_glossary.html)>.
- (25) SHENDURE, Jay; JL, Hanlee - Next-generation DNA sequencing. 26:10 (2008) 1135–1145. doi: 10.1038/nbt1486.
- (26) WU, Yan; ENGEN, John R.; HOBBS, William B. - Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) Further Improves Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry. 2006). doi: 10.1016/j.jasms.2005.10.009.
- (27) Mass spectrometry in toxinology : A 21st-century technology for the study of biopolymers from venoms - 47:2006) 609–613. doi: 10.1016/j.toxicon.2006.01.013.
- (28) MARÍA, José et al. - Snake venomomics and antivenomics : Proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. **Journal of Proteomics**. . ISSN 1874-3919. 72:2 (2009) 165–182. doi: 10.1016/j.jprot.2009.01.008.
- (29) HARVEY, Alan L. - Recent Studies on Dendrotoxins and Potassium Ion Channels. 28:1 (1997) 7–12.
- (30) GILLES, Nicolas; SERVENT, Denis - The European FP7 Venomomics Project. 6:2014) 1611–1612.
- (31) GILLES, Nicolas - *Venomomics results. Final brochure*. [s.d.].

Imagem da capa por Greg Hume (“Jameson's Mamba at the Cincinnati Zoo”)