

Corpo Editorial

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

Está é a 16ª Edição do Boletim Eletrônico da SBTx.

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

Contribuições e sugestões ao boletim serão sempre bem-vindas!

Abraços,

Denise, Matheus, Gisele, Luis e Inácio

NESTE VOLUME

- EDITORIAL
- COMENTÁRIO SOBRE TRABALHO DE IMPACTO EM TOXINOLOGIA
- SBTx JOVEM
- COMO CONTRIBUIR PARA O TOXINSIGHTS
- AGENDA DE EVENTOS

EDITORIAL

Prezados Colegas,

Novo ano e nova diretoria da SBTx!

Nós - Denise, Matheus, Gisele, Luís Roberto e Inácio - já estamos trabalhando com afinco como chapa eleita em 2015 para dirigir a SBTx. Como apontado em nossa proposta de chapa, pretendemos atuar como uma diretoria de transição, incentivando os jovens toxinologistas a assumirem a nossa querida Sociedade Brasileira de Toxinologia.

A diretoria, nestes três primeiros meses de gestão, atuou em várias frentes, sendo que questões formais como registro da ata da assembleia de 2015 e transferência bancária, com a titularidade da nova diretoria, já foram concluídas.

Como acordado na Assembleia Extraordinária de novembro de 2015, a diretoria da SBTx encaminhou à CAPES uma moção de apoio ao edital CAPES de Toxinologia, redigida pelos coordenadores de projetos ligados ao programa. Em resposta, a CAPES informou que uma vez que os projetos aprovados no Edital Toxinologia 2011 ainda se encontram vigentes, um novo edital poderá somente ser lançado, talvez, em 2017. Ainda atendendo a resoluções da Assembleia, a tesouraria entrou em contato com todos os associados inadimplentes e com isso já temos atualizado o quadro de sócios ativos da SBTx.

Nestes primeiros meses de 2016, participamos de vários eventos, como o da sanção do PLC 77/20 que instituiu o Código Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação, e que ocorreu em 11/01/2016 no Palácio do Planalto em Brasília. A Dra Mariana Castro nos representou nesta solenidade. A SBTx, representada pelo Dr. Inácio Junqueira de Azevedo, também esteve presente na reunião ocorrida na sede da SBPC em São Paulo para debater a proposta de

Estratégia Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação (Encti) 2016-2019, junto com o Secretário de Políticas e Programas de Pesquisa e Desenvolvimento do MCTI.

Ainda participamos nas reuniões da organização do próximo congresso da FeSBE que ocorrerá em agosto de 2016 em Foz do Iguaçu. E por falar em evento, já estamos pensando no nosso próximo Congresso que deverá acontecer no primeiro semestre de 2017, em Natal. Reservem suas agendas!

Neste novo volume do nosso boletim, como sempre, vocês encontrarão comentário sobre artigo científico, informações sobre eventos, cursos e notícias da SBTx Jovem.

Boa leitura!



Assembleia extraordinária da SBTx, em novembro de 2015.
Foto: Dr Rafael Porto, Instituto Butantan

NOTAS DE IMPACTO

Comentário sobre o artigo feito pelas Dras. Suely Gomes de Figueiredo e Juliana Barbosa Coitinho, professoras do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, Laboratório de Química de Proteínas (LQP).

Stonefish toxin defines an ancient branch of the perforin-like superfamily

Ellisdon, A.M. *et al*, 2015, PNAS, v.112, no 50, 2015

Os peixes representam mais da metade das espécies dos vertebrados venenosos e frequentemente estão envolvidos em acidentes humanos. No entanto, as peçonhas destes animais são comparativamente menos estudadas que as de outros organismos, provavelmente devido à dificuldade de obter os espécimes, mas principalmente à natureza lábil de seus componentes que é característica inerente destes venenos. Os peixes marinhos escorpeniformes são os mais venenosos, de acordo com a morfologia de seu aparato venenoso, que consiste de espinhos dorsais e anais onde estão contidas glândulas ou células produtoras do veneno, são classificados em três gêneros: *Synanceia* (peixe pedra) mostrado na Figura 1A, *Pterois* (peixe leão), *Scorpaena* (peixe escorpião).

Os sintomas mais pronunciados do envenenamento por estes peixes são a dor excruciante, edema persistente, e, dependendo da espécie, podem ocorrer também desordens cardiorrespiratórias, como distúrbios eletrocardiográficos, arritmias, taquicardia, hipotensão e dificuldades respiratórias. Apesar de severos, os sintomas do envenenamento raramente são fatais. Dados da literatura sugerem que os efeitos cardiovasculares e inflamatórios destes venenos podem ser atribuídos à ação de uma única proteína, com atividade hemolítica/citolítica, denominada "fator letal" ou "citolisina multifuncional".

As citolisinas stonustoxin (SNTX), trachynilysin (TLY) e *S. plumieri* cytolytic toxin (Sp-CTx) já foram isoladas do veneno dos peixes *Synanceia horrida*, *S. trachynis* e do peixe escorpião brasileiro *Scorpaena plumieri* respectivamente. Estas apresentam alta massa molecular e natureza dimérica. SNTX é um heterodímero de ~150 kDa formado por duas subunidades (SNTX- α e SNTX- β), e, como TLY e Sp-CTx, induz atividade hemolítica por um aparente mecanismo de formação de poro, mecanismo esse relativamente raro em eucariotos.

Este artigo traz avanços significativos na caracterização da estrutura da stonustoxin (SNTX), o fator letal da peçonha do peixe pedra (*Synanceia horrida*). Supreendentemente, os autores mostraram que esta toxina pertence a um ramo da superfamília "perforin-like". A estrutura tridimensional da SNTX foi determinada por cristalografia de raios X (resolução de 3,1 Å) mostrada na figura 1B. O modelo cristalográfico confirmou sua natureza heterodimérica e permitiu aos autores inferirem que a SNTX é membro de uma superfamília de proteínas formadoras de poros.

Para avaliar a presença de domínios com funções conhecidas, foi realizada uma pesquisa por similaridade estrutural que revelou a presença de quatro domínios em cada membro do heterodímero: (i) Domínio N-terminal MACPF/CDC (resíduos 1-265) homólogo ao complexo perforina de ataque à membrana/citolisina dependente de colesterol ("*Membrane Attack Complex-Perforin/Cholesterol-Dependent Cytolysin*"). Este domínio é encontrado em várias espécies e representa uma superfamília de toxinas formadoras de poros; (ii) Domínio FAT (resíduos 266-385) com alta similaridade estrutural com o

domínio FAT (“*focal adhesion-targeting*”) da cinase-1 de humanos. Este é encontrado em várias proteínas e desempenha um papel na montagem de complexos de sinalização; (iii) Domínio THX (resíduos 386-517), com alta similaridade estrutural com a tioredoxina-3 (THX-3) de *Saccharomyces cerevisiae*, mas que, em SNTX, não possui os resíduos catalíticos, o que sugere um papel estrutural e (iv) Domínio C-terminal (resíduos 518-703) que é similar ao domínio PRYSPRY membro da família motivo tripartido (TRIM) que participa do reconhecimento imune em bactérias e vírus intracelulares. Este domínio na SNTX tem localização distal ao domínio MACPF/CDC (Figura 1B).

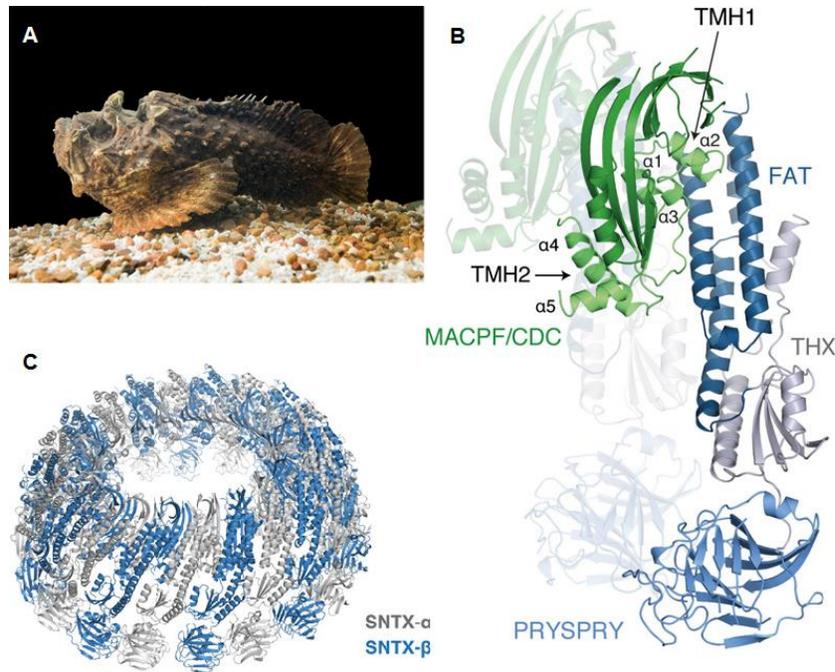


Figura 1. O peixe pedra (*Synanceia horrida*) possui nos seus espinhos um fator letal, a stonustoxin (SNTX). **(A)** O peixe *S. horrida* destacando seus espinhos dorsais. **(B)** Estrutura tridimensional de SNTX evidenciando os domínios MACPF/CDC, FAT, THX, PRYSPRY e os dois grupos de hélices transmembranas TMH-1 e TMH-2. **(C)** Modelo do pré-poro de SNTX calculado por extrapolação da simetria rotacional interna de 18° entre as subunidades SNTX- α e SNTX- β . (Adaptado do próprio artigo - Ellisdon, A.M. et al, 2015).

A análise estrutural revelou que as subunidades (α e β) interagem paralelamente ao longo de seu eixo longitudinal e permitiu definir as bases moleculares do mecanismo funcional de SNTX.

A presença do domínio MACPF/CDC sugeriu que, semelhante às proteínas MACPF/CDC, SNTX forma um grande poro oligomérico supramolecular nas membranas. Usando microscopia eletrônica de transmissão, os autores obtiveram evidências diretas que a SNTX forma poros grandes de formato anelar em eritrócitos de coelho. Tomados conjuntamente, estes dados permitiram aos autores classificar esta toxina como uma genuína proteína formadora de poros da superfamília MACPF/CDC. O domínio MACPF/CDC na SNTX consiste de uma folha- β antiparalela com quatro fitas ($\beta 1 \rightarrow 4$) altamente torcidas que empacotam dois grupos de α -hélices denominados hélices transmembranas TMH 1 e 2 (Figura 1B).

A análise da distribuição superficial mostrou uma complementaridade de cargas na interface das fitas $\beta 4$ e $\beta 1$ dos domínios MACPF/CDC nos monômeros SNTX- α (carregada positivamente) e - β (carregada

negativamente), com formação de uma grande e contínua folha- β entre as subunidades. Este arranjo está de acordo com a complementaridade entre monômeros de MACPF/CDC descritos para outras perforinas, que direcionam eventos iniciais de oligomerização para a formação do poro, ou seja, a montagem do pré-poro.

Os autores ainda sugeriram que o domínio PRYSPRY (Figura 1B) das subunidades é o responsável pela interação inicial da SNTX com uma superfície celular. De forma consistente com essa função, na estrutura de SNTX, esse domínio situa-se em sua base exposta ao solvente, em posição análoga aos domínios Ig e C2 de CDC e perforinas, que medeiam as interações proteína-proteína e proteína-lípido no reconhecimento de patógenos em proteínas imune TRIM.

A análise estrutural da forma dimérica da SNTX forneceu uma visão do mecanismo da montagem do pré-poro da SNTX. De acordo com os autores, o evento de oligomerização requer interações entre a interface das subunidades beta de uma SNTX com a alfa da parceira e uma simetria rotacional de 18° é necessária para o alinhamento completo destas subunidades. Quando extrapolada, a simetria rotacional evidencia a formação de um pré-poro com 20 subunidades SNTX, ou seja, um pré-poro com 10 heterodímeros SNTX- α/β que se alinham ao longo de um plano horizontal, cujos diâmetros interno e externo concordam com as imagens do poro de SNTX em eritrócitos de ratos. Semelhante ao que ocorre entre as subunidades ($\alpha - \beta$), a oligomerização é dirigida por complementaridade de cargas das superfícies que interagem.

Algumas mudanças conformacionais na SNTX foram sugeridas pelos autores para possibilitar a oligomerização dos heterodímeros. A interação entre os domínios MACPF/CDC leva ao estiramento das hélices nas regiões transmembranares (TMH-1 e -2) permitindo a formação de uma folha- β contínua que constitui o β -barril do poro (Figura 1C). Além disto, o modelo proposto mostrou somente poucos confrontos estéricos entre os heterodímeros, sendo necessário para a montagem do pré-poro apenas um rearranjo em um *loop* existente entre SNTX- β e uma hélice do feixe TMH-2 de SNTX- α . Consistente com essa alteração conformacional, estudos prévios de mutagênese em região equivalente ao *loop* mostraram que a mobilidade dessa região é essencial para a formação inicial do dímero estável e, conseqüentemente, dos eventos de oligomerização subsequentes.

Os autores também mostraram por meio de análises de sequência e filogenéticas que proteínas SNTX-*like* foram identificadas em uma ampla variedade de espécies venenosas e não venenosas representando um terceiro ramo extenso e antigo da superfamília de proteínas MACPF/CDC. Isso sugere um papel ancestral comum de SNTX além do conhecido no veneno secretado, como, por exemplo, algum papel imunológico devido à presença do domínio PRYSPRY.

Portanto, esse artigo revelou de forma muito interessante não somente a estrutura tridimensional do heterodímero SNTX, mas também demonstrou pela primeira vez, evidência direta de que esta toxina é formadora de poros, estabelecendo o arranjo estrutural para a formação desse poro. Além disso, os autores sugerem a possibilidade de que SNTX forme poros em células de uma variedade de tecidos, podendo esta propriedade estar associada com várias conseqüências fisiológicas do envenenamento como atividade hemolítica, edema, aumento da permeabilidade vascular e dano muscular. Esta última sugestão está de acordo com dados da literatura descritos para as toxinas TLX e Sp-CTx. O reconhecimento de que as toxinas SNTX-*like* possuem o domínio MACPF/CDC, formador de poros, fornece bases experimentais para estudos futuros com outras toxinas encontradas em espécies de peixes relacionadas e de outros vertebrados.

SBTx JOVEM



Março 2016 - nº 16

Toxinologia em Foco: Sistema CRISPR-Cas9 e a edição de genomas

O termo CRISPR é a abreviação de *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, ele representa um grupo específico de regiões do DNA com sequências palindrômicas e repetidas, e a palavra Cas9 se refere a uma nuclease guiada por RNA (CRISPR Associated protein 9). Este mecanismo faz parte do sistema imune adaptativo microbiano que tem como função a remoção de material genético de patógenos do seu genoma. A habilidade da enzima Cas9 de cortar regiões específicas de DNA é consequência do pareamento de sua molécula de RNA guia com uma região complementar no DNA.

A manipulação da sequência de nucleotídeos do RNA guia possibilita que a ação da Cas9 seja direcionada a um determinado ponto de interesse. Uma vez realizada a quebra nas duas fitas de DNA, o sistema de reparo de DNA é acionado e é neste ponto em que ocorre a "edição" da sequência de nucleotídeos. A partir deste momento o reparo das moléculas de DNA podem seguir dois caminhos: reparo por *nonhomologous end join* (NHEJ) ou por *homology-directed repair* (HDR). O reparo por NHEJ é uma via com maior propensão a erros por consequência da ausência de *template* para o reparo, logo o processo deixa "cicatrices" na forma de mutações por inserção ou deleção. O método HDR apresenta alta fidelidade por usar um molde para o reparo do DNA, possibilitando a inserção de sequências no local desejado. De forma resumida, o sistema CRISPR-Cas9 permite edições que vão desde modificações pontuais à inserção de novas sequências.

Apesar de promissora, a aplicação desta tecnologia em certos modelos é permeada por questões éticas e morais. Tal discussão se amplificou com a publicação em maio de 2015, na revista *Protein & Cell*, por um grupo que utilizou a tecnologia CRISPR para editar um gene em embriões humanos. Entretanto, esta técnica também pode ser utilizada em modelos de estudos com regimentos ético e científico definidos, por exemplo, no desenvolvimento de linhagens celulares com alterações em algum gene chave que permita a elucidação do mecanismo de ação e/ou aplicação de toxinas animais como agentes terapêuticos.

Para saber mais:

<https://www.broadinstitute.org/what-broad/areas-focus/project-spotlight/crispr-timeline>

Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 8(11), 2281–2308. <http://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>

Liang, P. (2015). CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human trippronuclear zygotes. *Protein & Cell*. <http://doi.org/10.1007/s13238-015-0153-5>

Participe do próximo boletim: sugestão de temas.

sbtxjovem@butantan.gov.br

sbt.org.br / (n) 2627-9427

www.facebook.com/pages/SBTx

Fique Ligado!

✓ 45ª. Reunão Anual da SBBq
18 - 21/06/2016 - Natal - RN
<http://www.sbbq.org.br/reuniao/2016/>

✓ XVIII Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular
13 - 16/07/2016 - São Paulo - SP
<http://www.sbbc.org.br/xviii-congresso-da-sbbc/>

✓ Curso Introdução à Imunobiologia
Instituto Butantan, São Paulo - SP
4 - 8/04/2016
<http://www.butantan.gov.br/educacao/cursos/Paginas/default.aspx>

✓ Curso de Biologia Marinha - Arraial do Cabo - RJ
10 - 12/06/2016
<http://irvambiental.com.br/cursos/em-andamento/curso-de-biologia-marinha-2016/?v=7516fd43adaa>

BOLETIM ELETRÔNICO

Conteúdo e como contribuir com material para divulgação

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

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

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

- Anúncios de eventos;

- Anúncios de patrocinadores.

AGENDA DE EVENTOS

CONGRESSOS E CURSOS INTERNACIONAIS

68ª Reunião Anual da SBPC

Julho, 3 a 9, 2016

Porto Seguro, BA

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

Gordon Research Conference - Microbial Toxins & Pathogenicity

Julho, 10-15, 2016

Waterville Valley, NH, EUA

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

XXXI Reunião Anual da FeSBE

Agosto, 29 a 1º de setembro de 2016

Foz do Iguaçu, PR

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

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

Setembro, 18 a 23, 2016

Miami Beach, FL, EUA

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

10th International Conference on Toxic Cyanobacteria

Outubro, 23-28, 2016

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