UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E BIOLOGIA EVOLUTIVA

ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA DAS GLÂNDULAS DE
VENENO DA *MICRURUS CORALLINUS* (COBRA-CORAL)
E IDENTIFICAÇÃO DE CANDIDATOS ANTIGÊNICOS
PARA UM ANTI-SORO ALTERNATIVO

LUCIANA IWANAGA LEÃO

SÃO PAULO
2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E BIOLOGIA EVOLUTIVA

ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA DAS GLÂNDULAS DE
VENENO DA *MICRURUS CORALLINUS* (COBRA-CORAL)
E IDENTIFICAÇÃO DE CANDIDATOS ANTIGÊNICOS
PARA UM ANTI-SORO ALTERNATIVO

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo,
para a obtenção de Título de Mestre em
Ciências, na Área de Genética e Biologia
Evolutiva.

Orientador: Dr. Inácio de Loiola Meirelles
Junqueira de Azevedo

LUCIANA IWANAGA LEÃO

SÃO PAULO

2008

Leão, Luciana I.

Análise transcriptômica das glândulas de veneno de *Micrurus corallinus* (cobra-coral) e identificação de candidatos antigênicos para um anti-soro alternativo

127 p.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. *Micrurus corallinus* 2. Anti-soro antielapídico 3. Transcriptoma I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr.(a).

Orientador(a)

À minha mãe, Yako, e a meu pai, Luiz

Aos meus irmãos, Cris e Du

E ao meu querido Marcelo

Ever tried. Ever failed.

No matter.

Try again. Fail again.

Fail better.

—Samuel Beckett, *Worstward Ho*

Non est ad astra mollis e terris via.

—Sêneca, *Hercules Furens*

Au milieu de l'hiver, j'ai découvert en moi un invincible été.

—Albert Camus, *Noces à Tipasa*

Agradecimentos

Ao *Dr. Inácio de L. M. Junqueira de Azevedo*, que me ensinou a correr atrás dos meus objetivos. Sua orientação, neste trabalho, garantiu que eu aprendesse a ser uma pesquisadora independente. Agradeço a oportunidade de ter trabalhado com toxinas de animais no Instituto Butantan e ter feito parte desse campo tão promissor.

Ao *Dr. Paulo Lee Ho*, pela biblioteca de cDNA de *Micrurus corallinus*. Sem ela, esse projeto não teria acontecido.

Ao *Dr. Geraldo Magalhães*, pelo esforço despendido para me ajudar com as transfecções.

Aos *colegas de laboratório e técnicos*, que direta ou indiretamente me ajudaram em algum momento do meu projeto. Agradeço especialmente à *Débora e Ágatha*, que me ajudaram muito nesse último ano do projeto, e ao *Enéas de Carvalho*, por todos os conselhos metodológicos.

Aos meus grandes amigos *Henrique Ramos, Vivian Hashimoto, Patrícia Diniz e Erika Nakajima*, pela amizade incondicional. Ao *Rico e Vivis*, obrigada também pela ajuda nas imunizações e nas sangrias.

Ao *Giuseppe Puorto*, pela grande amizade e pelas aulas sobre serpentes e animais peçonhentos. Aprendi a ter outro olhar para esse mundo herpetológico. Obrigada.

À minha família, pelo carinho e preocupação em todos os momentos da minha vida. Ao meu pai, *Dr. Luiz Eduardo V. Leão*, por me compreender e me aconselhar sempre com as palavras de quem entende de ciência e pesquisa. À minha mãe, *Yasuko*, por me ajudar e ter paciência com a bagunça que ficou a sala de estar dela.

Ao meu querido *Marcelo Yamashita Salles*, que me ajudou em todos os momentos desde que estamos juntos. Agradeço seu companheirismo, a tolerância e os ombros para chorar. Obrigada por estar ao meu lado nos momentos mais difíceis, especialmente nesse final de projeto. Obrigada por usar grande parte do seu tempo para editar a minha dissertação e deixá-la mais do que perfeita. Sem você, esse trabalho não se concretizaria. Obrigada, Má.

Ao *Instituto Butantan*, que me acolheu e me ajudou nesses quatro anos em que estive trabalhando nele.

À *FAPESP, CNPq e Fundação Butantan* pelo suporte financeiro.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1 SERPENTES PRODUTORAS DE VENENOS.....	9
1.2 COBRAS-CORAIS (GÊNERO <i>MICRURUS</i>).....	11
1.3 VENENO DE COBRAS-CORAIS.....	15
1.3.1 Ações do veneno.....	15
1.3.2 Ação Neurotóxica e Miotóxica.....	15
1.3.3 Ação Hemorrágica.....	16
1.3.4 Ação Cardiovascular.....	16
1.3.5 Componentes do veneno.....	17
1.3.6 Envenenamento por cobras-coraís.....	19
1.3.7 Epidemiologia.....	21
1.4 SOROS ANTIVENENO DE SERPENTES.....	23
1.4.1 Histórico.....	23
1.4.2 A produção do soro antielapídico.....	24
1.5 IMUNIZAÇÃO GENÉTICA OU VACINA DE DNA.....	26
1.6 TRANSCRIPTOMAS DE GLÂNDULAS DE VENENOS.....	27
2. OBJETIVOS.....	30
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 PREPARO DE FAGOS PARA GERAÇÃO DE ESTS.....	31
3.1.1 Biblioteca de <i>Micrurus corallinus</i> (fago λ gt11D).....	31
3.1.2 Preparação da bactéria <i>E. coli</i> Y1088	31
3.1.3 Preparação do fago (λ gt11D-GI e λ gt11D-GII).....	31
3.1.4 Montagem das placas para fagos.....	31
3.1.5 Amplificação do cDNA contido no fago (PCR).....	32
3.1.6 Sequenciamento dos clones.....	32
3.1.7 Análise das seqüências expressas.....	33
3.2 CLONAGEM DOS CANDIDATOS ANTIGÊNICOS PARA IMUNIZAÇÃO GENÉTICA (VACINA DE DNA).....	34
3.2.1 Os candidatos antigênicos.....	34
3.2.2 Estratégia de clonagem.....	34
3.2.2.1 Desenho de primers.....	35
3.2.2.2 PCR.....	36
3.2.2.3 Clonagens em PGEM-T.....	36
3.2.2.4 Digestão com <i>Bam</i> HI e <i>Eco</i> RI.....	37
3.2.2.5 Subclonagem em pSecTag2A.....	37
3.3 PROCESSO PRÉ-IMUNIZAÇÃO GENÉTICA.....	38
3.3.1 Maxiprep dos candidatos antigênicos para imunização genética..	38
3.3.2 Transfecção de clones em células eucarióticas.....	38
3.4 IMUNIZAÇÃO DOS CANDIDATOS ANTIGÊNICOS ESCOLHIDOS.....	39
3.5 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	40
3.6 ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA	42
3.6.1 ELISA.....	42
3.6.2 Western Blot.....	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44

4.1 O TRANSCRIPTOMA.....	44
4.1.1 Banco de Seqüências.....	44
4.1.2 Análise dos cDNAs de toxinas identificados no banco de ESTs..	49
4.1.2.1 <i>Proteína de três dígitos</i>	50
4.1.2.2 <i>Fosfolipase do tipo A2</i>	52
4.1.2.3 <i>Lectinas do tipo C</i>	55
4.1.2.4 <i>Peptídeo Natriurético</i>	59
4.1.2.5 <i>L-aminoácido oxidase</i>	61
4.1.2.6 <i>Inibidor do tipo Kunitz</i>	61
4.1.2.7 <i>Metaloprotease</i>	62
4.1.2.8 <i>Serinoprotease</i>	62
4.1.2.9 <i>NGF</i>	63
4.1.2.10 <i>WAP</i>	64
4.2 IMUNIZAÇÃO GENÉTICA.....	65
4.2.1 Escolha de candidatos antigênicos a partir do transcriptoma de <i>M. corallinus</i>	66
4.2.2 Clonagem dos candidatos antigênicos para imunização genética.	69
4.2.2.1 <i>Antígeno 1 (Atg1)</i>	69
4.2.2.2 <i>Antígeno 2 (Atg2)</i>	71
4.2.2.3 <i>Antígeno 3 (Atg3)</i>	72
4.2.2.4 <i>Antígeno 4 (Atg4)</i>	73
4.2.2.5 <i>Antígeno 5 (Atg5)</i>	74
4.2.3 Transfecção preliminar de clones em células eucarióticas e <i>Western-Blot</i>	75
4.2.4 Expressão e purificação das proteínas recombinantes.....	78
4.2.4.1 <i>Candidato antigênico Atg1 (Proteína V8)</i>	78
4.2.4.2 <i>Candidato antigênico Atg2 (proteína V1)</i>	79
4.2.4.3 <i>Candidato antigênico Atg5 (Proteína V2)</i>	79
4.2.5 A imunização genética (ou vacina de DNA) em camundongos....	81
4.2.6 Análise da resposta imune.....	82
4.2.7 Imunização tripla com três candidatos antigênicos.....	87
5. CONCLUSÃO.....	91
6. RESUMO.....	92
7. ABSTRACT.....	93
8. APÊNDICES.....	94
8.1 ABREVIATURAS.....	94
8.2 ÍNDICE DE FIGURAS.....	96
8.3 ÍNDICE DE TABELAS.....	98
9. BIBLIOGRAFIA.....	99
10. BIOGRAFIA.....	110
ANEXO I.....	113

1. INTRODUÇÃO

1.1 SERPENTES PRODUTORAS DE VENENOS

Os ofídios, ou as serpentes, compõem a Subordem *Serpentes*, que atualmente apresenta cerca de 3.200 espécies. É a segunda subordem mais abundante depois de *Sauria* (lagartos e lagartixas), que possui 4.636 espécies. As serpentes fazem parte da Ordem *Squamata*, o principal e mais numeroso grupo de répteis existente. Elas são encontradas em quase todo o mundo e habitam regiões temperadas e tropicais, pela sua dependência do calor externo para efetuar a termorregulação.

As serpentes usam o veneno para paralisar e matar suas presas ou para se defender de predadores. Os componentes tóxicos desses venenos têm ações rápidas e seletivas muito potentes, que interferem em mecanismos fisiológicos, celulares e moleculares específicos. Cada veneno apresenta uma ação particular característica da espécie da serpente, decorrente dos tipos de toxinas que o compõem e do tipo específico de presa a que é dirigido. Entretanto, o veneno também pode agir de forma eficaz em outros alvos da dieta ou possíveis em predadores da serpente.

Dentre as mais de 3.200 espécies de serpentes existentes, apenas 420 espécies são peçonhentas, ou seja, utilizam seu veneno para caçar e são capazes de inoculá-lo (DOWLING & DUELLMAN, 1978) (Figura 1A). Essas serpentes peçonhentas se agrupam em quatro famílias:

- Família *Atractaspididae* – composta por duas subfamílias: *Aparalactinae* (de dentição opistóglifa) e *Atractaspidinae* (de aparelho inoculador semelhante à dentição solenóglifa). A subfamília *Atractaspidinae* é composta pelo gênero *Atractaspis*. O veneno dessas serpentes se caracteriza por conter sarafotoxinas de potente ação cardiotoxica e vasoconstritora, semelhante à das endotelinas.
- Família *Viperidae* – abrange as serpentes venenosas que apresentam dentição solenóglifa, ou seja, dentes inoculadores de veneno frontais e móveis. Estes dentes são ocos e é por onde passa o tubo inoculador de veneno. Uma característica principal das serpentes da Família *Viperidae* é a presença de fosseta loreal, ou seja, um órgão termorreceptor para captação do calor.

- Família *Colubridae* – algumas serpentes desta família podem ser consideradas venenosas, pois apresentam glândula produtora de veneno, apesar de terem dentição opistóglifa, ou seja, apresentarem um par de dentes posteriores por onde o veneno escorre e pode vir a ser inoculado. Por causa da posição dos dentes, essas serpentes raramente causam acidentes.
- Família *Elapidae* – composta por cerca de 300 espécies, distribuídas em 62 gêneros. Estas serpentes têm dentição denominada proteróglifa. A maxila é fixa e não permite a mobilidade dos dentes inoculadores. O veneno é caracterizado por apresentar ações neurotóxicas. Os representantes desta Família não possuem fosseta loreal (Figura1B). A esta família pertencem as cobras-corais brasileiras do gênero *Micrurus* estudadas neste projeto, e por isso ela será mais bem detalhada adiante.

Todas essas famílias pertencem à Infraordem *Caenophidia*, ou “serpentes avançadas”, um clado diverso que contém mais de 80% das espécies de serpentes do mundo (KEOGH et al., 1998).

A Família *Elapidae* está amplamente distribuída por toda a faixa intertropical do planeta (SLOWINSKI et al., 1997) e forma o principal grupo de serpentes venenosas. Elas apresentam presas e glândulas de veneno e algumas são considerados os animais mais perigosos e temidos do mundo. Porém a maioria dos elapídeos são serpentes pequenas e difíceis de serem encontradas, tais como as serpentes do gênero *Micrurus*, que se acham por toda a região da América.

Duas subfamílias são reconhecidas: *Elapinae* e *Hydrophiinae* (KEOGH et al., 1998). Os elapines representam aproximadamente 225 espécies de serpentes terrestres que podem ser encontradas nos trópicos e, eventualmente, nos subtropicais de algumas regiões. Nesta subfamília encontram-se as serpentes do Velho Mundo, tais como as cobras indianas (*Naja*), a cobra-rei (*Ophiophagus*), a *kraits* (*Bungarus*) e as mambas (*Dendroaspis*). Três gêneros ocorrem no Novo Mundo: *Leptomicrurus*, *Micrurus* e *Micruroides* (também denominadas cobras-corais) (CAMPBELL & LAMAR, 2004). A maioria dos elapines é ovípara, com exceção de alguns gêneros africanos e australianos vivíparos.

Os hidrofíneos são representados pelas serpentes marinhas. A subfamília contém aproximadamente setenta espécies. As serpentes marinhas podem ser encontradas nas

águas tropicais da Índia e do Oceano Pacífico Oeste. Elas apresentam algumas especializações que caracterizam as serpentes desta subfamília. Todas possuem glândula de sal ao redor da língua, que funciona como regulador osmótico. O corpo é, em geral, comprimido lateralmente, tem a cauda bastante desenvolvida, narinas com válvula de fechamento e uma série de adaptações anatômicas e comportamentais. São vivíparas e os filhotes nascem dentro da água (CAMPBELL & LAMAR, 2004).

1.2 COBRAS-CORAIS (GÊNERO *MICRURUS*)

As cobras-corais são os únicos elapídeos em toda a América. *Micrurus* é o gênero mais representativo em abundância e diversidade dos elapídeos do Novo Mundo, amplamente distribuídos e encontrados desde o sudoeste dos Estados Unidos, passando pela América Central até o centro sul da Argentina (DOWLING & DUELLMAN, 1978). Muitos dos elapídeos são encontrados na Bacia Amazônica, principalmente em regiões com baixa densidade populacional (CARDOSO et al., 2003).

Entre as serpentes venenosas, quase todas as espécies de *Micrurus* dependem de ambientes florestais. O gênero possui espécies que apresentam atividade diurna e noturna, e há as predominantemente diurnas, como a *M. corallinus* da Mata Atlântica.

As serpentes são animais ectotérmicos, isto é, sua temperatura corpórea depende da temperatura do ambiente externo. Entretanto, por meio do comportamento, são capazes de manter sua temperatura dentro de amplitudes muito menores que as variações de temperatura ambiente. Elas conseguem isso pela busca de locais adequados para se aquecer ou resfriar, e/ou pela posição e postura de seu corpo (MARQUES & SAZIMA, 1997).

As cobras-corais possuem alimentação especialista, isto é, se alimentam de um único ou poucos tipos de presas. A maioria das espécies de cobras-corais se alimenta prioritariamente de serpentes menores (especialmente colubrídeos e tiflopídeos), mas elas também podem se alimentar de gimnofionas e anfisbenas. Dessa forma, sua alimentação é denominada dieta ofiófaga e estenofágica, ou seja, alimentam-se de presas específicas, geralmente animais vermiformes, o que inclui outras serpentes (CAMPBELL & LAMAR, 2004).

Muitas espécies de serpentes possuem um padrão de cores com faixas transversais, manchas e outros desenhos. Essa estratégia lhes proporciona camuflagem e dificulta sua localização por predadores orientados visualmente. As cobras-corais, muito

venenosas, se utilizam de tática diferente: em vez de se camuflar, exibem cores vistosas. Seu colorido vivo alerta o predador para o risco que corre caso ataque a serpente. Diversas espécies de colubrídeos não venenosos (falsas-corais) imitam (mimetizam) o padrão de colorido das cobras-corais verdadeiras, uma estratégia para enganar e afastar o predador (MARQUES & SAZIMA, 1997). Os predadores aprendem, por experiência, a associar o padrão de coloração apossemática dessas serpentes com uma experiência desagradável e/ou traumática. Este esforço adaptativo garante às serpentes a proteção contra predadores que aprendem a evitar esse padrão particular de coloração.

As 61 espécies de cobras-corais atualmente reconhecidas são divididas em três gêneros: *Micrurus* (57 espécies), *Leptomicrurus* (três espécies) e *Micruroides* (uma espécie) (Figura 2). O *Micrurus* pode ser encontrado em *habitats* terrestres do sul dos EUA até o sul da América do Sul. A *Leptomicrurus* é encontrado nas regiões baixas tropicais e nas florestas úmidas amazônicas. O monotipo *Micruroides* é encontrado apenas no Deserto Sonoran no sudoeste dos EUA e no nordeste do México (SLOWINSKI, 1995).

Foram realizados diversos estudos filogenéticos desse grupo. Pesquisas bioquímicas e morfológicas evidenciaram que as cobras-corais apresentam uma relação mais próxima com outros elapídeos do que com os colubrídeos (SLOWINSKI, 1995). ROZE (1987) apresentou uma árvore filogenética de cobras-corais na qual foi a primeira publicação sobre relação entre as cobras-corais (Figura 3). A filogenia proposta por Roze inseriu o *Micruroides* como um grupo irmão de todas as outras corais, divididas em *Leptomicrurus* e *Micrurus*. O grupo seguinte deu origem a mais uma divisão: *M. mipartitus* e as outras *Micrurus*. Este último grupo foi separado em grupo Monodal (seqüência de faixas alternadas vermelha-amarela-preta-amarela-vermelha) e o grupo Triadal da América do Sul, caracterizada por uma seqüência de cores diferenciadas (vermelha-preta-amarela-preta-amarela-preta-vermelha) (SLOWINSKI, 1995).

ÁGLIFA

OPISTÓGLIFA

SOLENÓGLIFA

PROTERÓGLIFA

B

Elapidae (M. corallinus)

Viperidae (B. jararaca)

Figura 1: A) Quatro principais tipos de dentiões encontradas entre as Famílias de Serpentes *Atractaspididae*, *Viperidae*, *Colubridae* e *Elapidae*. B) Ausência da fosseta loreal nos elapídeos e comparação com os viperídeos.

Micrurus corallinus

Leptomicrurus scutiventris

Micruroides euryxantus

Figura 2: Os três gêneros principais encontrados entre as cobras-corais: *Micrurus*, *Leptomicrurus* e *Micruroides*.

Figura 3: Filogenia de cobras-corais de Roze (1987). S.A. = América do Sul.

1.3 VENENO DE COBRAS-CORAIS

1.3.1 Ações do veneno

Os dados clínicos relacionados a acidentes por corais são escassos e sugerem um grande conjunto de atividades farmacológicas. Os venenos são conhecidos por serem neurotóxicos, miotóxicos, hemorrágicos e causar efeitos cardiovasculares. Apesar da demonstração dessas atividades, somente os efeitos neurotóxicos e miotóxicos são observáveis em acidentes humanos. Além disso, o veneno dessas serpentes possui toxicidade elevada, se comparado a venenos de serpentes da Família *Viperidae*, e apresenta uma atividade proteolítica baixa, mas variável, entre as espécies e populações naturais (JORGE DA SILVA JR & BUCARETCHI, 2003).

1.3.2 Ação Neurotóxica e Miotóxica

Classicamente, sabe-se que os venenos das serpentes corais possuem neurotoxinas com dois mecanismos de ação (JORGE DA SILVA JR & BUCARETCHI, 2003):

- *Neurotoxicidade pré-sináptica* – causada por proteínas com atividade fosfolipásica. Elas atuam nas terminações axônicas e impedem a liberação de acetilcolina (ACh) na fenda sináptica da junção neuromuscular de nervos

motores, de maneira similar à β -bungarotoxina do veneno da serpente *Bungarus multicinctus*.

- *Neurotoxicidade pós-sináptica* – causada por proteínas com estrutura em três dígitos (3FTx) desprovidas de ação enzimática. Atuam por fixação competitiva nos receptores colinérgicos das membranas pós-sinápticas da junção neuromuscular de nervos motores (ação semelhante à do curare).

A ação miotóxica pode estar relacionada à ação neurotóxica, ou parcialmente mascarada por ela. Experimentalmente, a maioria dos venenos de corais é capaz de provocar mionecrose. Nos envenenamentos em humanos por corais, um quadro de mialgia pode se instalar, mas sem indicativo claro de mionecrose (JORGE DA SILVA JR & BUCARETCHI, 2003).

Na mionecrose, o sarcolema é a principal estrutura celular atingida. Uma vez que o sarcolema é afetado, um influxo de Ca^{2+} ocorre. Com a elevação do Ca^{2+} citosólico, há a hipercontração dos microfilamentos, danos mitocondriais e ativação de fosfolipases dependentes do Ca^{2+} . A presença de vesículas citoplasmáticas e alterações mitocondriais são indicadoras da degradação de fosfolipídeos por fosfolipases ativadas pelo Ca^{2+} . A ação mionecrótica experimental também foi evidenciada no veneno de várias espécies de *Micrurus* do Brasil (GUTIERREZ et al., 1992).

1.3.3 Ação Hemorrágica

Os efeitos hemorrágicos foram, inicialmente, demonstrados experimentalmente (MOUSSATCHÉ et al., 1976), mas nunca evidenciados em acidentes humanos. A presença de proporções diferentes e a diversidade de proteases nos venenos já estudados também sugerem uma ação presa-específica. Venenos de *M. brasiliensis*, *M. frontalis* e *M. lemniscatus* causam hemorragia visceral, pulmonar e subendocárdica em ratos. Uma fração (fosfolipase A2) do veneno de *M. frontalis* de ação hemorrágica foi isolada e parcialmente caracterizada (JORGE DA SILVA JR & BUCARETCHI, 2003).

1.3.4 Ação Cardiovascular

Efeitos hipotensivos foram descritos, experimentalmente, com o veneno de *M. fulvius* e, mais recentemente, com o veneno de *M. frontalis* (FRANCIS et al., 1993).

Os estudos bioquímicos dos venenos são escassos devido à grande dificuldade de capturar e manter em cativeiro essas serpentes e à pequena quantidade de veneno obtida na extração. Estudos comparativos iniciais foram realizados com soroneutralização cruzada. Quando se reage o veneno das principais corais brasileiras (*M. corallinus*, *M. frontalis*, *M. spixii* e *M. ibiboboca*) com o soro anti-*M. corallinus*, nota-se que ele é capaz de neutralizar o efeito letal da *M. corallinus*, mas não o das outras três serpentes. Por outro lado, quando reagidos com o soro anti-*M. frontalis*, este é capaz de neutralizar os efeitos letais do veneno da *M. frontalis*, *M. spixii* e *M. ibiboboca*, mas não o veneno da *M. corallinus* (HIGASHI et al., 1995). Isso é evidência de que o mecanismo da ação tóxica do veneno da *M. corallinus* é causado por componentes distintos dos presentes no veneno de outras corais, como a *M. frontalis* (PRIETO DA SILVA et al., 2001a e PRIETO DA SILVA, 2001b).

Mais recentemente, estudos comparativos enzimáticos, cromatográficos, mionecróticos e imunoquímicos foram realizados com o veneno de várias espécies de serpentes corais do Brasil para esclarecer algumas das ações de seu veneno e determinar padrões de variabilidade intra e interespecífica (AIRD & JORGE DA SILVA, 1991). Frações neurotóxicas e hemorrágicas também já foram isoladas do veneno de *M. surinamensis* e *M. frontalis*.

1.3.5 Componentes do veneno

Os venenos são misturas biológicas complexas que as serpentes utilizam no ato de imobilizar e matar presas para se alimentar. Os venenos podem ser transparentes ou ter variações de coloração amarela, dependendo da quantidade de L-aminoácido oxidase presente neles, que possui riboflavina (de cor amarelada) como grupo prostético. Os venenos contêm cerca de 25% de sólidos totais, dos quais cerca de 70 a 90% são proteínas e polipeptídeos de relativo alto peso molecular. O restante (10-30%) corresponde a substâncias de baixo peso molecular como carboidratos, aminoácidos, pequenos peptídeos, aminas, nucleotídeos, compostos inorgânicos e íons (JORGE DA SILVA JR & BUCARETCHI, 2003).

O veneno de cobras-corais contém um número de substâncias enzimáticas e não-enzimáticas que parece estar presente em grande quantidade em todas as espécies. Ocorre, também, a presença de variação individual e geográfica dentre espécies diferentes do gênero. Sabe-se que os venenos de espécies brasileiras diferentes variam bastante, mas todos apresentam atividade fosfolipásica (AIRD & JORGE DA SILVA, 1991).

As enzimas presentes (13-150kDa) incluem fosfolipases A2, responsáveis pela catálise da hidrólise lipídica. Outras enzimas encontradas na maioria das cobras-corais são a hialuronidase, que atua como outro fator espalhador na destruição de certas barreiras estruturais dos tecidos, e o L-aminoácido oxidase, que tem ação catalítica amplamente distribuída. Algumas hidrolases, tais como fosfodiesterase e anticolinesterase, foram reportadas no veneno de *M. fulvius* e parecem estar presente em venenos de outras espécies (KOCHOLATY et al., 1971). Dentre as substâncias não-enzimáticas (5-10kDa), estão as neurotoxinas pós-sinápticas, cardiotoxinas (CTX), inibidores de protease, dendrotoxinas (inibidores de serinoproteases do tipo Kunitz), inibidores de acetilcolinesterase e neurotrofinas (NGF) (YEE et al., 2004).

As fosfolipases A2 (PLA2, E.C. 3.1.1.4) são mediadores celulares e estão envolvidas em várias respostas, tais como inflamação, hemólise, inibição da agregação plaquetária e outras. Elas estão presentes nos venenos da maioria das serpentes das Família *Viperidae*, *Elapidae* e *Hydrophiidae* (MÉNEZ et al., 1992). As PLA2 são formadas, principalmente, por cinco α -hélices e duas folhas- β pregueadas curtas (ARNI & WARD, 1996). Nem sempre a atividade tóxica das PLA2 está relacionada com atividade enzimática, já que algumas das toxinas mais potentes desta classe não apresentam nenhuma atividade enzimática, possivelmente por ter o aminoácido aspartato da posição 49 (sítio de ligação ao Ca^{2+}) substituído por resíduos de carga positiva, como a lisina (MORA et al., 2005).

As 3FTx (*three finger toxins*) não possuem atividade enzimática e contêm de sessenta a 74 aminoácidos. Essas toxinas podem ter suas seqüências facilmente alinhadas por oito cisteínas muito conservadas (STRYDOM, 1977), que formam um núcleo globular da proteína e de onde emergem três alças formadas por cinco folhas- β pregueadas antiparalelas, duas folhas antiparalelas formadas pela primeira alça, e três folhas antiparalelas formadas pela segunda alça e parte da terceira alça. (ENDO & TAMIYA, 1991). Por essa razão são chamadas de toxinas com forma de três dígitos (“three finger shaped toxins”). Nenhuma estrutura em α -hélice é encontrada nessas moléculas. A forma é discoidal achatada e apresenta um lado côncavo e um lado convexo. Tem baixa massa molecular, entre 6 a 14 kDa, e ponto isoelétrico típico entre pH 8 e 10. São extremamente resistentes às variações físicas ambientais. Devido ao seu pequeno tamanho, são facilmente absorvidas e se distribuem rapidamente nos tecidos da presa (PRIETO DA SILVA, 2001b). Também chamadas de α -neurotoxinas ou toxinas

curaremiméticas, elas são capazes de bloquear a transmissão nervosa ao competir pelo receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) localizado na membrana pós-sináptica dos músculos esqueléticos e neuronais (VITAL BRAZIL, 1980).

Há proteínas fisiológicas em mamíferos que não são toxinas, mas apresentam semelhanças estruturais com as 3FTx (TSETLIN, 1999). Em mamíferos, essas proteínas pertencem a dois grupos de proteínas ancoradas à célula via glicofosfatidilinositol (GPI): proteínas Ly-6 e o receptor de membrana CD59. Essas duas proteínas são monoméricas. Um terceiro grupo de proteínas, também ancoradas a GPI, porém maior e com pelo menos três domínios em três dígitos, é o uPAR, receptor para o ativador de plasminogênio do tipo uroquinase.

Citotoxinas são proteínas básicas, desprovidas de ação enzimática e capazes de causar hemólise, citólise, despolarização de membranas musculares e cardiotoxicidade específica. Muitos autores consideram sinônimas as citotoxinas e as cardiotoxinas, em vista das suas semelhanças estruturais. As cardiotoxinas são componentes que se ligam a receptores de membrana das fibras musculares cardíacas e produzem despolarização da fibra e paralisia irreversível, com parada cardíaca. A única serpente da América cujo veneno contém cardiotoxinas, pelos relatos até hoje, é a *M. fulvius* (EUA e México), mas é muito provável que elas estejam presentes nos venenos de outras *Micrurus*, como demonstrado por JORGE DA SILVA JR et al. (1991).

1.3.6 Envenenamento por cobras-corais

Envenenamentos humanos causados por cobras-corais são relativamente raros devido a seus hábitos (semifossoriais) e comportamento não agressivo. Apesar da baixa incidência, os acidentes causados por serpentes corais são graves.

A característica principal do envenenamento por *Micrurus* é o choque neurotóxico (BRAZIL & BRAZIL FILHO, 1933). Sabe-se que a ação dos venenos de *M. corallinus* e *M. frontalis*, as duas espécies usadas na produção do soro antielapídico, é bastante distinta uma da outra (VITAL BRAZIL, 1987). Ambos atuam na junção neuromuscular, causa evidente de sua ação letal. No entanto, o que diferencia basicamente esses dois venenos é a atuação sobre a sinapse, na qual a *M. frontalis* apresenta apenas ação pós-sináptica, e a *M. corallinus*, ação pré-sináptica com aumento espontâneo da liberação de acetilcolina associado ao bloqueio pós-sináptico da transmissão elétrica entre o nervo e o músculo (VITAL BRAZIL & FONTANA, 1983/84). VITAL BRAZIL & FONTANA (1983/84) consideram que, embora exista um bloqueio

evidente do receptor nicotínico por α -neurotoxinas, a ação principal do veneno de *M. corallinus* é pré-sináptica.

Como os acidentes elapídicos no Brasil, causados pelas serpentes pertencentes ao gênero *Micrurus* ou cobras-corais, é pouco freqüente, é possível compreender um número reduzido de investigações para estudar as repercussões clínicas do envenenamento causado por esse gênero de serpentes.

Sabe-se que os venenos das cobras-corais são extremamente ativos e de alta toxicidade, mas a maior parte dos pacientes que procuram os serviços médicos após acidentes causados por essas serpentes apresenta manifestações clínicas de envenenamento discretas, ou mesmo ausência delas, sendo raros os acidentes graves com manifestações paralíticas. Possivelmente, essas observações clínicas estão relacionadas com os aspectos biológicos dessas serpentes na natureza. As cobras-corais são, de maneira geral, animais de pequeno porte e de baixa agressividade, além de ter presas inoculadoras anteriores e pequenas, o que dificultaria a injeção da peçonha.

Com certa freqüência, o indivíduo é picado na região digital ao manusear a serpente de forma inadequada e imprudente. As manifestações clínicas locais costumam ser discretas. O edema, quando presente, costuma ser leve e, geralmente, se associa ao uso prévio de torniquetes. Não se observam equimoses ou hemorragias locais, embora tenha sido demonstrado recentemente que a peçonha da espécie *M. averyi*, da região amazônica, apresenta atividade hemorrágica em camundongos (BARROS et al., 1994). A maioria dos pacientes menciona dor no local da picada, de intensidade variável, com tendência à progressão proximal e geralmente acompanhada de parestesia.

As manifestações sistêmicas são caracterizadas pela atividade neurotóxica pré e pós-sináptica do veneno na junção neuromuscular, o que desencadeia bloqueio da liberação de ACh e competição das neurotoxinas com os receptores colinérgicos da placa terminal da junção neuromuscular e o conseqüente aparecimento de síndrome miastênica aguda. O início das manifestações paralíticas é muito variável: podem surgir de minutos a horas após a picada. De maneira geral, essas manifestações se iniciam depois de várias horas após o acidente. Porém, uma vez iniciadas, tendem a progredir e a se agravar caso não se institua o tratamento adequado. As seguintes manifestações paralíticas têm sido relatadas (JORGE DA SILVA JR & BUCARETCHI, 2003):

- ptose palpebral;
- dificuldade de acomodação visual;
- oftalmoplegia e anisocoria;

- dificuldade para deglutição e mastigação;
- dificuldade para se manter na posição ereta ou para se levantar;
- dispnéia restritiva e obstrutiva, respectivamente por paralisia da musculatura torácica intercostal e por acúmulo de secreções, que evoluem para paralisia diafragmática.

1.3.7 Epidemiologia

A apresentação dos dados sobre acidentes por animais peçonhentos no Brasil é baseada na notificação à CNCZAP (Coordenação Nacional de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos) de 81.611 acidentes no período de janeiro de 1990 a dezembro de 1993, o que representou uma média de 20 mil casos/ano para o país. A maioria dos acidentes foi registrada nas regiões Sudeste e Sul, as mais populosas e com melhor organização de serviços de saúde e sistemas de informação. Os coeficientes anuais de incidência para o Brasil estiveram em torno de 13 acidentes/100 mil habitantes, distribuídos desigualmente nas diferentes macrorregiões (Tabela 1).

No mesmo período, a distribuição dos acidentes de acordo com o gênero da serpente indica um predomínio absoluto do envenenamento botrópico, seguidos dos acidentes crotálico, laquétrico e elapídico (Tabela 2).

Tabela 1: Coeficientes de incidência anual (por 100 mil habitantes) dos acidentes ofídicos por região fisiográfica. Brasil, 1990 a 1993. Dados fornecidos pelo CNCZAP.

Região	Coeficientes de incidência (x 100 mil) habitantes			
	1990	1991	1992	1993
Norte	24.4	23.2	23.8	25.9
Nordeste	6.8	6.7	6.2	7.6
Centro-Oeste	34.7	28.4	38	32.1
Sudeste	13.1	13.2	12.9	12.3
Sul	15.3	15.1	17.5	16.8
Brasil	13.8	13.3	14.1	13.9

Tabela 2: Diagnóstico dos acidentes ofídicos segundo gênero no Brasil, 1990 a 1993. Dados fornecidos pelo CNCZAP.

Diagnóstico	No de Acidentes	%
<i>Bothrops</i>	59.619	73.1
<i>Crotalus</i>	5.072	6.2
<i>Lachesis</i>	939	1.1
<i>Micrurus</i>	281	0.3
Não informados	13.339	16.3
Não peçonhentos	2.361	2.9

Os casos de envenenamento de cobras-corais no Brasil são devidos, principalmente, à *M. corallinus* e à *M. frontalis*, que ocupam áreas altamente povoadas na região Central, Sul e Sudeste do Brasil. Comparado com os viperídeos, o número de acidentes provocados pela cobra-coral não é muito grande, já que ela é pouco agressiva e ataca somente quando ameaçada (CAMPBELL & LAMAR, 2004). Porém, quando o acidente ocorre, os sintomas costumam ser bastante graves e podem levar à morte por asfixia após cinco ou seis horas (VITAL BRAZIL, 1980). No Brasil, o número de acidentes elapídicos nos últimos cinco anos tem permanecido ao redor de 1% ao ano, como pode ser observado na Tabela 3 abaixo.

Tabela 3: Comparação entre o número de acidentes elapídicos e o número de acidentes ofídicos ocorridos entre 2001 e 2005.

Ano	Acidentes elapídicos	Total de acidentes ofídicos
2001	114	19342
2002	127	24682
2003	143	27196
2004	123	26952
2005	143	27831

Fonte: Sinan-Animais Peçonhentos/SVS/MS, dados atualizados até 24/04/2006.

1.4 SOROS ANTIVENENO DE SERPENTES

1.4.1 Histórico

Atualmente, a produção de soros antitoxinas animais ainda é baseada nos métodos originalmente descritos por Vital Brazil (CARDOSO et al., 2003), que, por meio de imunização em cavalos com veneno de serpentes, pôde demonstrar as relações de especificidade entre os soros imunológicos e os venenos que lhes deram origem. A partir desse momento, a soroterapia foi então introduzida como tratamento para acidentes ofídicos no Brasil. O soro antiaracnídico e o soro antiescorpiônico também surgiram posteriormente, produzidos juntamente com o soro antiofídico por algumas instituições no país, como o Instituto Butantan, em São Paulo, o Instituto Vital Brazil, no Rio de Janeiro, a Fundação Ezequiel Dias (Funed), em Belo Horizonte e o Centro de Produção e Pesquisa em Imunobiológicos (CPPI), em Curitiba (CARDOSO et al., 2003).

Do ponto de vista prático, é necessário distinguir a produção de soro para fins analíticos daquela para fins terapêuticos. Na obtenção de soros policlonais para análise, o veneno é injetado em animais de pequeno porte para se obter um soro imunoreativo que permita seu uso em procedimentos imunoquímicos. Entretanto, a produção de soros voltados à soroterapia é baseada na imunização de animais de grande porte (cavalos, caprinos etc.) com venenos de uma ou mais espécies de animais peçonhentos de importância médica, o que por si só apresenta uma diferença marcante quanto à escala de trabalho. Além disso, por se tratar de um produto para uso interno humano, deve atender a inúmeras exigências de controle de eficiência e qualidade.

Para que um soro seja eficiente na neutralização dos efeitos tóxicos de veneno animal, é necessário que ele contenha anticorpos dirigidos contra as principais toxinas responsáveis por sua ação sistêmica e local (WARREL, 1997). Dessa forma, a escolha da fonte dos antígenos utilizados na imunização dos animais é um fator primordial para obtenção dos produtos ativos. Devido à grande variabilidade da glândula de veneno de serpentes, às diferenças entre as espécies de um mesmo gênero ou ainda entre indivíduos de uma mesma espécie, vários soros devem ser produzidos com finalidade específica para cada tipo de acidente (WARREL, 1997).

Dadas as características estruturais de cada toxina, algumas delas são mais eficientes que outras em induzir resposta imune (CARDOSO et al., 2003). A imunização de animais com misturas complexas de antígenos pode, então, levar à produção de

anticorpos predominantemente contra algumas toxinas e deixar que outras, menos imunogênicas, não apresentem anticorpos específicos. Outro fenômeno que pode ocorrer é a redução da resposta imune, devido à presença de proteínas imunossupressoras, como as descritas nos venenos de *Crotalus durissus terrificus* (CARDOSO et al., 1997).

Por outro lado, a mistura de soros monoespecíficos leva, necessariamente, à diluição do conteúdo total de anticorpos contra o veneno de cada espécie, e por isso sua eficiência tende a ser reduzida. Outro aspecto relevante na imunização tradicional é a forma de preparação dos antígenos. O ideal seria a administração de venenos ativos, por ser mais confiável que o uso de componentes detoxificados, porém os efeitos deletérios do veneno podem comprometer a saúde do animal. Assim, uma combinação de doses com frações menos tóxicas seguidas de doses reforço com o veneno total pode ser mais eficiente (HIGASHI et al., 1989).

Apesar das dificuldades de obtenção desses soros, somada às desvantagens citadas acima, seu uso é considerado o tratamento mais efetivo na neutralização de toxinas com ação sistêmica presente na glândula de veneno de serpentes (RAWEERITH et al., 2005).

Nos últimos anos, a obtenção de soros hiperimunes contra venenos para fins analíticos vem ganhando outro rumo, já que os avanços alcançados pela biologia molecular têm tornado possível a obtenção não apenas de toxinas animais recombinantes, mas também do uso dessas toxinas e de seus cDNAs para fins imunológicos, como veremos mais adiante.

1.4.2 A produção do soro antielapídico

Do pouco que é sabido sobre veneno da *M. corallinus*, é possível dizer que ele é bastante específico, mesmo comparado a outras espécies do gênero. Sabe-se que o principal tipo de toxina do veneno da *M. corallinus* é a neurotoxina pré-sináptica, que inibe a liberação de acetilcolina pelas terminações nervosas motoras, enquanto as principais toxinas do veneno da *M. lemniscatus* e *M. frontalis* são neurotoxinas pós-sinápticas, curaremiméticas (VITAL BRAZIL, 1987). Tanto as pré-sinápticas como as pós-sinápticas podem também estar presentes em uma mesma espécie. Por essa razão, o soro antielapídico monoespecífico pode não surtir o efeito desejado se a vítima for picada por uma *M. corallinus*. É por essa razão que o soro antielapídico produzido deve englobar esses dois tipos diferentes de toxinas presentes no veneno das cobras-coraís

encontradas no Brasil. Dessa forma, este soro antielapídico apresenta anticorpos produzidos a partir de imunização em cavalos com veneno de *M. corallinus* e *M. frontalis* na proporção de 1:1, de modo a conter tanto o soro de *M. corallinus* como o de *M. frontalis*.

A *M. corallinus* possui dieta ofiófaga, hábito fossorial e o padrão mimético encontrado em várias outras serpentes. Essas características dão indício da dificuldade de se obter e manter esses animais em cativeiro. Somada à dificuldade de manutenção, o tamanho reduzido de suas glândulas e, conseqüentemente, a baixa produção de veneno tem gerado uma problemática na produção de soro antielapídico no Instituto Butantan.

O Instituto Butantan acaba utilizando a quase integralidade do veneno conseguido para a obtenção de soro antielapídico e pouco ou nada dele acaba restando para estudos bioquímicos (HO et al., 1995). Na verdade, mesmo a quantidade de veneno disponibilizada para a obtenção de soro não atende ao que seria o ideal para suprir a demanda de produção que cobrisse todo o território nacional. Mesmo que o número de acidentes seja pequeno se comparado ao de outros gêneros, a ampla dispersão geográfica do gênero *Micrurus* e a gravidade dos acidentes exigem que o soro seja distribuído por todo o país, o que aumenta a demanda de produção.

Tabela 4: Quadro geral da disponibilidade dos animais entregues ao Instituto Butantan para cada gênero de serpentes, a quantidade de veneno e a longevidade em cativeiro (valores aproximados).

Gênero	Nº de animais entregues por ano	Quantidade de veneno por extração (µL/extração)	Longevidade em cativeiro (anos)
<i>Bothrops</i>	2200	400-900	5
<i>Crotalus</i>	1500	300	5
<i>Lachesis</i>	2	800-1000	2
<i>Micrurus</i>	200	5-20	1

Fonte: Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, dados fornecidos em comunicação pessoal em 2005 (valores aproximados).

1.5 IMUNIZAÇÃO GENÉTICA OU VACINA DE DNA

Nos últimos anos, a obtenção de soros hiperimunes contra venenos para fins analíticos vem tomando outro rumo, já que os avanços alcançados pela biologia molecular tornaram possível a obtenção não apenas de toxinas animais recombinantes, mas também o uso dessas toxinas e de seus cDNAs para fins imunológicos. Elas agora podem ser usadas para a imunização com toxinas recombinantes ou apenas com fragmentos com epítomos específicos (TANJONI et al., 2003), e ainda há a possibilidade de imunização genética (vacinas de DNA) (HARRISON et al., 2000; HARRISON, 2004; HASSETT & WHITTON, 1996; LIU, 2003; WAGSTAFF & HARRISON, 2006). Esse último campo é recente e pode representar uma alternativa bastante promissora para resolver situações nas quais a imunização tradicional pode não ser possível devido à falta de antígenos.

A imunização genética teve início a partir de observações em 1992 de que plasmídeos poderiam ser utilizados para expressar DNA exógeno em células animais e estimular a resposta imunológica (TANG et al., 1992). O trabalho de HARRISON et al. (2000) demonstram que ratos imunizados com DNA que codifica o domínio carboxi-terminal JD9 da jararagina, a mais importante toxina da jararaca, por meio do método de biobalística (*Gene-Gun*), obtiveram altos títulos de anticorpos IgG. Esse foi o primeiro estudo em que foram aplicados métodos baseados em injeção de DNA para preparações de antiveneno. O método pode representar uma nova abordagem imunológica mais específica e com menos efeitos colaterais do que os sistemas convencionais de produção de antiveneno. HARRISON (2004) conseguiu produzir altos títulos de anticorpos com potencial para melhoria no tratamento sistêmico de picadas de serpentes da família *Viperidae*. Recentemente, WAGSTAFF & HARRISON (2006) imunizaram camundongos com DNA quimérico sintético contendo sete epítomos de maior significância dentro do grupo de metaloproteinases (SVMP) expressas em glândulas de veneno de *Echis ocellatus* e *Cerastes cerastes*. Estes epítomos foram escolhidos bioinformaticamente a partir do transcriptoma dessa espécie, ou seja, após a identificação de alguns milhares de cDNAs abundantes de suas glândulas de veneno. Como resultado, conseguiram excelente proteção contra esse veneno e contra o de espécies correlatas.

Alguns trabalhos de imunização por DNA foram muito bem-sucedidos, como pode ser verificado nos trabalhos citados acima, e pensar em soro antiveneno a partir de

vacina de DNA é inovador. No entanto, o maior desafio a ser vencido ainda se refere ao estabelecimento de estudos mais conclusivos sobre as vantagens de se substituir a forma tradicional de produção de soros ou de complementar a demanda de soros antivenenos com a fabricação de soros por tecnologias recombinantes.

1.6 TRANSCRIPTOMAS DE GLÂNDULAS DE VENENOS

Uma abordagem muito utilizada hoje a fim de obter um perfil geral de toxinas presentes na glândula de veneno tem sido a análise transcriptômica. A geração de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) é um método bastante interessante, já que se baseia no seqüenciamento aleatório de clones de uma biblioteca de cDNA e fornece uma amostra estatisticamente representativa da diversidade da expressão gênica naquele sistema (LEE et al., 1995). Em termos qualitativos e quantitativos, é uma forma de se representar os mRNAs expressos no tecido analisado.

Essa técnica parece ser bastante apropriada para o estudo de tecidos raros ou de caracterização bioquímica difícil – caso das serpentes do gênero *Micrurus* – pois permite a análise indireta da composição de proteínas a partir do seqüenciamento parcial de cDNAs. Uma grande quantidade de clones representados em uma biblioteca pode ser obtida por meio de pequenas quantidades de RNA e perpetuada sem a necessidade de muito material biológico (ADAMS et al., 1991). Esse sistema de análise de bibliotecas de cDNA tem a vantagem de ser mais prático do que o seqüenciamento total do cDNA, pois utiliza-se de *primers* universais que permitem a leitura das extremidades 3' e 5' dos cDNAs, suficiente para a sua identificação.

Na área toxinológica, as ESTs vêm tornando possível a identificação das toxinas já bioquimicamente conhecidas no veneno de uma serpente ou a descrição de novas toxinas após análise comparativa com bancos de seqüências de DNA e proteínas. Por ser uma abordagem mais genérica e não focada em componentes específicos, muitas vezes permite a identificação de novas toxinas que, por abordagens objetivas e direcionadas, não poderiam ser descobertas (JUNQUEIRA DE AZEVEDO & HO, 2002). Além disso, com o transcriptoma não são descritas apenas seqüências, mas ainda um perfil da composição e diversidade das proteínas presentes no veneno da serpente pode ser levantado de forma simples e abrangente, visto que o seqüenciamento aleatório de clones de uma biblioteca primária de cDNA fornece amostra representativa da diversidade da expressão gênica naquele sistema (LEE et al., 1995).

Em 2002, foi realizado em nosso laboratório o primeiro estudo da diversidade dos componentes presentes no veneno de uma serpente através da geração de ESTs (JUNQUEIRA DE AZEVEDO & HO, 2002 e JUNQUEIRA DE AZEVEDO, 2003a). Durante a geração de ESTs da glândula de veneno de *B. insularis*, uma serpente da família *Viperidae*, e sua análise posterior e identificação em banco de dados, puderam ser identificados alguns cDNAs nunca antes descritos em glândulas de venenos. Esse trabalho trouxe um perfil do transcriptoma da glândula de veneno da *B. insularis*, com a ocorrência, abundância e seqüência completa de diferentes metaloproteínases (SVMP), serinoproteínases, peptídeos potenciadores de bradicinina, entre outras toxinas. Além disso, foi possível identificar a seqüência de um suposto fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), que posteriormente demonstramos ser de fato uma nova toxina, totalmente diferente de todas já encontradas em venenos (JUNQUEIRA DE AZEVEDO et al., 2001 e KOMORI et al., 1999). Pudemos identificar ainda a seqüência do cDNA de uma suposta proteína de ligação com Ca^{2+} com quatro motivos EF-hand, que foi denominada calglandulina (JUNQUEIRA DE AZEVEDO et al., 2003b). Uma forma ortóloga dessa proteína foi detectada em humanos (CHEN et al., 2004) e chamada de *calglandulin-like*, por ser a calglandulina de *B. insularis* a única referência dessa nova proteína humana.

Um outro relato de transcriptoma de serpentes foi publicado por KASHIMA et al. (2004). Foram seqüenciados 549 clones de *B. jararacussu* que se agruparam em 197 clusters. Uma comparação com o banco de dados identificou PLA2, incluindo as formas Lys49 e Asp49 e outras toxinas. Nenhum precursor dos BPPs (Peptídeo Potenciador de Bradicinina) foi encontrado, o que mostra diferenças significativas entre exemplares de espécies distintas. FRANCISCHETTI et al. (2004) também publicaram um trabalho similar sobre cDNAs expressos de *Bitis gabonica*.

Ultimamente, vários transcriptomas de glândulas de veneno de serpentes de espécies da família *Viperidae* têm sido relatados por nosso e outros grupos. QINGHUA et al. (2006) identificou toxinas relacionadas à coagulopatia por meio do estudo do transcriptoma realizado de glândulas de veneno de *Agkistrodon acutus*. O transcriptoma de *Echis ocellatus* foi realizado pelo grupo de WAGSTAFF & HARRISON (2006). No nosso grupo, analisamos uma biblioteca da serpente *Lachesis muta* (JUNQUEIRA DE AZEVEDO et al., 2006), e, recentemente, foi publicado um artigo científico sobre o transcriptoma de espécies da Família *Colubridae* (CHING et al., 2006). Em nosso grupo, realizamos ainda estudos de transcriptomas de outros organismos produtores de

venenos, como a aranha *Loxosceles laeta* (FERNANDES-PEDROSA et al., 2002), a sanguessuga *Haementeria depressa* (FARIA et al., 2005) ou o carrapato *Amblyoma cajennensis* (BATISTA et al., 2008). É importante enfatizar que não há relatos de trabalhos sobre transcriptoma dentre a família *Elapidae*.

No caso de cobras-corais do gênero *Micrurus*, levando em conta seu hábito fossorial e alimentar, além da dificuldade de se conseguir quantidade adequada de veneno para estudos bioquímicos, a obtenção de um banco de ESTs pode ser extremamente útil por permitir o primeiro estudo sistemático da composição molecular de suas toxinas. Além de representar uma contribuição para o conhecimento biológico de seu veneno, também permitirá a seleção de candidatos antigênicos para o desenvolvimento de um soro antielapídico alternativo. Na verdade, é de grande interesse do Instituto Butantan, junto ao Centro de Biotecnologia, a idéia do desenvolvimento de metodologias alternativas que permitam a auto-suficiência do Instituto para atender a demanda de produção de soros antielapídeos para o país. Entendemos que o transcriptoma, seguido de uma análise da viabilidade da obtenção de formas recombinantes de toxinas representativas selecionadas, ou sua imunização genética, sejam etapas iniciais imprescindíveis para se pensar em um processo alternativo de imunização.

2. OBJETIVOS

- Geração de *Expressed Sequences Tags* (ESTs) das glândulas de veneno de *Micrurus corallinus* (cobra-coral)
- Montagem de clusters, anotação e análise qualitativa e quantitativa da expressão gênica a partir do banco de ESTs
- Escolha de candidatos antigênicos para uma imunização genética preliminar.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PREPARO DE FAGOS PARA GERAÇÃO DE ESTs

3.1.1 Biblioteca de *Micrurus corallinus* (fago λ gt11D)

Foram utilizadas bibliotecas de *M. corallinus* obtidas pelo Dr. Paulo Lee Ho, do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan, já validadas em trabalhos anteriores (HO et al., 1995 e HO et al., 1997), preparadas a partir do *RNA poli(A)* extraído de dez espécimes de *M. corallinus*, como descrito por SOARES (1994). Os cDNAs obtidos foram divididos em duas frações (400 a 600 pb e >600 pb), visto que as neurotoxinas de três dígitos e as PLA2 são codificadas por transcritos menores. Foram ligados a fagos λ gt11D pré-digeridos com extremidades *EcoRI/NotI* (Pharmacia).

3.1.2 Preparação da bactéria *E. coli* Y1088

Foi feito um pré-inóculo de colônia de *E. coli* Y1088 em 5mL de meio NZCYM (SAMBROOK et al., 1989) acrescido de maltose 0,2%. O inóculo cresceu no mesmo meio de cultura. Após a adição de MgSO_4 0,01M, a densidade óptica (DO) foi acompanhada até cerca de 2,0.

3.1.3 Montagem das placas para fagos

Placas “bottom ágar” foram preparadas com o meio NZCYM citado acima, acrescido de ágar. Para o plaqueamento dos fagos, 100 μ L de bactéria *E. coli* Y1088 foram misturados a 100 μ L de uma diluição dos fagos (descrita a seguir). O material é incubado por vinte minutos a 37°C e a mistura foi acrescida ao meio NZCYM com agarose (“top agarose” 0,7%). O “top agarose” é, então, distribuído sobre a placa “bottom ágar”. Após 12-16 horas, as placas estavam preparadas para isolamento das colônias líticas de fagos.

3.1.4 Diluição do fago (λ gt11D-GI e λ gt11D-GII)

Foram feitas diluições seriadas de 1:10 a 1:10⁷ em meio SM (SAMBROOK et al., 1989) a fim de descobrirmos o melhor valor para o trabalho, ou seja, qual proporção era mais adequada para se observar as colônias líticas devidamente espaçadas. Descoberta a diluição mais apropriada para a detecção das colônias líticas, o fago λ gt11D

(**Pharmacia**) passou a ser diluído na proporção ótima da placa toda vez que fosse necessário preparar o conteúdo de “top agarose” descrito anteriormente.

3.1.5 Amplificação do cDNA contido no fago (PCR)

Cada placa de lise (colônia lítica) foi aspirada por pipeta Pasteur descartável e inserida em um tubo contendo meio SM. Após uma hora de incubação sob agitação em temperatura ambiente, o material genético do fago estava preparado para ser amplificado. Foram utilizados dois tipos de enzima taq polimerase para a amplificação do cDNA contido nos fagos: *Taq DNA Polymerase Recombinant*, da **Invitrogen**; e *Platinum®Taq DNA Polymerase*, da **Invitrogen**. Os *primers* utilizados foram *λgt11* forward (5′ GGTGGCGACGACTCCTGGAGCCCG 3′) e reverse (5′ TTGACACCAGACCAACTGGTAATG 3′) que se ligam ao fago *λgt11D* correspondente. Por esse método, não foi necessário purificar os fagos nem a extração de seu DNA, pois o material genético do fago se expõe durante o PCR (*Polymerase Chain Reaction*). O produto de PCR foi purificado para uso posterior no sequenciamento, segundo três protocolos distintos que avaliamos para escolha do mais eficiente pelo menor custo: 1) por separação em gel de agarose seguida de purificação física em colunas de sílica da banda majoritária, com *GFX™ PCR – DNA and Gel Purification Kit*, da **Amersham Biosciences**; 2) por purificação física direta do produto de PCR; ou 3) por tratamento químico do produto de PCR, realizado com enzimas exonuclease I (ExoI) 10U/μL, da **Amersham Biosciences**, e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) 1U/μL, da **Amersham Biosciences**.

A purificação do produto de PCR por tratamento químico foi baseada no protocolo usual utilizado no Centro do Genoma Humano, na Universidade de São Paulo (USP). É feita uma reação com 8μL de produto de PCR, somado a um *mix* de 0,5μL de ExoI e 1μL de SAP. A amostra é colocada por uma hora a 37°C e inativada por 15 minutos a 80°C.

3.1.6 Sequenciamento dos clones

Com os plasmídeos ou o cDNA do fago isolados, foi feito o sequenciamento deles. Primeiramente foi feita a reação de sequenciamento, na qual foram colocados o DNA amplificado (300ng), o *primer* (3,2pmol), tampão 6 μl (*Save Money*, 200mM Tris-HCl pH 9.0 e 5mM MgCl₂) e *Big Dye* (2μl) (*Kit Big Dye*, **Applied Biosystems**). As

amostras foram precipitadas com isopropanol e ressuspensas em 20µl formamida (**Applied Biosystems**).

Foram produzidas seqüências parciais por meio da utilização do *primer* λ gt11F para a síntese da cadeia complementar, gerando ESTs 5'. Esse *primer* se liga ao sítio promotor do fago utilizado, λ gt11, que está presente no produto de PCR. A síntese se inicia em apenas um sítio onde o *primer* se anela ao DNA do vetor e termina quando ocorre a incorporação de um dos nucleotídeos análogos, 2'3' dideoxynucleotídeos 5'trifosfatos (ddNTPs), pois a polimerase não consegue continuar a elongação do DNA. A leitura se baseia na separação em polímero de seqüenciamento (**POP6**) dos diferentes tamanhos dos DNAs sintetizados nas amostras, contendo os quatro dideoxi-nucleotídeos fluorescentes que emitem comprimentos de onda diferentes (*Kit Big Dye*). Foi utilizado o seqüenciador *ABI 3100*, da **Applied Biosystems**, de dezesseis capilares.

3.1.7 Análise das seqüências expressas

Para os processos de análise, foi utilizado um conjunto de programas de bioinformática desenvolvido no laboratório (*pipeline* de submissão), otimizado especialmente para os modelos de seqüências de toxinas com que trabalhamos, pois a enorme quantidade de isoformas e formas parálogas de toxinas requerem parâmetros estridentes de análise. Primeiramente, as seqüências tiveram eliminadas as seqüências do vetor e as regiões de baixa qualidade. Para isso, utiliza-se o programa *Phred* (HUANG & MADAN, 1999) e são aceitos somente trechos de seqüência com 75% de bases com qualidade (valor de *phred*) igual ou acima de 25, dentro de uma janela de 75 bases. Em seguida, houve a remoção de adaptadores e vetores com o programa *CrossMatch*. As seqüências menores que 150pb foram descartadas. Finalmente, as ESTs foram agrupadas em *clusters* (conjuntos de seqüências contíguas). Por meio do programa *CAP3* (LAZO et al., 2001) com parâmetros estridentes e com descarte de clusters com posições ambíguas em bases de alta qualidade.

Com os *clusters* montados, foi feita uma comparação com o banco de dados, primeiramente por *Blastx* (nucleotídeos x aminoácidos) e, se necessário, por *Blastn* (nucleotídeos x nucleotídeos), para uma identificação dos *clusters*. Para uma melhor interpretação dessas identificações foi criada uma tabela de anotações, com todos os dados apresentados no banco (*e-value*, porcentagem de similaridade, *overlap* etc.), o que permite análises quantitativas a respeito da proporção de expressão de cada cluster.

3.2 CLONAGEM DOS CANDIDATOS ANTIGÊNICOS PARA IMUNIZAÇÃO GENÉTICA (VACINA DE DNA)

3.2.1 Os candidatos antigênicos

Foram cinco os cDNAs candidatos selecionados a partir da análise do banco transcriptômico de *Micrurus corallinus*, quatro deles representantes das 3FTx e um representante de PLA2. Estes cinco candidatos foram selecionados por serem as toxinas mais abundantes na glândula de veneno dessa serpente e por outros critérios descritos no item 4.2.1. Os representantes desses cinco candidatos antigênicos foram nomeados Antígeno 1 (Atg1) a Antígeno 5 (Atg5) (Tabela 5).

Tabela 5: Apresentação dos diferentes candidatos, clusters, clones e tamanhos (pb) respectivos. Para cada clone foi atribuída uma numeração para facilitar sua denominação.

Candidato	Cluster	Clones utilizados da biblioteca	Clones da subclonagem	Tamanho da ORF (pb)
Atg1	MCOR0604C	MCAL01H08 MCAL09C06	MCAL01H08.5	258
Atg2	MCOR0599C	MCAL07D03 MCAL07H04	MCAL07D03.2	234
Atg3	MCOR0039C	MCAH05B08 MCAL06A11	MCAH05B08.1	246
Atg4	MCOR0100C	MCAL07E03 MCAL09G04	MCAL07E03.5	246
Atg5	MCOR0036C	MCAL09A06 MCAL06A06	MCAL09A06.1	437

3.2.2 Estratégia de clonagem

A primeira etapa é desenhar *primers* específicos para cada candidato antigênico. A região referente à proteína madura é amplificada por PCR e clonada, primeiramente, no vetor pGEM-T. É feita a digestão e o fragmento resultante é ligado a um segundo vetor, pSecTag2A. Cada uma das etapas será descrita a seguir com mais detalhes. A Figura 4 apresenta um esquema da estratégia de clonagem utilizada.

Figura 4: Esquema da estratégia utilizada para clonagem dos candidatos antigênicos.

3.2.2.1 Desenho de primers

Para os cinco candidatos, foram desenhados *primers* específicos de acordo com a Figura 5 abaixo:

Figura 5: Esquema do desenho de *primers* específicos para clonagem dos candidatos antigênicos.

Os primers contêm sítios de restrição nas duas pontas para ligação posterior no vetor pSecTag2A. Para cada candidato, foram escolhidos dois clones representantes. Para cada grupo foram desenhados dois *primers* (*Forward* e *Reverse*). Os *primers* e seus respectivos nomes estão descritos a seguir.

Atg1

NEURO1F (5' GGATCCCATAGTATGTTACAAGAGGG 3') e

NEURO1R (5' GAATTCCACCATTGCATTTGTCTCTCA 3')

Atg2

NEURO2F (5' GGATCCCTTGGAATGTAAGATATGCA 3') e

NEURO2R (5' GAATTCCGTTGCAATTGTCTGTTTTGC 3')

Atg3

NEURO3F (5' GGATCCCACGAAATGTCTCACAAAGT 3') e

NEURO3R (5' GAATTCCACGGTTGCAATTGGTTTTT 3')

Atg4

NEURO4F (5' GGATCCACTTGTATGTTACACAAACG 3') e

NEURO4R (5' GAATTCAGAGCTCTCCGTTGCATTTGTC 3')

Atg5

PLA2 1F (5' GGATCCCAACCTCATTAACCTCCAACG 3') e

PLA2 1R (5' GAATTCTTCGGCAACGATTGGGGTTCAT 3')

3.2.2.2 PCR

Com os *primers* específicos, foi realizada uma amplificação por PCR usando como molde os produtos de PCR dos fagos utilizados na geração das ESTs. As condições da amplificação foram alteradas no decorrer dos experimentos. A temperatura de anelamento adequada para a maioria dos PCRs foi de 55°C, e a temperatura de extensão foi de 72°C para a *taq* polimerase (1min/kb). Os 50µL totais foram aplicados em gel de agarose 1,5%. A banda resultante foi recortada e purificada com *kit GFXTM PCR (Amersham Biosciences)*. Esse procedimento foi realizado para cada um dos cinco candidatos.

3.2.2.3 Clonagens em PGEM-T

O fragmento purificado foi ligado no vetor *pGEM®-T Easy (Promega)*, por complementariedade dos nucleotídeos adenina inseridos pela *taq* polimerase aos nucleotídeos T (timina) do vetor. A ligação foi transformada em bactérias DH5α. A fim de selecionar as colônias que continham o fragmento/clone, foi realizado um *screening* por PCR, já que os clones são muito pequenos e muito difíceis de serem detectados por meio de outros protocolos. No *screening* por PCR, usamos a própria colônia de bactéria como amostra para amplificação por PCR. Os *primers* utilizados são M13F e o *primer reverse* do candidato em estudo, seguindo as próprias condições de amplificação descritas acima. Com os clones positivos foram feitas *minipreps* com *kit GFXTM*

(Amersham Biosciences). Os clones foram seqüenciados (ABI 3100 Applied Biosystems) para se conferir a ligação ao vetor.

3.2.2.4 Digestão com BamHI e EcoRI

Os clones ligados ao PGEM-T foram digeridos com as enzimas de restrição EcoRI (Invitrogen) e BamHI (Invitrogen). O vetor pSecTag2A (Invitrogen) também foi digerido com as mesmas enzimas para que fosse possível uma ligação entre vetor e fragmento/clon. A digestão permaneceu a uma temperatura de 37°C por 2 a 4 horas, dependendo do clone em estudo, e em seguida o inserto foi isolado em gel de agarose.

3.2.2.5 Subclonagem em pSecTag2A

Para a clonagem final foi escolhido o vetor de secreção extracelular, pSecTag2A. O “A” é referente à fase de leitura do sítio múltiplo de clonagem escolhido. O pSecTag2A é um vetor de expressão em células de mamíferos. Ele contém algumas fusões que ajudam na captura da proteína quando expressa *in vitro*, tal como cauda de histidina (His) e epítipo myc. É um vetor que se mantém na forma episomal e secreta a proteína para fora da célula, por possuir o sinal de secreção da cadeia kappa das imunoglobulinas. A Figura 6 apresenta o mapa do vetor com os diferentes sítios de restrição, os promotores (promotor do tipo CMV e SV40) e as fusões.

Figura 6: Mapa do vetor pSecTag2A utilizado na clonagem final realizada com os candidatos antigênicos. Nesse mapa estão apresentados os diferentes promotores, sítios de restrição e fusões.

Os insertos foram, então, ligados ao pSecTag2A e, em seguida, transformados em bactérias DH5 α . A seleção dos clones foi realizada por meio de *screening* por PCR, da mesma forma como mencionado na clonagem em pGEM-T, mas o *primer forward* utilizado é o T7F. Os clones positivos foram novamente purificados por meio do kit *GFXTM* (**Amersham Biosciences**). O seqüenciamento ocorreu ao final de todas as clonagens para se conferir a ligação do vetor ao clone e as prováveis mutações decorrentes de todo o processo.

3.3 PROCESSO DE IMUNIZAÇÃO GENÉTICA

3.3.1 *Maxiprep dos candidatos antigênicos para imunização genética*

Preparações de DNA em grande quantidade (*maxipreps*) foram feitas com o kit *QIAGEN® Plasmid Purification* (**Qiagen**). Para isso, os clones obtidos a partir da clonagem são transformados novamente. São realizados pré-inóculos. Após aproximadamente 12 horas, esses pré-inóculos são expandidos em 300mL (proporção de 1:30) em meio LB com ampicilina. O inóculo cresce aproximadamente por 15 horas. No dia seguinte, começa a utilização do kit propriamente dito, segundo o protocolo do fabricante. A amostra final é eluída em 300 μ L e deve permanecer na geladeira por dois dias para uma eluição ótima.

Feitas as *maxipreps*, o DNA é quantificado espectrofotometricamente.

3.3.2 *Transfecção de clones em células eucarióticas*

Para a avaliação das construções, foram usadas células COS-07. As células COS-07, células de rim de macaco verde africano, são as mais utilizadas para transfecções do tipo transiente e, por esse motivo, optamos pela utilização delas. Nos ajudou o Dr. Geraldo S. Magalhães, pesquisador do Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan.

O primeiro passo em uma transfecção é repicar as células a fim de que elas cresçam e atinjam uma confluência ao redor de 95%. Feito isso, as células são tratadas com lipofectamina (*LipofectamineTM 2000*, da **Invitrogen**). O meio utilizado é o meio DEMEN (meio *Dulbecco High Glucose*) com soro bovino. Em um tubo são misturados 250 μ L de meio DEMEN mais 4 μ g de plasmídeo. Em outro tubo, 250 μ L de meio DEMEN mais 10 μ L de lipofectamina. Após 5 minutos, o conteúdo dos dois tubos é

misturado. Por conseguinte, após 20 minutos este conteúdo é derramado sobre as células. Dessa forma, tem início a transfecção. A cada 12 horas é necessário observar as condições fisiológicas das células: meio, formato das células e disposição delas. Nesse momento, o meio DEMEN com soro bovino é substituído por meio DEMEN sem soro bovino, pois há indícios de que o soro atrapalha a formação do complexo lipossomo-DNA na transfecção. Após 24 horas tem início a expressão, portanto, a primeira coleta de sobrenadante aconteceu após 24 horas. Três coletas são suficientes para verificar a presença ou não de expressão da proteína. No último dia, são coletados os extratos de células, já que, apesar de a proteína estar em um vetor de secreção (pSecTag2A), podem ocorrer falhas e a proteína não ser secretada e continuar dentro da célula.

3.4 IMUNIZAÇÃO DOS CANDIDATOS ANTIGÊNICOS ESCOLHIDOS

A imunização dos candidatos citados acima foi feita em camundongos Balb/c, fêmeas, peso homogêneo (18-22g), com seis a oito semanas de idade. Cada grupo de cinco animais representa um candidato antigênico. Como controle, foi realizada uma sangria inicial antes da imunização, a fim de se obter o soro pré-imune. Foi feita uma sangria final, após a 3ª dose da imunização. As doses ocorreram de quinze em quinze dias, com três doses para cada grupo (Figura 7).

Figura 7: Esquema das dosagens aplicadas nos camundongos durante processo de imunização com os candidatos antigênicos selecionados.

Cada animal recebeu 100µg de DNA por dose, sendo no total 300µg/animal. Para tanto, foi necessária a realização de *maxiprep* (*Plasmid Purification*®, **Qiagen**) com cada um dos candidatos. As *maxipreps* foram quantificadas e, para facilitar sua utilização nas imunizações, todas as concentrações foram acertadas para 1µg/µL, dessa forma, 100µL seria o equivalente a 100µg. Este acerto foi preparado com PBS 10X (*Phosphate Buffered Saline*) estéril e água **MilliQ** autoclavada (estéril).

Os animais foram anestesiados intraperitonealmente com aproximadamente 200µL de anestésico (ketamina 500µL/10mL + xilazina 1000µL/10mL). A injeção do DNA foi intramuscular (IM) e cada animal recebeu uma dose de 100µL, divididos em 50µL em cada pata.

O sangue foi coletado em tubos *ependorf* e colocado na estufa a 37°C por 1 hora. Depois, por mais 1 hora a 4°C (em geladeira). O sangue é centrifugado por 10 minutos, a 3.000 rpm em 4°C. O soro então é retirado e mantido em freezer a -20°C.

3.5 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM *E. COLI*

A fim de termos antígenos para o teste dos soros, fizemos a expressão de três dos cinco antígenos baseadas em construções para expressão em *E. coli* de que já dispunhamos no laboratório (PRIETO DA SILVA, 2001b e DE OLIVEIRA et al., 2003). Primeiramente é feita a transformação em bactéria, no caso a *E. coli* DE3 starpLys (resistência a cloranfenicol e ampicilina). Um pré-inóculo em 25mL de meio LB (SAMBROOK et al., 1989) é preparado e, no dia seguinte, é expandido para 500mL + 15mL de pré-inóculo. É crescido em meio de cultura LB com ampicilina e clorafenicol até atingir DO $\approx$ 0,6. Antes da indução, é retirada uma alíquota de 1mL de amostra não-induzida (NI). É colocado então IPTG (indutor de expressão) por 2 ou 3 horas a 37°C.

Após a indução, uma alíquota de 1mL do induzido é retirada e o restante é centrifugado a 5.000 rpm em 5°C, por 15 minutos. O *pellet* é congelado ou ressuspenso com um tampão, de acordo com o pI da proteína (ponto isoelétrico). Como todas as proteínas têm pI básico, o tampão utilizado foi o Tris pH 6,8 0,1M (pI $\pm$ 1,5) (Tabela 6).

Tabela 6: As proteínas Atg1, Atg2 e Atg5 com seus respectivos pontos isoelétricos (pI) e o nome da proteína de acordo com a similaridade com o banco de dados (Blastx).

Nome	Proteína	pI
Atg1	Neurotoxina 8	7,97
Atg2	Neurotoxina 7/3/1	8,58
Atg5	PLA2	8,24

As bactérias ressuspendidas são lisadas em *FrenchPressure*®. O lisado é centrifugado por 30 minutos em 4°C, a 10.000 rpm. O sobrenadante é coletado e passado na coluna de cromatografia de afinidade a metal (sepharose carregada com Ni²⁺), com fluxo de cerca de 1ml por minuto. São feitas lavagens com várias concentrações de imidazol (5mM, 20mM, 40mM e 60mM) no mesmo tampão e, no final, a proteína é eluída com 1M imidazol (25 alíquotas de 1mL).

O corpúsculo de inclusão é lavado primeiramente com uréia 1M. É centrifugado, o sobrenadante é coletado e uma alíquota é retirada para o gel de SDS-PAGE (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida). O corpúsculo é ressuspendido depois em uréia 8M. Uma alíquota dela é aplicada no gel para se verificar a presença de proteína no corpúsculo. O corpúsculo em uréia 8M é passado na coluna e o *flow through* (material não adsorvido) é coletado. No decorrer do processo da purificação, a concentração de uréia é diminuída de 8M para 6M. É feita uma lavagem com imidazol 60mM (cinco alíquotas de 5mL) e, depois, outra lavagem com imidazol 1M. São retiradas 25 alíquotas de 1mL, da mesma forma que na purificação do sobrenadante. Todas as alíquotas coletadas são colocadas no gel para visualização. O gel é corado com *Comassie Blue* (coloração azulada) e fixado.

Para utilizar as proteínas purificadas no *coating* de ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*), é necessário retirar o imidazol presente nas amostras coletadas. Para tanto, é feita a diálise. Como se tratava de corpúsculo de inclusão, a solução continha uréia. Para facilitar, as três diálises foram feitas em uma mesma solução de 1L contendo uréia 6M e tampão NaCl-Tris pH 6,8, porém cada proteína estava em membrana diferente. A membrana utilizada foi de 3kDa, devido ao tamanho das proteínas (9kDa-12kDa). Após 3 horas, a solução é trocada e a concentração final de imidazol passa a ficar ao redor de 0,85mM.

Para se fazer a curva de BSA (Albumina Sérica Bovina), a fim de se quantificar a proteína obtida após a diálise, foram colocadas várias concentrações de BSA em gel de SDS-PAGE juntamente com a proteína a ser quantificada, conforme descrito na figura correspondente nos resultados. A intensidade da banda nos mostra a quantidade de proteína contida naquela alíquota. A curva tem de ser precisa para que seja possível a

quantificação sem erros. A quantificação é feita por densitometria de bandas em fotodigitalizador *Eagle Eye*, que interpreta a intensidade da banda em valor numérico.

3.6 ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA

3.6.1 ELISA

A melhor forma de análise da resposta imune proveniente das imunizações é o método imunoenzimático ou ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*). Primeiramente, é necessário se fazer o *coating* de ELISA, ou seja, adicionar a proteína recombinante que se ligará ao soro (anticorpo) proveniente das imunizações com DNA em camundongos. A quantificação da proteína é essencial nessa etapa, já que são colocados 2µg de proteína em cada poço da placa de 96well (96 poços) de ELISA. A proteína é diluída em tampão de *coating* $\text{NaHCO}_3 + \text{Na}_2\text{CO}_3$ 0,05M pH9,6. A placa com o *coating* é deixada dentro da geladeira, a 4°C, embrulhada com plástico PVC. A proteína adere à parede da placa. O excesso é removido no dia seguinte.

Após isso, é feito um bloqueio da placa com leite 10% em PBS-T (*Phosphate Buffered Saline + Tween*) antes de se iniciar as incubações com os anticorpos primário e secundário. O anticorpo primário é o soro proveniente da imunização. São feitas diluições, nesse caso, a partir de 1:20-1:10240. A primeira coluna da placa não possui *coating*, apenas o tampão de *coating*. A segunda coluna é o branco, ou seja, possui *coating*, mas não é colocado o soro primário. A partir da terceira coluna, têm início as diluições. O anticorpo primário é incubado durante 1h30 em uma solução de BSA 1% + PBS-T 0,1%, a 37°C. O bloqueio de leite é substituído pelo BSA.

Após a incubação e lavagem, a placa é incubada com anticorpo secundário em todos os poços, inclusive o controle sem *coating* e o branco. O anticorpo secundário, neste caso, é o IgG anti-mouse conjugado com peroxidase. A incubação deve ocorrer por uma hora a 37°C.

É feita uma última lavagem e a placa é revelada. É preparada uma solução de 0,004% OPD (ortofenilenodiamina) + 0,005% H_2O_2 (água oxigenada) em tampão citrato-fosfato (ácido cítrico 0.1M. e fosfato de sódio 0.2M) que será colocada na placa. O OPD reage com a H_2O_2 na presença da peroxidase. A coloração amarelada passa a vigorar devido à oxidação do OPD, que garante o reconhecimento da proteína (*coating*) com o anticorpo primário (soro da imunização em camundongos). A reação é bloqueada

com adição de ácido sulfúrico H_2SO_4 8N assim que houver titulação aparente (amarelo mais intenso para menos intenso). Bloqueado, o ELISA pode ser lido. Para o OPD, o comprimento de onda é 492nm. O branco é a média da coluna sem o soro primário. A titulação é a diluição onde a Absorbância for próxima de 0,100.

3.6.2 Western Blot

Para o *Western blot*, as amostras são aplicadas em gel SDS-PAGE (SAMBROOK et al., 1989). Dá-se início à transferência do gel para uma membrana de nitrocelulose. A membrana é colocada face-a-face com o gel, e uma corrente elétrica (350mA) é aplicada para mover as proteínas para a membrana. A ligação das proteínas à membrana é baseada tanto em interações hidrofóbicas como em interações de cargas entre a membrana e as proteínas. Após 1h30, o gel é corado com *Ponceau S* a fim de se verificar a presença do perfil de proteínas presentes na amostra, documentado e descorado com água.

O bloqueio da ligação não-específica é feito ao se colocar a membrana em uma solução diluída de leite seco desnatado (10%), com pequena quantidade de detergente, como Tween 20 (0,05%).

No dia seguinte, ocorrem as incubações. Primeiramente, a membrana é incubada com anticorpo primário na presença de leite. A solução permanece em agitação leve por aproximadamente 1 hora. Depois de se enxaguar a membrana para remover o anticorpo primário não ligado, ela é exposta a outro anticorpo conjugado com uma enzima, direcionada a porções espécies-específicas do anticorpo primário. Mais comumente, uma peroxidase é usada em conjunto com um agente quimioluminescente, e a reação produz fluorescência proporcionalmente à quantidade de proteína.

Depois das sondas não-ligadas serem lavadas, o *Western blot* está pronto para detectar a proteína de interesse. A membrana é, dessa forma, revelada.

Em caso de necessidade de reutilização da membrana para outras incubações, é necessário lavá-la com um tampão denominado *Stripping Buffer* (100nM β -mercapto, 2% SDS, 62.5mM Tris HCL pH 6.7). Este tampão permite a reutilização da membrana (*reprobing*).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 O TRANSCRIPTOMA

4.1.1 Banco de Sequências

A descrição de propriedades farmacológicas, ações patológicas, atividades catalíticas, entre outros, ainda constitui a base fundamental no entendimento do funcionamento dos venenos animais. Entretanto, nos dias de hoje, a atribuição dessas propriedades só passa a ter valor reconhecido quando vinculada às suas bases moleculares. Portanto, o entendimento aprofundado do funcionamento dos venenos de serpentes requer antes de tudo uma boa compreensão de sua composição em termos bioquímicos.

O estudo de venenos, baseado no fracionamento cromatográfico de proteínas e caracterização particularizada de componentes é um processo lento e trabalhoso. Tecnologias proteômicas, por outro lado, permitem um rápido conhecimento da diversidade de substâncias presentes no veneno, porém, metodologicamente, a obtenção de informações extensivas sobre a estrutura primária de proteínas ainda é um desafio. A disponibilidade de amostra, a existência de equipamentos com funções específicas, a qualidade da espectrometria de massas, a necessidade de modificações químicas das amostras são alguns dos requisitos para se obter uma informação estrutural por vias proteômicas (CALVETE et al., 2007). Por outro lado, ainda que limitada pela natureza indireta da informação, as abordagens transcriptômicas têm sua vantagem na facilidade de se obter grandes quantidades de informação sobre seqüências de toxinas e traçar um perfil da expressão gênica nas glândulas de veneno (JUNQUEIRA DE AZEVEDO & HO, 2002).

A partir desse princípio, alguns trabalhos buscaram realizar a caracterização transcriptômica de diversas espécies, conforme descrito na *Introdução* deste trabalho. Porém nenhum deles abordou sistematicamente uma espécie de elapídeo terrestre e muito menos espécies de cobras-corais, cujo veneno ainda é pouco conhecido. Essa foi uma das razões que nos motivou ao presente estudo.

A análise do transcriptoma da serpente *Micrurus corallinus* foi feita então com base em bibliotecas pré-existentes construídas em fago λ GT11, em 1992, pelo Dr. Paulo Lee Ho, nosso colaborador nesse projeto (HO et al., 1995). Foram utilizadas duas sub-

bibliotecas com faixas de tamanho de cDNAs diferentes, GI (>600pb) e GII (400 a 600 pb), construídas a partir do mRNA de dez espécimes. Dessas bibliotecas, preparamos e seqüenciamos cerca de 1.500 clones para que fossem observados os transcritos mais abundantes.

Diferentemente de outros trabalhos de nosso grupo, estas bibliotecas haviam sido preparadas em fago e foi necessária a padronização de um procedimento de geração de ESTs a partir de colônias de fagos, tendo em vista que esse projeto utilizava uma metodologia diferente daquela usualmente utilizada no nosso Laboratório para geração de ESTs. Muitos testes foram realizados a fim de se padronizar a metodologia, diminuir os custos e aumentar o rendimento. A primeira padronização foi no PCR de amplificação dos cDNAs e, posteriormente, na purificação do produto de PCR.

Com relação à padronização do PCR, foram realizados diversos testes-pilotos para determinar a quantidade mínima necessária de *primer* e enzima taq polimerase para que houvesse uma amplificação eficiente, porém com custo não muito alto. Duas enzimas taq polimerases foram testadas (*Taq DNA Polymerase Recombinant*, da **Invitrogen**, e *Platinum®Taq DNA Polymerase*, da **Invitrogen**). Ambas produziram o mesmo rendimento, porém a *taq platinum*, apesar de mais cara, apresenta uma vantagem por estar complexada a um anticorpo que inibe atividade polimerásica em temperatura ambiente. Dessa forma, pode ser manuseada na bancada e não obrigatoriamente no gelo – como ocorre com as enzimas taq comuns – além de evitar a amplificação errônea de DNA. O custo é um ponto que levamos em consideração pelo fato de estarmos trabalhando em larga escala (placas de 96 poços ou 96well) e não com clones individuais. As quantidades mínimas determinadas para que houvesse uma amplificação eficiente avaliada em gel de agarose foram: 10µL de fago *λgt11D*, 1µL de *primer λgt11F*, 1µL de *primer λgt11R* e 0,5µL de taq polimerase.

Um dos grandes esforços que realizamos foi a padronização da purificação do produto de PCR. Quando se trabalha com clones individuais, a utilização de kits de purificação a partir de gel é bastante interessante e vantajosa. Mas quando se trabalha em larga escala, o trabalho demandado para manipulação individual de cada amostra e o custo bastante elevado desses kits os tornam menos atraentes. Sistemas de purificação em larga escala como placas de filtro de 96 poços também têm custo elevado. Dessa forma, avaliamos três técnicas (separação em gel de agarose 1% seguida de purificação física por meio da utilização do *kit GFX™ PCR*, purificação física diretamente na

coluna GFX e purificação química com enzimas que removem os excedentes de *primers* e nucleotídeos) e comparamos o rendimento juntamente com o custo. A relação custo-benefício no último caso foi maior e mais favorável. E por essa razão optamos por utilizar o tratamento químico para purificação do produto de PCR.

Dessa forma, pudemos gerar as ESTs que foram então processadas bioinformaticamente, incluindo além do agrupamento (*clustering*) também a anotação e as análises estatísticas da expressão das toxinas e proteínas celulares encontradas. No processo bioinformático de agrupamento ou clusterização, realizado com o programa *CAP3*, observamos algumas particularidades. Sabe-se que as neurotoxinas presentes nesses venenos são muito diversas e poucas substituições em alguns resíduos são capazes de mudar a classe na qual essas proteínas se inserem. Dessa forma, testamos três estringências diferentes para agrupamento das seqüências (95%, 98% e 99% de identidade), para avaliar como se comportaria o agrupamento de cDNAs. A idéia era evitar que diferentes isoformas se reunissem no mesmo cluster. A Tabela 7 ilustra as quantidades de grupos encontrados.

Tabela 7: Três valores diferentes de identidade testados como parâmetro de estringência no *CAP3* e os resultados obtidos.

VALOR DE IDENTIDADE (%)	CONTIGS	SINGLETS	TOTAL
95	125	420	545
98	120	476	596
99	120	564	684

A seguir, identificamos previamente os clusters codificantes para neurotoxinas (conforme análise por similaridade, *Blastx*) e notamos que, com 95% de identidade, diferentes cDNAs de neurotoxinas não eram separados em grupos diferentes, já com 99% ocorria uma separação exagerada de alguns grupos protéicos que não deveriam ser divididos. Dessa forma, optamos por utilizar o valor de 98% de identidade como parâmetro de estringência no *CAP3* (valor usado em outros casos, JUNQUEIRA DE AZEVEDO et al., 2006) e, em seguida, separar manualmente as seqüências de neurotoxinas que não deveriam pertencer a um mesmo cluster, conforme discutido adiante. Assim, realinhamos algumas seqüências em novos clusters, que foram reinseridos na nossa base de dados.

O banco final de ESTs de *M. corallinus* contém então 1.438 seqüências de clones que foram agrupadas em 611 clusters, incluindo 483 clusters compostos por clones individuais (*singlets*) e 128 clusters com duas ou mais seqüências (*contigs*). Após aplicação de filtro contra seqüências de RNA ribossomal, DNA mitocondrial e vetores ou outros contaminantes, 5% dos clones foram desconsiderados das análises subseqüentes.

A análise com o banco de dados via *Blast* revelou que, de 611 clusters, 485 (correspondente a 1.250 clones ou 92% do total) produziram semelhanças significativas com o banco de dados (*e-value* < 10⁻⁰⁵) e outros 103 clusters (107 clones ou 8% do total) não puderam ser identificados. Dessa forma, foi possível realizar a anotação, tabulada em planilha Excel (ilustrada no Anexo I), de onde extraímos as informações mais relevantes dos resultados que serão apresentados a seguir.

As informações identificadas foram divididas de acordo com as duas funções gerais esperadas para os transcritos da glândula de veneno: toxinas (funções tóxicas) e demais transcritos envolvidos nas funções celulares (funções não-tóxicas).

Tanto os transcritos enquadrados na categoria “toxinas” como os “transcritos celulares” tiveram representação equivalente no perfil geral de proteínas da glândula (aproximadamente 46% do total de clones cada um). Entretanto, as proteínas celulares são mais diversificadas (392 clusters). Isso fica mais evidente quando observamos a redundância (clones/cluster) de cada categoria. As toxinas têm média de 6,7 clones para cada cluster enquanto os transcritos celulares apresentam valor de 1,6. Isso significa que cada toxina é, em média, quatro vezes mais expressa do que um dado transcrito celular (Tabela 8).

Tabela 8: Representação dos clusters obtidos a partir das ESTs da glândula de veneno de *M. corallinus*.

Categoria	Clusters	Clones	Redundância (clones/clusters)	Representação do total de clones (%)
No hit/ genômico/ íntrons	103	107	1,0	7,9
Seqüências similares	485	1250	2,6	92,1
Similaridade com transcritos/proteínas <u>tóxicas</u>	93	625	6,7	45,9
Similaridade com transcritos/proteínas <u>celulares</u>	392	625	1,6	46,2
Outros (mitocondrial, RNA ribossomal, vetor)	23	81	3,5	5,4

Ao observar os tipos particulares de toxinas (Figura 8), podemos perceber que as proteínas de três dígitos (neurotoxinas) são os transcritos mais abundantes, seguidas de fosfolipases do tipo A2 (PLA2), como era esperado. Depois vêm as lectinas do tipo C e o precursor do peptídeo natriurético. As outras classes de toxinas encontradas são menos abundantes (Figura 8). Quando verificamos o perfil das possíveis proteínas celulares (Figura 9), o padrão apresentado segue o que se espera de uma glândula secretória, caso da glândula de veneno, na qual as proteínas mais expressas estão relacionadas à transcrição/tradução.

Figura 8: Representação gráfica da proporção dos tipos de toxinas encontradas em glândulas de veneno de *Micrurus corallinus* (% do total de clones de toxinas).

Figura 9: Representação gráfica da proporção dos tipos de proteínas celulares encontradas em glândulas de veneno de *Micrurus corallinus* (% do total de clones de proteínas celulares).

4.1.2 Análise dos cDNAs de toxinas identificados no banco de ESTs

Foi possível identificar dez classes de toxinas, que representam aproximadamente 46% (625 clones agrupados em 93 clusters) de todas as informações contidas neste banco transcriptômico (Tabela 9). É um valor esperado quando comparado com outros viperídeos (JUNQUEIRA DE AZEVEDO et al., 2006; QINGHUA et al., 2006; WAGSTAFF & HARRISON, 2006), já que esse tecido é especializado na síntese de proteínas tóxicas, e uma biblioteca de cDNA da glândula de veneno desse animal deve representar a composição e a diversidade das toxinas expressas nele. A análise de cada grupo de toxinas está representada a seguir, de acordo com sua abundância.

Tabela 9: Representação dos tipos de toxinas encontradas na glândula de veneno de *Micrurus corallinus*, com o respectivo número de *clusters* e clones.

TOXINAS	nº de clusters	nº de clones	% do total
WAP	1	1	0.1%
NGF	1	1	0.1%
Serinoprotease	1	1	0.1%
L-aminoácido oxidase	2	2	0.1%
Kunitz	2	3	0.2%
Metaloprotease	1	4	0.3%
Peptídeo Natriurético	5	14	1.0%
Lectinas do tipo C	13	65	4.7%
PLA2	12	208	15.3%
Proteína de três dígitos	55	326	24.0%
TOTAL	93	625	45.9%

4.1.2.1 Proteína de três dígitos

Esse grupo de toxinas, as proteínas de estrutura em três dígitos (3FTx), é o que apresentou maior abundância de seqüências expressas (~52% do total de toxinas) no padrão obtido da glândula de veneno de *M. corallinus*. Essas proteínas são pequenas, com menos de oitenta aminoácidos e geralmente com quatro, às vezes cinco, pontes dissulfeto. Possuem efeitos farmacológicos muito distintos (PRIETO DA SILVA, 2001b e ENDO & TAMIYA, 1991).

A análise da montagem dos clusters de 3FTx chegou após uma revisão a um número final de 326 clones (~24% do total) agrupados em 55 clusters. Ocorre que muitos desses clusters foram recriados manualmente após a montagem inicial pelo programa CAP3, pois se notou que alguns dos *contigs* iniciais estavam agrupando, na verdade, variantes diferentes. Então, cada *contig* inicial foi inspecionado visualmente para identificar os SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) que fossem comuns a mais de uma seqüência dentro da montagem. Quando tais SNPs eram encontrados, as respectivas seqüências eram removidas e arranjadas em um novo cluster, após avaliação da qualidade das bases no ponto. Assim, foram obtidos os 55 clusters.

Quanto às proteínas derivadas desses clusters, em uma análise comparativa não foi possível agrupá-las em tipos funcionais definidos, baseando-se na seqüência, por exemplo, pelo número de cisteínas conservadas ou de acordo com o tamanho do C-terminal (NIRTHANAN & GWEE, 2004), já que a diversidade de neurotoxinas observadas foi extremamente grande. Além disso, visto que é o primeiro banco transcriptômico de

um membro da Família *Elapidae*, tivemos dificuldade em identificar as possíveis funções e os possíveis ortólogos em outras espécies por não haver dados suficientes para sua validação na literatura. Dessa forma, optamos por organizar essas toxinas de acordo com a semelhança das seqüências entre si. Assim, separamos três lotes diferentes de cDNAs de 3FTx.

Os dois primeiros lotes contêm seqüências muito similares às quatro possíveis α -neurotoxinas já descritas na literatura para *Micrurus corallinus* (HO et al., 1995). O primeiro foi denominado *homolog 7/3/1* (representando os cDNAs das isotoxinas nxh7, nxh3, nxh1) por serem semelhantes entre si e apresentarem diferenças significativas na região referente ao peptídeo sinal e em alguns poucos aminoácidos da região referente à proteína madura. A proteína madura apresenta 57 aminoácidos. O segundo lote refere-se ao *homolog 8* (representando o cDNA nxh8), uma forma peculiar que traz diferenças significativas na região referente à proteína madura quando comparado ao *homolog 7/3/1* (PRIETO DA SILVA, 2001b). Comparando esse dois lotes entre si, nxh8 compartilha apenas 42% de similaridade com o grupo *homolog 7/3/1*. A forma madura apresenta 65 aminoácidos. A organização de seu cDNA é similar à descrita para o precursor da *erabutoxina a* de *Laticauda semifasciata* (TAMIYA et al., 1985). A nxh8 apresenta dez cisteínas que podem formar cinco pontes dissulfeto. Foi constatado que a nxh8 pode se ligar ao próprio receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) ou compartilhar um epítipo funcional com as α -neurotoxinas, e que o soro anti-nxh8 (recombinante) pode impedir a ligação dos componentes pós-sinápticos do veneno de *M. corallinus* ao nAChR (PRIETO DA SILVA, 2001b).

O restante das neurotoxinas encontradas (grupo denominado “outras neurotoxinas”) não é propriamente um grupo de seqüências relacionadas, mas sim novas 3FTx que obtiveram um valor de identidade em torno de 50% com seqüências de 3FTx do banco de dados. Na Figura 10, estão representadas todas as 3FTx encontradas, incluindo cada cluster que representa o grupo “outras neurotoxinas”. Estas foram reagrupadas por semelhança e serão mais bem detalhadas no item 4.2.1.

Ainda com relação à estrutura de três dígitos, um cluster interessante foi encontrado. O cluster MCOR0226S, com apenas um clone, apresenta semelhança com o precursor de proteína Ly-6E de linfócitos de *Gallus gallus* (TOULON et al., 1988). Trata-se de uma 3FTx, porém provavelmente não-tóxica. As proteínas da família Ly-6 formam um grupo de receptores da superfície celular envolvidos na ativação de

leucócitos (TOULON et al., 1988), por isso acreditamos que o cluster MCOR0226S não deva ser uma toxina.

Figura 10: Proteínas de três dígitos encontradas na glândula de veneno de *M. corallinus* (nº de clones/grupo – gráfico maior e nº de clones/cluster – gráfico menor).

4.1.2.2 Fosfolipase do tipo A2

As fosfolipases do tipo A2 (PLA2) são encontradas na maioria dos venenos e costumam ser classificadas em dois subtipos: tipo I, mais comum em elapídeos, e tipo II, presente nos venenos de viperídeos (DUFTON & HIDER, 1983). Baseando-se na ausência ou presença do *loop* pancreático (resíduos 62-67), as PLA2 tipo I, elapídicas, podem ainda ser subdivididas em Ia ou Ib. A maioria dos venenos elapídicos apresenta PLA2 Ia, embora tenha sido reportado o tipo Ib em algumas espécies como *Oxyunarus scutellatus* (FOHLMAN et al., 1977), *Pseudonaja textilis* (PEARSON et al., 1993), *Notechis scutatus* (FRANCIS et al., 1995), cobra-rei (HUANG et al., 1996), AAG23963 e AAG23964 e em cobras-corais (FRANCIS et al., 1997).

Com 120 aminoácidos e seis ou sete pontes dissulfeto, são compostas por alfa hélices e algumas estruturas em folhas beta (DUFTON & HIDER, 1983). Estas toxinas apresentam diversas funções e especificidades. Algumas PLA2 são neurotoxinas pré-

sinápticas, ou β -neurotoxinas com alvos específicos nas junções neuromusculares (HARRIS, 1991) para aumentar a liberação de neuromediadores. Algumas atuam como miotoxinas que despolarizam membranas celulares musculares (MEBS & OWNBY, 1990) e levam à necrose. Acredita-se que as PLA2 possam desempenhar ações neurotóxicas por se ligarem à membrana nervosa e catalisar a hidrólise fosfolipídica com a produção de lisofosfolipídios e ácidos graxos (ROSSETTO et al., 2006).

As PLA2 encontradas aqui apresentam estrutura similar às PLA2 de veneno de outros elapídeos, ou seja, classificam-se como tipo I, particularmente do tipo Ia, pois está ausente o *loop* pancreático. O cluster mais abundante obtido é o MCOR0036C, com 196 clones. Esse cluster apresentou uma identidade de 100% com a sequência de PLA2 de *Micrurus corallinus* previamente clonada e caracterizada por nosso grupo (DE OLIVEIRA et al., 2003). Esta sequência apresenta na posição 49 um aminoácido aspartato altamente conservado (Asp49) e envolvido intimamente na ligação com íon metal Ca^{2+} , que tem função essencial na atividade catalítica dessa enzima.

Realizamos todos os clusters de PLA2 encontrados no banco, e é interessante notar que dois deles, MCOR0404S e MCOR0609S (*singlets*), apresentaram sequências bastante peculiares, já que possuem inserções de 114pb na posição 110, dentro do trecho referente à proteína madura (Figura 11). Uma observação interessante é que essa inserção corresponde exatamente aos últimos 114pb do íntron 4 do gene das PLA2 (FUJIMI et al., 2002). Isso significa que houve um *splicing* alternativo no transcrito desse clone, de forma que o íntron 4 (normalmente com ~500pb) não foi completamente removido e sua porção 3' permaneceu no transcrito final. De fato, a inserção se inicia com o dinucleotídeo GT e se encerra com AG, justamente a sequência canônica das junções íntron/éxon (LEWIN, 2000) (Figura 11). Além disso, a inserção de 114pb é múltipla de 3 e corresponde portanto a 38 códons codificantes (sem códons de parada). Isso permite que, após a inserção, a fase de leitura se mantenha igual à da molécula original, apresentando o mesmo C-terminal. A análise da sequência de aminoácidos inserida não revela similaridade com domínios conhecidos. Claro que essa inserção pode ser decorrente de um erro fortuito no processo de *splicing*, mas o fato de não conter códons de parada nem resíduos de cisteína (o que poderia desestabilizar a estrutura) e manter a fase da tradução indicam que pode resultar em um novo produto protéico.

Sabe-se da relevância da ação fosfolipásica do tipo A2 no veneno de *M. corallinus* por ela apresentar efeito pré-sináptico neurotóxico (HARRIS, 1991 e

ROSSETTO et al., 2006). E, além disso, é a segunda classe de toxinas mais abundante encontrada no banco. Por essa razão, as PLA2 são candidatos antigênicos para uma possível imunização genética.

Figura 11: Alinhamento dos clusters de fosfolipase do tipo A2 obtidos por análise do transcriptoma da glândula de veneno de *M. corallinus*. Nota-se uma inserção de 114pb delimitada por GT e AG (seqüência canônica das junções íntron/éxon).

4.1.2.3 Lectinas do tipo C

As lectinas do tipo C são proteínas não-enzimáticas presentes em venenos de serpentes de todas as Famílias. Assim como as lectinas de plantas, algumas das lectinas de veneno são capazes de se ligar a carboidratos. Na presença de Ca^{2+} , as lectinas tipo C iniciam uma grande infinidade de processos biológicos, tais como adesão, aglutinação, endocitose e neutralização do patógeno. Elas podem ser divididas em sete grupos diferentes de acordo com suas características estruturais (WEIS et al., 1998). As lectinas tipo C que parecem ter perdido a propriedade de se ligar a carboidratos são chamadas lectinas-like, por apenas conservarem características estruturais em comum com as lectinas “verdadeiras”. As lectinas de veneno podem causar agregação de hemáceas de forma dose-dependente. Recentemente, foram isoladas lectinas-like tipo C, que atuam como antagonistas e agonistas de agregação plaquetária e afetam a trombose e hemostase por inibição e ativação de receptores específicos da membrana de plaquetas (OGAWA et al., 2005). Algumas dessas lectinas podem atuar também como anticoagulantes. Bioquimicamente, as lectinas tipo C são normalmente proteínas homo ou heterodiméricas com cadeias alfa e beta relacionadas estruturalmente, e com as subunidades ligadas por pontes dissulfeto entre as cisteínas conservadas na Família. Possuem cerca de 130 aminoácidos por subunidade.

As lectinas tipo C têm sido bastante utilizadas como ferramenta para investigar e estudar receptores plaquetários (DU et al., 2002). Alguns inibem a função plaquetária e previnem a interação com o ligante, outros ativam as plaquetas também diretamente via receptores ou indiretamente por meio de proteínas plasmáticas. Como exemplos tem-se o echicetin, que é utilizado como receptor IgMk, e o botrocetin, que se liga ao fator von Willebrand.

A convulxina-like (Ofioluxina) foi a primeira proteína a ser identificada que age via GPVI (Glicoproteína VI) e ela tem sido bastante utilizada para o isolamento, caracterização e investigação de mecanismos sinalizadores desse importante receptor. Essa foi a primeira lectina do tipo C identificada na *Família Elapidae* (DU et al., 2002).

As lectinas tipo C encontradas aqui também são relativamente abundantes. Sessenta e cinco clones apresentaram similaridades com essas proteínas e foram agrupados em treze clusters, o que representa aproximadamente 5% do total de proteínas expressas nesse tecido. Muitas delas correspondiam à ORFs (*Open Reading Frame*) completas, ilustradas na Figura 12A e alinhadas com outras lectinas tipo C de veneno.

Sendo componentes ubíquos de venenos, porém muito diversificados em termos de estrutura-função, é interessante compreender como as diferentes lectinas tipo C de *M. corallinus* se encaixam na filogenia da Família. Uma análise filogenética *Baesian*a revela que as proteínas de veneno de serpentes se isolam num agrupamento único e distinto das lectinas fisiológicas animais (Figura 12B) Dentro do grande grupo da lectinas de veneno, nota-se claramente a distinção entre as lectinas tipo C verdadeiras e seus homólogos estruturais, as lectinas-*like* (suporte de ramo de 0,81 e 1,0 respectivamente). Todas as lectinas de *M. corallinus* se enquadram dentro do grupo das verdadeiras, juntamente com as lectinas de outros elapídeos. A única exceção é o cluster MCOR0067C (claramente distinto dos demais já no alinhamento), que é mais similar a proteínas fisiológicas curtas do grupo das litostatinas do que às lectinas de veneno (verdadeiras ou não). Recentemente, foi observada uma sequência semelhante a essa no transcriptoma da serpente *B. insularis* (BINS004C), que nesta filogenia realmente se agrupa com o MCOR0067C. Dessa forma, o achado de outra lectina com essas características corrobora a possibilidade de que esse seja um terceiro grupo de lectinas de veneno.

Quanto à organização dentro do ramo das lectinas verdadeiras, a maioria dos clusters se agrupa junto com a lectina de *Lapemis hardwick*, um elapídeo da subfamília *Hydrophiinae* (serpentes marinhas). Apenas um cluster, MCOR0090C, se agrupa com as lectinas verdadeiras de outros elapídeos e de viperídeos. De qualquer forma, esses componentes parecem estar bem diversificados em *M. corallinus*.

1 100

MCOR0026C (1) MGQFLVLSGLLLVAFSLNGIGAD---HHCPSDWYSFDK---FYKYFIQWKSWNDNEASRLQDSSSLASHSHQAEIFRVQKVI FMNTVL-YDDV-
MCOR0040C (1) MGRFLVLSLCLLVAFSLNGIGAHR---YCPDFWFSNHA---SYKLFKHPMTWDQARFQTEKQENGQSLASHDAEVSVKLSNHSQRLK-LTLDV-
MCOR0067C (1) MGQHAHFWGFCLLACL SVLPVEGIQRG-AKCPDEEAYIYRR---YQYQLVDMSLTWDAAETEQHRLRGAHATLRTTAEERIVSSHRRSST-ATDA-
MCOR0077C (1) MGQFIIVSGLVVLVAFSLRGTGAD---HHCPSSWASYNE---FVPMVSNGSMTWNNEBGFLLQKQPDCHSLASHSKPEAAFTVGLAYHGASS-RSSV-
MCOR0090S (1) MGHFTFISLCLMPFI LSLSGAECY---TOPIDWLSRNG---LYKLFDDTKTWPDAIRFKHKHPGCHLSIHSSEASADLAEYIYDYLYKS-EKNV-
MCOR0095C (1) MGHFTFISLCLMPFI LSLSGAECY---TOPIDWLSRNG---LYKLFDDTKTWPDAIRFKHKHPGCHLSIHSSEASADLAEYIYDYLYKS-EKNV-
MCOR0292S (1) -GKFIIVSFGFLVVAFFLRGTGAD---HHCPSSWASYNE---FVPMVSNGSMTWNNEBGFLLQKQPDCHSLASHSKPEAAFTVGLAYHGASS-RSSV-
MCOR0603Cedit (1) MGHFTFISLCLMPFI LSLSGAECY---TOPIDWLSRNG---LYKLFDDTKTWPDAIRFKHKHPGCHLSIHSSEASADLAEYIYDYLYKS-EKNV-
AAK43584 (1) MGHFTFISLCLMPFI LSLSGAECY---YTOPIDWLPKNG---LYKYVFSKHTKTWDAEMYRKFKPGCHLSLHNSADAVVEFSEIYSIDYLTG-QGHV-
AAK43586 (1) MGHFTFISLCLMPFI LSLSGAECY---TOPIDWLPKNG---LYKYVFSKHTKTWDAEMYRKFKPGCHLSLHNSADAVVEFSEIYSIDYLTG-RGHV-
AAB49518 (1) ---GKFIIVSFGFLVVAFFLRGTGAD---HHCPSSWASYNE---FVPMVSNGSMTWNNEBGFLLQKQPDCHSLASHSKPEAAFTVGLAYHGASS-RSSV-
ABH05181 (1) MGHFTFISLCLMPFI LSLSGAECY---TOPIDWLPKNG---LYKYVFSKHTKTWDAEMYRKFKPGCHLSLHNSADAVVEFSEIYSIDYLTG-QGHV-
AAS54808 (1) MGRFLFASLGLLVAFSLSGTGAN---LYCPDFWFSNHY---SYKLFYSVLTWDQARFQTEKQENGQSLASHDVGESVKLSNYSIQRWG-FFDV-
AAQ15153 (1) MGRFIFVSGFLVVLVAFSLSGTGA---DPLSGWSSYEG---HYKYFAFELYKTWDDAEENFMEGVRKGGHLSVSESGEADFVAQLISENMKRLDFFV-
AAQ15155 (1) MGRFIFVSGFLVVLVAFSLSGTGA---DPLSGWSSYEG---HYKYFNFELKNWADDENFTQQQAGGHVVSFGSEADFFVKLAFTQFDHSIF-
AAS01426 (1) MGRFIFVSGFLVVLVAFSLSGAKGN---NCPDQWLPKNG---LYKIFDELKAWKDAEMFRKYKPGCHLSAFHLYGESPEIAEYIYSDYHKG-QSEV-
BINS0004C (1) MFLITICFISGLL-SLTWAGSVSVR---TVCPSGTGFYKDGSEWYFYKFEYDFQTHDDEEQFKWRG-HLASLTGKQKVKSIAAYVTADNPE-GDLV-
LMUT0078C (1) MGRFLFVSGFLVVLVAFSLSGTGA---DPLSGWSSYEG---HYKYFHLFKTWDDAEENFMQKQGGHLSVSESGEADFVAQLISENMKRLDFFV-
LMUT0114C (1) MCSWLFIICAF LGITFMQDVSATCTCLCAQGFCAAGMVQYKS---AYKYVVRQYITWTEARISITQRYSPSTSLASHSHSTENNFIIFHLMGKPLFKYQKQYAG-
LMUT0074C (1) MGRFIFVSGFLVVLVAFSLSGAAG---DPLSGWSSYEG---HYKYFNEPKNWADDENFTQQHTGGHVSFHSKSKEADFFVKLAFTQFDHSIF-
POLF0063C (1) MGRFIVNLNGLLVAFSLRSGSEA---DPLSGWSSYDK---YKYKVFDRKNWADDENFMQEGKGGHLSALGSLGEGFKVGLAFKFLKEHTYIV-
POLF0083C (1) MGRSIFIVNLNGLLVAFSLRSGSEA---DPLSGWSSYDK---YKYKVFDRKNWADDENFMQEGKGTSGHLSLISSEEGYVANLAFKVRK-HP5-M-
WMER0022C (1) MGQFIIVSGLLLVAFSLTGTGA---HHCPGTSYEN---FYKAFANNRNREDAFTEQQTGGHLSIQCTEADFVAQLARRIET-PRNI-
WMER0007C (1) MGQR-FLTLGLFVMSVSLKGSAT---LPLSGWSSNYTD---YKYKVFYEFKTWDDAEKFKME-IGRAASLHNSSEESFVHNHLLTKSFE--SGSA-
AAU11827 (1) MASVPHPTIFLPLACLAGIVNTRATSSCPKNGTHHGS---RQETFTKQMDNSASBAACIR-KGGNASHINNRNEFNTHILKLSGE-NRRT-
NP 114433 (1) MASRSRMLLLLCLAKTGVLG-IDIMRSPCAPGWYHKSS---NNGYGRFKRLNWDASLEOYSGNGAHLASLISLKEASTIAEYISGYOR--SOP1-

	101	197
MCOR0024C	(91) WIGLSDPW---ENRTVWSDGSAID--YTSWVSEKPSAVDEEQHCVHLS---SSSRVREAEASCESNNYFIKIM	
MCOR0060C	(90) WIGCRLSKS---RKSTWESDGSNLT--YTSWEKGEPNLNMGEFCVLS---TGSRYLQNDKSWHSHVSVKFLQOSEAKA	
MCOR0067C	(93) WIGMHAVR-TPKKLIWEMIDGTTYPGTLLWNRAESTLSLTAECTSVNTHIPGNAAIRIQTATALPFIKFRSSF--	
MCOR0077C	(91) WIGLNDPE---KRRARQWSDGSRIL--YKSWMPGEPNNHASMEYCVVLS---AWSRYVGNDDGDSRHNFFVKQFPRS-	
MCOR0090S	(90) WIGLNDPQ---KERIWEWIDRSSTN--YTSWNEGEPNNSWNKEYCVHLL--ASQGYLKNDTPCESLFAFIRCFQF	
MCOR0095C	(90) WIGLNDPQ---KERIWEWIDRSSTN--YTSWNEGEPNNSWNKEYCVHLL--ASQGYLKNDTPCESLFAFIRCFQF	
MCOR0292S	(90) WIGLNDPE---KRRARQWSDGSRIL--YKSWMPGEPNNHASMEYCVVLS---AWSRYVGNDDGDSRHNFFVKQF	
MCOR0603Cedit	(90) WIGLNDPQ---KERIWEWIDRSSTN--YTSWNEGEPNNSWNKEYCVHLL--ASQGYLKNDTPCESLFAFIRCFQF	
	AAK43584 (90) WIGCRDRTK---KKYIWEWIDRSRTD--FLPWRKKQPDHFNNEFCVEIV--NFTGYLQNDNDCAALRPLFOCKY	
	AAK43586 (90) WIGCRDRTK---KKYIWEWIDRSRTD--FLPWRKKQPDHFNNEFCVEIV--NFTGYLQNDNDCAALRPLFOCKY	
	AB49518 (67) WIGLWDKK---KDFSWEWIDRSCTD--YLTWDKNQPDHYEGKEFCVELV--SLTGYRLNDQVCESKNAFLQCKF	
	AB495181 (90) WIGLNDPQ---KRRTVWSDGSRSSN--YFSWNQGEPNNSKNKEYCVHLL--APTGYLKNDAPESLHPFLQCKY	
	ABN54808 (90) WIGCRLSKS---RNGIWEWSDGSNLT--YTSWKEGEPNLFNMEFCVLS---ACTRYLQNDKKTKLHLHPFLQFQPRSEANG	
	AAQ15153 (90) WIGLRVQGD-EKQCNSEWSDGSSVS--YENWIESES---KTCUGLE--QOTKERKVNLNLYGQQRIPFVCEA	
	AAQ15155 (88) WIGLSNVW---NQCWNQWNSNAAMLRL--YKAAWE-ES---YCVYFK--STNNK--VRSRSCKRMANFVECF	
	AAS01426 (90) WIGLWDKK---KDFSWEWIDRSCTD--YLSWDKNQPDHYQNKFCVELV--SDTGYRLNDQVCESKNAFLQCKF	
	BINS0004C (93) WIGCREVKGSSSVKTRWRITDGRSM--YKKWSYGEPIKIHYYDPCVGLS--PASGVYEVVARECNTPTPLCKWPKS	
LMUT0078C	(90) WIGLRVQGE-QKCTSKWSDGSSRIL--YENWDESEL---KTCUGLE--QDNTKEKENVYCGKINPEVCEA	
LMUT0114C	(97) WIGAHDTF---KEGTFTVWIDGSKFD--FQSPFSEQDGLTGEHYLGSWF--LRNEKITNDYNNSWKFGSVKQYSLANGGCSSSCEAK	
LMUT0074C	(88) WIGLSNVW---NKCSWQWNSNAAMLRL--YKAAWEES---YCVYFK--STNNK--KKSCKRMAFVYEFQA	
POLF0063C	(90) WIGLRAGQG-QQKCSRRSDGSGRIL--YENWHPLQS---KKCTALS--KWTEYLKQYNIHQDTLPLFKFLAEPDDPE	
POLF0083C	(88) WIGLSNWI---NQCSWQWSDGSSGLF--YEAWEVG---PDCVMRL--LQPFQIDQYSVCEKSTLPTFKFLAKREDPAPE	
WMER0022C	(89) RIGLKAAPQREQCSRKWSDGSRIG--YKKINTKY---IKKCVLS--KVTCYQKQHNFNCDKCPFIKILASEDPVSEAPGGLEKQGSPPA	
WMER0007C	(86) WIGLSNVW---RKCHWEWSDQLVD--FEAWVER---PHCVGMR--VQPKLVSHHMDQIKPLPFIKSPKEAKVAPR-	
AAU11827	(93) WIGGNDVAV---KEGMWFSWDGSKFNL--YKGWKKGGDPKHVPAEHCETN--FKGAG--FNNALCKVRRSLFAKLN	
NP 114433	(93) WIGLNDHPQ---KROONWIDGAMFLY--YRSWS-GKSMG--GNKHCAEMS--SNNNPLTSSNECKROHPLFKYRP

Figura 12: A) Alinhamento das lectinas do tipo C e seus homólogos estruturais, as lectinas-like, juntamente com as lectinas fisiológicas animais encontradas no transcriptoma de glândulas de veneno de *M. corallinus*. B) Análise filogenética *Baesiana* dessas lectinas tipo C (setas vermelhas indicam os clusters das lectinas tipo C encontradas no banco transcriptômico de glândulas de veneno de *M. corallinus*).

4.1.2.4 Peptídeo Natriurético

O precursor do peptídeo natriurético encontrado nos elapídeos é uma forma diferenciada do precursor dos peptídeos potenciadores de bradicinina (BPP) e do peptídeo natriurético encontrado nos viperídeos. Os peptídeos natriuréticos estão presentes em muitos venenos, inclusive nos elapídicos, onde são codificados por outro tipo de precursor, sem os BPPs (SCHWEITZ et al., 1992 e HO et al., 1997).

Três são os principais tipos de peptídeos natriuréticos encontrados: peptídeo natriurético atrial (ANP), peptídeo natriurético cerebral (BNP) e peptídeo natriurético tipo C (CNP). O peptídeo natriurético da serpente do gênero *Dendroaspis* (DNP) compartilha propriedades estruturais e funcionais com essas três formas. Todos apresentam efeito de vasodilatação, assim como efeitos natriuréticos. Os efeitos de vasodilatação induzido pelas três formas de peptídeos natriuréticos são mediados pela estimulação de uma guanilato ciclase específica (WOODARD et al., 2002). Um peptídeo análogo aos CNPs foi sintetizado e perfundido em rim de rato, e apresentou resposta sobre o volume urinário e excreção de Na^{2+} dose-depentente (HO et al., 1997).

Encontramos cinco clusters em um total de catorze clones, que representam aproximadamente 1% de todas as proteínas expressas no banco obtido. O cDNA representante do cluster MCOR0001C (seis clones) é muito semelhante ao que foi caracterizado por HO et al. (1995), à exceção da cisteína extra que não foi confirmada em nossa sequência. Todos os peptídeos natriuréticos descritos até hoje apresentam uma estrutural em anel com dezessete aminoácidos atrelado por uma ponte dissulfeto, que se estende com alguns poucos aminoácidos pelo N-terminal. Já no C-terminal, os peptídeos natriuréticos do tipo B e C de mamíferos apresentam de quatro a sete aminoácidos. O peptídeo natriurético de *M. corallinus* apresenta algumas peculiaridades: a) ele apresenta uma extensão C-terminal não usual que é mais longa; e b) essas regiões flangeadoras apresentam duas regiões homólogas de função desconhecida.

Ao realinhar os clusters entre si notamos que três clusters (MCOR0019C, MCOR0193S, MCOR0195S) apresentaram uma grande deleção de 237 pb em relação ao MCOR0001C resultando na ausência de 79 aminoácidos (Figura 13). Analisando as montagens e as ESTs individualmente, ao nível de cromatogramas, percebemos que esta deleção não deriva de artefatos do processo bioinformático e que estão até presentes em mais clones (sete no total) do que a molécula arquétipa do cluster MCOR0001C (seis clones). A fase de leitura é mantida após a deleção, de forma que o polipeptídeo

codificado possui o peptídeo sinal, parte do prodomínio incluindo, uma parte das regiões homólogas e o restante do C-terminal. Portanto, o trecho deletado corresponde ao peptídeo natriurético maduro propriamente dito e um pouco da região flanqueadora. Diferentemente da inserção no cDNA da PLA2 (descrita na Figura 12), o trecho deletado não segue a regra GT-AG de *splicing* e portanto não deve se tratar de um *splicing* alternativo. Além disso, alguns clusters ainda apresentam inserções correspondentes a quatro resíduos (VHPE) próximas ao C-terminal.

É difícil precisar qual o real significado de uma molécula como esta, abundante, com parte dos elementos do prodomínio e do C-terminal, mas em que está ausente o CNP. Uma pista pode ser a presença, mesmo na forma deletada, de uma das regiões repetitivas, que já foi sugerida como possuindo elementos característicos de peptídeos biologicamente ativos (HO et al., 1997). Assim, talvez esse precursor seja “desenhado” para produzir um novo peptídeo baseado nesse trecho. É interessante notar que os precursores dos BPPs/CNPs de venenos, cujas estruturas são conhecidas há algum tempo, vêm revelando novos peptídeos em suas regiões propeptídicas. GRAHAM et al., 2005, por exemplo encontraram peptídeos inibidores de bradicinina no mesmo precursor dos BPPs. Mais recentemente, WAGSTAFF et al., 2008, descreveram que a região espaçadora conservada (EKW) de alguns precursores gera peptídeos presentes no veneno capazes de inibir as metaloproteases do próprio veneno, num suposto mecanismo de proteção contra proteólise na glândula.

Figura 13: Alinhamento entre as seqüências de peptídeo natriurético encontrado em análise do banco de dados. A região repetitiva está delimitada entre as barras pontilhadas, com a região mais conservada destacada.

4.1.2.5 L-aminoácido oxidase

L-aminoácido oxidases são conhecidas há muito tempo em venenos. São enzimas grandes, de 58kDa, que atuam basicamente sobre L-aminoácidos convertendo-os em cetoácidos e gerando H_2O_2 , o que parece contribuir para a inibição da agregação plaquetária e lesão celular (NATHAN et al., 1982). Não foi obtido nenhum clone completo, devido provavelmente ao seu cDNA (2,8 kb) ser muito longo (RAIBEKAS & MASSEY, 1998). Dois clusters, MCOR0200S e MCOR0263S, cada um contendo apenas um clone (*singlet*), foram encontrados no banco de *M. corallinus* (Figura 14). A L-aminoácido oxidase já foi reportada em elapídeos, pois está depositada no banco de dados (Accession nº AAY89682), mas não em *Micrurus*. Na análise desses dois clusters, notamos que os dois se sobrepõem, sendo que o MCOR0200S representa a parte correspondente a 3'UTR (posição 1368pb-1551pb), enquanto o MCOR0263S contém a parte C-terminal da região referente à proteína madura (885pb-1386pb).

Figura 14: Dois clones encontrados no banco de dados de *M. corallinus* representando duas regiões fracamente contíguas da L-aminoácido oxidase.

4.1.2.6 Inibidor do tipo Kunitz

Nos venenos de cobras, a estrutura dos inibidores de serinoprotease do tipo Kunitz aparece na forma de dois tipos de moléculas funcionalmente distintas: os inibidores de serinoprotease não-neurotóxicos e os neurotóxicos, também chamados de dendrotoxinas, que não possuem grande ação inibitória nas proteases. Os não-neurotóxicos são capazes de inibir a tripsina e quimiotripsina, e são comuns nas Famílias *Viperidae* e *Elapidae* (ZUPUNSKI et al., 2003). As dendrotoxinas estão presentes nos venenos de alguns elapídeos, como a mamba negra (*Dendroaspis*) e os kraits (*Bungarus*). Sua ação tóxica se dá pelo aumento da liberação de neurotransmissores, como a acetilcolina, das membranas pré-sinápticas das sinapses colinérgicas. As dendrotoxinas têm como alvo canais de potássio das membranas das células nervosas, que são bloqueados.

Dois clusters de baixa expressão, MCOR0110C e MCOR0611S, foram encontrados no banco de dados. Ambos aparentam ser mais parecidos com os inibidores que com as neurotoxinas, já que são similares a diversos tipos de inibidores dos viperídeos, embora o grau de conservação dos dois seja baixo. Entretanto, no contexto de forte perturbação neurotóxica do veneno de *M. corallinus* tal atividade é bastante plausível, portanto mais análises ainda são necessárias para se determinar sua função exata.

4.1.2.7 Metaloprotease

As metaloproteases de veneno são normalmente agrupadas de acordo com a presença de domínios específicos. Há um domínio proteolítico caracterizado pela presença de um sítio catalítico que conserva o motivo HEXXHXXGXXH, responsável pela ligação de um íon metálico, geralmente Zn^{2+} . Após o domínio catalítico pode haver um domínio tipo desintegrina, capaz de se ligar às integrinas de plaquetas ou de células endoteliais. A região responsável pela ligação às integrinas pode apresentar o motivo RGD (desintegrinas RGD) ou ter esta sequência substituída por outra, como ECD (desintegrinas não-RGD), alterando sua especificidade. O carboxi-terminal das desintegrinas não-RGD pode ter ainda um domínio rico em cisteínas de função pouco conhecida.

A metaloprotease encontrada aqui é representada apenas por um único cluster MCOR0063C, de apenas quatro clones (1123pb). É semelhante à cobra encontrada em *Naja naja*, espécie da Família *Elapidae* do Velho Mundo. Trata-se de um exemplar de metaloprotease do tipo P-III, ou seja, ela apresenta o domínio tipo desintegrina não-RGD seguido de um domínio rico em cisteínas.

4.1.2.8 Serinoprotease

As serinoproteases de veneno, especialmente em viperídeos, estão relacionadas à tripsina. Essas proteínas possuem em torno de 35kDa, apresentam seis pontes dissulfeto e quantidades variáveis de sítios de glicosilação. Estas enzimas normalmente contém doze resíduos de cisteína e uma extensão C-terminal, o que é característica das serinoproteases. As serinoproteases do veneno de cobra devem ocorrer como enzimas similares à tripsina, amplamente descrita nos viperídeos, ou como as proteínas do tipo Fator X, mais complexas, encontradas em alguns elapídeos terrestres (KINI, 2005). Recentemente, algumas enzimas similares à tripsina foram descritas na Família

Elapidae, por exemplo, ABN72544, o que mostra que essa não é uma classificação pragmática.

A variação de substratos das diversas serinoproteases de veneno é bastante grande e muitas delas atuam sobre os elementos da cascata de coagulação.

As serinoproteases através de evoluções adaptativas aceleradas geram variantes de diversas funções (FRY et al., 2006), incluindo especificamente componentes sanguíneos de degradação e ativação que estão envolvidas na coagulação e fibrinólise (SERRANO & MAROUN, 2005), ativando o sistema kalicreína/kinina (HUNG & CHIOU, 2001) ou afetando agregação plaquetária (LAING et al., 2005).

No transcriptoma de *M. corallinus* nós não encontramos nenhum dos tipos, apenas um único cluster parcial (MCOR0160S) que mostra mais similaridade com as serinoproteases não-venenosas dos mamíferos (~52% de identidade) do que com as serinoproteases das serpentes (~39%). Os maiores acertos se dão com as prostasinas de mamíferos basais, como o ornitorrinco (Monotremata) e o gambá (Metatheria). Este é um canal que ativa a protease envolvida no crescimento de células epiteliais. A porção semelhante ao MCOR0160S corresponde a uma parte do domínio da Peptidase S1, indício de que deve ocorrer atividade proteolítica. Mas, como a sequência é parcial, não é possível determinar a presença de domínios adicionais, como o C-terminal transmembrana ou o propeptídeo. Dada a onipresença da serinoprotease nos venenos de cobra, nós incluímos este cluster entre as possíveis toxinas de *M. corallinus*, embora uma confirmação posterior ainda seja necessária.

4.1.2.9 NGF

Assim como seus homólogos de mamíferos que regulam diferenciação neuronal, os NGFs (*Nerve Growth Factor*) de veneno atuam como agonistas de baixo potencial de receptores TrkA (tirosina-quinase), ao competir pela ligação ao receptor com o NGF endógeno, influenciando no desenvolvimento de neurônios colinérgicos (MCDOWALL, http://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2004_6/Page1.htm).

Os NGFs pertencem à família dos fatores neurotróficos e são polipeptídeos neurotróficos muito bem caracterizados. Foram os primeiros fatores neurotróficos a ser identificados como polipeptídeos que regulam manutenção e sobrevivência neuronal (KOSTIZA & MEIER, 1996). Por definição, os fatores neurotróficos são proteínas solúveis endógenas que regulam sobrevivência, crescimento, plasticidade morfológica, ou síntese de proteínas para funções diferenciadas dos neurônios.

Os NGFs apresentam um papel importante na ontogênese e regulam o desenvolvimento e manutenção de neurônios derivados de neurônios sensoriais embrionários e de células nervosas do nervo periférico simpático dos vertebrados. Recentemente, tem surgido evidências de que as NGFs têm efeito similar dentre os neurônios colinérgicos do sistema nervoso central. Apesar de induzir um típico crescimento de fibras em cultura celular, veneno de serpente e NGF humano exibem também efeitos não-neuronais, tal como indução de extravasamento plasmático e liberação de histamina de todas as células sanguíneas (KASHIMA et al., 2002).

As proteínas do tipo NGF são típicas também de muitos venenos, onde se apresentam como complexos homodiméricos associados por ligações, geralmente não-covalentes. Os NGFs de venenos podem ser incluídos dentro do grupo das vasculotoxinas. O efeito desses fatores no envenenamento é provavelmente deixar o local da picada mais suscetível aos outros componentes do veneno e levar a uma distribuição ótima de substâncias que dificilmente poderiam se infiltrar no tecido alvo (KOSTIZA & MEIER, 1996).

Esse componente também foi encontrado em nosso banco, porém é bem menos abundante que as demais. Talvez pelo fato de sua seqüência ser bastante longa, o único cluster obtido (MCOR0149S) é parcial, ou seja, corresponde apenas a parte da região C-terminal. Sua relevância no veneno de serpentes ainda não é muito clara.

4.1.2.10 WAP

Essa é uma classe nova de toxinas. No banco obtivemos apenas um cluster, MCOR0526S, com apenas um clone. É uma seqüência parcial, ou seja, não contém a porção do peptídeo sinal e parte da proteína madura.

A proteína WAP (*Whey Acidic Proteins*), ou *waprina* ou *nawaprina* (assim denominada por ter sido descrita primeiramente em *Naja nigrocollis*) apresenta um possível papel como inibidor de protease. É semelhante à elafina (inibidor de elastase de leucócito humano), caltrina-like (inibidor de transporte de cálcio) e a outros inibidores de protease extracelular. Por apresentar diferenças significativas em regiões importantes da molécula, *nawaprina* possivelmente não apresenta uma atividade de inibição da elastase e deve ter uma função diferente em venenos de serpentes (TORRES et al., 2003). Membros dessa família apresentam quatro pontes dissulfeto, das quais três estão na base da molécula. Em mamíferos, sua função parece estar relacionada à maturação espermática no epidídimo.

O domínio WAP geralmente consiste de cinquenta resíduos de aminoácidos, com oito resíduos de cisteína conservados formando quatro pontes dissulfeto. Apesar dos resíduos de cisteína serem conservados, os segmentos intercisteína são totalmente diferentes dos demais membros da família WAP. Além disso, o domínio WAP é encontrado em proteínas com funções divergentes, incluindo inibição $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, inibidor de proteinase com atividade antimicrobial (elafina), atividade inibitória do crescimento (ps20) e proteínas antibactericidas. A maioria das proteínas de domínio WAP reportadas estão envolvidas no sistema imune inato (NAIR et al., 2007).

4.2 IMUNIZAÇÃO GENÉTICA

Como discutido anteriormente, a produção de soro no Instituto Butantan é limitada, principalmente, pelo tamanho reduzido das glândulas de veneno das cobras-corais, o que acarreta uma baixa produção de veneno. Por essa razão, há uma necessidade de buscar formas alternativas para a geração de soro antielapídico. A escolha mais óbvia seria a produção de toxinas recombinantes em *E. coli*. Porém as 3FTx, que são as toxinas mais abundantes encontrada no veneno, apresentam muitas pontes dissulfeto, o que poderia acarretar um dobramento incorreto da proteína que leva a mudanças funcionais. Há, dessa forma, uma necessidade de se fazer o *refolding* da proteína (reestruturação da proteína), o que é bastante complicado, lento e custoso. Essa alternativa foi bastante explorada em projetos anteriores de nosso laboratório (PRIETO DA SILVA, 2001b), que confirmaram essas dificuldades metodológicas esperadas. Por outro lado, sistemas eucariontes como células de mamíferos ou levedura podem não render a quantidade necessária de proteína a fim de se produzir o soro. Então, experimentalmente, seria importante determinar a viabilidade de geração de resposta imune contra toxinas de cobra-coral por meio de uma outra abordagem, tal como a imunização genética, ou a vacina de DNA. Essa idéia é atual e já foi testada para venenos africanos de *Echis ocellatus* e *Cerastes cerastes* (HARRISON, 2004 e WAGSTAFF & HARRISON, 2006). O intuito final desse projeto é justamente a imunização em cavalos, porém antes é necessário definir a prova do princípio, com a escolha dos candidatos antigênicos e pela avaliação das construções a serem utilizadas.

4.2.1 Escolha de candidatos antigênicos a partir do transcriptoma de *M. corallinus*

Tendo em vista o padrão obtido pela análise transcriptômica, pudemos ratificar as informações contidas na literatura sobre as toxinas predominantes desse veneno e, assim, dar continuidade ao projeto.

O passo seguinte foi escolher os candidatos antigênicos para uma possível imunização alternativa. Vários tipos de toxinas foram analisados dentro do banco de ESTs (transcriptoma) de *Micrurus corallinus*. Essas seqüências foram comparadas com seqüências semelhantes no banco de dados e, com base na literatura, verificamos o efeito farmacológico esperado e em que contexto esse efeito estava inserido. Entre os vários critérios que podem ser adotados para orientar nossa escolha, consideramos, por exemplo:

- 1) cDNAs que eram abundantes (dado pelo número de clones seqüenciados), pois podem representar toxinas mais relevantes.
- 2) Representantes de tipos diferentes de toxinas, pois assim pode-se despertar resposta imune abrangente para todos os componentes.
- 3) Toxinas com formas ortólogas presentes em espécies diferentes.
- 4) Proteínas novas, sem função aparente, mas com peptídeo sinal para secreção.
- 5) cDNAs de proteínas não descritas como toxinas na literatura, mas que mediam efeitos deletérios.

Resolvemos escolher inicialmente, como validação, as proteínas sobre as quais se sabe que têm ação tóxica e são abundantes no veneno, tais como as 3FTx (α -neurotoxinas) e as PLA2, também conhecidas pela sua ação β -neurotóxica ou pré-sináptica.

Pela análise das 3FTx encontradas por semelhança com o banco de dados, fizemos um alinhamento e conseguimos reunir os 37 clusters com seqüências completas (*full-lengths*) em diferentes lotes, conforme relatado anteriormente, dos quais escolhemos representantes de quatro grupos como candidatos a antígenos, conforme descrito a seguir.

Um grupo (representado pelo cluster MCOR0604C) é semelhante a uma seqüência peculiar, a *homolog 8* (nxh8) (PRIETO DA SILVA, 2001b). Cinco clusters (um total de 44 clones) compõem o grupo, porém um cluster (MCOR0546S contendo 1 clone) foi excluído, pois apresentava muitos erros de seqüenciamento. O grupo está

representado na Figura 15 com enfoque na sequência escolhida como representante, pelas mesmas razões descritas acima. Da mesma forma, o clone MCAL01H08, pertencente ao cluster MCOR0604C, será considerado daqui em diante como nosso antígeno 1, referido como Atg1.

Figura 15: Alinhamento dos clusters que representam o grupo *homolog 8* (nxh8). O cluster MCOR0604C (Atg1) foi o escolhido para representar todo o grupo e é idêntico à sequência nxh8 (Accession nº sp|P58370|NXAH8_MICCO).

Um segundo grupo (representado pelo cluster MCOR0599C) é semelhante às neurotoxinas homólogas nxh1, nxh3 e nxh7 (Ho et al., 1995). Os quinze clusters pertencentes a esse grupo somam 126 clones e foram alinhados, sendo representados na Figura 16 com enfoque na sequência do cluster escolhido como representante, por estar entre os mais abundantes e possuir a sequência mais consensual do grupo. Dessa forma, o clone MCAL07D03, pertencente ao cluster MCOR0599C, será considerado daqui em diante como nosso antígeno 2, referido como Atg2.

Figura 16: Alinhamento dos clusters que representam o grupo nos quais incluem nxh1, nxh3 e nxh7. O cluster MCOR0599C (Atg2) foi o escolhido para representar todo o grupo e é idêntico à sequência nxh7 (Accession nº sp|Q9PRI1|NXAH7_MICCO).

Estes dois tipos de neurotoxinas eram os mais abundantes (Figuras 15 e 16) e, portanto, os candidatos eram mais evidentes. Entretanto, os outros clusters de 3FTx correspondem a formas bastante diferenciadas e não possuem identidade significativa com qualquer outra possível neurotoxina elapídica depositada nos bancos de dados (apresentam apenas um padrão de conservação dos resíduos importantes do grupo). Foi feito um alinhamento de todas essas seqüências diferentes de neurotoxinas (quinze clusters), que foram denominadas “outras neurotoxinas”. Deste alinhamento, fomos excluindo as proteínas que representavam isoformas semelhantes umas das outras até que ficassem apenas as formas mais diferenciadas. Sete clusters foram então omitidos, e restou somente um representante de cada tipo (Figura 17). Dentro desse conjunto, destacam-se dois tipos mais abundantes: um composto por 29 clones (representado pelo cluster MCOR0039C) e outro com 27 clones (representado pelo cluster MCOR0100C). Esses dois clusters, destacados na Figura 17, foram selecionados como candidatos antigênicos por serem abundantes e diferentes das duas seqüências já conhecidas de *Micrurus* descritas anteriormente, e foram denominados, respectivamente, Atg3 e Atg4.

Figura 17: Alinhamentos dos clusters representantes do grupo “outras neurotoxinas”. Em destaque estão os clusters escolhidos como candidatos antigênicos (Atg3 e Atg4).

A Figura 18 representa o alinhamento das quatro diferentes 3FTx que foram selecionadas como candidatos.

Figura 18: Alinhamento dos principais candidatos de proteínas de três dígitos escolhidos a partir do transcriptoma de *M. corallinus*.

O quinto candidato escolhido é o cluster MCOR0036C, representando o cluster mais abundante obtido com 196 clones de possíveis PLA2. Como mostrado anteriormente, os outros clusters menos abundantes diferenciam-se deste pela presença de deleções e inserções. A Figura 19 representa o cluster escolhido como candidato da PLA2, considerado daqui em diante como Atg5 (Antígeno 5).

```

1   TGAGGTTGTA GACTGAAAAA GTTGGGAAC CACTGCTATA AAAGGCTGAA CTCGCCAGGT
61  ATCGAAATTC ATCTTACTTG CAGCTTCACC ATGGACAAAA TGAATCCTGC TCACCTTCTG
121 GTCTTGGCAG CAGTTTGTGT CTCCTCTTA GGAGCCTCCA GCGTTCCTCC CCGACCTCTC
181 AACCTCATTA ACTTCCAACG CATGATTCAA TGTACCACGA GGCGATCTGC GTGGGACTTT
241 ACGAACTACG GTTGCTACTG CGGCGCCGGA GGTAGCGGGA CACCGGTAGA CGAGTTGGAT
301 AGGTGCTGCA AGGTTTCATGA CGACTGCTAT GGTGCAGCCG AAAAAATATCA CAGATGCTCG
361 CCCAAGTTGA CGCTTTATAC ATCCACCTGT TCTTCCCAA CCGGGAGCGT CACCTGCAAA
421 GACAACGGCA CTAAATGTAA AGCTTTTGTC TGTAAATTGTG ACCGCACGGC AGCCCTCTGC
481 TTCGGGAGAG CGCCTTACAA CAAAAACAAC GAAAATATCA ACCCCAATCG TTGCCGATGA
541 TATTGAGAG GCTTCAGTGC AAGGACTGTG GCAGTTACTC ACCTGCGTGT GGCAATTCTC
601 TGGAGGGCCT CTATAATATA TATCATTTTC AAAAAACAAA AGGAACCATT TCCTGAACAA
661 TAAAGTGAGG CACCGATACC CAAAAA AAA

```

Figura 19: Candidato selecionado para representar as fosfolipases do tipo A2 (PLA2) (BINS0036C – 196 clones).

Estes cinco candidatos destacados acima foram preparados para avaliação de seus potenciais imunogênicos.

4.2.2 Clonagem dos candidatos antigênicos para imunização genética

Seguimos a estratégia apresentada na Figura 4 para clonagem de todos os candidatos. Entretanto, o andamento das clonagens foi diferenciado em cada caso. A seguir apresentamos caso a caso o resultado das clonagens.

4.2.2.1 Antígeno 1 (Atg1)

Todas as etapas foram realizadas com sucesso. A Figura 20A abaixo apresenta o PCR dos dois clones representantes do grupo: MCAL01H08 e MCAL09C06. Os dois clones foram amplificados com os *primers* específicos (Neuro1F e Neuro1R). A banda referente ao clone MCAL01H08 foi recortada e purificada. Esse inserto foi ligado ao vetor pGEM-T e transformado em bactérias DH5 α . A presença de colônias positivas foi

verificada pelo *screening* por PCR com os *primers* M13F e o Neuro1R. Dessa forma, dentre os seis testados, quatro foram positivos (MCAL01H08.3, MCAL01H08.4, MCAL01H08.5 e MCAL01H08.6). Foi escolhido o clone MCAL01H08.5 para ser inserido no segundo vetor. A etapa seguinte é a digestão com enzimas de restrição BamHI e EcoRI. A digestão está representada na Figura 20B. O fragmento exposto foi recortado e purificado.

Figura 20: A) PCRs dos clones MCAL01H08 e MCAL09C06, os dois clones representantes do grupo Atg1. B) Digestão do clone MCAL01H08.5 escolhido para representar o Atg1. Nesta figura está representado apenas o clone digerido (D). A imagem encontra-se superexposta para facilitar a visualização da banda de baixa massa molecular.

Após a digestão, foi feita uma segunda ligação com o vetor pSecTag2A. A ligação foi transformada. O *screening* por PCR é realizado para averiguar a presença de colônias positivas com o fragmento. Para cada clone positivo foi atribuído um terceiro número: MCAL01H08.5.1, MCAL01H08.5.2, MCAL01H08.5.3, MCAL01H08.5.3, MCAL01H08.5.5, como podemos observar na Figura 21. Os clones foram confirmados por seqüenciamento.

Figura 21: *Screening* por PCR (pSecTagA2 + fragmento/clone 1.5). Nessa figura estão presentes cinco clones do Atg1.

4.2.2.2 Antígeno 2 (Atg2)

Os clones representantes desse grupo de candidatos antigênicos, MCAL07D03 e MCAL07H04, foram amplificados por PCR. O resultado está apresentado na Figura 22A. A banda referente à amplificação do MCAL07D03 foi recortada, purificada e ligada ao pGEM-T, que foi transformado. Foi escolhido o clone MCAL07D03.2 para dar continuidade às clonagens. A digestão do clone MCAL07D03.2 está representada na Figura 22B. O fragmento produzido foi recortado, purificado e ligado no segundo vetor, o pSecTag2A. O *screening* por PCR (clone ligado ao vetor pSecTag2A) está representado pela Figura 23, e o clone escolhido MCAL07D03.2 foi confirmado por seqüenciamento.

Figura 22: A) PCRs dos clones MCAL07D03 (1) e MCAL07H04, (2) os dois clones representantes do Atg2. Foi escolhido o MCAL07D03 para dar continuidade às clonagens. B) Digestão do clone MCAL07D03.2 escolhido para representar o Atg2. Nesta figura está representado apenas o clone digerido (D). O fragmento proveniente da digestão (seta) foi recortado e purificado.

Figura 23: *Screening* por PCR (pSecTagA2 + fragmento/clone MCAL07D03.2). Nessa figura estão presentes dez clones do grupo *Atg2*.

4.2.2.3 Antígeno 3 (*Atg3*)

Esse grupo, representado pelos clones MCAH05B08 e MCAL06A11, apresentou algumas dificuldades na amplificação. Foram feitas numerosas tentativas (dados não mostrados) com ambos os clones, com diferentes condições de PCR e de produto de amplificação, até que com uma temperatura de anelamento de apenas 40°C conseguimos uma amplificação fraca (Figura 24A). A banda referente ao candidato foi recortada, purificada e ligada ao pGEM-T. A digestão com BamHI e EcoRI resultou na banda apresentada na Figura 24B. Apesar de a digestão não ter sido muito evidente, foi possível recortar a banda e purificá-la. O fragmento foi ligado no pSecTag2A e transformado em DH5 α . Um único clone positivo (MCAH05B08.1) foi selecionado por *screening* e confirmado por seqüenciamento.

Figura 24: A) Amplificação bem sucedida do clone MCAH05B08 (*Atg3*). B) Digestão do clone MCAH05B08.1 escolhido para representar o grupo *Atg3*. Nesta figura está representado apenas o clone digerido (D). O fragmento proveniente da digestão (seta) foi recortado e purificado.

4.2.2.4 Antígeno 4 (Atg4)

Este grupo, representado pelos clones MCAL07E03 e MCAL09G04, apresentou um padrão de amplificação inespecífico, com tamanhos não esperados. Testamos os *primers* individualmente e verificamos que o problema estava no *primer reverse* Neuro4R encomendado, que veio com defeito, pois não era capaz de amplificar nenhum produto, mesmo quando combinado com *primers forward* universais ligados ao vetor (teste não apresentado).

Foi feito um novo desenho do *primer* Neuro4R. Com o novo primer, a amplificação ocorreu sem problemas, como pode ser verificado na Figura 25A. A banda amplificada do clone MCAL07E03 foi ligada ao pGEM-T e transformada em DH5 α . Foi escolhido o clone MCAL07E03.5 para dar continuidade às clonagens. O clone MCAL07E03.5 foi digerido com as enzimas BamHI e EcoRI, como realizado nos outros experimentos citados acima. A Figura 25B apresenta a digestão e o fragmento proveniente dessa digestão.

Figura 25: A) PCRs dos clones MCAL07E03 (1) e MCAL09G04 (2), os dois clones representantes do Atg4. Essa figura representa a amplificação bem sucedida com utilização do novo *primer* Neuro4R. B) Digestão do clone MCAL07E03.5. Nesta figura está representado apenas o clone digerido (D). O fragmento proveniente da digestão (seta) foi recortado e purificado

O fragmento purificado foi ligado no vetor pSecTag2A e transformado em bactérias DH5 α . Após o *screening* por PCR, os clones foram confirmados por seqüenciamento.

4.2.2.5 Antígeno 5 (Atg5)

No caso do Atg5, os clones que o representam são MCAL09A06 e MCAL06A06. Os dois clones foram amplificados com os *primers* específicos (PLA1F e PLA1R). Na Figura 26A estão representadas, em gel de agarose 1,5%, as duas amplificações realizadas para esse grupo. A banda referente ao clone MCAL09A06 foi recortada, purificada, ligada ao vetor pGEM-T, e este transformado em bactérias *E. coli* DH5 α . A presença de colônias positivas foi ratificada pelo *screening* por PCR. Para cada colônia positiva foi atribuído um número. Dessa forma, o clone 9 apresentou quatro novos subclones (MCAL09A06.1 MCAL09A06.2, MCAL09A06.3, MCAL09A06.4). Foi escolhido o clone MCAL09A06.1 para ser inserido no segundo vetor. A etapa seguinte foi a digestão com enzimas de restrição BamHI e EcoRI, a fim de tornar as extremidades coesivas para encaixe no segundo vetor. A digestão está representada na Figura 26B.

Figura 26: A) PCRs dos clones MCAL09A06 (1) e MCAL06A06 (2), os dois clones representantes do Atg5. B) Digestão do clone MCAL09A06.1 escolhido para representar o Atg5. Estão representados o clone não digerido (ND) e o clone digerido (D) com o fragmento liberado (seta).

Por conseguinte, foi realizada a ligação com o vetor pSecTag2A e a transformação em *E. coli*. O *screening* por PCR foi realizado para averiguar a presença de colônias positivas com o fragmento. Para cada clone positivo foi atribuído um terceiro número, como podemos observar na Figura 27. Os clones positivos foram

denominados MCAL09A06.1.1, MCAL09A06.1.2, MCAL09A06.1.3, MCAL09A06.1.4 e confirmados por seqüenciamento.

Figura 27: *Screening* por PCR (pSecTagA2 + fragmento/clone MCAL09A06.1). Nessa figura estão presentes quatro clones do Atg5.

A fim de se aumentar consideravelmente a quantidade de DNA dos cinco candidatos antigênicos, foram feitas *maxipreps* ou grandes preparações das amostras dos candidatos obtidos após a clonagem. Esse procedimento é necessário, pois se sabe que, no caso de vacinas de DNA, grandes quantidades de DNA são utilizadas para se injetar em animais (camundongos), especialmente em injeções intramusculares.

Após a eluição em 300µL, foram feitas quantificações por meio do espectrofotômetro e detecção da pureza (DO 260/280).

4.2.3 Transfecção preliminar de clones em células eucarióticas e Western-Blot

Realizamos transfecções de algumas construções com as células do tipo COS-07, que são mais utilizadas para transfecções do tipo transiente. Essa etapa foi realizada a fim de se verificar o funcionamento correto do sistema de expressão antes de dar início às imunizações genéticas.

Primeiramente, testou-se o Atg1. Pelo resultado do *Western Blot* com o soro antielápidico, não foi possível verificar bandas imunoreativas nas amostras de extrato celular e de meio de cultura, indicando que não deveria haver proteína recombinante sendo expressa/secretada (Figura 28). O controle positivo de veneno bruto de *M. corallinus* apresentou marcação.

Foram realizados outros experimentos de transfecção em células eucariontes do tipo COS-07 que não obtiveram resultados satisfatórios e, dessa forma, não estão representadas neste trabalho.

Figura 28: SDS-PAGE contendo amostras das três coletas de sobrenadante e do extrato de células. Na primeira figura encontra-se a membrana de transferência, que mostra a proteína total corada com Ponceau S. A segunda figura é o resultado do *Western blot* revelado com antiveneno de *Micrurus corallinus* (anti-*corallinus*) extraído de cavalo. c+ - controle positivo (no caso, veneno de *Micrurus corallinus*), Sc – Sobrenadante/ controle, S1 – Sobrenadante/1ªcoleta, S2 – Sobrenadante/2ªcoleta, S3 – Sobrenadante/3ªcoleta, Ec – Extrato de células/ controle, Ef – Extrato de células/final.

Porém, apesar de as transfecções realizadas em células COS-07 não terem resultados satisfatórios, mais um experimento foi realizado com o sobrenadante e extrato de células provenientes da transfecção dos antígenos Atg1 e Atg4. Como não obtivemos resultados positivos com as transfecções, resolvemos mudar o anticorpo primário utilizado para um anticorpo mais específico do que o anti-*corallinus* usado anteriormente. A membrana foi revelada com anticorpo anti-cmyc. Neste caso, o controle positivo é uma proteína HEK (80kDa) que contém o epítipo c-myc. O SDS-PAGE foi realizado com as amostras de sobrenadante de cada um dos antígenos (Atg1 e Atg4), coletadas 72 horas após a transfecção. Os extratos de células apresentados são os

extratos finais de cada uma das transfecções. Estes resultados estão apresentados abaixo na Figura 29.

Figura 29: SDS-PAGE contendo amostras das três coletas de sobrenadante e do extrato de células. Na primeira figura encontra-se a membrana de transferência, que mostra a proteína total corada com Ponceau S. A segunda figura é o resultado do *Western Blot* revelado com anti-cmyc, c+ – controle positivo (no caso, proteína HEK), Sc – Sobrenadante/ controle, S1 – Sobrenadante/Atg1, S4 – Sobrenadante/Atg4, Ec – Extrato de células/ controle, E1 – Extrato de células/final do Atg1, E4 – Extrato de células/final do Atg4, LMW – padrão de peso molecular.

Mesmo não evidente, pode se notar que o controle positivo acendeu e, juntamente com ele, uma pequena mancha no extrato de células da transfecção do Atg1 pode ser percebida. Esse é o resultado obtido mais próximo do resultado esperado.

Outros tipos de células COS foram utilizadas para as transfecções, pois poderia ser devido ao tipo celular a ausência de expressão em células eucariontes.

Também foi utilizado um controle positivo de GFP (*Green Fluorescent Protein*) durante algumas transfecções, a fim de que pudéssemos controlar as condições de expressão de forma igualitária para todas as células transfectadas. Quando ocorria a expressão de GFP, as transfecções realizadas estariam sob as mesmas condições. Esse controle foi bem sucedido em todos os experimentos realizados com ele, pela observação da coloração esverdeada no microscópio eletrônico.

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que o experimento de avaliação da expressão em cultura de células não foi bem sucedido. Foram realizadas muitas tentativas de transfecções em células eucariontes, que apresentaram resultados inconclusivos, principalmente pelos controles positivos de que dispúnhamos, que em muitos casos não reagiram. O tipo de células COS utilizadas nas transfecções, assim como o anticorpo primário utilizado, foi modificado a fim de se tentar abranger o maior número de condições possíveis para um resultado mais satisfatório.

Tendo em vista que os resultados não foram satisfatórios para assegurar a expressão ou não dos candidatos antigênicos, decidimos investir diretamente na imunização em camundongos, o nosso objetivo final.

4.2.4 Expressão e purificação das proteínas recombinantes

Embora a vacina de DNA fosse nosso objetivo, necessitávamos dos antígenos para avaliar as imunizações. Tendo em vista que a melhor forma de analisar o resultado da imunização seria o teste de ELISA com o *coating* feito a partir da proteína purificada de cada candidato antigênico, optamos por expressar em *E. coli* e purificar essas proteínas. Para isso, utilizamos clonagens já feitas anteriormente por pesquisadores que trabalharam no nosso laboratório (PRIETO DA SILVA, 2001b e DE OLIVEIRA et al., 2003), uma vez que três dos candidatos antigênicos escolhidos (Atg1, Atg2 e Atg5) já haviam sido estudados anteriormente, porém, de acordo com a bioquímica tradicional de clonagem, expressão e purificação das proteínas recombinantes.

Dessa forma, essas clonagens feitas no vetor *pRSET* foram recuperadas, transformadas e seqüenciadas novamente. Os antígenos apresentavam denominações diferentes: Atg1 = V8, Atg2 = V1 e Atg5 = V2. Com as seqüências analisadas, iniciamos o processo de expressão, em bactéria *E. coli* DE3 star pLys. Esta bactéria pareceu ser a melhor opção, já que é a mais utilizada para expressão de proteínas tóxicas. Diferentemente de outras linhagens, esta não apresenta escape (expressão basal, antes da indução com IPTG), pois possui o plasmídeo pLys, que confere resistência à cloranfenicol e codifica a lisozima T7, que reduz a expressão basal da T7 RNA polymerase e, portanto, só se observa a expressão da proteína após a indução com IPTG. Com esta cepa é possível que a cultura cresça até uma densidade significativa para expressão da proteína e, mesmo que as bactérias morram pela ação tóxica da proteína, uma quantidade considerável de proteína pode ser obtida.

4.2.4.1 Candidato antigênico Atg1(Proteína V8)

Uma alíquota de cada uma das lavagens do corpúsculo foi coletada e a amostra foi aplicada no gel.

A banda que representa o corpúsculo de inclusão é onde as proteínas estão aglomeradas. Dessa forma, o corpúsculo de inclusão foi purificado. As lavagens e as eluições (1M imidazol) estão representadas na Figura 30.

Figura 30: SDS-PAGE com amostras da expressão e purificação (corpúsculo de inclusão) da proteína Atg1 referente ao candidato antigênico Atg1. FT8M – *flow thru* 8M uréia, L60 – lavagens do corpúsculo com 60mM imidazol (5 alíquotas), E1-E25 – eluições com 1M imidazol.

Na análise do gel de SDS-PAGE é possível notar uma purificação bem sucedida do corpúsculo, como pode ser observado da sexta eluição até a nona eluição.

4.2.4.2 Candidato antigênico Atg2 (proteína VI)

O corpúsculo de inclusão pôde ser observado na lavagem 8M uréia. Dessa forma, foi feita a purificação do corpúsculo sob as mesmas condições realizadas para a purificação da proteína Atg1. O resultado está apresentado abaixo (Figura 31).

Figura 31: SDS-PAGE com amostras da expressão e purificação (corpúsculo de inclusão) da proteína Atg2 referente ao candidato antigênico Atg2. L60 – lavagens do corpúsculo com 60mM imidazol (5 alíquotas), E1-E25 – eluições com 1M imidazol.

Nota-se que a proteína começou a sair da coluna com mais intensidade a partir da sexta eluição e continuou até aproximadamente a décima eluição.

4.2.4.3 Candidato antigênico Atg5 (Proteína V2)

Da mesma forma que a expressão e purificação das proteínas Atg1 e Atg2, a purificação da proteína Atg5 também predominou no corpúsculo de inclusão, como já

era esperado. O não-induzido e o induzido também não se apresentaram de forma evidente, porém sabe-se que houve indução pela análise das lavagens.

Da mesma forma, a proteína Atg5 teve o corpúsculo de inclusão purificado, como pode ser observado na Figura 32 seguinte.

Figura 32: SDS-PAGE com amostras da expressão e purificação (corpúsculo de inclusão) da proteína Atg5 referente ao candidato antigênico Atg5. L60 – lavagens do corpúsculo com 60mM imidazol (5 alíquotas), E1-E25 – eluições com 1M imidazol.

Nota-se pelas eluições com 1M imidazol, que a purificação foi bem sucedida e a proteína passou a ser recuperada com mais intensidade a partir da quarta eluição (E4) e com maior intensidade na quinta eluição (E5).

Como foi comprovado, a maior parte das proteínas estava contida no corpúsculo de inclusão. Dessa forma, passamos a trabalhar apenas com as alíquotas da purificação do corpúsculo.

A diálise é necessária para se retirar o imidazol presente nas amostras coletadas durante a purificação, já que ele atrapalha o teste de ELISA. A uréia pode permanecer, por ser responsável pela estruturação da proteína e não influenciar o teste. Sem uréia, possivelmente a proteína precipitaria.

A diálise decorreu sem que a proteína precipitasse. A solução de 6M uréia foi diluída com a troca de solução, sem que isso prejudicasse o andamento da diálise.

Para a diálise, foram escolhidas amostras com a proteína mais intensa e mais evidente, a partir dos géis de SDS-PAGE mostrados anteriormente nas purificações do corpúsculo de inclusão.

As alíquotas de cada proteína foram colocadas em um mesmo tubo. Cada tubo foi dialisado individualmente, cada um em uma membrana de 3kDa, colocado dentro de um béquer com 1L de solução 6M uréia e tampão NaCl-Tris pH 6,8.

As três proteínas foram colocadas no mesmo gel para facilitar o processo. Foi feita a curva de BSA e o resultado está apresentado na Figura 33 abaixo.

Figura 33: SDS-PAGE com amostras das proteínas purificadas e dialisadas juntamente com a curva de BSA. No gel, a curva de BSA tem início em 3µg – 0,5µg de BSA, de 0,5 em 0,5.

Os valores numéricos da quantificação foram obtidos baseados na curva de BSA. Os valores numéricos para cada banda de proteína estão apresentados a seguir:

Atg1 – $3,37\mu\text{g}/10\mu\text{L} = 337\text{ng}/\mu\text{L}$

Atg2 – $4,23\mu\text{g}/10\mu\text{L} = 423\text{ng}/\mu\text{L}$

Atg5 – $5,04\mu\text{g}/10\mu\text{L} = 504\text{ng}/\mu\text{L}$

4.2.5 A imunização genética (ou vacina de DNA) em camundongos

As imunizações genéticas requerem uma quantidade considerável de DNA (candidato antigênico) para se injetar nos animais. Por essa razão, realizamos *maxipreps* para cada um dos candidatos antigênicos a fim de aumentar sua quantidade de DNA. Como há cinco animais em cada grupo, seriam necessários aproximadamente 1500µg de DNA por grupo (100µg/animal por dose).

Os animais foram anestesiados intraperitonealmente. Para alguns animais foram necessários mais do que 200µL de anestésico para o adormecimento total. Foi realizada então a injeção intramuscular dos DNAs antigênicos. O soro foi coletado e mantido no freezer a -20°C. A maior parte dos soros apresentou cor avermelhada forte, decorrente da hemólise de algumas hemáceas, especialmente no soro pré-imune. Não foi possível concluir a razão dessa hemólise.

4.2.6 Análise da resposta imune

Dois testes ELISA diferentes foram preparados. No primeiro, usamos as proteínas recombinantes expressas e purificadas (Atg1, Atg2 e Atg5) a fim de preparar o coating do ELISA. Os soros primários foram obtidos dos camundongos imunizados com os respectivos DNAs (Atg1, Atg2 e Atg5).

O resultado está apresentado na Figura 34. Nela é possível notar o reconhecimento da proteína recombinante do *coating* com o anticorpo presente no soro dos camundongos. Títulos mais altos foram obtidos para Atg1 (1:5120) e Atg2 (1:10240). O terceiro candidato a antigênico testado (Atg5) não apresentou um alto título de anticorpos (1:160).

Este resultado pôde ser confirmado por observação no *Western Blot* realizado com as três proteínas recombinantes e os três soros obtidos das respectivas imunizações, como mostram as Figuras 35 e 36.

Figura 34: Gráfico de ELISA com as diferentes diluições e a absorbância detectada. Cada ponto no gráfico representa três titulações de uma mesma imunização (desvio padrão).

LMW Atg2 Atg5 Atg1 Mcor Mfro Bjar CTX

Figura 35: SDS-PAGE corado com *Comassie Blue*. Figura representa as três proteínas recombinantes obtidas (Atg1, Atg2 e Atg5) e venenos de algumas serpentes (*M. corallinus* – Mcor, *M. frontalis* – Mfro, *B. jararaca* – Bjar e Cardiotoxina – CTX).

LMW Atg2 Atg5 Atg1 Mcor Mfro Bjar CTX

LMW Atg2 Atg5 Atg1 Mcor Mfro Bjar CTX

LMW Atg2 Atg5 Atg1 Mcor Mfro Bjar CTX

Figura 36: Resultado da revelação de *Western Blot*. Nota-se a detecção das proteínas recombinantes quando incubado com os soros provenientes da imunização genética em camundongos com os três candidatos respectivamente: Atg1, Atg2 e Atg5.

Pela análise da figura, nota-se que houve reconhecimento de cada proteína recombinante quando em contato com o soro produzido nas imunizações. Cada soro reconheceu sua proteína específica, porém não houve reconhecimento dos venenos representados na figura (*M. corallinus*, *M. frontalis*, *B. jararaca* e Cardiotoxina).

No segundo teste ELISA, o *coating* foi preparado com as proteínas recombinantes Atg1 e Atg2, dessa vez contra os soros obtidos com a imunização em camundongos com os Atg3 e Atg4. Portanto, esta é uma análise cruzada para se descobrir se esses soros são semelhantes entre si ou se reagem com as proteínas recombinantes purificadas (Atg1 ou Atg2). Lembrando ainda que não dispúnhamos das formas recombinantes dos Atg3 e Atg4, produzidas em *E. coli*.

Neste teste foi possível perceber similaridade entre Atg2 e Atg3/4, mas não com Atg1 (Figura 37). Este resultado mostrou que estas seqüências sintetizaram proteínas similares; entretanto, Atg1 parece ter diferenças na estrutura ou na similaridade de epítomos (proteínas diferentes).

Figura 37: Gráficos de ELISA para a análise cruzada entre os soros contra Atg3 e Atg4 com relação às proteínas recombinantes purificadas Atg1 e Atg2. Cada ponto no gráfico representa três titulações de uma mesma imunização (desvio padrão).

4.2.7 Imunização tripla com três candidatos antigênicos

A fim de testar a eficácia dos três candidatos antigênicos mais significativos contidos no veneno, inclusive em predominância, resolvemos imunizar camundongos com os três candidatos simultaneamente.

Pela análise dos gráficos de ELISA, é possível verificar o que aconteceu quando reagimos os três candidatos purificados (Atg1, Atg2 e Atg5) e o veneno puro de *M. corallinus* com o soro proveniente da imunização simultânea com DNA de três candidatos antigênicos (Figura 38).

Foi possível verificar um melhor reconhecimento pelo soro da imunização tripla para a proteína recombinante Atg2 purificada (1:5120), sendo que para as outras proteínas e o veneno puro os títulos obtidos foram mais baixos: Atg1 (1:320), Atg5 (1:120) e veneno puro de *M. corallinus* (1:120). A análise por *Western Blot* também foi realizada, porém não foram observadas bandas imunoreativas. Isso decorre, provavelmente, da maior sensibilidade do teste de ELISA em detectar anticorpos presentes do que o *Western Blot*, paralelamente aos baixos títulos apresentados para cada uma das proteínas e para o veneno puro.

Figura 38: Gráficos de ELISA proveniente do resultado de imunização com três candidatos antigênicos (Atg1, Atg2 e Atg5). Os gráficos mostram a reação entre os *coatings* (V1, V8 e V2) com o soro proveniente da imunização com os três candidatos.

Portanto, nossos resultados indicam que a imunização com DNA, via de regra, é capaz de gerar resposta imune contra as proteínas recombinantes. Entretanto, o veneno não foi reconhecido por estes soros. Isso indica que, possivelmente, haja algum problema na configuração estrutural das proteínas geradas nos camundongos como resultado da transfecção dos cDNAs. Talvez o dobramento incorreto leve à produção de anticorpos contra determinantes lineares, não capazes de reconhecer as proteínas nativas. Talvez o esquema de clonagem no vetor pSecTag2A, com vários “tags” para controle de expressão/purificação, tenha prejudicado o dobramento. Assim, novas construções e/ou diferentes vetores de expressão podem ajudar a melhorar a expressão desses antígenos. Diversos protocolos de imunização podem gerar resultados completamente distintos. Na injeção intramuscular, usada aqui, o DNA costuma ser injetado nos músculos tibial anterior ou quadríceps de camundongos. Normalmente, para este protocolo induz-se uma lesão no músculo com uma cardiotoxina antes da injeção do DNA para estimular o processo de reparo muscular (OLIVEIRA et al., 1999 e LAI & BENNETT, 1998). Porém a CTX é um componente de venenos elapídicos (*Naja sp.*), justamente uma proteína da família das 3FTx e poderia assim induzir resposta imune correlata à do veneno. Outra forma usada em alguns casos é a injeção por meio de lipossomos que permitam que a dose tenha um efeito mais prolongado, uma vez que a liberação do DNA é paulatina. Um protocolo teoricamente mais promissor é o de biobalística. Nesse procedimento, cerca de 50µg de DNA são adsorvidos a microesferas de ouro (0,2 a 4mm de diâmetro) e injetados em alta velocidade (1.500km.h^{-1}) na derme dos animais. O DNA é dissociado das micropartículas pela ação do líquido celular, ocorrendo ou não a integração do gene exógeno no genoma do organismo (OLIVEIRA et al., 1999). Esse procedimento já demonstrou em vários casos ser mais eficiente para indução de resposta imune do tipo Th2 (IL-4, IL-5, IL-10), ou seja, aquela que é mais indutora de anticorpos, o que é particularmente interessante para a geração de um soro hiperimune. O fator limitante desse procedimento é a disponibilidade do equipamento de disparo das biopartículas, tal como o *Helios GeneGun* (Bio-Rad) ou similar. Este tipo de protocolo é o que foi o utilizado por WAGSTAFF & HARRISON, 2006, para a geração de um anti-soro contra toxinas do viperídeo *E. ocellatus*. Esses mesmos autores utilizaram o vetor pSecTagB por diferentes vias de imunização com antígenos de um nematóide, apresentando títulos muito maiores quando injetado por biobalística (*Gene Gun*) (HARRISON & BIANCO, 2000).

Outra questão importante a ser testada, é a contribuição de adjuvantes vacinais. Este campo é amplo e são utilizadas desde construções com plasmídeos codificando citocinas que aumentem a secreção de anticorpos, como o fator GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), até adjuvantes mais comuns, como sais de alumínio, fosfato, monofosforil lipídio A, ou complexos com lipídios catiônicos (ULMER et al., 1999 e FISCHER et al., 2003). Até mesmo o próprio DNA excedente usado na imunização tem caráter adjuvante, pois o padrão de metilação do DNA bacteriano é diferente do de mamífero, o que ativa o sistema imune inato (KLINMAN et al., 1997 e LIU et al., 2003).

Anos de estudo sobre vacinas de DNA mostraram que, diferentemente das vacinas inativadas ou de subunidade, as vacinas gênicas resultam em uma apresentação antigênica via moléculas de MHC de classe I e classe II, o que mimetiza o processo resultante de infecção natural ao ativar linfócitos T CD4+, CD8+ e a produção de anticorpos. Os diferentes tipos de resposta imune induzida pela administração de DNA justificam claramente sua aplicação nos campos das doenças infecciosas. (OLIVEIRA et al., 1999). A questão é saber derivar essa resposta para o objetivo de gerar soros hiperimunes e não apenas proteção. Algumas poucas tentativas de realizar esse objetivo são encontradas. Além daqueles trabalhos referentes à imunização com DNA de toxinas de serpentes, citados anteriormente, alguns outros esforços buscaram gerar hipersoros contra doenças bacterianas ou virais. FISCHER et al., 2003, por exemplo, usando uma composição lipídica catiônica junco com DNA, geraram títulos razoáveis de anticorpos contra o vírus da raiva em cavalos. Já HERRMANN et al., 2006, foram capazes de produzir em coelhos um antisoro contra o antrax capaz de neutralizar os efeitos deletérios da toxina de *Bacillus anthracis*.

Dessa forma, citando HARRISON & BIANCO (2000), a aplicação das metodologias baseadas em DNA para o desenvolvimento de antivenenos terapêuticos representa a maior mudança conceitual na produção de antivenenos em um século e tem o potencial de promover uma terapia imunológica específica com melhor custo-benefício e menor periculosidade do que as atualmente usadas.

De qualquer forma, este nosso resultado, mesmo que ainda longe de uma aplicação terapêutica, são os primeiros passos para a utilização da imunização genética para fins de produção do soro anti-*coralinus*, o que nos encoraja a dar prosseguimento à pesquisa.

5. CONCLUSÃO

1. O transcriptoma de *Micrurus corallinus* originou 1.438 ESTs que foram agrupadas em 611 clusters.
2. As proteínas com funções tóxicas representam 46% da expressão gênica das glândulas de veneno, sendo encontrados dez tipos de toxinas.
3. Proteínas de três dígitos (3FTx) e fosfolipases do tipo A2 (PLA2) são os cDNAs de toxinas mais representativos das glândulas de veneno.
4. As toxinas de três dígitos são extremamente diversificadas com varias isoformas de cDNAs de cada subtipo, prevalecendo as α -neurotoxinas.
5. Algumas destas toxinas foram descritas pela primeira vez na Família *Elapidae* e outras foram descritas pela primeira vez no gênero *Micrurus*.
6. O grupo mais representativo de não toxinas são as proteínas com função celular relacionadas à transcrição e à tradução protéica.
7. A partir da análise do transcriptoma da glândula de veneno de *Micrurus corallinus*, cinco candidatos foram selecionados para uma imunização por DNA em camundongos
8. A análise da resposta imunológica indicou que a injeção com DNA dos candidatos antigênicos gerou anticorpos, pois houve o reconhecimento da proteína recombinante purificada pelo soro proveniente dos animais imunizados.

6. RESUMO

A partir de uma biblioteca de cDNA de glândulas de veneno de *Micrurus corallinus* (cobra-coral), uma serpente da Família *Elapidae* bastante representada no Brasil e muito comum em áreas florestais tropicais, foram gerados 1.438 *Expressed Sequences Tags* (ESTs), agrupados em 611 clusters. O banco representa os genes mais expressos na glândula de veneno de *M. corallinus*. Os transcritos relacionados às toxinas apresentaram ao redor de 46% de representação nesse banco de seqüências. A composição geral das toxinas inclui: toxinas de três dígitos (3FTx) (24%), fosfolipases A2 (PLA2) (16%), lectinas do tipo C (5%), entre outros. O banco permitiu não somente a identificação de possíveis toxinas, mas também de transcritos celulares, sendo a maioria envolvida nas funções fisiológicas de células da glândula de veneno. A maior parte dessas moléculas apresenta um envolvimento na expressão gênica e protéica, o que reflete uma alta especialização do tecido para a síntese de toxinas. A análise do transcriptoma de glândulas de veneno de *M. corallinus* possibilitou a identificação de alguns candidatos antigênicos para um anti-soro antielapídico alternativo. Cinco candidatos antigênicos foram selecionados por meio da análise do transcriptoma obtido: Atg1 (Grupo das neurotoxinas *homolog* 8), Atg2 (Grupo das neurotoxinas *homolog* 7/3/1), Atg3 (Outras neurotoxinas 1), Atg4 (Outras neurotoxinas 2) e Atg5 (fosfolipase do tipo A2). Avaliamos a viabilidade de imunização com o DNA desses candidatos. Para isso, os cinco grupos de antígenos foram clonados, primeiramente em pGEM-T e, posteriormente, em pSecTag2A, que é um vetor de expressão em células de mamíferos. As clonagens foram inicialmente testadas em células do tipo COS (transfecção transiente), entretanto não ficou clara a capacidade dessas células em expressar os antígenos. Para a análise da resposta imunológica da vacina de DNA, proteínas recombinantes produzidas em *E. coli* foram utilizadas para o *coating* de ELISA para detectar anticorpos presentes no soro primário proveniente da imunização com DNA. Os resultados mostraram que o soro dos animais imunizados foi capaz de reconhecer os antígenos recombinantes. Isso indica que a imunização por DNA em camundongos poderia ser uma boa alternativa em relação à imunização do veneno puro de serpente, que é custosa e muito depende da disponibilidade do veneno. Apesar da necessidade de testes complementares, esse é um resultado promissor, já que a produção de anticorpos pode ser alcançada por via de imunização intramuscular, mais prática para objetivos de produção.

7. ABSTRACT

Micrurus corallinus (coral snake) is a tropical forest snake belonging to the *Elapidae* Family, and is very common in Brazil. From the cDNA library of its venom glands, 1.438 *Expressed Sequences Tags* (ESTs) were generated and grouped into 611 clusters. This database contains the most expressed genes in the *M. corallinus* venom glands. The transcripts related to toxins represent approximately 46% of the total genes in this database. The toxin compound consists of: three finger toxins (24%), phospholipases A2 (PLA2s) (16%), type-C lectins (5%), among others. This database allowed not only the identification of possible toxins, but also the identification of cellular transcripts, most of which seems to be involved in physiological functions of venom gland cells. The majority of these molecules are involved in gene and protein expression, revealing the high level of specialization of the tissue for toxin synthesis. The analysis of the *M. corallinus* venom gland transcriptome allowed the identification of some antigenic candidates for an alternative antielapidic antiserum. Five antigenic candidates were selected after analysing the transcriptome: Atg1 (*Homolog* group 8), Atg2 (*Homolog* group 7/3/1), Atg3 (Other neurotoxins 1), Atg5 (A2-type phospholipase). These five antigenic groups were used for DNA immunization. Then they were first cloned in pGEM-T and, after, in pSecTag2A, which is an expression vector in mammal cells. The cloning was tested in COS-type cells (transient transfection), without signs of expression. To analyze the immunological response, recombinant proteins were produced in *E. coli* and used for ELISA coating to react with the primary serum deriving from the DNA immunization. The results showed that the serum from the immunized animals was able to recognize the recombinant antigens, indicating that the DNA immunization in mice could be a feasible alternative regarding the traditional immunization with crude snake venom, which is costly and heavily dependent on the availability of the venom. Regardless the need for additional tests, this is a promising result, because the antibody production can be achieved by intramuscular immunization, a more effective method when aiming for downstream production.

8. APÊNDICES

8.1 ABREVIATURAS

3FTx - Proteínas com estrutura em três dígitos

ACh - Acetilcolina

ANP - Peptídeo Natriurético Atrial

Atg1 - Antígeno 1 – Neurotoxina homolog 8

Atg2 - Antígeno 2 – Neurotoxina homolog 7/3/1

Atg3 - Antígeno 3 – Outras neurotoxinas 1

Atg4 - Antígeno 4 – Outras neurotoxinas 2

Atg5 - Antígeno 5 – PLA2

BNP - Peptídeo Natriurético Cerebral

BPP - Peptídeo Potenciador de Bradicinina

BSA - Albumina Sérica Bovina

CMV - Citomegalovírus (Promotor de vetor de expressão de células eucariontes)

CNCZAP - Coordenação Nacional de Controle de Zoonoses e Animais Peçonhentos

CNP - Peptídeo natriurético tipo C

CTX - Cardiotoxinas

DEMEN - Meio *Dulbecco High Glucose*

DNP - Peptídeo Natriurético da serpente do gênero *Dendroaspis*

DO - Densidade Óptica

ELISA - *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

EST - *Expressed Sequence Tag* (Etiquetas de Sequências Expressas)

ExoI - Exonuclease I

GFP - *Green Fluorescent Protein*

GPI - Glicofosfatidilinositol

IM - intramuscular

IPTG - indução da expressão do promotor lac e seus derivados – isopropil β -thiogalactoside

LMW - padrão de peso molecular (*Low Molecular Weight*)

nAChR - receptor nicotínico de acetilcolina

NGF- *Nerve Growth Factor* (neurotrofinas)

nxh1 - neurotoxina *homolog* 1
nxh3 - neurotoxina *homolog* 3
nxh7 - neurotoxina *homolog* 7
nxh8 - neurotoxina *homolog* 8
OPD - o-dihidrocloreto de fenilenodiamina
ORF - *Open Reading Frame*
PBS - *Phosphate Buffered Saline*
PBS-T - *Phosphate Buffered Saline + Tween*
PCR - *Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase)
pI - Ponto Isoelétrico
PLA2 - Fosfolipase do tipo A2
SAP - *Shrimp Alkaline Phosphatase*
SDS-PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida + sulfato dodecil de sódio
SV40 - Promotor de vetor de expressão de células eucariontes
SVMP - Metaloproteinase de veneno de serpentes
WAP - *Whey Acidic Proteins*

8.2 ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: A) Quatro principais tipos de dentições encontradas entre as Famílias de Serpentes <i>Atractaspididae</i> , <i>Viperidae</i> , <i>Colubridae</i> e <i>Elapidae</i> . B) Ausência da fosseta loreal nos elapídeos e comparação com os viperídeos.....	13
Figura 2: Três gêneros principais encontrados entre as cobras-corais: <i>Micrurus</i> , <i>Leptomicrurus</i> e <i>Micruroides</i>	14
Figura 3: Filogenia de cobras-corais de Roze (1987). S.A. = América do Sul.....	15
Figura 4: Esquema da estratégia utilizada para clonagem dos candidatos.....	35
Figura 5: Esquema do desenho de <i>primers</i> específicos para clonagem dos candidatos antigênicos.....	35
Figura 6: Mapa do vetor pSecTag2A utilizado na clonagem final realizada com os candidatos antigênicos.....	37
Figura 7: Esquema das dosagens aplicadas nos camundongos durante processo de imunização com os candidatos antigênicos selecionados.....	39
Figura 8: Representação gráfica da proporção dos tipos de toxinas encontradas em glândulas de veneno de <i>Micrurus corallinus</i>).....	48
Figura 9: Representação gráfica da proporção dos tipos de proteínas celulares encontradas em glândulas de veneno de <i>Micrurus corallinus</i>	49
Figura 10: Proteínas de três dígitos encontradas na glândula de veneno de <i>M. corallinus</i> (nº de clones/grupo – gráfico maior e nº de clones/cluster – gráfico menor).....	52
Figura 11: Alinhamento dos clusters de fosfolipase do tipo A2 obtidos por análise do transcriptoma da glândula de veneno de <i>M. corallinus</i>	54
Figura 12: A) Alinhamento das lectinas do tipo C e seus homólogos estruturais juntamente com as lectinas fisiológicas animais. B) Análise filogenética <i>Baesi</i> ana dessas lectinas tipo C.....	57/58
Figura 13: Alinhamento entre as seqüências de peptídeo natriurético encontrado em análise do banco de dados.....	60
Figura 14: Dois clones encontrados no banco de dados de <i>M. corallinus</i> representando duas regiões fracamente contíguas da L-aminoácido oxidase.....	61
Figura 15: Alinhamento dos clusters que representam o grupo <i>homolog 8</i> (nxh8).....	67
Figura 16: Alinhamento dos clusters que representam o grupo nos quais incluem nxh1, nxh3 e nxh7.....	67
Figura 17: Alinhamentos dos clusters representantes do grupo “outras neurotoxinas”.....	68
Figura 18: Alinhamento dos principais candidatos de proteínas de três dígitos escolhidos a partir do transcriptoma de <i>M. corallinus</i>	68
Figura 19: Candidato selecionado para representar as fosfolipases do tipo A2 – PLA2 (BINS0036C – 196 clones).....	69

Figura 20: A) PCRs dos clones MCAL01H08 e MCAL09C06, os dois clones representantes do grupo Atg1. B) Digestão do clone MCAL01H08.5 escolhido para representar o Atg1.....	70
Figura 21: <i>Screening</i> por PCR (pSecTagA2 + fragmento/clone 1.5).....	71
Figura 22: A) PCRs dos clones MCAL07D03 (1) e MCAL07H04, (2) os dois clones representantes do Atg2. B) Digestão do clone MCAL07D03.2 escolhido para representar o Atg2.....	71
Figura 23: <i>Screening</i> por PCR (pSecTagA2 + fragmento/clone MCAL07D03.2).....	72
Figura 24: A) Amplificação bem sucedida do clone MCAH05B08 (Atg3). B) Digestão do clone MCAH05B08.1 escolhido para representar o grupo Atg3.....	72
Figura 25: A) PCRs dos clones MCAL07E03 (1) e MCAL09G04 (2), os dois clones representantes do Atg4. B) Digestão do clone MCAL07E03.5.....	73
Figura 26: A) PCRs dos clones MCAL09A06 (1) e MCAL06A06 (2), os dois clones representantes do Atg5. B) Digestão do clone MCAL09A06.1 escolhido para representar o Atg5.....	74
Figura 27: <i>Screening</i> por PCR (pSecTagA2 + fragmento/clone MCAL09A06.1).....	75
Figura 28: SDS-PAGE contendo amostras de sobrenadante e do extrato de células.....	76
Figura 29: SDS-PAGE contendo amostras de sobrenadante e do extrato de células.....	77
Figura 30: SDS-PAGE com amostras da expressão e purificação (corpúsculo de inclusão) da proteína Atg1 referente ao candidato antigênico Atg1.....	79
Figura 31: SDS-PAGE com amostras da expressão e purificação (corpúsculo de inclusão) da proteína Atg2 referente ao candidato antigênico Atg2.....	79
Figura 32: SDS-PAGE com amostras da expressão e purificação (corpúsculo de inclusão) da proteína Atg5 referente ao candidato antigênico Atg5.....	80
Figura 33: SDS-PAGE com amostras das proteínas purificadas e dialisadas juntamente com a curva de BSA.....	81
Figura 34: Gráfico de ELISA com os diferentes títulos e a absorbância detectada.....	83
Figura 35: Figura representa as três proteínas recombinantes obtidas (Atg1, Atg2 e Atg5) e venenos de algumas serpentes.....	84
Figura 36: Resultado da revelação de <i>Western Blot</i>	84
Figura 37: Gráficos de ELISA para a análise cruzada entre Atg3 e Atg4 com relação às proteínas recombinantes purificadas Atg1 e Atg2.....	86
Figura 38: Gráficos de ELISA proveniente do resultado de imunização com três candidatos antigênicos (Atg1, Atg2 e Atg5).....	88

8.3 ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Coeficientes de incidência anual (por 100 mil habitantes) dos acidentes ofídicos por região fisiográfica. Brasil, 1990 a 1993.....	21
Tabela 2: Diagnóstico dos acidentes ofídicos segundo gênero no Brasil.....	22
Tabela 3: Comparação entre o número de acidentes elapídicos e o número de acidentes ofídicos ocorridos entre 2001 e 2005.....	22
Tabela 4: Quadro geral da situação dos animais entregues ao Instituto Butantan para cada gênero de serpentes, a quantidade de veneno e a longevidade em cativeiro).....	25
Tabela 5: Apresentação dos diferentes candidatos, clusters, clones e tamanhos (pb) respectivos.....	34
Tabela 6: As proteínas Atg1, Atg2 e Atg5 com seus respectivos pontos isoelétricos (pI) e o nome da proteína de acordo com a similaridade com o banco de dados.....	40
Tabela 7: Três valores diferentes de identidade testados como parâmetro de estringência no CAP3 e os resultados obtidos.....	46
Tabela 8: Representação dos clusters obtidos a partir das ESTs da glândula de veneno de <i>M. corallinus</i>	47
Tabela 9: Representação dos tipos de toxinas encontradas na glândula de veneno de <i>Micrurus corallinus</i> , com o respectivo número de <i>clusters</i> e clones.....	50

9. BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, M. D.; KELLEY, J. M.; GOCAYNE, J. D.; DUBNICK, M.; POLYMEROPOULOS, M. H.; XIAO, H.; MERRIL, C. R.; WU, A.; OLDE, B.; MORENO, R. F.; KERLAVAGE, A. R.; MCCOMBIE, W. R.; VENTER, J. C. **Complementary DNA sequencing: Expressed Sequence Tags and Human Genome Project.** *Science*, 252. 1991. Pp. 1651-1656.
- AIRD, S. D.; JORGE DA SILVA, N. Jr. **Comparative enzymatic composition of Brazilian coral snake (*Micrurus*) venom.** *Comp. Biochem. Physiol.* 1991. 99B: 287-294.
- ARNI, R. K.; WARD, R. J. **Phospholipase A2: A structural review.** *Toxicon*. 1996. 34:327-841.
- BARROS, A. C.; FERNANDES, D. P.; FERREIRA, L. C.; DOS SANTOS, M. C. **Local effects induced by venoms from five species of genus *Micrurus* sp. (coral snakes).** *Toxicon*. 1994. 32(4):445-52.
- BATISTA, I. F.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; FARIA F.; SIMONS, S. M.; BARROS-BATESTTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; LEÃO, L. I.; HO, P. L.; JUNQUEIRA DE AZEVEDO, I. L. M. **Expressed sequence tags (ESTs) from the salivary glands of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae).** *Toxicon*. 2008. 51(5):823-34.
- BRAZIL, V.; BRAZIL FILHO, V. **Do envenenamento elapídico em confronto com o choque anafilático.** *Bol. Inst. Vital Brazil*. 1933. 15:43-49.
- CALVETE, J. J.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. **Snake venomomics: Strategy and applications.** *J. Mass. Spectrom.* 2007. 42(11):1405-14.
- CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The Venomous Reptiles of Western Hemisphere: Coral snakes and sea snakes, *Elapidae* Family.** Nova York: Cornell University Press, 2004. Vol. I
- CARDOSO, D. F.; LAFAYE P.; NATO, F. et al. **Neutralizing human anti-crotoxin scFv isolated from a non-imunized phage library.** In: 12TH WORLD CONGRESS INTERNATIONAL SOCIETY TOXINOLOGY. Isla Margarita, 1997.
- CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD Jr., V. **Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.** São Paulo: Sarvier, Fapesp. 2003. 468 p.

- CHEN, S.; GUO, J. H.; SAIYIN, H.; CHEN, L.; ZHOU, G. J.; HUANG, C. Q.; YU, L. **Cloning and characterization of human CAGLP gene encoding a novel EF-hand protein.** *DNA Seq.* 2004. 15(5-6):365-8.
- CHING, A. T.; ROCHA, M. M.; PAES LEME, A. F.; PIMENTA, D. C.; DE FÁTIMA, D.; FURTADO, M.; SERRANO, S. M.; HO, P. L.; JUNQUEIRA DE AZEVEDO, I. L. M. **Some aspects of the venom proteome of the *Colubridae* snake *Philodryas olfersii* revealed from a Duvernoy's (venom) gland transcriptome.** *FEBS Lett.* 2006. 580(18):4417-22.
- DE OLIVEIRA, U. C.; ASSUI, A.; DA SILVA, A. R.; DE OLIVEIRA, J. S.; HO, P. L. **Cloning and characterization of a basic phospholipase A2 homologue from *Micrurus corallinus* (coral snake) venom gland.** *Toxicon.* 2003. 42(3):249-55.
- DOWLING, H. G.; DUELLMAN, W. E. **Systematic Herpetology:** A synopsis of families and higher categories. Nova York: Hiss Publications, 1978.
- DU, X. Y.; CLEMETSON, J. M.; NAVDAEV, A.; MAGNENAT, E. M.; WELLS, T. N.; CLEMETSON, K. J., **Ophioluxin, a convulxinlike C-type lectin from *Ophiophagus hannah* (King cobra) is a powerful platelet activator via glycoprotein VI.** *J. Biol. Chem.* 2002. 277: 35124-35132.
- DUFTON, M. J.; HIDER, R. C. **Classification of phospholipases A2 according to sequence. Evolutionary and pharmacological implications.** *Eur. J. Biochem.* 1983. 137:545-551.
- ENDO, T.; TAMIYA, N. "Structure-functions relationships of postsynaptic neurotoxins from snake venoms." In: HARVEY, A. L. **Snake Toxins, International Encyclopedia Of Pharmacology And Therapeutics.** Nova York: Pergamon Press, 1991.
- FARIA, F.; JUNQUEIRA DE AZEVEDO, I. L. M.; HO, P. L.; SAMPAIO, M. U.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. **Gene expression in the salivary complexes from *Haementeria depressa* leech through the generation of expressed sequence tags.** *Gene.* 2005. 349:173-85.
- FERNANDES-PEDROSA, M. F.; JUNQUEIRA DE AZEVEDO, I. L. M.; GONCALVES-DE-ANDRADE, R. M.; VAN DEN BERG, C. W.; RAMOS, C. R.; HO, P. L.; TAMBOURGI, D. V. **Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from *Loxosceles laeta* venom.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002. 298(5): 638-645.

- FISCHER, L.; MINKE, J.; DUFAY, N.; BAUDU, P.; AUDONNET, J. C. **Rabies DNA vaccine in the horse: strategies to improve serological responses.** *Vaccine*. 2003. 21(31):4593-4596.
- FOHLMAN, J.; LIND, P.; EAKER, D. **Taipoxin, an extremely potent presynaptic snake venom neurotoxin:** Elucidation of the primary structure of the acidic carbohydrate-containing taipoxin-subunit, a phospholipase homolog. *FEBS Lett*. 1977. 84:367–371.
- FRANCIS, B. R.; WILLIAMS, E. S.; SEEBART, C.; KAISER, I. I. **Proteins isolated from the venom of the common tiger snake (*Notechis scutatus scutatus*) promote hypotension and hemorrhage.** *Toxicon*. 1993. 31(4):447-58.
- FRANCIS, B. R.; COFFIELD, J. A.; SIMPSON, L. L., KAISER, I. I. **Amino acid sequence of a new type of toxic phospholipase A2 from the venom of the Australian tiger snake (*Notechis scutatus scutatus*).** *Arch. Biochem. Biophys*. 1995. 318:481-488.
- FRANCIS, B. R.; DA SILVA JR., N. J.; SEEBART, C.; CASAS E SILVA, L. L.; SCHMIDT, J. J.; KAISER, I. I. **Toxins isolated from the venom of the Brazilian coral snake (*Micrurus frontalis frontalis*) include hemorrhagic type phospholipases A2 and postsynaptic neurotoxins.** *Toxicon*. 1997. 35:193-203.
- FRANCISCHETTI, I. M.; MY-PHAM, V.; HARRISON, J.; GARFIELD, M. K., RIBEIRO, J. M. ***Bitis gabonica* (Gaboona viper) snake venom gland:** Toward a catalog for the full-length transcripts (cDNA) and proteins. *Gene*. 2004. 337:55-69.
- FRY, B. G.; VIDAL, N.; NORMAN, J. A.; VONK, F. J.; SCHEIB, H.; RAMJAN, S. F.; KURUPPU, S.; FUNG, K.; HEDGES, S. B.; RICHARDSON, M. K.; HODGSON, W. C.; IGNJATOVIC, V.; SUMMERHAYES, R.; KOCHVA, E. **Early evolution of the venom system in lizards and snakes.** *Nature*. 2006. 439:584-588.
- FUJIMI, T. J.; KARIYA, Y.; TSUCHIYA, T., TAMIYA, T. **Nucleotide sequence of phospholipase A(2) gene expressed in snake pancreas reveals the molecular evolution of toxic phospholipase A(2) genes.** *Gene*. 2002. 292(1-2):225-31.
- GRAHAM, R. L.; GRAHAM, C.; MCCLEAN, S.; CHEN, T.; O'ROURKE, M.; HIRST, D.; THEAKSTON, D.; SHAW, C. **Identification and functional analysis of a novel bradykinin inhibitory peptide in the venoms of New World *Crotalinae* pit vipers.** *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2005. 338(3):1587-92.

- GUTIÉRREZ, J. M.; ROJAS, G.; DA SILVA JR., N. J.; NÚÑEZ, J. **Experimental myonecrosis induced by the venoms of South American *Micrurus* (coral snakes).** *Toxicon*. 1992. 30(10):1299-1302.
- HARRIS, J. B. Phospholipases in snake venoms and their effects on nerve and muscle. In: **Snake Toxins, International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics.** HARVEY, A. L. Nova York: Pergamon Press, 1991. Pp. 91-129.
- HARRISON, R. A.; BIANCO, A. E. **DNA immunisation with *Onchocerca volvulus* genes, Ov-tmy-1 and OvB20:** serological and parasitological outcomes following intramuscular or GeneGun delivery in a mouse model of *Onchocerciasis*. *Parasite Immunol*. 2000. 22(5):249-57.
- HARRISON, R. A.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; LAING, G. D.; WU, Y.; RICHARDS, A.; BROADHEAD, A. **Antibody from mice immunized with DNA encoding the carboxyl-disitegrin and cysteine-rich domain (JD9) of the haemorrhagic metalloprotease, Jararhagin, inhibits the main lethal component of viper venom.** *Clin. Exp. Immunol*. 2000. 121:358-363.
- HARRISON, R. A. **Development of venom toxin-specific antibodies by DNA immunization:** Rationale and strategies to improve therapy of viper envenoming. *Vaccine*. 2004. 2:1648-1655.
- HASSETT, D. E.; WHITTON, J. L. **DNA immunization.** *Trends in Microbiology*. 1996. 4(8): 307-312.
- HERRMANN, J. E.; WANG, S.; ZHANG, C.; PANCHAL, R. G.; BAVARI, S.; LYONS, C. R.; LOVCHIK, J. A.; GOLDING, B.; SHILOACH, J.; LU, S. **Passive immunotherapy of *Bacillus anthracis* pulmonary infection in mice with antisera produced by DNA immunization.** 2006.
- HIGASHI, H. G.; GUIDOLIN, R.; NISHIKAWA, A. K. et al. **Produção em cavalos de anticorpos antiveneno total de *Crotalus durissus terrificus* em cavalos por fosfolipase A2.** *Mem. Inst. Butantan*. 1989. 51:91-100.
- HIGASHI, H. G.; GUIDOLIN, R.; CARICATTI, C. P.; FERNANDES, I.; MARCELINO, J. R.; MORASS, J. F.; YAMAGUCHI, I.; STEPHAN, M. A.; DIAS DA SILVA, W.; TAKEHARA, H. A. **Antigenic cross-reactivity among components of Brazilian *Elapidae* snake venoms.** *J. Med. Biol. Res*. 1995. 28:767-771.

- HO, P. L.; SOARES, M. B.; YAMANE, T.; RAW, I. **Reverse Biology applied to *Micrurus corallinus*, a South American Coral Snake.** *Toxicol. Toxin Reviews*. 1995. 14(3), 327-337.
- HO, P. L.; SOARES, M. B.; MAACK, T.; GIMENEZ, I.; PUERTO, G.; FURTADO, M. F. D.; RAW, I. **Cloning of an unusual natriuretic peptide from the South American coral snake *Micrurus corallinus*.** *Eur. J. Biochem*. 1997. 250:144-149.
- HUANG, M. Z.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; CHUNG, M. C. M.; KINI, R. M. *Arch. Biochem. Biophys*. 1996. 332:150–156.
- HUANG, X.; MADAN, A. **CAP3: A DNA sequence assembly program.** *Genome Res*. 1999. 9(9):868-77.
- HUNG, C. C.; CHIOU, S. H. **Fibrinogenolytic proteases isolated from the snake venom of Taiwan habu: serine proteases with kallikrein-like and angiotensin-degrading activities.** *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2001. 281:1012-1018.
- JORGE DA SILVA JR., N.; GRIFFIN, P. R.; AIRD, S. D. **Comparative chromatography of Brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms.** *Comp. Biochem. Physiol*. 1991; 100B:117-26.
- JORGE DA SILVA JR., N.; BUCARETCHI, F. “Mecanismos de ação do veneno elapídico e aspectos clinicos dos acidentes.” In: **Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.** São Paulo: Sarvier, FAPESP, 2003. Pp. 99-107.
- JUNQUEIRA DE AZEVEDO, I. L. M.; FARSEY, S. H. P.; OLIVEIRA, M. L. S.; HO, P. L. **Molecular Cloning and Expression of a Functional Snake Venom Vascular Endothelium Growth Factor (VEGF) from *Bothrops insularis* Pit Viper. A new member of the VEGF Family of Proteins.** *Journal of Biological Chemistry*. 2001. 276(43): 339836-39842.
- JUNQUEIRA DE AZEVEDO, I. L. M.; HO, P. L. **A survey of gene expression and diversity in the venom glands of the pitviper snake *Bothrops insularis* through the generation of expressed sequence tags (ESTs).** *Gene*. 2002. 299: 279-291.
- JUNQUEIRA DE AZEVEDO, I. L. M. **Análise da diversidade do transcriptoma da glândula de veneno da serpente *Bothrops insularis*: identificação e caracterização de novas proteínas através da geração de *Expressed Sequences Tags* (ESTs).** 2003a. Tese de doutorado. Instituto de Biociências. São Paulo.

- JUNQUEIRA DE AZEVEDO, I. L. M.; PERTINHEZ, T.; SPISNI, A.; CARREÑO, F. R.; FARAH, C. S.; HO, P. L. **Cloning and expression of calglandulin: a new EF-hand protein from the venom glands of *Bothrops insularis* snake.** *Biochim. et Biophys. Acta.* 2003b. 1648(1-2):90-98.
- JUNQUEIRA DE AZEVEDO, I. L. M.; CHING, A. T.; CARVALHO, E.; FARIA, F.; NISHIYAMA JR, M. Y.; HO, P. L.; DINIZ, M. R. ***Lachesis muta* (Viperidae) cDNAs reveal diverging pit viper molecules and scaffolds typical of cobra (Elapidae) venoms: implications for snake toxin repertoire evolution.** *Genetics.* 2006. 173(2):877-89.
- 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. **cDNA sequence and molecular modeling of a nerve growth factor from *Bothrops jararacussu* venomous gland.** *Biochimie.* 2002. 84:675-680.
- KASHIMA, S.; ROBERTO, P. G.; SOARES, A. M.; ASTOLFI-FILHO, S.; PEREIRA, J. O.; GIULIATI, S.; FARIA JR, M.; XAVIER, M. A. S.; FONTES, M. R. M.; GIGLIO, J. R.; FRANÇA, S. C. **Analys of *Bothrops jararacussu* venomous gland transcriptome focusing on structural and functional aspects: I-gene expression profile of highly expressed phospholipases A2.** *Biochimie.* 2004. 86:211-219.
- KEOGH, J. S.; SHINE, R.; DONNELLAN, S. **Phylogenetic relationships of terrestrial Australo-Papuan elapid snakes (subfamily *Hydrophiinae*) based on cytochrome b and 16S rRNA sequences.** *Mol. Phylogenet. Evol.* 1998. 10(1):67-81.
- KINI, R. M. **Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake venoms.** *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* 2005. 34(4-5):200-4.
- KLINMAN, D.; YAMSHCHIKOV, G.; ISHIGATSUBO, Y. **Contribution of CpG Motifs to the immunogenicity of DNA vaccines.** *J. Immunol.* 1997. 158:3635-9.
- KOCHOLATY, W. F.; LEDFORD, E. B.; DALY, J. G.; BILLINGS, T. A. **Toxicity and some enzymatic properties and activities in the venoms of *Crotalidae*, *Elapidae* and *Viperidae*.** *Toxicon.* 1971. 9(2):131-8.
- KOMORI, Y.; NIKAI, T.; TANIGUCHI, K.; MASUDA, K.; SUGIHARA, H. **Vascular endothelial growth factor VEGF-like heparin-binding protein from the venom of *Vipera aspis aspis* (Aspic Viper).** *Biochemistry.* 1999. 38:11796-11803.

- KOSTIZA, T.; MEIER, J. **Nerve growth factors from snake venoms: chemical properties, mode of action and biological significance.** *Toxicon*. 1996. 34(7):787-806.
- LAI, W. C.; BENNETT, M. **DNA vaccines.** *Crit. Rev. Immunol*. 1998. 18(5):449-84.
- LAING, G. D.; COMPTON, S. J.; RAMACHANDRAN, R.; FULLER, G. L.; WILKINSON, M. C.; WAGSTAFF, S. C.; WATSON, S. P.; KAMIGUTI, A. S.; THEAKSTON, R. D.; SENIS, Y. A. **Characterization of a novel protein from *Proatheris superciliaris* venom: proatherocytin, a 34-kDa platelet receptor PAR1 agonist.** *Toxicon*. 2005. 46:490-499.
- LAZO, G. R.; TONG, J.; MILLER, R.; HSIA, C.; RAUSCH, C.; KANG, Y.; ANDERSON, O. D. **Software scripts for quality checking of high-throughput nucleic acid sequencers.** *Biotechniques*. 2001. 30(6):1300-1305.
- LEE, N. H.; WEINSTOCK, K. G.; KIRKNESS, E. F.; EARLE-HUGHES, J. A.; FULDNER, R. A.; MARMAROS, S.; GLODEK, A.; GOCAYNE, J. D.; ADAMS, M. D.; KERLAVAGE, A. R. *et al.* **Comparative expressed-sequence-tag analysis of differential gene expression profiles in PC-12 cells before and after nerve growth factor treatment.** *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995. 92(18): 8303-8307.
- LEWIN, B. **Genes VII.** Oxford: Oxford University Press, 2000. 990 p.
- LIU, M. A. **DNA vaccines: a review.** *Journal of Internal Medicine*. 2003. 253(4):402-410.
- MARQUES, O. A. V.; SAZIMA, I. **Diet and feeding behavior of coral snake *Micrurus corallinus*, from Atlantic Forest of Brazil.** *Herpetol. Nat. History*. 1997. 5(1):88-93.
- McDOWALL, J. **Snake Venom: Bungarotoxins.**
http://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2004_6/Page1.htm (acessado dia 7 de julho de 2006).
- MEBS, D.; OWNBY, C. L. **Myotoxic components of snake venoms: their biochemical and biological activities.** *Pharmacol Ther*. 1990. 48(2):223-36. Review.
- MÉNEZ, A.; BONTEMS, F.; ROUMESTAND, C.; GILQUIN, B.; TOMA, F. **Structural basis for functional diversity of animal toxins.** *Proceedings of Royal Society of Edimburg*. 1992. 99B(1/2): 83-103.
- MORA, R.; VALVERDE, B.; DÍAZ, C.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. **A Lys49 phospholipase A(2) homologue from *Bothrops asper* snake venom induces proliferation, apoptosis and necrosis in a lymphoblastoid cell line.** *Toxicon*. 2005. 45(5):651-60.

- MOUSSATCHÉ, H.; YATES, A.; MELÉNDEZ, T.; MENDOZA, J. **Preliminary report o the fractionation of the venom of *Micrurus nigrocinctus* and the pharmacological properties of the fractions.** ABSTRACTS OF THE 5TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ANIMAL, PLANT AND MICROBIAL TOXINS. 1976; 60.
- NAIR, D. G.; FRY, B. G.; ALEWOOD, P.; KUMAR, P. P.; KINI, R. M. **Antimicrobial activity of omwaprin, a new member of the waprins family of snake venom proteins.** *Biochem. J.* 2007. 402, 93–104 doi:10.1042/BJ20060318 93
- NATHAN, I.; DVILANSKY, A.; YIRMIYAHU, T.; AHARON, M.; LIVNE, A. **Impairment of platelet aggregation by *Echis colorata* venom mediated by L-amino acid oxidase or H₂O₂.** *Thromb Haemost.* 1982. 48(3):277-82.
- NIRTHANAN, S.; GWEE, M. C. **Three-finger alpha-neurotoxins and the nicotinic acetylcholine receptor, forty years on.** *J. Pharmacol. Sci.* 2004. 94(1):1-17. Review.
- OGAWA, T.; CHIJIWA, T.; ODA-UEDA, N.; OHNO, M. **Molecular diversity and accelerated evolution of C-type lectin-like proteins from snake venom.** *Toxicon.* 2005. 45(1):1-14. Review.
- OLIVEIRA, S. C.; ROSINHA, G. M.; DE-BRITO, C. F.; AFONSO, R. R.; COSTA, M. C.; GOES, A. M. RECH, E. L., AZEVEDO, V. **Immunological properties of gene vaccines delivered by different routes.** *Braz. J. Med. Biol.* 1999. 32(2):207-14
- PEARSON, A.; TYLER, M. I.; RETSON, K. V.; HOWDEN, M. E. H. **Studies on the subunit structure of textilotoxin, a potent presynaptic neurotoxin from the venom of the Australian common brown snake (*Pseudonaja textilis*): The complete amino-acid sequences of all the subunits.** *Biochim. Biophys. Acta.* 1993. 1161 223–229.
- PRIETO DA SILVA, A. R.; YAMAGUSHI, I. K.; MORAIS, J. F.; HIGASHI, H. G.; RAW, I.; HO, P. L.; OLIVEIRA, J. S. **Cross reactivity of different specific *Micrurus* antivenom sera with homologous and heterologous snake venoms.** *Toxicon.* 2001a. 39(7):949-53.
- PRIETO DA SILVA, A. R. B. **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*).** 2001b. Tese de doutorado. Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.
- QINGHUA, L.; XIAOWEI, Z.; WEI, Y.; CHENJI, L.; YIJUN, H.; PENGXIN, Q.; XINGWEN, S.; SONGNIAN, H.; GUANGMEI, Y. **A catalog for transcripts in the venom gland of**

- the *Agkistrodon acutus*: identification of the toxins potentially involved in coagulopathy.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006. 341(2):522-31.
- RAIBEKAS, A. A.; MASSEY, V. **Primary structure of the snake venom L-amino acid oxidase shows high homology with the mouse B cell interleukin 4-induced Fig1 protein.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998. 248(3):476-8.
- RAWEERITH, R.; RATANABANANGKOON, K. **Immunochemical and biochemical comparisons of equine monovalent and polyvalent snake antivenoms.** *Toxicon.* 2005. 45:369-375.
- ROSSETTO, O.; MORBIATO, L.; CACCIN, P.; RIGONI, M.; MONTECUCCO, C. **Presynaptic enzymatic neurotoxins.** *J. Neurochem.* 2006. 97(6):1534-45.
- ROZE, J.A. **Summary of coral snakes (*Elapidae*) from Cerro de La Neblina, Venezuela, with description of a new subspecies.** *Rev. Fr. Aquariol. Herpetol.* 1987. 14:109-112.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning:** A laboratory manual. 3 vols. Cold Spring Harbour: Laboratory Press, 1989.
- SCHWEITZ, H.; VIGNE, P.; MOINIER, D.; FRELIN, C.; LAZDUNSKI, M. **A new member of the natriuretic peptide family is present in the venom of the green mamba (*Dendroaspis angusticeps*).** *J. Biol. Chem.* 1992. 267(20):13928-32.
- SERRANO, S. M., MAROUN, R. C. **Snake venom serine proteinases: Sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved.** *Toxicon.* 2005. 45:1115–1132.
- SLOWINSKI, J. B. **A phylogenetic analysis of new world coral snakes (*Elapidae*: *Leptomicrurus*, *Micruroides* and *Micrurus*) based on allozymic and morphological characters.** *J. Herpetol.* 1995. 29:325-38.
- SLOWINSKI, J. B.; KNIGHT, A.; ROONEY, A.P. **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.* 1997. 8(3):349-62.
- SOARES, M. B. “Construction of directionally cloned cDNA libraries in phagenid vectors.” In: ADAMS, M.; FIELDS, C.; VENTER, J. C. **Automated DNA sequencing and analysis techniques.** Londres: Academic Press, 1994. pp. 110-114.

- STRYDOM, D. J. **Snake venom toxins:** The amino-acid sequence of a short-neurotoxin homologue from *Dendroaspis polylepis polylepis* (black mamba) venom. *Eur. J. Biochem.* 1977. 76(1):99-106.
- TAMIYA, T.; LAMOUROUX, A.; JULIEN, S. F.; GRIMA, B.; MALLET, S.; FROMAGEOT, P.; MÉNEZ, A. **Cloning and sequence analysis of the cDNA encoding a snake neurotoxin precursor.** *Biochimie.* 1985. 67:185-189.
- TANG, D. C.; DEVIT, M.; JOHNSTON, S. A. **Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response.** *Nature.* 1992. 356(6365):152-4.
- TANJONI, I.; BUTERA, D.; BENTO, L.; DELLA-CASA, M. S; MARQUES-PORTO, R.; TAKEHARA, H. A.; GUTIERREZ, J. M.; FERNANDES, I.; MOURA-DA-SILVA, A. M. **Snake venom metalloproteinases: structure/function relationships studies using monoclonal antibodies.** *Toxicon.* 2003. 42(7):801-8.
- TORRES, A. M.; WONG, H. Y.; DESAI, M.; MOOCHHALA, S.; KUCHEL, P. W.; KINI, R. M. **Identification of a novel family of proteins in snake venoms. Purification and structural characterization of nawaprin from *Naja nigricollis* snake venom.** *J. Biol. Chem.* 2003. 278(41):40097-104.
- TOULON, M.; PALFREE, R. G.; PALFREE, S.; DUMONT, F. J.; HÄMMERLING, U. **Ly-6 A/E antigen of murine T cells is associated with a distinct pathway of activation: Requirements for interferon and exogenous interleukin 2.** *Eur. J. Immunol.* 1988. 18(6):937-42.
- TSETLIN, V. **Snake venom alpha-neurotoxins and other 'three-finger' proteins.** *Eur. J. Biochem.* 1999. 264(2):281-6. Review.
- ULMER, J. B.; DeWITT, C. M., CHASTAIN, M. et al. **Enhancement of DNA vaccine potency using conventional aluminum adjuvants.** *Vaccine.* 1999. 18:18-28.
- VITAL BRAZIL, O. **Veneneos ofídicos neurotóxicos.** *Ver Ass. Med. Bras.,* 26:212-218. 1980
- VITAL BRAZIL, O.; FONTANA, M. D. **Ações pré-juncionais e pós-juncionais da peçonha da cobra coral *Micrurus corallinus* na junção neuromuscular.** *Mem. Inst. Butantan.* 1983/84. 40/41:221-240.
- VITAL BRAZIL, O. **Coral snake venoms:** Model of action and pathophysiology of experimental envenomation. *Rev. Inst. Med. trop São Paulo,* 1987;29-119.

- WAGSTAFF, S. C.; HARRISON, R. A. **Venom gland EST analysis of the saw-scaled viper, *Echis ocellatus*, reveals novel alpha9beta1 integrin-binding motifs in venom metalloproteinases and a new group of putative toxins, renin-like aspartic proteases.** *Gene*. 2006. 377:21-32.
- WAGSTAFF, S. C.; FAVREAU, P.; CHENEVAL, O.; LAING, G. D.; WILKINSON, M. C.; MILLER, R. L.; STÖCKLIN, R.; HARRISON, R. A. **Molecular characterisation of endogenous snake venom metalloproteinase inhibitors.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. 365(4):650-6.
- WARREL, D. A. "Geographical intraspecies variation in the clinical manifestation of envenoming by snakes." In: **Venomous snakes: ecology, evolution and snakes bites.** Oxford: Claredon Press, 1997. Pp. 189-204.
- WEIS, W. I.; TAYLOR, M. E.; DRICKAMER, K. **The C-type lectin superfamily in the immune system.** *Immunol. Rev.* 1998. 163:19-34. Review.
- WOODARD, G. E.; ROSADO, J. A.; BROWN, J. ***Dendroaspis* natriuretic peptide-like immunoreactivity and its regulation in rat aortic vascular smooth muscle.** *Peptides*. 2002. 23:23-29.
- YEE, J. S. P.; NANLING, G.; AFIFIYAN, F.; DONGHUI, M.; LAY, P. S.; ARMUGAN, A.; JEYASEELAN, K. **Snake postsynaptic neurotoxins: gene structure, phylogeny and applications in research and therapy.** *Biochimie*. 2004. 86:137-149.
- ZUPUNSKI, V.; KORDIS, D.; GUBENSEK, F. **Adaptive evolution in the snake venom Kunitz/BPTI protein family.** *FEBS Lett.* 2003. 547(1-3):131-6.

10. BIOGRAFIA

LUCIANA IWANAGA LEÃO

Formação Acadêmica

- Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade de São Paulo (2001-2005)
- Licenciatura pela Faculdade de Educação da Universidade de São Paulo (2004-2006)
- Pós-graduação pelo Departamento de Genética e Biologia Evolutiva da Universidade de São Paulo (2006-2008)

Atuação Profissional

2008

Professora de ensino fundamental I e II, ensino médio e curso pré-vestibular no EMAE do GRAACC (Grupo de Apoio ao Adolescente e Criança com Câncer)

2006-2008

*Mestrado no Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan – Geração de um banco transcriptômico de glândulas de veneno de *Micrurus corallinus* e identificação de candidatos antigênicos para um anti-soro antielapídico.*

2003-2005

*Iniciação Científica no Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan – Geração e análise de um banco representativo de cDNAs de *Bothrops insularis*.*

2001-2003

Iniciação Científica no Departamento de Bioquímica e Fisiologia Animal da UNIFESP – Estudo sobre a ação de enzimas hepáticas em fígado perfundido de rato.

Trabalhos apresentados em Congressos

LEÃO LI, Ho PL, Junqueira de Azevedo ILM. *Identification of putative antigenic candidates to an antielapidic serum based on the analysis of *Micrurus corallinus* transcriptome*. 2008. 33rd FEBS Congress & 11th IUBMB Conference. Atenas, Grécia.

LEÃO LI, Ho PL, Junqueira de Azevedo ILM. *Identification of putative antigenic candidates to an antielapidic serum based on the analysis of *Micrurus corallinus* transcriptome*. 2008. XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq) e XI Reunião da Panamerican Association for Biochemistry and Molecular Biology (PABMB). Águas de Lindóia, São Paulo.

- LEÃO LI, Ho PL, Junqueira de Azevedo ILM. *The analysis of Micrurus corallinus (coral-snake) transcriptome*. 2007. XXXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - Sbbq e 10th International Union of Biochemistry and Molecular Biology Conference (IUBMB). Salvador, Bahia.
- Ramos-Guimarães, P ; Oliveira-Carvalho, A.L ; Correa-Neto, C ; Aguiar, A. S. ; Melgarejo, A.R. ; LEÃO, L. I.; Junqueira-de-Azevedo, I. L. M.; Ho, PL ; Soares, MR ; Zingali, R.B. *Predictive proteome of Micrurus frontalis versus Micrurus corallinus venom*. 2007. 9th IST Pan-American Section Meeting, Mexico.
- LEÃO LI, Ho PL, Junqueira de Azevedo ILM. *Identification of putative antigenic candidates to an antielapidic serum based on the analysis of Micrurus corallinus transcriptome*. 2006. VIII Reunião Anual Do Instituto Butantan. São Paulo.
- LEÃO LI, Ho PL, Junqueira de Azevedo ILM. *Identification of putative antigenic candidates to an antielapidic serum based on the analysis of Micrurus corallinus transcriptome*. 2006. IX Congresso Brasileiro de Toxinologia - SBTx. Fortaleza, Ceará.
- LEÃO LI, Ho PL, Junqueira de Azevedo ILM. *A full-length set of ORFs from Bothrops insularis transcriptome and a comparative view of Viperidae envenoming through major toxin profile*. 2005. XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq. Águas de Lindóia, São Paulo.
- LEÃO LI, Ho PL, Junqueira de Azevedo ILM. *The generation and analysis of a cDNA database of Bothrops insularis venom glands, focusing on identification of new toxins and the characterization of the full-length sequences of some transcripts*. 2005. VII Reunião Anual Científica do Instituto Butantan. São Paulo.
- LEÃO LI, Junqueira de Azevedo ILM, Nishiyama MYJr, Ho PL. *The generation and analysis of a cDNA database of Bothrops insularis venom glands, focusing on identification of new toxins and the characterization of the full-length sequences of some transcripts*. 2004. VI Reunião Científica Anual do Instituto Butantan. São Paulo.
- LEÃO LI, Ho PL, Junqueira de Azevedo ILM. *The Bothrops insularis Transcriptome Project: The Generation And Analysis Of An Updated Expressed Sequence Tags (ESTs) Database*. 2004. VIII Congresso da Sociedade Brasileira de Toxinologia. VIII Congresso da Sociedade Brasileira de Toxinologia. Angra dos Reis, Rio de Janeiro.
- LEÃO LI, Borges DR. *Influência da Idade na Resposta à Agressão Hepática por Diferentes Agentes*. 2003. PIBIC. São Paulo.

Artigos aceitos para publicação

- Batista IFC, Chudzinski-Tavassi AM, Faria F, Simons SM, Labruna MB, Barros-Batistti DM; LEÃO LI, Ho PL, Junqueira de Azevedo ILM. **Expressed Sequence Tags (ESTs) from the salivary glands of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae)**. *Toxicon*. 2007.

Outras atividades

Análise das metaloproteases de Bothrops insularis

No projeto de iniciação científica, o banco transcriptômico de *B. insularis* foi ampliado para 2 mil ESTs. Durante o período das pesquisas com *M. corallinus*, foi realizado o seqüenciamento completo de metaloproteases e serinoproteases presentes na glândula de veneno de *B. insularis*, que correspondia à continuidade do projeto desenvolvido durante a Iniciação Científica (IC 04/10803-4).

Transcriptoma de Amblyomma cajennense

Participação nas etapas técnicas desse projeto, com a geração de 1800 ESTs. Participação também na anotação e análise do banco de transcriptoma do carrapato *Amblyomma cajennense*, projeto em colaboração com o Dr. Paulo Lee Ho (Centro de Biotecnologia) e a Dra. Isabel F. Batista (Laboratório de Bioquímica). Já havia participado. As seqüências foram depositadas no dbEST do GenBank.

Projeto Butantan na Amazônia

Participação, no mês de setembro de 2006, do *workshop* e palestras nas Faculdades Integradas do Tapajós (FIT), dedicados aos alunos, professores e profissionais da região a fim de iniciar um primeiro contato do Instituto Butantan com a população local de Santarém. O projeto tem o intuito de formar mestres e doutores na região de Santarém, criando um programa de pós-graduação orientado pelo Instituto, que ocorrerá em parceria com as faculdades locais. As pesquisas serão realizadas na Base Avançada que será construída pelo Instituto Butantan na cidade de Belterra.

Participação como monitora, por indicação do Dr. Giuseppe Puerto (diretor do Museu do Instituto Butantan), dos cursos oferecidos às populações ribeirinhas do Rio Tapajós e Rio Amazonas, assim como às populações locais de Belterra e Alter do Chão.

Proteômica das glândulas de veneno de Bothrops insularis

Colaboração com dados sobre o transcriptoma de glândulas de veneno de *B. insularis* para pesquisa proteômica do Dr. Richard Hemmi Valente e Dr. Gilberto Domont, do Rio de Janeiro (FIOCRUZ). Um artigo científico unindo os dados transcriptômicos e proteômicos está sendo submetido à publicação no presente momento.

Tabela 8: Tabela de anotação - representa todo o perfil transcriptômico de clusters obtidos a partir da geração de ESTs de glândulas de veneno de *Micrurus corallinus*.

CLUSTER	Tamanho (pb)	N° de Clones no Cluster	FULL	Categoria 1ª	PRODUTO	Blast	Accession N°	% ID	e-value	overlap
MCOR0001C	551	6	FF	TB	natriuretic peptide	X	>gb AAC60341.1	99	4.00E-73	138/139
MCOR0002C	573	2	P	UF	similar to Hypothetical protein CGI-99	X	>ref XP_217550.2	81	2.00E-80	146/179
MCOR0003C	868	3	FP	CM	Eno3-prov protein	X	>gb AAH45082.1	92	E-141	251/271
MCOR0004C	435	35	FF	TNtx	Alpha-neurotoxin homolog 7 precursor	X	sp Q9PRI1 NXAH7_MICCO	100	4.00E-41	78/78
MCOR0005C	541	2	FP	OF	II-FBPL precursor	X	>gb ABB30003.1	39	2.00E-22	58/148
MCOR0006C	870	5	P	CT	60S acidic ribosomal protein P0 (L10E)	X	sp P47826 RLA0_CHICK	94	E-131	240/254
MCOR0007C	1028	21	FF	CM	(GAPDH) homologue	X	dbj BAD74117.1	91	E-171	294/322
MCOR0008C	876	5	FP	CE	alpha skeletal actin precursor	X	ref NP_776650.1	100	E-157	275/275
MCOR0009C	952	4	P	MT	Dinodon mitochondrion, complete genome		>ref NC_001945.1	88	8.00E-81	256/290
MCOR0010C	524	2		NH	no hit					
MCOR0011C	671	26	FP	CT	similar to 60S acidic ribosomal protein P0	X	ref XP_850994.1	99	E-108	199/201
MCOR0012C	682	2	FP	CT	Elongation factor 1-gamma (EF-1-gamma)	X	sp Q68FR6 EF1G_RAT	84	E-110	190/225
MCOR0013C	602	6	FP	CT	40S ribosomal protein S5	X	>gb AAP20199.1	97	1.00E-94	171/176
MCOR0014C	827	5	FF	MT	Dinodon mitochondrion, complete genome	X	sp O79551 ATP6_DINSE	69	1.00E-83	158/226
MCOR0015C	689	3	P	UF	55 kDa erythrocyte membrane protein	X	dbj BAD97116.1	77	4.00E-52	98/127
MCOR0016C	522	2		NH	no hit					
MCOR0017C	858	6	FP	CM	ornithine decarboxylase antizyme - human	X	gb AAA82155.1	70	5.00E-64	125/177
MCOR0018C	790	2	P	CR	Alpi-prov protein	X	>gb AAH89726.1	55	5.00E-15	44/80
MCOR0019C	474	5	FP	TB	natriuretic peptide	X	>gb AAC60341.1	89	1.00E-21	53/59
MCOR0020C	549	2	FF	OF	Hemoglobin alpha-A subunit	X	sp P0C0U6 HBA_DRYCE	88	6.00E-64	121/137
MCOR0021C	564	7	FP	CT	Similar to ribosomal protein S3	X	>gb AAH41299.1	99	2.00E-96	182/183
MCOR0022C	441	2	FP	CE	similar to Troponin C	X	dbj BAD14398.1	92	2.00E-68	130/140

CLUSTER	Tamanho (pb)	N° de Clones no Cluster	FULL	Categoria 1aria	PRODUTO	Blast	Accession N°	% ID	e-value	overlap
MCOR0023C	485	2	P	CD	ubiquitin C	X	>gb ABC94632.1	72	2.00E-46	108/149
MCOR0024C	535	3	FF	TL	C-type lectin-like protein 2	X	gb AAK43585.1	40	2.00E-27	64/158
MCOR0025C	477	2	FP	CT	similar to ribosomal protein L13	X	gb AAH93063.1	91	1.00E-71	129/141
MCOR0026C	940	3	FF	CP	signal sequence receptor, beta	X	>ref NP_001006561.1	92	6.00E-92	167/181
MCOR0027C	914	4	FP	CT	ribosomal protein L4	X	ref NP_001007480.1	95	E-163	277/289
MCOR0028C	825	4	FP	CT	60S ribosomal protein L5	X	sp P22451 RL5_CHICK	96	E-144	249/259
MCOR0029C	538	2	FP	CD	Proteasome (prosome, macropain)	X	ref NP_989113.1	96	7.00E-80	144/149
MCOR0030C	623	3	FP	CP	Protein disulfide-isomerase precursor PDI	X	>gb AAY33972.1	93	1.00E-95	174/186
MCOR0031C	986	3	P	CE	superfast myosin heavy chain	X	ref NP_001009221.1	85	E-148	268/312
MCOR0032C	869	3	FP	CD	Proteasome activator complex subunit 1	X	sp Q4U5R3 PSME1_BOVIN	63	8.00E-86	156/245
MCOR0033C	577	2	FP	CE	similar to Actin, cytoplasmic 2	X	sp P63260 ACTG_MOUSE	100	4.00E-92	165/165
MCOR0034C	522	2	FP	CT	similar to Elongation	X	>ref XP_884705.1	60	1.00E-42	92/151
MCOR0035C	721	20	FF	TNtx	Short neurotoxin 3 precursor	X	sp Q9W7K0 NXS3_PSETE	53	2.00E-15	43/80
MCOR0036C	698	196	FF	TP	phospholipase A2	X	gb AAN60018.1	100	2.00E-86	146/146
MCOR0037C	597	2	P	MT	NADH dehydrogenase subunit 4	X	ref YP_313690.1	80	2.00E-88	161/199
MCOR0038C	625	2	P	CT	ribosomal protein L6	X	ref NP_989483.1	87	7.00E-99	176/202
MCOR0039C	486	29	FF	TNtx	Short neurotoxin homolog NTL4	X	sp Q9YGI8 NXSH4_BUNMU	61	1.00E-26	53/86
MCOR0040C	611	3	P	CT	eukaryotic translation initiation factor	X	ref XP_213456.2	86	3.00E-61	118/137
MCOR0041C	559	2	P	CM	similar to isocitrate dehydrogenase 2	X	ref XP_536192.2	91	E-102	171/186
MCOR0042C	833	2	P	CE	Keratin, type I cytoskeletal 15	X	sp Q6IFV3 K1C15_RAT	78	E-122	216/276
MCOR0043C	711	2		NH	no hit					
MCOR0044C	648	2	P	OF	similar to selenophosphate synthetase	X	ref XP_870912.1	83	1.00E-48	102/122
MCOR0045C	766	8	P	CR	similar to guanine nucleotide binding protein	X	>gb AAO21313.1	97	E-132	229/234
MCOR0046C	673	2	FP	MT	NADH dehydrogenase subunit 1	X	>gb AAL66854.1	88	E-106	195/220

CLUSTER	Tamanho (pb)	N° de Clones no Cluster	FULL	Categoria 1aria	PRODUTO	Blast	Accession N°	% ID	e-value	overlap
MCOR0047C	681	2	P	CT	40S ribosomal protein S2	X	gb AAZ38987.1	99	E-125	224/226
MCOR0048S	449	1	P	CD	ubiquitin	X	>gb AAV84266.1	99	6.00E-77	148/149
MCOR0049C	547	4	FP	CT	Ribosomal protein S6	X	gb AAH27620.1	95	7.00E-91	164/172
MCOR0050C	443	2	FP	OF	Ferritin light chain, oocyte isoform (B-ferritin)	X	sp Q7SXA5 FRIL_XENLA	68	3.00E-35	73/106
MCOR0051C	745	2	P	CP	Coatomer subunit delta (Delta-coat protein)	X	>emb CAA57072.1	86	3.00E-13	38/44
MCOR0052C	491	3	P	CT	similar to K123 protein	X	>ref NP_990350.1	51	1.00E-15	45/88
MCOR0053C	564	3	FF	OF	Defender against cell death 1 (DAD-1)	X	sp O131113 DAD1_CHICK	90	4.00E-55	112/124
MCOR0054C	544	2	P	MT	cytochrome oxidase subunit 1	X	>ref YP_313683.1	81	7.00E-61	105/129
MCOR0055C	537	2	FF	UF	MGC52838 protein	X	>gb AAI06323.1	76	3.00E-47	87/114
MCOR0056C	559	2	FP	CT	similar to ribosomal protein S9-like	X	sp Q6ZWN5 RS9_MOUSE	99	1.00E-92	172/173
MCOR0057C	757	5	FP	CT	40S ribosomal protein S4	X	sp P47836 RS4_CHICK	98	E-142	248/252
MCOR0058C	548	4	FP	CE	Alpha crystallin B chain (Alpha(B)-crystallin)	X	sp P41316 CRYAB_RABIT	62	1.00E-47	100/160
MCOR0059C	581	6	FP	CT	Eukaryotic translation elongation factor	X	sp P24534 EF1B_HUMAN	88	3.00E-81	149/169
MCOR0060C	566	4	FF	TL	C-type lectin-like protein 2	X	>gb AAK43585.1	42	1.00E-31	67/156
MCOR0061C	541	2	FP	CE	tropomyosin alpha striated muscle isoform	X	>gb AAT68295.1	94	1.00E-76	153/162
MCOR0062C	646	2	FF	UF	SH3 domain binding glutamic acid-rich	X	ref XP_216547.1	86	5.00E-39	80/93
MCOR0063C	1123	4	P	TM	cobrin precursor	X	gb AAF00693.1	82	0.0	305/370
MCOR0064C	556	2	P	CR	Breast cancer metastasis-suppressor 1	X	sp Q9HCU9 BRMS1_HUMAN	67	6.00E-69	125/184
MCOR0065C	572	3	FP	CT	similar to 60S ribosomal protein L8 isoform	X	sp P62917 RL8_HUMAN	98	E-101	182/185
MCOR0066C	606	2	P	CP	hypoxia up-regulated 1	X	>ref NP_001006588.1	67	2.00E-70	140/207
MCOR0067C	572	3	P	TL	Lithostathine 2 precursor	X	sp Q08731 LIT2_MOUSE	34	8.00E-16	53/155
MCOR0068C	869	4	FP	CR	similar to CAVP-target protein (CAVPT)	X	>ref XP_516109.1	70	2.00E-88	165/234
MCOR0069C	566	2	P	CM	similar to ATP synthase, H ⁺ transporting	X	>ref XP_858232.1	81	7.00E-76	143/175
MCOR0070C	540	2	P	CT	similar to 40S ribosomal protein S8	X	>ref XP_422423.1	96	8.00E-98	171/177

CLUSTER	Tamanho (pb)	N° de Clones no Cluster	FULL	Categoria 1aria	PRODUTO	Blast	Accession N°	% ID	e-value	overlap
MCOR0071C	618	2	P	CR	Actin-related protein 2/3 complex	X	sp O15144 ARPC2_HUMAN	97	6.00E-47	91/93
MCOR0072C	897	6	P	CR	ADP/ATP translocase 2	X	sp P05141 ADT2_HUMAN	96	E-142	245/255
MCOR0073C	2458	39	FF	MT	Cytochrome c oxidase subunit 1	X	sp O79548 COX1_DINSE	88	0.0	470/530
MCOR0074C	515	2	P	CR	TRIM5/cyclophilin A V4 fusion protein	X	>gb AAT99909.1	88	2.00E-71	124/140
MCOR0075C	779	7	FF	MT	Cytochrome c oxidase subunit 3	X	sp O79552 COX3_DINSE	82	E-116	207/251
MCOR0076C	1473	15	FF	CM	similar to Fructose-bisphosphate aldolase A	X	>ref XP_586556.2	90	0.0	328/364
MCOR0077C	557	4	FF	TL	stejaggregin-A alpha chain	X	>gb AAQ15166.1	44	2.00E-32	72/163
MCOR0078C	486	2	P	CR	GNB2L1 protein	X	gb AAI02287.1	99	3.00E-82	147/148
MCOR0079C	614	2		NH	no hit					
MCOR0080C	528	2	P	OF	Scaffold attachment factor B	X	>ref XP_542146.2	65	5.00E-62	117/178
MCOR0081C	802	2	P	CD	similar to X-prolyl aminopeptidase 2	X	>ref XP_420139.1	61	2.00E-27	64/104
MCOR0082C	669	5	P	MT	Naja naja 12S ribosomal RNA gene	N	>gb AF236683.2 AF236683	91	E-119	315/344
MCOR0083C	484	5	FF	CT	60S acidic ribosomal protein P1	X	sp P18660 RLA1_CHICK	92	1.00E-53	106/114
MCOR0084C	515	2	P	CD	polyubiquitin C	X	ref NP_062613.2	60	2.00E-37	94/155
MCOR0085C	981	5	FF	CT	40S ribosomal protein SA (p40)	X	sp P50890 RSSA_CHICK	96	E-167	287/296
MCOR0086C	453	3	FF	CT	40S ribosomal protein S27	X	sp P42677 RS27_HUMAN	100	8.00E-45	84/84
MCOR0087C	1005	4	P	CT	eukaryotic translation elongation factor 1	X	ref NP_001013122.1	68	E-115	219/318
MCOR0088C	463	2	FF	CT	ubiquitin-like/S30 ribosomal fusion protein	X	>ref NP_999102.1	81	2.00E-56	109/133
MCOR0089C	874	19	FF	CT	60S ribosomal protein L7a	X	sp P32429 RL7A_CHICK	96	E-146	258/266
MCOR0090C	735	27	FF	TL	C-type lectin-like protein 2	X	>gb AAK43585.1	74	2.00E-72	117/158
MCOR0091C	427	2	FF	TNtx	Alpha-neurotoxin homolog 7 precursor	X	sp Q9PRI1 NXAH7_MICCO	97	2.00E-38	74/76
MCOR0092C	485	18	FF	TNtx	alpha neurotoxin	X	>gb AAF75223.1	49	3.00E-15	39/79
MCOR0093C	603	2	FF	TP	phospholipase A2	X	>gb AAN60018.1	90	5.00E-73	134/148
MCOR0094C	512	12	FF	TNtx	weak toxin 3 / cardiotoxin 6	X	gb AAL30061.1	49	3.00E-17	43/87

CLUSTER	Tamanho (pb)	N° de Clones no Cluster	FULL	Categoria 1aria	PRODUTO	Blast	Accession N°	% ID	e-value	overlap
MCOR0095C	719	11	FF	TL	C-type lectin-like protein 2	X	>gb AAK43585.1	74	7.00E-71	116/155
MCOR0096C	534	3	FP	CR	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	X	sp P24367 PPIB_CHICK	84	1.00E-77	141/166
MCOR0097C	531	5	FF	CT	ribosomal protein S11	X	>ref NP_001026004.1	97	1.00E-84	153/157
MCOR0098C	679	6	P	CT	similar to ubiquitin A-52	X	>ref XP_533870.2	99	3.00E-69	129/130
MCOR0099C	553	2	FF	CR	Calpactin I light chain	X	>ref XP_533060.2	62	1.00E-38	76/121
MCOR0100C	488	27	FF	TNtx	muscarinic toxin precursor	X	>gb ABB83639.1	51	1.00E-15	44/85
MCOR0101C	495	2	P	CT	similar to ribosomal protein L13a	X	ref XP_512821.1	92	2.00E-84	153/165
MCOR0102C	556	2	FP	CT	60S ribosomal protein L15	X	sp P61313 RL15_HUMAN	100	E-100	175/175
MCOR0103C	445	2	FF	TNtx	long chain neurotoxin LsIII	X	>dbj BAC78204.1	55	1.00E-19	48/86
MCOR0104C	483	2	FF	CT	40S ribosomal protein S12	X	sp P84175 RS12_CHICK	98	1.00E-70	130/132
MCOR0105C	471	5	FF	TNtx	Cardiotoxin 4N precursor (CTX-4N)	X	sp Q9W6W9 CTX4N_NAJAT	56	4.00E-15	46/82
MCOR0106C	438	6	FF	TNtx	Alpha-neurotoxin homolog 7 precursor	X	sp Q9PRI1 NXAH7_MICCO	100	4.00E-41	78/78
MCOR0107C	506	2	P	CT	similar to ribosomal protein S23	X	>ref XP_424903.1	97	2.00E-77	143/146
MCOR0108C	606	6	FF	CT	60S ribosomal protein L41 (HG12)	X	sp P62945 RL41_HUMAN	100	4.00E-06	25/25
MCOR0109C	474	12	FF	TNtx	Cytotoxin 7 precursor (Cardiotoxin 7)	X	sp P49122 CX7_NAJAT	51	5.00E-16	42/82
MCOR0110C	410	2	FF	TK	trypsin inhibitor preproprotein	X	>gb AAP04484.1	59	2.00E-25	53/89
MCOR0111C	537	2	P	CT	similar to 40S ribosomal protein	X	>ref XP_536549.2	95	2.00E-65	125/131
MCOR0112C	499	2	P	CT	similar to ribosomal protein	X	>ref XP_424903.1	96	5.00E-78	144/149
MCOR0113C	453	2	FF	CT	similar to 40S ribosomal protein	X	sp P62273 RS29_HUMAN	100	1.00E-28	56/56
MCOR0114C	459	2	FF	CT	ribosomal protein L28	X	>ref NP_001016714.1	88	2.00E-65	121/137
MCOR0115C	596	3	FF	CT	40S ribosomal protein	X	sp P62277 RS13_HUMAN	100	2.00E-80	151/151
MCOR0116C	497	2	FF	CT	40S ribosomal protein S15	X	sp P62841 RS15_HUMAN	100	3.00E-78	145/145
MCOR0117C	415	2	FF	TNtx	Alpha-neurotoxin homolog 7	X	sp Q9PRI1 NXAH7_MICCO	89	1.00E-36	70/78
MCOR0118C	495	33	FF	TNtx	Alpha-neurotoxin homolog 8	X	sp P58370 NXAH8_MICCO	98	4.00E-47	85/86

CLUSTER	Tamanho (pb)	N° de Clones no Cluster	FULL	Categoria 1aria	PRODUTO	Blast	Accession N°	% ID	e-value	overlap
MCOR0119C	473	3	P	CT	elongation factor 2	X	>gb AAV33974.1	97	1.00E-71	129/132
MCOR0120C	476	4	FF	TNtx	muscarinic toxin precursor	X	>gb ABB83638.1	63	1.00E-24	55/86
MCOR0121S	343	1	P	CM	Glycogen phosphorylase, muscle form	X	sp Q9WUB3 PYGM_MOUSE	87	1.00E-53	100/114
MCOR0122S	429	1	P	UF	similar to Pim1 protein	X	>ref XP_690996.1	41	3.00E-19	54/131
MCOR0123S	444	1		NH	no hit					
MCOR0124S	465	1	FP	CT	eukaryotic translation initiation factor	X	>dbj BAD92756.1	83	6.00E-70	126/151
MCOR0125S	231	1	FP	CE	NEDD4 family-interacting protein	X	sp Q6GLN5 NFIP1_XENLA	67	5.00E-07	27/40
MCOR0126S	333	1		NH	no hit					
MCOR0127S	182	1	FP	MT	similar to ATPase inhibitor	X	>ref XP_691054.1	82	1.00E-09	28/34
MCOR0128S	507	1	FF	CT	40S ribosomal protein S18	X	sp P62269 RS18_HUMAN	100	4.00E-82	152/152
MCOR0129S	413	1	P	CT	eukaryotic translation elongation factor	X	>ref NP_001027570.1	99	6.00E-51	100/101
MCOR0130S	340	1		NH	no hit					
MCOR0131S	413	1	P	CT	elongation factor-1 alpha	X	>dbj BAD74118.1	98	2.00E-72	135/137
MCOR0132S	418	1		NH	no hit					
MCOR0133S	515	1	P	CT	similar to 60S ribosomal protein	X	>ref NP_001006241.1	93	5.00E-93	160/171
MCOR0134S	460	1	P	CP	Valosin-containing protein	X	>gb AAH07562.2	99	8.00E-80	151/152
MCOR0135S	382	1	P	CT	Transcription elongation factor A	X	sp O75764 TCEA3_HUMAN	65	4.00E-30	57/87
MCOR0136S	480	1	P	CD	autocrine motility factor receptor	X	sp Q9UKV5 AMFR2_HUMAN	85	1.00E-76	136/160
MCOR0137S	525	1	P	OF	Coatomer subunit alpha	X	>gb AAH75251.1	90	5.00E-34	65/72
MCOR0138S	492	1	P	CD	Ubiquitin-activating enzyme	X	>sp P31253 UBE1X_MOUSE	41	4.00E-28	62/150
MCOR0139S	417	1	P	CD	procollagen (type III) N-endopeptidase	X	>ref NP_001020611.1	90	9.00E-36	79/87
MCOR0140S	503	1	P	CP	Stress-induced-phosphoprotein 1	X	sp Q60864 STIP1_MOUSE	90	7.00E-83	145/161
MCOR0141S	501	1	P	UF	hypothetical protein XP_418405	X	>ref XP_418405.1	81	6.00E-67	117/144
MCOR0142S	445	1	P	DT	Bungarus flaviceps beta-bgt a2	N	>dbj AB112356.1	94	2.00E-15	55/58

CLUSTER	Tamanho (pb)	N° de Clones no Cluster	FULL	Categoria 1aria	PRODUTO	Blast	Accession N°	% ID	e-value	overlap
MCOR0143S	533	1	FF	CE	myosin alkali light chain	X	>gb AAA48979.1	97	2.00E-81	147/151
MCOR0144S	473	1		NH	no hit					
MCOR0145S	511	1	FP	CT	Eukaryotic translation initiation factor	X	sp Q9DBZ5 IF3C_MOUSE	89	4.00E-81	146/163
MCOR0146S	424	1	P	UF	similar to 9530046H09Rik protein	X	>ref XP_418182.1	86	2.00E-36	74/86
MCOR0147S	532	1	P	CP	xylosylprotein	X	>ref NP_001035000.1	77	4.00E-65	119/153
MCOR0148S	492	1		NH	no hit					
MCOR0149S	541	1	P	TN	Venom nerve growth factor 1	X	sp Q3HXY0 NGFV1_HOPST	93	6.00E-89	160/172
MCOR0150S	456	1	P	UF	Hypothetical protein MGC76288	X	>gb AAH61625.1	60	3.00E-41	89/146
MCOR0151S	501	1	FP	OF	CD2 antigen cytoplasmic tail-binding	X	sp Q95400 CD2B2_HUMAN	71	4.00E-54	100/140
MCOR0152S	498	1	P	TNtx	Alpha-neurotoxin homolog 8 precursor	X	sp P58370 NXAH8_MICCO	95	2.00E-39	71/74
MCOR0153S	484	1		NH	no hit					
MCOR0154S	360	1		NH	no hit					
MCOR0155S	418	1	P	OF	MHC class I protein	X	>gb AAA48519.1	50	1.00E-26	55/108
MCOR0156S	486	1	P	CM	glucose-6-phosphate dehydrogenase	X	>sp O55044 G6PD_CRIGR	77	2.00E-73	125/161
MCOR0157S	428	1	FP	OF	MHC class I protein	X	>gb AAA49389.1	76	2.00E-53	96/126
MCOR0158S	462	1	FF	CP	Signal recognition particle 19 kDa protein	X	sp Q5RBR1 SRP19_PONPY	80	9.00E-62	113/140
MCOR0159S	508	1	P	UF	Protein C20orf116 precursor	X	sp Q96HY6 CT116_HUMAN	75	2.00E-64	123/164
MCOR0160S	452	1	P	TS	Prostasin precursor	X	sp Q9ES87 PRSS8_RAT	53	4.00E-42	79/148
MCOR0161S	382	1	P	UF	similar to NG37 protein	X	>ref XP_849170.1	32	1.00E-10	40/125
MCOR0162S	475	1		NH	no hit					
MCOR0163S	398	1	P	CR	Intestinal alkaline phosphatase	X	>gb AAF36717.1	68	9.00E-39	82/120
MCOR0164S	332	1		CM	malate dehydrogenase 2, NAD					
MCOR0165S	377	1	P	CP	similar to SEC14-like protein 1	X	>ref XP_415614.1	94	1.00E-65	118/125
MCOR0166S	443	1	P	UF	hypothetical protein XP_845157	X	>ref XP_850250.1	68	3.00E-51	96/141

CLUSTER	Tamanho (pb)	N° de Clones no Cluster	FULL	Categoria 1aria	PRODUTO	Blast	Accession N°	% ID	e-value	overlap
MCOR0167S	429	1	P	OF	integral membrane glycoprotein	X	>gb AAA30859.1	45	2.00E-32	63/139
MCOR0168S	342	1	P	CE	similar to myosin, heavy polypeptide 7	X	>ref XP_546980.2	81	8.00E-46	91/112
MCOR0169S	164	1	P	OF	MHC class I protein	X	>gb AAA49389.1	78	5.00E-18	40/51
MCOR0170S	446	1	P	CM	similar to Probable cation-transporting	X	>ref XP_423767.1	80	1.00E-58	115/142
MCOR0171S	424	1	P	CP	similar to alpha-1,3-mannosyltransferase	X	>ref XP_859208.1	75	4.00E-33	63/83
MCOR0172S	473	1	P	RT	predicted CDS, reverse transcriptase	X	>ref XP_780819.1	47	2.00E-34	72/153
MCOR0173S	402	1	P	CT	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	X	>ref NP_001026424.1	78	3.00E-58	105/133
MCOR0174S	403	1	P	UF	similar to OCIA domain containing 1	X	>ref XP_707712.1	51	2.00E-24	59/115
MCOR0175S	370	1	P	CT	ribosomal protein S3	X	gb AAQ94564.1	96	1.00E-19	50/52
MCOR0176S	393	1	P	TNtx	Weak neurotoxin 10 precursor	X	sp Q802B2 TW10_NAJSP	41	4.00E-09	26/63
MCOR0177S	449	1	P	CR	similar to SH3 domain protein	X	>ref XP_534577.2	66	2.00E-55	105/158
MCOR0178S	471	1		NH	no hit					
MCOR0179S	359	1	P	UF	similar to hypothetical protein FLJ22662	X	>ref XP_416206.1	59	6.00E-37	71/119
MCOR0180S	377	1	P	CM	fructose-1,6-bisphosphate aldolase A	X	>gb AAA37210.2	88	8.00E-59	111/125
MCOR0181S	456	1	FF	CR	Fatty acid-binding protein, heart	X	sp P10790 FABPH_BOVIN	75	2.00E-52	98/129
MCOR0182S	383	1	P	OF	MHC class I protein	X	>gb AAA49389.1	74	3.00E-43	77/104
MCOR0183S	425	1	P	CR	StAR-related lipid transfer protein 7	X	sp Q8R1R3 STAR7_MOUSE	91	9.00E-71	125/136
MCOR0184S	392	1	P	CP	Protein transport protein Sec61	X	sp P38377 S61A1_CANFA	97	6.00E-64	123/126
MCOR0185S	426	1	P	OF	MHC class I protein	X	>gb AAA48518.1	58	2.00E-43	79/135
MCOR0186S	494	1	P	CE	similar to Tubulin alpha-6 chain	X	>ref XP_862226.1	98	2.00E-83	150/153
MCOR0187S	600	1	P	UF	hypothetical protein LOC394935	X	ref NP_989311.1	56	2.00E-50	104/184
MCOR0188S	205	1	P	CM	Ca2+-transporting ATPase	X	>gb AAY67989.1	95	1.00E-30	65/68
MCOR0189S	459	1	FP	CE	actin related protein 2/3	X	>ref NP_001025803.1	85	8.00E-64	108/126
MCOR0190S	457	1	P	MT	Cytochrome c oxidase subunit 1	X	sp O79548 COX1_DINSE	83	2.00E-40	89/106

CLUSTER	Tamanho (pb)	N° de Clones no Cluster	FULL	Categoria 1aria	PRODUTO	Blast	Accession N°	% ID	e-value	overlap
MCOR0191S	299	1	P	CT	elongation factor 2	X	>gb AAY33974.1	98	3.00E-43	85/86
MCOR0192S	556	1		NH	no hit					
MCOR0193S	391	1	FP	TB	natriuretic peptide	X	>gb AAC60341.1	88	1.00E-20	52/59
MCOR0194S	493	1	P	CR	bromodomain and PHD finger	X	>ref NP_001026635.1	95	5.00E-39	78/82
MCOR0195S	464	1	FP	TB	natriuretic peptide	X	>gb AAC60341.1	86	1.00E-24	57/66
MCOR0196S	493	1	FF	OF	galectin-1	X	gb AAT37622.1	51	1.00E-32	68/132
MCOR0197S	287	1	P	CT	eukaryotic translation inititation	X	>gb AAL54908.1	98	4.00E-48	94/95
MCOR0198S	472	1	FP	CP	Translocation-associated membrane	X	>ref NP_989731.1	85	5.00E-51	96/112
MCOR0199S	437	1	P	CT	Thyroid hormone receptor-associated	X	>ref XP_417769.1	80	2.00E-58	108/134
MCOR0200S	546	1	P	TA	L-amino acid oxidase precursor	X	>gb AAY89682.1	75	5.00E-20	47/62
MCOR0201S	435	1	P	CM	nicotinamide N-methyltransferase	X	sp P40261 NNMT_HUMAN	61	9.00E-44	81/131
MCOR0202S	224	1		NH	no hit					
MCOR0203S	474	1	FP	TL	C-type lectin-like protein 2	X	>gb AAK43585.1	77	6.00E-38	68/88
MCOR0204S	290	1	P	CE	putative collagen alpha-2 (XI) chain	X	>gb AAA67751.1	54	6.00E-16	42/77
MCOR0205S	426	1		NH	no hit					
MCOR0206S	559	1		NH	no hit					
MCOR0207S	490	1	FP	CT	Protein FAM50A (XAP-5 protein)	X	>ref XP_215220.3	88	1.00E-60	121/136
MCOR0208S	189	1	P	CR	serine/threonine kinase 19	X	>emb CAI41867.1	58	7.00E-10	29/50
MCOR0209S	528	1		NH	no hit					
MCOR0210S	565	1		NH	no hit					
MCOR0211S	579	1	P	CM	NADPH dependent diflavin oxidoreductase 1	X	>ref XP_415553.1	81	1.00E-74	129/158
MCOR0212S	522	1	P	CT	splicing factor 3B subunit 2	X	>gb AAH14125.2	97	E-101	170/174
MCOR0213S	374	1		NH	no hit					
MCOR0214S	560	1	P	CT	similar to initiation factor eIF-2Be	X	>ref XP_422755.1	68	5.00E-68	126/183

CLUSTER	Tamanho (pb)	N° de Clones no Cluster	FULL	Categoria 1aria	PRODUTO	Blast	Accession N°	% ID	e-value	overlap
MCOR0215S	552	1	FP	CM	ATP synthase, H+ transporting	X	ref NP_001011021.1	72	4.00E-51	97/155
MCOR0216S	570	1	P	CM	Dolichyl-diphosphooligosaccharide	X	>sp P48440 OST48_CHICK	93	2.00E-98	177/190
MCOR0217S	559	1	P	UF	LOC383103 protein	X	>ref NP_001013800.1	81	6.00E-75	132/162
MCOR0218S	572	1	FP	CD	Cysteine protease ATG4A	X	sp Q5ZIW7 ATG4A_CHICK	83	4.00E-93	156/187
MCOR0219S	609	1	P	UF	N-myc downstream-regulated gene 2	X	ref NP_001030381.1	87	5.00E-58	114/131
MCOR0220S	272	1	P	UF	similar to KIAA0265 protein	X	>ref XP_425257.1	67	7.00E-10	29/43
MCOR0221S	577	1	P	UF	similar to RIKEN cDNA 4921536I21	X	>ref XP_422374.1	63	5.00E-10	33/52
MCOR0222S	527	1	FP	UF	similar to COMM domain containing 7	X	>ref XP_852352.1	77	1.00E-65	127/164
MCOR0223S	515	1		NH	no hit					
MCOR0224S	551	1	P	CE	tropomyosin	X	>gb AAA49112.1	94	2.00E-88	173/183
MCOR0225S	509	1	P	CR	similar to programmed cell death	X	ref NP_001006815.1	84	5.00E-39	80/95
MCOR0226S	532	1	FF	OF	Lymphocyte antigen Ly-6E precursor	X	sp Q90986 LY6E_CHICK	56	8.00E-36	70/125
MCOR0227S	535	1	FP	CR	similar to death-associated protein 3	X	>ref XP_514436.1	40	7.00E-11	35/86
MCOR0228S	558	1	P	CM	NAD kinase	X	ref NP_001026041.1	91	1.00E-90	169/185
MCOR0229S	557	1	P	RT	predicted CDS, reverse transcriptase	X	>ref XP_780819.1	45	2.00E-21	45/98
MCOR0230S	458	1	P	CM	Succinate dehydrogenase [ubiquinone]	X	sp Q9CQA3 DHSB_MOUSE	88	1.00E-77	130/147
MCOR0231S	500	1	P	CD	similar to Xaa-Pro aminopeptidase 2	X	>ref XP_580998.2	60	2.00E-50	97/160
MCOR0232S	545	1	P	CD	Calpain small subunit 1	X	sp P04574 CPNS1_PIG	67	4.00E-64	122/180
MCOR0233S	490	1	FP	CP	Signal peptidase complex subunit 3	X	sp P28687 SPCS3_CHICK	91	1.00E-51	102/111
MCOR0234S	548	1	P	MT	NADH dehydrogenase subunit 5	X	>ref YP_313678.1	68	3.00E-61	127/186
MCOR0235S	486	1	P	CD	Ubiquinol-cytochrome c reductase core	X	gb AAI06253.1	64	1.00E-53	105/162
MCOR0236S	493	1	FP	CE	similar to microtubule-associated protein	X	ref XP_592416.2	96	1.00E-57	109/113
MCOR0237S	559	1		NH	no hit					
MCOR0238S	412	1	P	DT	Ohanin precursor, gene, complete cds	N	>gb DQ103590.1	87	1.00E-06	55/63

CLUSTER	Tamanho (pb)	N° de Clones no Cluster	FULL	Categoria 1aria	PRODUTO	Blast	Accession N°	% ID	e-value	overlap
MCOR0239S	527	1	FP	OF	Ferritin, higher subunit (Ferritin H)	X	>sp P07229 FRI1_RANCA	75	1.00E-47	88/116
MCOR0240S	554	1	P	OF	optic atrophy 1 (autosomal dominant)	X	ref NP_001034398.1	91	7.00E-99	168/184
MCOR0241S	545	1	P	CM	glucose regulated thiol oxidoreductase	X	>ref NP_989441.1	81	2.00E-86	148/181
MCOR0242S	520	1	FF	OF	MHC class I protein	X	>gb AAA49389.1	78	9.00E-66	114/146
MCOR0243S	511	1	P	OF	similar to zn-finger	X	>ref XP_782581.1	46	2.00E-36	77/167
MCOR0244S	536	1	FP	UF	similar to putative membrane protein	X	ref NP_001002575.1	96	6.00E-90	166/172
MCOR0245S	563	1		NH	no hit					
MCOR0246S	553	1	P	UF	hypothetical protein XP_787740	X	>ref XP_792833.1	46	3.00E-40	84/179
MCOR0247S	484	1	P	CM	glucose-fructose oxidoreductase	X	>ref NP_001028571.1	91	2.00E-53	98/107
MCOR0248S	540	1	P	DT	Bungarus candidus beta-neurotoxin	N	>gb AY425950.1	93	9.00E-15	57/61
MCOR0249S	423	1	FP	CM	NADH-ubiquinone oxidoreductase B18	X	sp Q02368 NB8M_BOVIN	68	6.00E-43	80/117
MCOR0250S	588	1	FP	UF	similar to transmembrane protein	X	>ref XP_415767.1	81	1.00E-79	148/182
MCOR0251S	591	1	P	CE	epithelial mucin	X	>gb AAB48542.1	40	1.00E-27	74/185
MCOR0252S	575	1	FF	CR	calglandulin-like protein	X	sp Q3SB15 CALGL_OXYSC	98	4.00E-84	153/156
MCOR0253S	301	1		NH	no hit					
MCOR0254S	373	1	P	CT	eukaryotic translation initiation factor	X	>dbj BAD92356.1	92	4.00E-58	114/123
MCOR0255S	165	1		NH	no hit					
MCOR0256S	475	1	P	CR	stromal cell derived factor 4	X	ref NP_001006302.1	93	2.00E-83	147/158
MCOR0257S	417	1		NH	no hit					
MCOR0258S	503	1	P	CR	CSNK2A1 protein	X	>gb AAH50036.1	97	1.00E-95	163/167
MCOR0259S	222	1	P	CT	Nuclease sensitive element-binding protein	X	>ref NP_989745.1	90	9.00E-34	63/70
MCOR0260S	169	1		NH	no hit					
MCOR0261S	408	1	FP	CT	ribosomal protein L11	X	>emb CAH71474.1	99	3.00E-72	134/135
MCOR0262S	228	1	P	CP	transporter associated with antigen	X	>gb AAP36717.1	60	4.00E-13	38/63

CLUSTER	Tamanho (pb)	N° de Clones no Cluster	FULL	Categoria 1aria	PRODUTO	Blast	Accession N°	% ID	e-value	overlap
MCOR0263S	506	1	P	TA	L-amino acid oxidase precursor	X	>gb AAV89681.1	81	7.00E-76	137/168
MCOR0264S	506	1	P	CD	procollagen (type III) N-endopeptidase	X	>ref NP_001020611.1	96	1.00E-59	122/126
MCOR0265S	517	1	FP	CR	regulator of G-protein signaling protein GAIP	X	>ref NP_989560.1	86	8.00E-75	130/151
MCOR0266S	565	1		NH	no hit					
MCOR0267S	246	1	FP	UF	hypothetical protein XP_420745	X	>ref XP_420745.1	93	1.00E-20	45/48
MCOR0268S	523	1		NH	no hit					
MCOR0269S	197	1	P	CD	midgut aminopeptidase N2	X	>gb AAQ24379.1	52	1.00E-07	31/59
MCOR0270S	462	1	P	RN	Putative rRNA methyltransferase 3	X	>sp Q5ZKM1 RRMJ3_CHICK	85	2.00E-67	127/148
MCOR0271S	513	1	P	OF	MHC class I protein	X	>gb AAA48519.1	58	4.00E-45	85/146
MCOR0272S	467	1	P	CE	similar to Mucin 5B precursor	X	>ref XP_421033.1	43	1.00E-28	62/141
MCOR0273S	387	1	FP	TL	C-type lectin-like protein 2	X	>gb AAK43585.1	70	6.00E-48	85/121
MCOR0274S	363	1		NH	no hit					
MCOR0275S	400	1		NH	no hit					
MCOR0276S	560	1	FP	UF	Transmembrane emp24 domain	X	>sp Q9BVK6 TMED9_HUMAN	90	9.00E-94	165/183
MCOR0277S	440	1	P	CE	similar to Filamin A	X	>ref XP_538205.2	72	2.00E-31	62/85
MCOR0278S	522	1	P	CT	Dr1-associated corepressor	X	sp Q9D6N5 DRAP1_MOUSE	67	9.00E-53	109/161
MCOR0279S	479	1	P	CE	Ficolin-1 precursor	X	>ref NP_001005799.1	44	6.00E-25	69/154
MCOR0280S	453	1	P	CR	similar to Thioredoxin-like protein 2	X	>ref XP_421826.1	81	3.00E-60	113/138
MCOR0281S	398	1		NH	no hit					
MCOR0282S	304	1	P	OF	coatomer protein complex	X	>ref NP_001006339.1	83	1.00E-39	83/100
MCOR0283S	252	1	P	UF	similar to CG17660-PA isoform 4	X	>ref XP_707885.1	72	4.00E-28	58/80
MCOR0284S	487	1		NH	no hit					
MCOR0285S	293	1	P	VT	Escherichia coli K-12 MG1655		>gb AE000176.1 AE000176	99	E-162	290/291
MCOR0286S	420	1	P	UF	MGC89502 protein	X	ref NP_001008127.1	95	3.00E-35	76/80

CLUSTER	Tamanho (pb)	N° de Clones no Cluster	FULL	Categoria 1aria	PRODUTO	Blast	Accession N°	% ID	e-value	overlap
MCOR0287S	433	1	P	RT	predicted CDS, reverse transcriptase	X	>ref XP_781181.1	63	9.00E-07	21/33
MCOR0288S	427	1	P	CD	Proteasome activator complex	X	sp Q4U5R3 PSME1_BOVIN	56	2.00E-38	79/139
MCOR0289S	456	1	P	CR	similar to FGF intracellular binding	X	>ref XP_533228.2	85	6.00E-67	124/145
MCOR0290S	358	1	P	DT	pla2 gene for phospholipase A2	N	dbj AB111959.1	89	1.00E-09	57/64
MCOR0291S	449	1	P	UF	similar to hypothetical protein FLJ10081	X	>ref XP_424221.1	54	5.00E-18	54/100
MCOR0292S	471	1	P	TL	C-type lectin-like protein 2	X	>gb AAK43585.1	43	5.00E-29	64/148
MCOR0293S	513	1	P	CE	Junctional adhesion molecule A precursor	X	sp Q9Y624 JAM1_HUMAN	46	2.00E-30	71/154
MCOR0294S	508	1	FP	CT	Mitochondrial ribosomal protein L16	X	ref NP_060310.1	55	2.00E-36	74/133
MCOR0295S	507	1	FP	UF	MGC85236 protein	X	>gb AAH78477.1	84	8.00E-40	79/94
MCOR0296S	562	1	P	MT	Uqcrc2-prov protein	X	>gb AAH42931.1	72	1.00E-71	131/181
MCOR0297S	501	1		NH	no hit					
MCOR0298S	474	1	P	CE	similar to beta-1 syntrophin	X	ref NP_001005798.1	87	1.00E-74	137/157
MCOR0299S	252	1		NH	no hit					
MCOR0300S	501	1	P	OF	similar to vesicle-associated membrane	X	>ref XP_581657.1	86	1.00E-39	78/90
MCOR0301S	456	1	FP	CT	eukaryotic translation initiation factor	X	ref NP_001013113.1	80	8.00E-64	120/150
MCOR0302S	525	1	P	OF	Pulmonary surfactant-associated protein	X	sp P35248 SFTPD_RAT	41	5.00E-30	66/160
MCOR0303S	384	1	P	CE	NAD-dependent deacetylase sirtuin-2	X	sp Q8VDQ8 SIRT2_MOUSE	65	1.00E-21	49/75
MCOR0304S	544	1	P	CR	similar to ATP-binding cassette	X	>ref XP_539916.2	65	2.00E-60	119/181
MCOR0305S	544	1	P	UF	similar to Reticulocalbin-2 precursor	X	>ref XP_544790.2	76	2.00E-79	138/180
MCOR0306S	468	1	P	CT	similar to ribosomal protein S27	X	>ref XP_509802.1	95	1.00E-42	81/85
MCOR0307S	573	1	P	DT	mtlp gene for muscarinic toxin-like protein	N	>emb AJ421675.1 BMU421675	89	E-137	380/423
MCOR0308S	569	1	P	CT	UPF2 regulator of nonsense transcripts	X	>ref XP_507656.1	73	2.00E-52	105/142
MCOR0309S	562	1	P	UF	Hypothetical protein LOC23065	X	>gb AAM88856.1	100	1.00E-13	39/39
MCOR0310S	579	1	P	UF	similar to FLJ20254 protein	X	>ref XP_426216.1	47	2.00E-47	84/176

CLUSTER	Tamanho (pb)	N° de Clones no Cluster	FULL	Categoria 1aria	PRODUTO	Blast	Accession N°	% ID	e-value	overlap
MCOR0311S	357	1	P	UF	Nucleolar complex protein 4 homolog	X	sp Q5ZJC7 NOC4L_CHICK	63	4.00E-25	54/85
MCOR0312S	446	1	FP	TL	C-type lectin-like protein 2	X	>gb AAK43585.1	72	6.00E-56	96/132
MCOR0313S	555	1	P	CR	CMIP protein / c-Maf-inducing protein	X	>ref XP_423491.1	94	4.00E-95	168/178
MCOR0314S	527	1		DT	Ohanin precursor	N	>gb DQ103590.1	88	3.00E-36	132/149
MCOR0315S	554	1	FP	CM	Guanidinoacetate N-methyltransferase	X	>sp Q71N41 GAMT_BRARE	77	3.00E-46	84/108
MCOR0316S	560	1	P	CM	methylcrotonoyl-Coenzyme A carboxylase	X	>ref NP_998092.1	80	2.00E-71	131/162
MCOR0317S	546	1	P	UF	similar to CG10189-PA isoform 3	X	>ref XP_850047.1	70	1.00E-54	103/146
MCOR0318S	575	1	P	UF	similar to B-cell lymphoma 9 protein	N	>ref XM_429583.1	91	2.00E-96	258/283
MCOR0319S	554	1	FP	OF	MHC class II antigen	X	>gb AAQ06509.1	45	4.00E-33	75/166
MCOR0320S	513	1	FF	UF	hypothetical protein XP_420228	X	>ref XP_420228.1	93	1.00E-65	125/133
MCOR0321S	530	1	P	CR	v-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene	X	>ref NP_001014964.1	86	9.00E-53	99/115
MCOR0322S	538	1	P	CE	paxillin	X	>ref NP_002850.1	99	3.00E-95	151/152
MCOR0323S	557	1	FP	CE	zinc finger protein 184 (Kruppel-like)	X	>ref NP_001025866.1	61	5.00E-09	30/49
MCOR0324S	570	1	P	OF	MHC class I protein	X	gb AAA48519.1	56	5.00E-51	92/163
MCOR0325S	532	1	P	UF	Josephin-2 (Josephin domain containing 2)	X	sp Q9CR30 JOS2_MOUSE	78	2.00E-57	104/132
MCOR0326S	564	1	P	OF	centromere protein ZW10 / kinetochore	X	>dbj BAB39105.1	61	2.00E-58	116/188
MCOR0327S	378	1	P	CT	40S ribosomal protein S3	X	>gb AAT01919.1	83	2.00E-25	60/72
MCOR0328S	472	1	FP	UF	CLE7 protein	X	>ref NP_990700.1	63	5.00E-34	71/111
MCOR0329S	559	1	P	CM	Pyruvate kinase muscle isozyme	X	sp P00548 KPYK_CHICK	89	1.00E-47	91/102
MCOR0330S	538	1	P	OF	TNF receptor-associated protein	X	>ref NP_001006175.1	78	2.00E-79	136/174
MCOR0331S	518	1		NH	no hit					
MCOR0332S	567	1		NH	no hit					
MCOR0333S	525	1	P	CT	similar to 60S ribosomal protein L3-like	X	>ref XP_414843.1	84	5.00E-35	71/84
MCOR0334S	402	1		NH	no hit					

CLUSTER	Tamanho (pb)	N° de Clones no Cluster	FULL	Categoria 1aria	PRODUTO	Blast	Accession N°	% ID	e-value	overlap
MCOR0335S	548	1	P	CR	ATP-binding cassette, sub-family F	X	>dbj BAD92801.1	93	4.00E-93	171/182
MCOR0336S	489	1	P	UF	Hypothetical protein LOC431674	X	>gb AAH67964.1	73	7.00E-66	118/161
MCOR0337S	525	1	P	CT	eukaryotic translation initiation factor	X	>ref XP_939382.1	92	1.00E-81	152/165
MCOR0338S	517	1	P	CR	erthyrocyte band 7 integral membrane	X	ref NP_001011965.1	92	7.00E-33	75/81
MCOR0339S	563	1	FP	CM	inosine monophosphate dehydrogenase	X	>ref NP_001025772.1	92	2.00E-93	166/179
MCOR0340S	368	1	P	UF	microsatellite MV4008 sequence	N	>gb AF236360.1	95	8.00E-08	39/41
MCOR0341S	578	1	P	CT	muscle, intestine and stomach expression	X	>ref XP_425228.1	65	2.00E-43	95/144
MCOR0342S	568	1	P	RT	reverse transcriptase-like protein	X	>gb AAN15747.1	42	1.00E-34	82/192
MCOR0343S	578	1	P	CT	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 16	X	ref NP_956318.1	93	E-100	180/192
MCOR0344S	521	1		NH	no hit					
MCOR0345S	580	1	P	CP	Sec61 alpha 1 subunit	X	emb CAJ82441.1	98	1.00E-68	132/134
MCOR0346S	555	1		NH	no hit					
MCOR0347S	534	1	FP	TL	C-type lectin-like protein 2	X	>gb AAK43585.1	63	1.00E-41	78/123
MCOR0348S	595	1	P	CM	ATP synthase, H+ transporting	X	>gb AAH11384.1	99	E-105	196/197
MCOR0349S	503	1	FF	UF	hypothetical protein LOC428592	X	>ref NP_001026695.1	89	2.00E-51	95/106
MCOR0350S	529	1	P	CT	splicing factor, arginine/serine-rich 2	N	>ref NM_001034118.1	98	6.00E-59	125/127
MCOR0351S	244	1	P	CD	ubiquitin	X	>gb AAV84266.1	100	4.00E-38	80/80
MCOR0352S	545	1	FP	CR	Chloride intracellular channel protein	X	emb CAI18421.1	90	5.00E-78	142/157
MCOR0353S	436	1	P	CM	similar to alcohol dehydrogenase ADH-F	X	>ref XP_420658.1	77	1.00E-62	110/142
MCOR0354S	534	1	P	OF	Craniofacial development protein 1	X	sp Q75QI0 CFDP1_CHICK	50	3.00E-34	86/172
MCOR0355S	544	1	P	CP	similar to Protein disulfide isomerase	X	>ref XP_419952.1	89	7.00E-77	140/157
MCOR0356S	538	1	P	UF	LOC51136 protein	X	>gb AAH88365.1	67	2.00E-56	97/144
MCOR0357S	580	1	P	CR	similar to Component of oligomeric golgi	X	>ref XP_239373.3	54	2.00E-55	107/195
MCOR0358S	538	1	P	CR	Mitogen-activated protein kinase 3	X	ref NP_958915.1	94	1.00E-95	165/175

CLUSTER	Tamanho (pb)	N° de Clones no Cluster	FULL	Categoria 1aria	PRODUTO	Blast	Accession N°	% ID	e-value	overlap
MCOR0359S	465	1		NH	no hit					
MCOR0360S	525	1		NH	no hit					
MCOR0361S	536	1	P	CP	vacuolar protein sorting homolog h-vps45	X	>gb AAC50931.1	80	1.00E-65	122/151
MCOR0362S	195	1	P	OF	Annexin A2 (Annexin II) (Lipocortin II)	X	sp P17785 ANXA2_CHICK	85	4.00E-24	55/64
MCOR0363S	544	1	P	CR	[3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase	X	>gb AAH04077.1	92	2.00E-95	168/181
MCOR0364S	533	1		NH	no hit					
MCOR0365S	480	1	P	CT	mitochondrial ribosomal protein L51	X	ref NP_001008675.1	72	3.00E-40	72/99
MCOR0366S	470	1	P	DT	mRNA for protease A, complete cds	N	>dbj AB031394.1	90	5.00E-13	67/74
MCOR0367S	559	1	P	CT	Eukaryotic translation initiation factor 5A	X	>sp P10160 IF5A_RABIT	99	8.00E-53	103/104
MCOR0368S	435	1		NH	no hit					
MCOR0369S	546	1	P	OF	similar to peptidylglycine alpha-amidating	X	>ref XP_424857.1	82	5.00E-86	147/178
MCOR0370S	475	1	FF	UF	similar to RIKEN cDNA 0610009E20	X	>ref XP_415849.1	95	2.00E-54	105/110
MCOR0371S	496	1	P	CT	Eukaryotic translation initiation factor 3	X	>emb CAG33415.1	98	9.00E-91	163/165
MCOR0372S	532	1	FP	CP	similar to TRAP-complex gamma subunit	X	>ref XP_422829.1	93	2.00E-88	166/177
MCOR0373S	562	1	P	MT	similar to cytochrome c oxidase subunit	X	>ref XP_419450.1	63	7.00E-36	76/120
MCOR0374S	488	1	P	CM	ATPase, H+ transporting, lysosomal	X	ref NP_001017064.1	93	7.00E-08	30/32
MCOR0375S	304	1		NH	no hit					
MCOR0376S	539	1	P	CE	similar to Filamin A (Alpha-filamin)	X	>ref XP_538205.2	74	7.00E-58	106/143
MCOR0377S	380	1	P	CM	Glycogen phosphorylase, muscle form	X	sp P11217 PYGM_HUMAN	82	8.00E-61	109/132
MCOR0378S	533	1	FP	CM	Fructose-1,6-bisphosphatase 1	X	>ref XP_425040.1	87	2.00E-68	130/148
MCOR0379S	443	1	P	CE	actin related protein 2/3 complex	X	ref NP_998321.1	92	3.00E-57	100/108
MCOR0380S	451	1	FP	UF	DCN1-like protein 4	X	>sp Q92564 DCNL4_HUMAN	87	6.00E-61	109/125
MCOR0381S	340	1	P	CT	similar to 40S ribosomal protein S4	X	>gb AAH07308.2	83	2.00E-47	94/112
MCOR0382S	296	1	P	TP	phospholipase A2	X	>gb AAN60018.1	100	2.00E-37	68/68

CLUSTER	Tamanho (pb)	N° de Clones no Cluster	FULL	Categoria 1aria	PRODUTO	Blast	Accession N°	% ID	e-value	overlap
MCOR0383S	536	1	FF	CD	Chain A, Solution Structure Of Mouse	X	pdb 1J0G A	95	2.00E-38	80/84
MCOR0384S	522	1		NH	no hit					
MCOR0385S	545	1	P	CE	cytoplasmic actin type 5	X	>gb AAQ18433.1	100	3.00E-63	118/118
MCOR0386S	537	1		NH	no hit					
MCOR0387S	535	1	FF	OF	chemokine / interleukin-8 variant 3	X	>gb AAQ01586.1	29	9.00E-06	26/88
MCOR0388S	409	1		NH	no hit					
MCOR0389S	464	1	P	CP	vacuolar protein sorting 45A variant	X	>dbj BAD96934.1	92	7.00E-76	142/153
MCOR0390S	485	1		NH	no hit					
MCOR0391S	424	1	P	CR	guanine nucleotide binding proteinrotein	X	>ref XP_518165.1	98	1.00E-62	117/119
MCOR0392S	383	1	P	CM	fumarylacetoacetate hydrolase domain	X	>emb CAJ81463.1	68	1.00E-40	83/122
MCOR0393S	530	1	FP	CM	Adenylate kinase isoenzyme 1	X	sp P05081 KAD1_CHICK	91	2.00E-78	148/162
MCOR0394S	421	1	P	CM	Fructose 1,6-Bisphosphate Aldolase	X	pdb 1EWD A	86	9.00E-60	115/133
MCOR0395S	378	1	P	CP	chaperone for superoxide dismutase	X	sp Q9WU84 CCS_MOUSE	60	5.00E-37	76/125
MCOR0396S	359	1	P	UF	Hypothetical protein CBG02169	X	>emb CAE58912.1	81	2.00E-23	49/60
MCOR0397S	409	1	P	UF	putative Ariadne-like ubiquitin ligase PAUL	X	>gb AAQ55547.1	81	6.00E-64	103/126
MCOR0398S	499	1		NH	no hit					
MCOR0399S	473	1		NH	no hit					
MCOR0400S	374	1	FP	CE	alpha actin	X	>gb AAU25922.1	91	5.00E-31	64/70
MCOR0401S	349	1		NH	no hit					
MCOR0402S	525	1		NH	no hit					
MCOR0403S	192	1	P	CD	membrane-bound aminopeptidase P	X	>gb AAK52065.1	85	1.00E-25	51/60
MCOR0404S	504	1	P	TP	phospholipase A2	X	>gb AAN60018.1	76	1.00E-68	127/167
MCOR0405S	401	1	P	CR	N-acetylglucosamine kinase	X	ref NP_001032857.1	72	9.00E-47	87/120
MCOR0406S	428	1	P	CR	ADP-ribosylhydrolase like 2	X	>ref NP_001006312.1	78	2.00E-56	110/140

CLUSTER	Tamanho (pb)	N° de Clones no Cluster	FULL	Categoria 1aria	PRODUTO	Blast	Accession N°	% ID	e-value	overlap
MCOR0407S	188	1	P	CT	similar to ribosomal protein S27 isoform 2	X	>ref XP_886008.1	95	2.00E-20	45/47
MCOR0408S	423	1	P	CP	Sec61a1-prov protein	X	>gb AAH45117.1	92	1.00E-68	128/138
MCOR0409S	424	1	P	CT	40S ribosomal protein S27	X	sp P47904 RS27_XENLA	85	2.00E-32	64/75
MCOR0410S	467	1	FP	CP	similar to Metaxin 2	X	ref XP_421989.1	89	3.00E-70	132/148
MCOR0411S	397	1	P	CT	eukaryotic translation elongation factor	X	>gb AAV66397.1	89	6.00E-59	114/128
MCOR0412S	254	1	P	CT	60S ribosomal protein L3	X	gb AAH09655.1	21	3.00E-38	76/83
MCOR0413S	184	1		NH	no hit					
MCOR0414S	386	1	FP	CR	similar to S100 calcium binding protein	X	ref XP_547580.1	59	1.00E-21	57/96
MCOR0415S	487	1	P	OF	solute carrier family 26, member 11	X	>ref NP_001014866.1	77	3.00E-63	125/162
MCOR0416S	497	1	FF	CT	40S ribosomal protein S14	X	sp P62263 RS14_HUMAN	99	2.00E-79	148/149
MCOR0417S	508	1	P	CR	similar to Diablo homolog, mitochondrial	X	>ref XP_415152.1	82	5.00E-66	130/157
MCOR0418S	322	1	P	CD	poly-ubiquitin precursor	X	>gb AAA31133.1	100	7.00E-39	81/81
MCOR0419S	494	1	P	CE	putative collagen alpha-2 (XI) chain	X	>gb AAA67751.1	50	1.00E-31	66/130
MCOR0420S	525	1		NH	no hit					
MCOR0421S	540	1		NH	no hit					
MCOR0422S	500	1	P	CE	Keratin, type I cytoskeletal 19	X	sp O93256 K1C19_CHICK	85	2.00E-74	142/166
MCOR0423S	426	1	FP	CR	similar to recombination protein REC14	X	>ref XP_413745.1	90	2.00E-66	117/129
MCOR0424S	469	1	P	CM	muscle phosphofructokinase	X	>ref NP_989554.1	84	5.00E-59	105/124
MCOR0425S	526	1	P	OF	Annexin A2 (Annexin II) (Lipocortin II)	X	sp P17785 ANXA2_CHICK	94	2.00E-86	156/165
MCOR0426S	319	1		NH	no hit					
MCOR0427S	542	1	P	OF	inosine monophosphate dehydrogenase	X	>ref NP_001025772.1	97	1.00E-95	176/180
MCOR0428S	159	1	P	OF	similar to isoprenoid acid acyltransferase	X	>ref XP_415422.1	78	1.00E-18	41/52
MCOR0429S	424	1	P	CT	similar to Transcription factor BTF3	X	>ref XP_423823.1	95	3.00E-66	133/139
MCOR0430S	428	1	P	OF	nicastrin	X	>gb AAR25612.1	62	2.00E-44	92/147

CLUSTER	Tamanho (pb)	N° de Clones no Cluster	FULL	Categoria 1aria	PRODUTO	Blast	Accession N°	% ID	e-value	overlap
MCOR0431S	553	1	FP	CT	similar to RD RNA-binding protein isoform	X	ref XP_591872.2	70	9.00E-52	111/157
MCOR0432S	562	1	P	CT	Sf3b3 protein / Splicing factor 3b, subunit 3	X	>gb AAH31197.2	100	3.00E-75	137/137
MCOR0433S	420	1	P	CE	similar to protocadherin 17; protocadherin	X	>ref XP_417021.1	94	7.00E-76	132/139
MCOR0434S	518	1	FP	CT	SWI/SNF related, matrix associated	X	sp Q5ZK40 SNF5_CHICK	96	1.00E-93	165/171
MCOR0435S	532	1	FP	OF	similar to B-cell receptor-associated protein	X	>ref XP_538200.1	79	5.00E-73	140/177
MCOR0436S	508	1	P	RT	similar to reverse transcriptase like family	X	>ref XP_783162.1	38	1.00E-14	43/112
MCOR0437S	559	1	P	CT	eukaryotic translation inititation factor 4B	X	>gb AAL54908.1	98	e-101	180/183
MCOR0438S	370	1	FF	CT	60S ribosomal protein L39	X	sp Q98TF5 RL39_CHICK	100	2.00E-23	51/51
MCOR0439S	478	1	FP	CR	Calgizzarin	X	sp P24479 S10AB_CHICK	85	9.00E-37	76/89
MCOR0440S	533	1	P	OF	similar to nuclease sensitive element	X	>ref XP_848660.1	84	7.00E-10	32/38
MCOR0441S	495	1	FF	CT	similar to ribosomal protein S24	X	ref XP_864468.1	96	7.00E-67	125/130
MCOR0442S	521	1	P	CM	Phosphoglycerate mutase 2	X	sp P15259 PGAM2_HUMAN	83	6.00E-78	141/168
MCOR0443S	482	1	P	DT	Snake BP-II gene for phospholipase A2	N	dbj D13384.1 TFLPLABPII	89	4.00E-26	97/108
MCOR0444S	408	1	FF	TNtx	Alpha-neurotoxin homolog 7 precursor	X	sp Q9PRI1 NXAH7_MICCO	85	8.00E-35	67/78
MCOR0445S	433	1	P	TNtx	alpha neurotoxin homolog 3 (NXH3)	N	>gb AF197564.1 AF197564	92	e-121	398/432
MCOR0446S	452	1		NH	no hit					
MCOR0447S	153	1		NH	no hit					
MCOR0448S	473	1	FF	CT	similar to 60S acidic ribosomal protein	X	>ref XP_424134.1	93	5.00E-52	107/115
MCOR0449S	544	1	FF	OF	Parvalbumin beta	X	>sp P02615 PRVB_BOACO	87	4.00E-47	95/108
MCOR0450S	386	1	P	CD	26S proteasome subunit	X	dbj BAD93292.1	87	1.00E-23	54/62
MCOR0451S	493	1	P	DT	Ohanin precursor, gene	N	>gb DQ103590.1	91	8.00E-49	141/154
MCOR0452S	388	1	P	OF	Copz1 protein / similar to Coatomer	X	>gb AAH25041.1	91	3.00E-56	109/119
MCOR0453S	493	1	P	DT	Ohanin precursor, gene, complete cds	N	>gb DQ103590.1	93	5.00E-07	41/44
MCOR0454S	361	1	P	TNtx	mRNA for short chain neurotoxin	N	>dbj AB017945.1	98	4.00E-56	120/122

CLUSTER	Tamanho (pb)	N° de Clones no Cluster	FULL	Categoria 1aria	PRODUTO	Blast	Accession N°	% ID	e-value	overlap
MCOR0455S	322	1	P	TNtx	Alpha-neurotoxin homolog 7 precursor	X	sp Q9PRI1 NXAH7_MICCO	100	1.00E-23	49/49
MCOR0456S	387	1	P	CT	ribosomal protein L14	X	gb AAL54903.1	78	2.00E-35	81/103
MCOR0457S	366	1	P	CE	similar to Alpha-tectorin precursor	X	>ref XP_546475.2	42	3.00E-19	47/111
MCOR0458S	550	1	P	CT	elongation factor RNA polymerase II	X	ref NP_001012865.1	77	1.00E-68	133/172
MCOR0459S	577	1		NH	no hit					
MCOR0460S	262	1	P	MT	cytochrome oxidase subunit 3	X	ref YP_313713.1	83	9.00E-26	59/71
MCOR0461S	587	1	FP	CE	zinc finger protein 593	X	>ref NP_001006307.1	79	2.00E-54	102/128
MCOR0462S	177	1	P	TNtx	muscarinic toxin precursor	X	gb ABB83639.1	58	3.00E-06	27/46
MCOR0463S	534	1	P	CD	Proteasome (prosome, macropain) 26S	X	>gb AAH73165.1	96	5.00E-67	128/133
MCOR0464S	380	1	P	TNtx	muscarinic toxin precursor	X	>gb ABB83639.1	43	3.00E-09	32/74
MCOR0465S	458	1	P	UF	unnamed protein product	X	>dbj BAB70838.1	60	1.00E-06	25/41
MCOR0466S	334	1	P	CT	similar to 60S ribosomal protein L8	X	>ref XP_416772.1	95	5.00E-55	105/110
MCOR0467S	366	1	FP	TP	phospholipase A2	X	>gb AAN60018.1	85	5.00E-56	101/118
MCOR0468S	542	1	P	RT	predicted CDS, reverse transcriptase	X	>ref XP_780819.1	45	3.00E-10	45/98
MCOR0469S	522	1		NH	no hit					
MCOR0470S	431	1	FF	TNtx	Alpha-neurotoxin homolog 7 precursor	X	sp Q9PRI1 NXAH7_MICCO	97	8.00E-40	76/78
MCOR0471S	545	1	P	CR	interferon, gamma-inducible protein 30	X	>ref NP_001017196.1	58	6.00E-58	106/180
MCOR0472S	343	1		NH	no hit					
MCOR0473S	534	1	FF	CT	ribosomal protein S10	X	sp P46783 RS10_HUMAN	98	6.00E-90	159/161
MCOR0474S	554	1	P	CD	similar to Microsomal signal peptidase	X	ref XP_417247.1	90	2.00E-93	166/183
MCOR0475S	334	1	P	UF	hypothetical protein XP_498725	X	ref XP_498725.2	65	6.00E-19	47/72
MCOR0476S	428	1	FF	TNtx	Alpha-neurotoxin homolog 7 precursor	X	sp Q9PRI1 NXAH7_MICCO	100	4.00E-41	78/78
MCOR0477S	578	1		NH	no hit					
MCOR0478S	463	1	P	CT	similar to endothelial differentiation	X	>ref XP_537793.2	85	4.00E-65	126/147

CLUSTER	Tamanho (pb)	N° de Clones no Cluster	FULL	Categoria 1aria	PRODUTO	Blast	Accession N°	% ID	e-value	overlap
MCOR0479S	449	1	P	TNtx	muscarinic toxin precursor	X	>gb ABB83639.1	46	2.00E-11	36/77
MCOR0480S	345	1	P	DT	b1 gene for beta-bungarotoxin B1 chain	N	>emb AJ251223.1 BMU251223	88	4.00E-25	101/114
MCOR0481S	555	1	FF	CE	apolipoprotein B mRNA editing enzyme	X	>ref NP_001026732.1	98	4.00E-78	148/151
MCOR0482S	409	1	FF	TNtx	Alpha-neurotoxin homolog 7 precursor	X	sp Q9PRI1 NXAH7_MICCO	98	5.00E-40	76/77
MCOR0483S	417	1	FF	TNtx	Alpha-neurotoxin homolog 7 precursor	X	sp Q9PRI1 NXAH7_MICCO	100	2.00E-40	77/77
MCOR0484S	512	1	FF	CT	ribosomal protein L27a	X	ref NP_036105.2	86	1.00E-79	139/148
MCOR0485S	400	1	P	OF	nuclease sensitive element binding	X	>ref NP_989745.1	85	2.00E-26	57/67
MCOR0486S	409	1	P	TNtx	Alpha-neurotoxin homolog 8 precursor	X	sp P58370 NXAH8_MICCO	93	1.00E-30	58/62
MCOR0487S	437	1	FP	CT	60S ribosomal protein L13a	X	gb AAZ38985.1	95	1.00E-74	138/144
MCOR0488S	349	1	P	TNtx	Alpha-neurotoxin homolog 7 precursor	X	sp Q9PRI1 NXAH7_MICCO	100	2.00E-30	59/59
MCOR0489S	476	1		NH	no hit					
MCOR0490S	409	1	P	TNtx	Alpha-neurotoxin homolog 7 precursor	X	sp Q9PRI1 NXAH7_MICCO	94	6.00E-27	53/56
MCOR0491S	419	1	P	TP	phospholipase A2	X	>gb AAN60018.1	92	1.00E-42	77/83
MCOR0492S	409	1	FF	CT	60S ribosomal protein L41	X	sp P62945 RL41_HUMAN	100	2.00E-06	25/25
MCOR0493S	449	1	FF	CT	60S ribosomal protein L30	X	sp P67884 RL30_OPHHA	97	7.00E-58	112/115
MCOR0494S	493	1	P	TP	phospholipase A2	X	>gb AAN60018.1	96	2.00E-32	62/64
MCOR0495S	444	1	P	TP	phospholipase A2	X	>gb AAN60018.1	95	3.00E-68	116/121
MCOR0496S	493	1	FF	TNtx	Alpha-neurotoxin homolog 8 precursor	X	sp P58370 NXAH8_MICCO	95	1.00E-44	82/86
MCOR0497S	382	1	FF	TNtx	Alpha-neurotoxin homolog 8 precursor	X	sp P58370 NXAH8_MICCO	92	1.00E-42	79/85
MCOR0498S	380	1	P	TNtx	isolate ctx23 cardiotoxin precursor	N	>gb DQ273581.1	89	2.00E-52	172/192
MCOR0499S	537	1	FP	CT	ribosomal protein L7	X	>ref NP_001006345.1	88	6.00E-84	155/176
MCOR0500S	518	1		NH	no hit					
MCOR0501S	287	1	P	UF	similar to apoA-I binding protein	X	>ref XP_424208.1	74	7.00E-36	71/95
MCOR0502S	301	1	P	CT	similar to ubiquitin and ribosomal	X	gb AAI02492.1	90	5.00E-39	83/92

CLUSTER	Tamanho (pb)	N° de Clones no Cluster	FULL	Categoria 1aria	PRODUTO	Blast	Accession N°	% ID	e-value	overlap
MCOR0503S	370	1	P	CE	ficolin	X	>ref NP_056652.1	74	7.00E-07	23/31
MCOR0504S	473	1	P	MT	cytochrome-c oxidase subunit II	X	>gb AAL55554.1	79	3.00E-65	123/155
MCOR0505S	474	1		NH	no hit					
MCOR0506S	521	1		NH	no hit					
MCOR0507S	454	1		NH	no hit					
MCOR0508S	561	1	P	RT	reverse transcriptase	X	>dbj BAD72127.1	58	5.00E-08	33/56
MCOR0509S	581	1	FF	TP	phospholipase A2	X	>gb AAN60018.1	97	8.00E-81	137/140
MCOR0510S	506	1		NH	no hit					
MCOR0511S	393	1	P	DT	Ohanin precursor, gene, complete cds	N	>gb DQ103590.1	87	3.00E-26	116/132
MCOR0512S	503	1	FP	CT	39S ribosomal protein L13, mitochondrial	X	sp Q9BYD1 RM13_HUMAN	83	1.00E-79	138/165
MCOR0513S	460	1		NH	no hit					
MCOR0514S	528	1		NH	no hit					
MCOR0515S	500	1	P	CT	similar to ribosomal protein S24	X	>ref XP_521519.1	99	2.00E-52	101/102
MCOR0516S	289	1	P	CR	Gamma-aminobutyric acid receptor	X	sp O95166 GBRAP_HUMAN	100	4.00E-08	26/26
MCOR0517S	396	1	FF	MT	NADH dehydrogenase subunit 4L	X	>gb AAY67987.1	77	1.00E-30	70/89
MCOR0518S	482	1	P	CT	similar to ribosomal protein S19	X	>ref XP_533657.2	98	2.00E-77	144/146
MCOR0519S	474	1	FP	TNtx	muscarinic toxin precursor	X	>gb ABB83639.1	65	2.00E-10	32/49
MCOR0520S	516	1	P	TNtx	Alpha-neurotoxin homolog 8 precursor	X	sp P58370 NXAH8_MICCO	94	1.00E-36	66/70
MCOR0521S	525	1	P	OF	similar to lipoic acid synthetase isoform	X	>ref XP_536255.1	87	4.00E-69	127/145
MCOR0522S	497	1	FP	CT	similar to ribosomal protein L14	X	>ref XP_418775.1	87	7.00E-67	120/137
MCOR0523S	534	1	P	DN	bradykinin-potentiating/C-type natriuretic	N	gb AY310916.1	89	8.00E-09	53/59
MCOR0524S	194	1	P	TNtx	Alpha-neurotoxin homolog 8 precursor	X	sp P58370 NXAH8_MICCO	91	2.00E-20	43/47
MCOR0525S	359	1		NH	no hit					
MCOR0526S	399	1	P	TW	similar to WAP four-disulfide core	X	>ref XP_875467.1	54	2.00E-10	26/48

CLUSTER	Tamanho (pb)	N° de Clones no Cluster	FULL	Categoria 1aria	PRODUTO	Blast	Accession N°	% ID	e-value	overlap
MCOR0527S	528	1	FF	CR	FK506-binding protein 2 precursor	X	sp P45878 FKBP2_MOUSE	82	2.00E-59	112/135
MCOR0528S	573	1		NH	no hit					
MCOR0529S	494	1		NH	no hit					
MCOR0530S	495	1	FF	CM	NADH dehydrogenase 1 beta subcomplex 4 / Ndufb4 protein / NADH-ubiquinone	X	gb AAH96421.1	56	2.00E-37	71/126
MCOR0531S	429	1	P	CR	high density lipoprotein binding protein	X	sp P81021 VIGLN_CHICK	97	2.00E-73	139/142
MCOR0532S	574	1	FF	CD	similar to Ufm1-conjugating enzyme 1	X	>ref XP_536135.1	88	1.00E-87	145/164
MCOR0533S	555	1	FF	CT	60S ribosomal protein L18	X	sp P69090 RL18_OREMO	90	3.00E-91	164/181
MCOR0534S	421	1		NH	no hit					
MCOR0535S	484	1	P	CT	Transcription initiation factor IIA	X	sp P52657 T2AG_HUMAN	95	2.00E-37	76/80
MCOR0536S	528	1	P	CR	Peroxisomal membrane protein 11B	X	sp O96011 PX11B_HUMAN	63	3.00E-40	88/138
MCOR0537S	646	1	P	UF	similar to RIKEN cDNA 1110015K06	X	>ref XP_414768.1	94	E-116	202/213
MCOR0538S	334	1	P	CT	Elongation factor 1-gamma (EF-1-gamma)	X	sp P29694 EF1G_RABIT	81	6.00E-34	67/82
MCOR0539S	344	1	FF	TNtx	Short neurotoxin homolog NTL4 precursor	X	sp Q9YGI8 NXSH4_BUNMU	59	3.00E-22	51/86
MCOR0540S	428	1	FF	TNtx	Alpha-neurotoxin homolog 7 precursor	X	sp Q9PRI1 NXAH7_MICCO	100	4.00E-41	78/78
MCOR0541S	360	1	P	CM	isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+)	X	ref NP_955858.1	72	1.00E-15	37/51
MCOR0542S	550	1	P	CT	ATP-dependent RNA helicase DDX39	X	sp O00148 DDX39_HUMAN	96	2.00E-44	90/93
MCOR0543S	431	1	FF	TNtx	alpha-neurotoxin-type protein 1	X	sp Q9PUB7 NXAH1_MICCO	100	5.00E-41	78/78
MCOR0544S	561	1	P	CM	similar to 3,2-trans-enoyl-CoA isomerase	X	>gb AAH78332.1	95	6.00E-29	64/97
MCOR0545S	456	1	P	CE	Microtubule-associated protein RP/EB	X	sp Q66HR2 MARE1_RAT	64	4.00E-48	98/152
MCOR0546S	458	1	FF	TNtx	Alpha-neurotoxin homolog 8 precursor	X	sp P58370 NXAH8_MICCO	80	5.00E-33	69/86
MCOR0547S	307	1	P	OF	ADP/ATP carrier protein	X	>gb AAB96347.1	88	5.00E-47	90/102
MCOR0548S	600	1	P	OF	CD9 antigen	X	>ref NP_990093.1	55	3.00E-26	57/102
MCOR0549S	588	1		NH	no hit					
MCOR0550S	528	1	P	TNtx	ctx-1 gene, exons 1-3	N	>emb AJ238736.1 NNA238736	86	3.00E-11	75/87

CLUSTER	Tamanho (pb)	N° de Clones no Cluster	FULL	Categoria 1aria	PRODUTO	Blast	Accession N°	% ID	e-value	overlap
MCOR0551S	378	1	P	TB	natriuretic peptide	X	gb AAC60341.1	77	7.00E-22	55/71
MCOR0552S	465	1	FF	TNtx	Cytotoxin 7 precursor (Cardiotoxin 7)	X	sp P49122 CX7_NAJAT	51	5.00E-16	42/82
MCOR0553S	339	1	P	MT	Dinodon semicarinatus mitochondrion		>ref NC_001945.1	84	2.00E-42	240/284
MCOR0554S	272	1		NH	no hit					
MCOR0555S	413	1	FF	TNtx	Alpha-neurotoxin homolog 7 precursor	X	sp Q9PRI1 NXAH7_MICCO	98	6.00E-37	72/73
MCOR0556S	463	1	P	CD	autocrine motility factor receptor	X	>gb AAD56722.1	74	2.00E-58	116/155
MCOR0557S	455	1	FF	TNtx	Alpha-neurotoxin homolog 7 precursor	X	sp Q9PRI1 NXAH7_MICCO	100	4.00E-41	78/78
MCOR0558S	528	1		NH	no hit					
MCOR0559S	537	1	P	CT	similar to Rpl24 protein	X	>ref XP_416616.1	95	2.00E-80	152/160
MCOR0560S	483	1		NH	no hit					
MCOR0561S	568	1	P	CP	Translocon-associated protein delta	X	sp Q62186 SSRD_MOUSE	79	6.00E-70	129/162
MCOR0562S	584	1		NH	no hit					
MCOR0563S	553	1	P	CR	ribosomal protein S6 kinase 1 (S6K) (pro-S6K)	X	sp Q8BSK8 KS6B1_MOUSE	83	1.00E-47	89/107
MCOR0564S	407	1	FP	CT	40S ribosomal protein S7	X	sp P62081 RS7_HUMAN	90	1.00E-34	79/87
MCOR0565S	527	1	P	MT	NADH-ubiquinone oxidoreductase	X	sp O79557 NU6M_DINSE	70	4.00E-39	84/119
MCOR0566S	415	1	FF	CT	40S ribosomal protein S26	X	sp P62854 RS26_HUMAN	98	7.00E-62	113/115
MCOR0567S	331	1	P	UF	musculoskeletal, embryonic nuclear	X	ref NP_995325.1	68	6.00E-09	33/48
MCOR0568S	423	1	FF	TNtx	Alpha-neurotoxin homolog 7 precursor	X	sp Q9PRI1 NXAH7_MICCO	100	4.00E-41	78/78
MCOR0569S	275	1	P	TNtx	Alpha-neurotoxin homolog 7 precursor	X	sp Q9PRI1 NXAH7_MICCO	97	2.00E-20	43/44
MCOR0570S	457	1	FF	MT	similar to Ubiquinol-cytochrome c reductase	X	ref XP_850254.1	74	2.00E-31	68/91
MCOR0571S	400	1	FF	TNtx	Alpha-neurotoxin homolog 7 precursor	X	sp Q9PRI1 NXAH7_MICCO	100	6.00E-40	76/76
MCOR0572S	466	1		NH	no hit					
MCOR0573S	410	1		NH	no hit					
MCOR0574S	234	1		NH	no hit					

CLUSTER	Tamanho (pb)	N° de Clones no Cluster	FULL	Categoria 1aria	PRODUTO	Blast	Accession N°	% ID	e-value	overlap
MCOR0575S	516	1	FP	CT	60S ribosomal protein L18a	X	sp Q02543 RL18A_HUMAN	98	2.00E-92	163/166
MCOR0576S	519	1	P	UF	ancient ubiquitous protein 1 isoform 2	X	>ref NP_001015555.1	48	3.00E-25	63/131
MCOR0577S	461	1	P	OF	Ewing sarcoma breakpoint region 1	X	gb AAH68226.1	85	4.00E-73	131/153
MCOR0578S	457	1	P	RT	transposon protein, putative, CACTA	X	gb AAP51898.1	34	7.00E-06	33/96
MCOR0579S	532	1	FP	OF	grancalcin	X	sp Q8VC88 GRAN_MOUSE	63	4.00E-43	87/136
MCOR0580S	507	1		NH	no hit					
MCOR0581S	553	1	FF	CT	Histone deacetylase complex subunit	X	sp O00422 SAP18_HUMAN	98	1.00E-83	150/153
MCOR0582S	417	1	P	CR	phospholipase C beta type	X	gb AAA03065.1	71	5.00E-47	99/139
MCOR0583S	408	1	P	MT	Cytochrome b	X	sp Q9MLI9 CYB_MICFL	87	2.00E-59	114/131
MCOR0584S	428	1	FF	TNtx	Alpha-neurotoxin homolog 7 precursor	X	sp Q9PRI1 NXAH7_MICCO	100	4.00E-41	78/78
MCOR0585S	531	1		NH	no hit					
MCOR0586S	197	1		NH	no hit					
MCOR0587S	448	1	FF	CT	ribosomal protein S15 isoform	X	gb AAH97585.1	99	8.00E-66	123/124
MCOR0588S	466	1		NH	no hit					
MCOR0589S	375	1		NH	no hit					
MCOR0590S	448	1	P	CR	nucleotide binding protein 2	X	>ref NP_001007834.1	86	7.00E-68	127/146
MCOR0591S	491	1	P	CR	similar to CBL E3 ubiquitin protein ligase	X	>ref XP_576396.1	39	1.00E-17	60/153
MCOR0592S	278	1	P	UF	similar to Nur77 downstream protein 2	X	>ref XP_415224.1	83	2.00E-06	25/30
MCOR0593S	320	1		NH	no hit					
MCOR0594S	434	1	P	CT	Rpl17 protein	X	>gb AAH03896.2	100	4.00E-50	100/100
MCOR0595S	358	1	P	MT	NADH dehydrogenase subunit 1	X	>gb AAL66854.1	85	3.00E-31	66/77
MCOR0596S	479	1	FP	CR	nucleotide binding protein 2	X	>ref NP_001007834.1	80	4.00E-26	58/72
MCOR0597C	418	8	FF	TNtx	alpha-neurotoxin-type protein 1	X	sp Q9PUB7 NXAH1_MICCO	100	5.00E-41	78/78
MCOR0598C	427	6	FF	TNtx	Alpha-neurotoxin homolog 7 precursor	X	sp Q9PRI1 NXAH7_MICCO	98	1.00E-40	77/78

CLUSTER	Tamanho (pb)	N° de Clones no Cluster	FULL	Categoria 1aria	PRODUTO	Blast	Accession N°	% ID	e-value	overlap
MCOR0599C	438	36	FF	TNtx	Alpha-neurotoxin homolog 7 precursor	X	sp Q9PRI1 NXAH7_MICCO	100	4.00E-41	78/78
MCOR0600C	423	25	FF	TNtx	Alpha-neurotoxin homolog 7 precursor	X	sp Q9PRI1 NXAH7_MICCO	100	4.00E-41	78/78
MCOR0601S	297	1	P	TNtx	alpha-neurotoxin-type protein 1	X	sp Q9PUB7 NXAH1_MICCO	100	1.00E-19	42/42
MCOR0602C	598	2	FF	TL	C-type lectin-like protein 2	X	>gb AAK43585.1	72	6.00E-55	91/126
MCOR0603C	612	6	FP	TL	C-type lectin-like protein 2	X	>gb AAK43585.1	71	3.00E-63	108/151
MCOR0604C	488	4	FF	TNtx	Alpha-neurotoxin homolog 8 precursor	X	sp P58370 NXAH8_MICCO	100	4.00E-48	86/86
MCOR0605C	500	5	FF	TNtx	Alpha-neurotoxin homolog 8 precursor	X	sp P58370 NXAH8_MICCO	100	4.00E-48	86/86
MCOR0606S	384	1	P	CT	ribosomal protein S3	X	>gb AAD27643.1	93	8.00E-29	60/64
MCOR0607S	458	1	P	TP	phospholipase A2	X	>gb AAN60018.1	100	4.00E-71	119/119
MCOR0608S	335	1	P	TP	phospholipase A2	X	>gb AAN60018.1	100	3.00E-45	81/81
MCOR0609S	448	1	FP	TP	phospholipase A2	X	>gb AAN60018.1	97	3.00E-58	104/107
MCOR0610S	352	1	FP	CD	ubiquitin	X	gb AAV84266.1	100	2.00E-59	117/117
MCOR0611S	398	1	FF	TK	trypsin inhibitor preproprotein	X	>gb AAP04484.1	59	1.00E-25	53/89

e-value: valor significativo da sequência no NR protein database

FULL?: clones parciais (P), clones inteiros mas com sequenciamento incompleto (FP) e clones inteiros e com sequências completas (FF)

% ID: percentual da sequência obtida na comparação com o banco de dados

overlap: quanto da sequência apresenta semelhança com o banco de dados