UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

CLONAGEM, IDENTIFICAÇÃO E ANALÍSE DE GENES DE PEPTÍDIOS TÓXICOS DA CASCAVEL SUL AMERICANA, *Crotalus durissus terrificus*. IMPLICAÇÕES EVOLUTIVAS E FUNCIONAIS.

GANDHI RÁDIS BAPTISTA

TESE DE DOUTORADO

ORIENTADOR: Prof. Dr. ISAÍAS RAW

SÃO PAULO
03/12/2001

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Rádis-Baptista, Gandhi
R129c Clonagem, identificação e analise de genes de peptídios tóxicos da cascavel sul americana, *Crotalus durissus terrificus*. Implicações evolutivas e funcionais / Gandhi Rádis-Baptista. -- São Paulo, 2001.
100 p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Raw, Isaías

1. Biologia molecular 2. Evolução gênica 3. Farmacologia molecular 4. Expressão gênica I. T. II. Raw, Isaías, orientador.

574.88 CDD

"Clonagem, Identificação e Analise de Genes de Peptídios Tóxicos da Cascavel Sul Americana, Crotalus durissus terrificus. Implicações Evolutivas e Funcionais"

GANDHI RÁDIS BAPTISTA

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências – Área: Bioquímica.

Aprovado por:

Prof. Dr. ISAIAS RAW
IQ – USP
(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. WALTER RIBEIRO TERRA
IQ – USP

Profa. Dra. BETTINA MALNIC
IQ – USP

Profa. Dra. LUCILE MARIA FLOETER WINTER
ICB – USP

Prof. Dr. CARLOS EDUARDO WINTER
ICB - USP

SÃO PAULO
19 DE FEVEREIRO 2002.

AGRADECIMENTOS

O trabalho descrito aqui foi realizado no Laboratório de Toxinologia Molecular do Instituto Butantan, São Paulo, entre julho de 1997 a Setembro de 2001. Manifesto meus sinceros agradecimentos às pessoas e aos Departamentos e Instituições que representam, cujo suporte e contribuição foram imprescindíveis.

Ao Prof. Dr. Isaías Raw, de quem a credibilidade à minha pessoa e o endosso ao projeto constituíram inestimáveis valores.

Ao Prof. Dr. Tetsuo Yamane, de quem a amizade, as discussões gerais e específicas acerca da evolução da Ciência e o incentivo a mim prestado foram constantes.

À Dra. Maria de Fátima M. Furtado e à Kathleen F. Grego, do Laboratório de Herpetologia do I. Butantan, que não só forneceram os espécimes de cascavéis para o estudo, mas também sempre estiveram acessíveis às discussões.

Ao Prof. Eduardo Brandt de Oliveira, do Depto de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pela contribuição crítica aos trabalhos publicados e pelas preparações da crotamina de veneno de alta qualidade.

À Dra. Irina Kerkis e ao Dr. Alexander Kerkis, professores visitantes do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, pela proposta de trabalho pioneira de utilização de células-tronco embrionárias na análise de toxinas de venenos animais.

À Sirley Daffre, ao auxílio e recomendações sobre os ensaios de atividade antimicrobiana de peptídios.

À Nancy Oguiura, às discussões iniciais sobre meu projeto e pela disponibilização dos anticorpos anti-crotamina.

Ao Instituto Butantan que, durante seus completados cem anos, mantém uma política segura de pesquisa científica e produção tecnológica.

À Universidade de São Paulo, que forneceu a oportunidade da minha formação acadêmica da graduação ao doutoramento.

Á Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, de quem o apoio financeiro e estratégico viabilizaram a execução do projeto.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contibuíram para o trabalho, mas que não foram mencionados.

Todo conhecimento pode, justificadamente, ser dividido em duas partes integrantes:
A forma do conhecimento e o conteúdo do conhecimento.
A forma não tem significância sem o conteúdo e o conteúdo sem a forma não pode ser objeto do pensamento.
(Voutilainen, 1983 – do processamento do conhecimento humano)

Esse trabalho é dedicado aos meus pais, cuja *simplicidade e atitudes éticas nortearam a minha formação. E*
à Lívia Márcia e à Kami Tiba, esposa e filha, que *estão sempre presentes nas minhas ações.*

Dreamtime painting by
the contemporary Australian aborigine
Brogas Tjapanardi (Fogden collection)

In the end, we will conserve only what we love,
we will love only what we understand,
we will understand only what we are taught.

Baba Dioum, Senegalese conservationist

(de: Greene, 1997)

Índice

1. INTRODUÇÃO

1.1. As Serpentes. Alguns aspectos de sua História Natural 1
1.2. O gênero Crotalus 5
1.3. A espécie Crotalus durissus 6
1.4. Composição geral do veneno de serpentes 8
1.5. Constituintes do veneno de C. durissus terrificus 10
1.6. A toxina Crotamina 12
1.7. Emprego de toxinas do veneno de serpentes na medicina 15

2. OBJETIVOS 16

3. MATERIAIS E MÉTODOS 17
3.1. Obtenção dos espécimes de serpentes C. d. terrificus e excisão dos tecidos ... 17
3.2. Isolamento do RNA total 18
3.3. Isolamento do Poli (A^+) RNA 18
3.4. Isolamento do DNA genômico 19
3.5. Síntese do DNA complementar (cDNA) 19
3.6. Construção da biblioteca de cDNA de glândula de veneno de C. d. terrificus crotamina –positivo 20
3.7. Construção das bibliotecas genômicas de C. d. terrificus crotamina-positivo e negativo 20
3.8. Rastreamento das Bibliotecas de cDNA e genômica por PCR 20
3.9. Análise dos produtos de PCR 21
3.10. Isolamento do gene da crotamina por "genome walking" 22
3.11. Isolamento e identificação do gene crotasin 23
3.12. Análise da expressão da crotamina por Northern Blot 23
3.13. Análise da expressão do crotasin por RT-PCR 24
3.14. Análise da presença do gene crotasin no genoma de C. d. terrificus crotamina-positivo por AR-PCR 25
3.15. Seqüenciamento do DNA 25
3.16. Bioinformática 26
3.17. Produção de crotamina e crotasin recombinantes 26
3.17.1. Construção, expressão e purificação de 6xHis-crotamina em E. coli 27
3.17.2. Construção, expressão e purificação de crotamina e crotasin em Pichia methanolica 28
3.18. Síntese de oligopeptídios a partir da seqüência da crotamina e crotasin 30
3.19. Imunoblot e imunodetecção 31
3.20. Determinação da atividade antibiótica 31
3.21. Análise de diferenciação de células-tronco embrionárias 32
3.22. Conjugação da crotamina com Cy3 36
3.23. Imunocitoquímica 36

1. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....36
1.1. Seqüências de nucleotídios dos precursores de crotamina.....36
1.2. Análise da expressão de crotamina por Northern blot.....39
1.3. Isolamento e organização estrutural do gene da crotamina (Crt-p1).....45
1.4. Isolamento do gene crotasin (Cts-p2).....42
1.5. Análise da expressão do gene Cts-p2 em C. d. terrificus por RT-PCR.....44
1.6. Detecção do gene Cts-p2 no genoma de C. d. terrificus crotamina-positivo...47
1.7. Comparação do produto do gene crotasin.....57
1.8. Produção de crotamina e crotasin recombinantes.....60
1.9. Determinação da atividade antibiótica.....62
1.10. Análise da diferenciação de células-tronco induzida por crotamina.....63
1.11. Localização do conjugado crotamina-Cy3 em células-tronco.....63

5. FIGURAS E TABELAS
Figura 1. Algumas espécies de cascavéis do território Brasileiro.....7
Figura 2. Típica presa solenóglifa e glândula de veneno de Viperídio.....8
Figura 3. Família dos peptídios crotamina-símile e cladograma.....13
Figura 4. cDNAs precursores das isoformas de crotamina.....37
Figura 5. Assinatura dos peptídios crotamina-ímile.....38
Figura 6. Northern blot de RNAs de glândula de veneno.....39
Figura 7. Atribuição dos limites dos exons e introns do gene Crt-p1.....43
Figura 8. Comparação do gene Crt-p1 e Cts-p2.....45
Figura 9. Análise da expressão do Cts-p2 por RT-PCR.....48
Figura 10. Identificação do Cts-p2 nos genomas de cascavéis.....50
Figura 11. Organização estrutural dos genes Crt-p1 e CTX.....51
Figura 12. Comparação do crotasin com peptídios e domínios protéicos.....57
Figura 13. Comparação dos peptídios crotamine-símile e β-defensinas.....58
Figura 14. Análise filogenética dos peptídios crotamine-símile e defensinas.....59
Figura 15. Imunoblot da crotamina recombinante.....61
Figura 16. Diferenciação de células-tronco induzida por crotamina.....64
Figura 17. Diferenciação de células-tronco em células nervosas.....66
Figura 18. Localização celular da crotamina-Cy3.....67
Figura 19. Alinhamento da crotamina com segmento da Rnase bovina.....76
Figura 20. Peptídios antibióticos e tóxicos com motivo CSαβ.....77
Tabela 1. Espécimes de C. d. terrificus usadas na investigação.....17
Tabela 2. Comparação dos genes Crt-p1 e Cts-p2.....47
Tabela 3. Similaridade entre os genes Crt-p1 e Cts-p2.....47
Tabela 4. Atividade antibiótica da crotamina e do crotasin.....62
Tabela 5. Atividade antibiótica dos oligopeptídios derivados.....62

1. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....80

2. PERSPECTIVAS.....81

3. REFERÊNCIAS.....83

4. APÊNDICE.....95
4.1. Sítio de clonagem do pQE12 e construção da 6xHis-crotamina.....95
4.2. Sítio de clonagem do vetor pMetα A.....96
9.3. Eletroferograma da construção pMetα A-Crotamina.....97
9.4. Eletroferograma da construção pMetα A-Crotasin.....98
6.1. Espectro de massa de oligopeptídio derivado do crotasin.....99
6.2. Titulação do anticorpo anti-crotasin.....100

10. CURRICULUM VITAE.....I-IV

RESUMO

O veneno de animais contém um arsenal de toxinas que desencadeia respostas fisiológicas e bioquímicas específicas. A crotamina, um peptídio catiônico (4,4 kDa, pI 9,5), é um dos componentes mais abundantes do veneno de cascavel Sul Americana (*Crotalus durissus terrificus*). No Brasil, há populações de *C. d. terrificus* que expressam ou não a crotamina no veneno. Em um único espécime de *C. d. terrificus* crotamina-positivo, foram isolados cDNAs precursores de duas isoformas de crotamina, dentre as quais a crotamina Ile-19, presente somente no veneno de *C.d. ruruima*. Análise por Northern blot de RNA total e mensageiro de glândulas de *C.d. terrificus* crotamina-positivo e –negativo, indica que a expressão é defectiva em espécimes de cascavel crotamina-negativo. O gene da crotamina (*Crt-p1*) foi isolado e possui três exons interrompidos por dois introns de diferentes fases e tamanhos. O exon I codifica a totalidade do peptídio sinal; o exon II codifica os três resíduos carboxi-terminais do peptídio sinal, bem como a maior parte da toxina madura; o terceiro exon codifica os resíduos terminais da toxina. Tentativa de identificar o pseudogene da crotamina, que indicaria a ausência de transcritos na glândula de veneno, permitiu isolar um gene parálogo ao da crotamina, isto é o gene crotasin (*Cts-p2*). Esse gene apresenta a mesma organização estrutural do gene da crotamina, contudo, o intron I é cerca de 800 pares de base mais longo e o exon II é hipermutado. Esse gene é expresso em diferentes tecidos de cascavel, majoritariamente no pâncreas, mas insignificantemente nas glândulas de veneno. Surpreendentemente, esse gene é também detectado no genoma de *C. d. terrificus* crotamina-positivo, sugerindo que o gene de crotamina é o produto de uma duplicação gênica, bem como da evolução acelerada que operou restritivamente ao exon II. Buscando as funções do produto desse gene nos tecidos de cascavel, por alinhamento de domínios protéicos e outras famílias de peptídios de vertebrados, duas categorias foram encontradas: peptídios catiônicos antibióticos (β-defensinas) e domínios ricos em cisteína de receptores de fator de crescimento. Testes antibióticos indicam que o crotasin, a crotamina e oligopeptídios derivados sintéticos possuem certa atividade microbicida seletiva. Por outro lado, ensaios com células-tronco embrionárias de camundongo e crotamina de veneno mostram que a crotamina é citotóxica em concentrações milimolares, mas induz a diferenciação dos corpos embrionários, em concentrações micromolares. Esses achados demonstram a multi-funcionalidade de peptídios catiônicos, com três pontes de cisteína precisamente arranjadas, é decorrente da versatilidade dos domínios protéicos anfipáticos, que permitem interação com a membrana plasmática, modulando canais iônicos e receptores celulares.

1. INTRODUÇÃO

1.1. As Serpentes. Alguns aspectos de sua História Natural

As serpentes constituem um grupo de répteis bem sucedido, em termos de história evolutiva. Enquanto há aproximadamente 3000 espécies de serpentes, que conquistaram diversos territórios, como rios, mares, desertos, florestas úmidas tropicais e subtropicais, só há em torno de 20 espécies de crocodilianos e aproximadamente 300 de tartarugas. As serpentes, variando de alguns centímetros até 10 metros de comprimento, habitam todos os continentes (exceto Antártida), em latitudes e altitudes muito distintas, como ao redor do Ártico até a Patagônia; do Himalaia às águas marinhas rasas. Esse sucesso evolutivo é atribuído, em parte, à ausência de patas – fato que permitiu que esses répteis ganhassem os diferentes ambientes. Porém, de maior significância, seria a capacidade de engolir de uma só vez suas presas e ao desenvolvimento do sistema de inoculação de veneno para imobilização da presa e/ou defesa (Bauchot, 1994).

Ao traçar a origem das serpentes, pode-se verificar que remonta uma ligação evolutiva com os lagartos. A história dos répteis começa ao redor de 330 a 340 milhões de anos atrás (mya), no período do baixo Carbonífero. Desse período, é proveniente o mais antigo fóssil classificado como réptil, com um crânio do tipo anapsídio, como os de tartaruga. Os Anapsídios deram origem a dois grupos maiores de répteis: os sinapsídios e os diapsídios. Os primeiros deram origem aos mamíferos e os seguintes deram origem aos ancestrais das serpentes. Os diapsídios se separaram em Archosauros (dinossauros e pterossauros, e atualmente, crocodilianos e pássaros) e Lepidosauromorfos (plesiossauros, ichtiossauros e placossauros e lepidossauros).

Na fauna atual, lagartos, cobras-cegas, e serpentes são três grupos de répteis que pertencem ao grupo dos Lepidossauros, que constituem a ordem dos Squamatas (do latim, escamas).

É consenso que as serpentes evoluíram dos lagartos de corpos alongados e sem patas, como as cobras cegas (*Amphisbaena sp.*), cujos parentes mais próximos (dragão de Komodo, e o monstro Gila - *Heloderma suspectum*, um dos dois únicos lagartos venenosos) estão dentro da família Varanoidea.

A seguir, é assinalado o aparecimento de algumas famílias de serpentes, de acordo com a era geológica em que surgiram (conforme extraído de Bauchout, 1994).

• ***Madtsoidae***	~85 mya (Cretáceo)
• Anilidae	~72 mya (Cretáceo)
• Boidae	~72 mya (Cretáceo)
• Tropidophidae	~72 mya (Cretáceo)
•Colubridae	~40 mya (Eoceno)
• Viperidae	~24 mya (Mioceno)
• Elapidae	~20 mya (Mioceno)

Vale lembrar que: (*i*) a família dos Madtsoidae surgiu a 85 mya, mas foi recentemente extinta (numa data indeterminada do Quaternário); (*ii*) durante a transição do Cretáceo para o Terciário (~65 mya), os dinossauros e outros animais foram extintos, mas não foram as serpentes; (*iii*) o registro mais antigo de uma serpente data de 100 mya – o mais antigo vertebrado é de 470-450 mya, os primeiros répteis de 340-330 mya, os primeiros mamíferos de 220-205 mya e o homem moderno (*Homo sapiens sapiens*) de 90 000 anos atrás.

O esquema a seguir apresenta um panorama da atual classificação das serpentes dentro do subfilo dos vertebrados (Bauchot, 1994; Greene, 1997; The EMBL Reptile Database – http://www.embl-heidelberg.de/~uetz/db-info):

Filo Chordata
- Classe Reptilia
  - Subclasse Anapsidida
  - Subclasse Archosauria
  - Subclasse Lepidosauria
    - Ordem Squamata
      - Subordem Sauria (Lacertília)
      - Subordem Amphisbaenia
      - Subordem Ophidiae (Serpentes)
  - **Superfam. Typhlopoidea (Scolecophidia)**
    - Família Anomalepidae (cobras-cegas albas)
    - Família Typhlopidae (cobras-cegas)
    - Família Leptotyphlopidae/Glauconiidae (cobras-cegas diminutas)

Superfam. Henophidia (Boidea)
Família Aniliidae/Ilysiidae (cobras cilíndricas)
Família Anomochilidae (cobras cilíndricas diminutas)
Família Boidae (jibóias e boas)
Família Bolyeridae (jibóias insulares – Round Island)
Família Cylindrophiidae (cobras cilíndricas Asiáticas)
Família Loxocemidae (jibóia Mexicana)
Família Tropidophiidae (cobra-madeira, Round Island "Boas ")
Família Uropeltidae (Shield-tail Snakes)
Família Xenopeltidae (Sunbeam Snakes)
Superfam. Xenophidia (Colubroidea = Caenophidia)
Família Acrochordidae (File Snakes)
Família Atractaspididae (vípera africana)
Família Colubridae (colubridios)
Família Elapidae (cobras, kraits, cobra coral)
Família Hydrophiidae (cobras-marinhas)
Família Viperidae (víperas e cascavéis)

Então, na subordem Ophidia, duas superfamílias de serpentes existem: a Scoleophidia e Alethinophidia.

Distintivamente, os membros da superfamília dos Scoleophidia (do grego, scolex = verme e ophidian = serpente) se caracterizam pela falta de diferenciação do formato da cabeça em relação ao corpo, deficiência visual e ausência de uma escama especializada que cobre os olhos, pelas mandíbulas ligadas e por apresentarem pélvis vestigiais que nem sempre são visíveis e que são sinais de ligação com vertebrados tetrápodes. Três famílias de cobras-cegas são compreendidas: Anomalepidae (cobras-cegas albas), Typhlopidae (cobras-cegas) e Leptotyphlopidae/Glauconiidae (cobras-cegas diminutas).

Já na grande superfamília Alethinophidia (alethino = verdadeiro e ophidian = serpente), as serpentes se caracterizam por possuírem a cabeça bem diferenciada do tronco, o crânio ser pro-cinético (a área da boca é móvel), os olhos seremcobertos por uma escama especializada e a habilidade de engolir suas presas de uma única vez. Nessa superfamília estaría compreendedida, sob a mesma chave dicotômica, os membros das famílias Aniliidae, Boidae, Acrochordidae e Colubroidae, entre as outras descritas.

Porém o EMBL Reptile Database classifica em duas superfamílias (ver esquema classificatório acima): a superfamília Henophidia (Boidea) e a Xenophidia (Colubroidea = Caenophidia).

De qualquer modo, a superfamília Colubroidea compreende 85 % de todas as serpentes existentes atualmente. Anteriormente denominada Caenophidia, essa última superfamília incorpora, assim, as famílias Acrochordidae, Atractaspididae, Colubridae, Elapidae, Hydrophiidae e Viperidae.

A relação abaixo apresenta o número de espécies de serpentes viventes de cada família (extraído de The EMBL Reptile Database):

Atractaspididae	67
Acrochordidae	3
Colubridae	1800
Elapidae	248
Aniliidae	1
Anomochilidae	2
Boidea (+ Phytonidae)	71
Bolyeridae	2
Cylindrophiidae	10
Loxocemidae	1
Tropidophiidae	23
Uropeltidae	47
Xenopeltidae	2
Hydrophidae	61
Anomalepidae	16
Leptotyphlopidae	90
Typhlopidae	226
Viperidae	240

As serpentes são também divididas em quatro categorias não taxonômicas, baseadas na dentição e a adaptação morfológica dessa dentição para a liberação e inoculação do veneno. Tais categorias compreendem:

Serpentes áglifas: os dentes não são modificados para liberação do veneno. Compreendem serpentes da família Colubridae, genuinamente não venenosa e aquelas que produzem secreção salivar tóxica, onde o veneno é introduzido na cicatriz criada pela mordida. Dificilmente causam acidentes para o homem;

Serpentes opistóglifas: também da família Colubridae, os dentes posteriores sofreram modificações, no curso da evolução, de modo que foi possível aumentar a eficiência de inoculação do veneno, através de canais superficiais;

Serpentes proteróglifas: compreendem serpentes da família Elapidae e Hidrophiidae. Invariavelmente, todos as espécies dessas famílias são perigosas ao homem. A dentição foi modificada de tal modo, que várias espécies do gênero *Naja* possuem a capacidade de ejetar o veneno à distância.

Serpentes solenóglifas: incluem serpentes da família Astractaspididae, Viperidae e Crotalidae. As solenóglifas possuem presas frontais ocas, sobre uma maxila rotátil, permitindo que essas sejam dobráveis quando não estão em uso (antes do bote). Do ponto de vista evolutivo, é o sistema de inoculação mais sofisticado, não só em termos da morfologia do sistema de injeção do veneno na presa, mas também da composição do veneno.

Este panorama, sobre a história natural das serpentes, mostra o complexo quadro evolutivo e classificatório desses répteis. Fósseis-chaves dos ancestrais das serpentes, esclarecedores para traçar sua história, são muito raros, o que tem tornado o quebra-cabeça de sua divergência e adaptações indefintivamente estabelecidos, quanto tantos outros intrigantes aspectos de sua dispersão.

Como esse trabalho tem como um dos objetos de estudo a evolução moleculardе uma toxina presente no veneno de cascavel Sul americana (*C. d. terrificus*), será comentado, um pouco mais, sobre o gênero *Crotalus* da família Viperidae. Detalhes sobre outras famílias podem ser obtidos em outro lugar (Bauchot, 1994; Greene, 1997).

1.2. Gênero Crotalus (Repitila: Squamata: Ophidia: Alethinophidian: Colubroidae: Viperidae: Crotalinae)

A família Viperidae inclue todas as serpentes solenóglifas, com exceção dos Astractaspidíos. Compreende as subfamílias Azemiopinae – a mais primitiva das víperas, Viperinae e Crotalinae. Na subfamília Viperinae estão os dez gêneros de víperas que vivem na Europa e África.

A subfamília Crotalinae difere dos outros Viperídeos pela presença do órgão termo-sensitivo em ambos os lados da cabeça, entre os olhos e os nostril, bem como uma estrutura caudal – o guizo. Esses receptores termo-sensíveis são capazes de detectar objetos que são mais quentes que o ambiente, numa variação de temperatura inferior a 0,003 °C. O gênero *Crotalus* pertence a essa última família e é composto de vinte e oito espécies, as quais são encontradas somente no novo mundo (do Sul do Canadá à Argentina Central) e com grande número de subespécies. Embora a maioria das espécies habite as regiões áridas, como cerrados, caatingas, desertos e savanas, algumas espécies podem ser encontradas em regiões pantanosas e de florestas (Campbell & Lamar, 1989). As serpentes do gênero *Crotalus* variam em tamanho, desde espécies com cerca de 50 a 60 cm de comprimento (*C. intermedius, C. pricei, C. transversus*), a espécies que excedem 150 cm (*C.atrox, C. basiliscus, C. durissus*). A presença de um guizo ao final da cauda torna os espécimes desse grupo de répteis inconfundíveis (do Espanhol, cascabeles = chocalho). A coloração destas serpentes freqüentemente mimetiza as do ambiente em que vivem apresentando, em geral, tons de marrom, cinza, verde, vermelho, rosa ou amarelo.

1.3. Espécie Crotalus durissus

Crotalus durissus é a espécie mais amplamente distribuída, ocorrendo desde o sul do Istmo de Tehuantepec no México (América Central) até a região norte da Argentina (América do sul). No México e América Central, *C. durissus*, ocorre desde o sudoeste de Michoacán até Honduras e Nicarágua. Na América do Sul, espécies de *C. durissus* ocorrem em todos os países com exceção do Equador e Chile. Esta espécie é geralmente encontrada a 700 metros do nível do mar, mas algumas populações podem ser observadas em elevações de 1500 a 2200 metros.

A espécie, *C. durissus*, compreende cinco subespécies: *C. d. durissus*, *C. d. culminatus*, *C. d. terrificus*, *C. d. totonacus* e *C. d. tzabcan*. Embora haja controvérsias, a subespécie *Crotalus durissus terrificus* (cascavel Sul americana) foi re-classificada em oito subespécies: *C. d. cascavella*, *C. d. collilineatus*, *C. d. cumanensis*, *C. d. durissus*, *C. d. dryinas*, *C. d. marajoensis*, *C. d. ruruima* e *C. d. terrificus* (Campbell & Lamar, 1989). Das cinco subespécies encontradas no Brasil, quatro delas são mostradas na Figura 1.

Fig. 330. *Crotalus durissus terrificus*: Rio Claro, São Paulo, Brazil. Photo by Ivan Sazima, courtesy of Augusto Shinya Abe.

Fig. 331. *Crotalus durissus collilineatus*: Rio Verde, Goiás, Brazil. Photo by Ivan Sazima, courtesy of Augusto Shinya Abe.

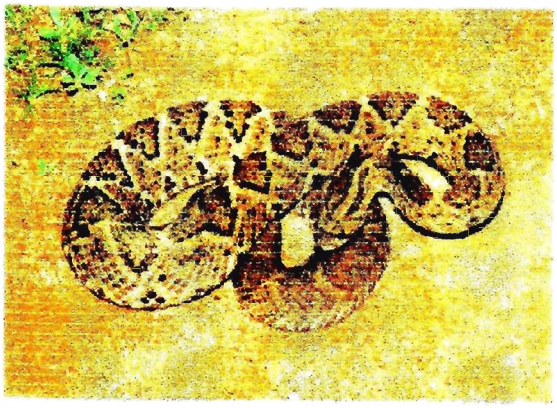


Fig. 332. *Crotalus durissus cascavella*, female, 1.170 mm TL (2.810 SVL), Glaria, Bahia, Brazil. Photo by Ivan Sazima.

Fig. 333. *Crotalus durissus ruruima*, Guyana, Roraima, Venezuela. [illegible] Museum of Natural History, University of Kansas, Lawrence.

Figura 1. Subespécies de *Crotalus durissus* que habitam o território Brasileiro.
Distribuição: *C.d .terrificus,* encontrados em Minas Gerais, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul; *C. d. collilineatus*, em Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais, São Paulo e Sul do país; *C. d. cascavella*, em regiões secas do Nordeste do país e extremo Nordeste de Minas Gerais; *C. d. ruruima*, na região do cerrado Roraima; *C. d. marajoensis*, que não está representado aqui, nos campos da Ilha de Marajó. Extraído de Campbell & Lamar, 1989.

1.4. Composição do veneno de serpentes

A inoculação parenteral de venenos constitui uma das estratégias de subjugar a presa para a alimentação desenvolvido por algumas famílias de serpentes ao longo da evolução, em adição à constricção e ao abocanhamento sem subjugação – mais primitivas. Também a inoculação de veneno constituiu uma estratégia de defesa, quando a retirada sem ameaça da própria serpente não é possível.

Das dezoito famílias existentes, somente quatro apresentam espécies que produzem secreções tóxicas: Atractaspidae, Colubridae, Elapidae e Viperidae.

O veneno é produzido em glândulas especializadas, que parecem ser embriologicamente relacionadas com as glândulas salivares e o pâncreas. No caso dos espécimes da família Viperidea - Viperinae e Crotalinae, a glândula de veneno (Figura 2) é ligeiramente triangular e possui um grande lúmen onde o veneno (secreção tóxica) é armazenado. Em adição, a glândula de veneno apresenta uma glândula globular acessória associada, que circunda a terminação do duto de veneno. Já o duto de veneno secundário conecta o lúmen da glândula acessória a uma bolsa formada pela bainha que envolve as presas (Kochva & Gans, 1966). Sendo assim, o sistema inoculador de veneo dos Viperídios solenóglifos, semelhante a uma injeção e com presas ocas em formas de agulha, é o mais eficiente em termos de velocidade de injeção, bem como de quantidade de veneno injetada (Meier & Stocker, 1995).

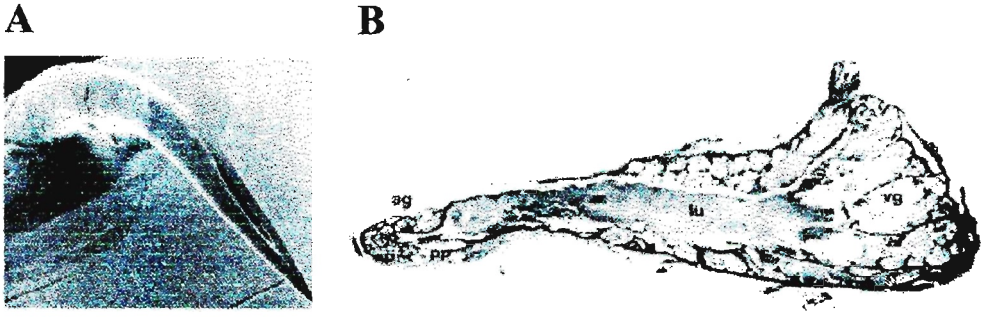


Figura 2. **A** – presa solenóglifa de espécime jovem de *Botrhops atrox*; **B** - corte sagital de uma glândula de veneno de Viperídios. Vg, glândula de veneno; lu, lúmen; ag; glândula acessória; (extraído de Kochva & Gans, 1966).

Os venenos de serpentes são os fluídos corpóreos mais concentrados, produzidos pelos vertebrados. Enquanto o conteúdo sólido da saliva fica em torno de 0,1 a 1,0%, o do suco gástrico de 0,5 – 0,8%, o pancreático de 0,4 – 1,0%, o de veneno alcança de 16 a 52%. Menos de 10% do material sólido não é proteína.

A concentração protéica no veneno aumenta de 15%, nos primeiros dias após a extração, a 30%, após 30 dias da extração. Contudo, idade, espécie, hidratação e alimentação, influem na produção.

A composição dos venenos e o seu conteúdo tóxico variam de acordo com espécie e distribuição geográfica. Essa variabilidade é também verificada no veneno de uma mesma espécie (variação intra-específica). É sugerido que a disponibilidade de determinadas presas, de acordo com a biogeografia, seria responsável pela variabilidade do veneno (Daltry et al., 1996).

Os componentes protéicos do veneno incluem constituintes enzimáticos e não enzimáticos. Constituintes outros que proteínas, que contribuem para a toxicidade dos venenos são, de um modo geral: ácidos graxos e fosfolipídios; açúcares livres, de glicoproteínas; FMN, como co-fator de L-amino oxidase – responsáveis pela coloração amarela de alguns venenos; nucleosídios e nucleotídios, particularmente ADP; aminoácidos livres, provenientes da autólise do veneno, da ativação de toxinas ou da degradação de células secretoras; aminas biógenas, incluindo histamina, serotonina, bufotenina e N-metiltriptofano; catecolaminas, tais como epinefrina, norepinefrina e dopamina; acetilcolina; íons metálicos e não-metálicos como Na^+, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Cu^{2+}, Mn^{2+}. Os componentes farmacologicamente ativos mais importantes dos venenos compreendem os polipeptídios enzimáticos e não enzimáticos. Alguns são de distribuição geral no veneno de várias famílias de serpentes, enquanto outros são restritos a um tipo de veneno, caracterizando os sintomas do envenenamentro por determinadas espécies de serpentes. As enzimas de natureza proteolítica contribuem para o dano tecidual e digestão da presa. Por outro lado, (poli-)peptídios que afetam a circulação sangüinea e movimentos musculares (respiratório e motores) são mais eficientes na imobilização da presa e de especial interesse na busca de compostos líderes na descoberta de novas drogas.

Diversos exemplos de oxiredutases, transferases, hidrolases, liases são encontrados, em quantidades variadas, em todas espécies de serpentes venenosas ou restritas aos venenos de Elapidíos e/ou Viperídios (Sarkar & Devi, 1959; Meier & Stocker, 1995). Até o momento, nos venenos de serpentes têm sido encontrados polipeptídios que agem sobre diferentes alvos celulares e com os mais variados modos de ação biológica (Sarkar & Devi, 1959). Esse arsenal de polipeptídios farmacologicamente ativos permite, evidentemente, uma maior toxicidade dos venenos em relação aos componentes isolados que os constitui. Já descritos se encontram: (a) toxinas de ação local (miotoxinas de baixo peso molecular, miotoxinas com ativiadade de PLA_2 e hemorraginas) (Ownby, 1990; Manjunatha Kini, 1997); (b) toxinas que afetam o sistema nervoso por interação com a membrana pré-sináptica e pós-sináptica ou canais iônicos (Mebs & Hucho, 1990, Chiappinelli, 1993; Harvey et al., 1993); (c) componentes cardiotóxicos (cardiotoxina de Elapídios e sarafotoxinas de *Astractaspis*) (Bdolah et al., 1991; Kochva et al., 1993); (d) toxinas que afetam o sistema cardiovascular (Marsh & Whaler, 1978; Kornalik, 1991), tais como (1) pressão sangüinea, (2) parede vascular (3) células endoteliais; (4) plaquetas; (5) ativação da protrombina; (6) o fibrinogênio; (7) proteína C; (8) antitrombina III.

Há ainda, componentes protéicos, não tóxicos com variadas ações biológicas que não estão compreendidos nas classes acima. Por exemplo, lectinas (Carvalho et al., 1998), fatores de crescimento de nervo, NGF (Kostiza & Meier, 1996; Lipps, 1998), inibidores de fosfolipase (Fortes et al., 1994; Perales et al., 1995), inibidores de adesão de plaquetas (Zhou et al., 1996; Liu et al., 1997) e componentes que afetam o sistema complemento (Vogt, 1991).

1.5. Constituintes do veneno de Crotalus durissus

Em adição, aos componentes amplamente encontrados no veneno de diferentes espécies, as toxinas que ocorrem prepoderantemente no veneno de *Crotalus durissus*, são assinaladas, a seguir.

- **Crotoxina** - uma neurotoxina com duas subunidades, que atuam sinergicamente: uma subunidade básica (Crotoxina B), com atividade fosfolipásica A_2 e uma subunidade ácida (Crotoxina A ou Crotapotina), não tóxica. Sua atividade neurotóxica é exercida, pré-sinapticamente, através do bloqueio da transmissão neuromuscular, alterando a liberação de acetilcolina.

Também, tem sido demonstrado que a crotoxina impede a recaptação de ^{3}H-colina, contribuindo para o bloqueio da neurotransmissão (Slotta and Fraenkel-Conrat, 1938; Chang and Lee, 1977; Hagwood and Santana de Sá, 1979, Kattah et al., 2000). Ambas subunidades foram clonadas e sequênciadas (Bouchier et al., 1988; 1991).

- **Convulxina (CVX)** - uma glicoproteína que consiste de duas subunidades (α e β), ligadas por pontes dissulfeto, formando uma estrutura hexamérica. A convulxina é um potente agregador de plaquetas, que se liga aos receptores plaquetários para colágeno (glicoproteína VI, GPVI). Tem sido demonstrado que peptídios derivados do colágeno impede a ligação de CVX, conjugada ao corante fluorescente FITC, ao receptor GPVI. Portanto, a atividade de CVX tem implicações no quadro patológico de trombose (Brazil, 1972; Lee 1972; Seki et al., 1980; Prado-Franceschi & Vital-Brazil, 1981; Niedergang et al., 2000). Os cDNAs das duas subunidades da convulxina foram clonadas (Leduc & Bon, 1998)

- **Girotoxina** – também uma glicoproteína, porém com atividade enzimática do tipo trombina e esterase. Injeção intravenosa (i.v.) em camundongo induz episódios temporários de rotação ao redor do eixo axial do corpo. Três outras toxinas trombina-símile são descritas em serpentes da família Crotalinae: crotalase de *Crotalus adamanteus* (cascavel diamante); ancrod de *Agkistrodon rhodostoma* (vípera Malaia); enzima trombina-símile de *C. durissus durissus* (cascavel da América Central). Acredita-se que essas enzimas liberem peptídios neuromoduladores de precursores endógenos (Barrio, 1961; Alexander et al., 1988).

- **Peptídios hipotensores** – da biblioteca de cDNA de glândula de veneno de *C. durissus terrificus*, espécime 9706, foram isolados isoformas de dois precursores de peptídios da família dos potenciadores da bradicinina (BPP) e dos peptidios natriuréticos do tipo C (GenBank nº de acesso AF308593 e AF308594) (dados não publicados).

Fator de crescimento de nervos (NGF) - um cDNA do precursor de NGF foi também isolado da biblioteca de glândula de veneno de *C. durissus terrificus*, espécime 9706 (GenBank nº de acesso AF306533) (dados não publicados).

Toxina analgésica – Giorgi et al. (1993) descobriu um fator analgésico no veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Administração subcutânea (s.c.), intraperitoneal (i.p.) ou oral (p.o) desse fator de peso molecular aparente de 3 kDa, mostrou um efeito antinociceptivo, que é abolido por tratamento com tripsina. Demonstração que morfina aumenta o efeito analgésico e naloxano antagoniza, sugere um mecanismo de ação similar ao da endorfina.

Crotamina, um peptídio tóxico (~5 kDa) que aumenta a corrente de sódio em células musculares e que causa mionecrose local. É discutida abaixo em detalhes.

1.6. A toxina Crotamina

A crotamina foi a primeira miotoxina básica a ser isolada do veneno de cascavel Sul – Americana, *Crotalus durissus terrificus* (Gonçalves e Vieira, 1950, 1956). É um dos componentes mais abundantes do veneno de cascavel Sul-Americana (Crotalus durissus terrificus) - o veneno bruto rende aproximadamente 10% de crotamina, por peso seco. A crotamina é um polipeptídio básico pequeno (PM 4400, pI 9,5), conectado por três pontes dissulfetos. A seqüência polipeptídica dessa miotoxina compartilha 92 % de similaridade com a de miotoxina-*a* proveniente do veneno de *Crotalus viridis viridis* (cascavel das pradarias), do oeste dos Estados Unidos (Ownby et al., 1976, Fox et al., 1979). Outras miotoxinas foram isoladas de diferentes espécies de serpentes do gênero *Crotalus* e visto compartilhar alta similaridade com a crotamina, constituindo uma família. São essas as miotoxinas I e II de *C. viridis concolor* (Bieber et al., 1987; Engle et al., 1983), o peptídio C de *C. viridis helleri* (Maeda et al., 1978) e a CAM-toxina de *C. adamanteus* (Samejima et al., 1987). Na figura 3 é apresentada a família dos peptídios tóxicos crotamina-símile de várias cascavéis do continente Americano.

Várias isoformas de miotoxinas têm sido observadas em pool de venenos e, também, no veneno de um único espécime adulto de *Crotalus* (Mebs e Kornarlik, 1984; Bobber et al., 1988; Griffin & Aird, 1990; Aird et al., 1991).

```
           10          20          30          40
YKQCHKKGGHCFPKEKICLPPSSDFGKMDCRWRWKCCKKGS---G    Crotamine
YKQCHKKGGHCFPKEKICIPPSSDFGKMDCRWRWKCCKKGS---G    Crotamine Ile 19
YKQCHKKGGHCFPKEKICIPPSSDEGKMDCRWKWKCCKKGS---G    Myotoxin-a
YKRCHKKEGHCFPKTVICLPPSSDFGKMDCRWKWKCCKKGSVNNA    Myotoxin 2 and 3
YKRCHKKEGHCFPKTVICLPPSSDFGKMDCRWKWKCCKKGSVN      Myotoxin I
YKRCHKKGGHCFPKEKICLPPSSDFGKMDCRWKWKCCKKGSVN      Myotoxin II
YKRCHKKEGHCFPKTVICLPPSSDFGKMDCRWKWKCCKKGSVNNA    S12909
YKRCHKKGGHCFPKTVICLPPSSDFGKMDCRWKWKCCKKGSVN      Toxic peptide C
```

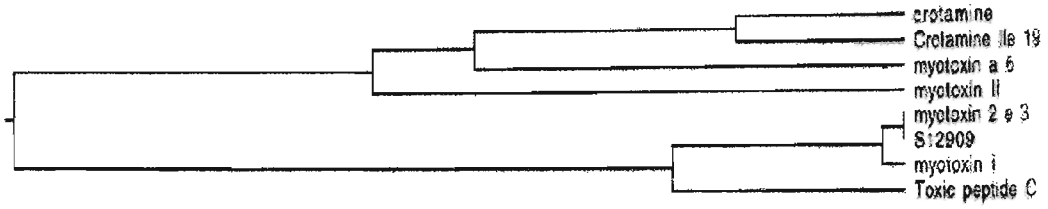


Figura 3. Família das miotoxinas crotamina-símile. O alinhamento foi feito com o programa CLUSTAL, usando a tabela de substituição PAM 150. O cladograma foi feito pelo método do Neighbor-joining. Crotamina, *C. d. terrificus* (Laure, 1975); crotamina Ile-19, *C. d. ruruima* (dos Santos et al., 1993); miotoxina-a, de *C. viridis viridis* (Fox et al., 1979); miotoxina 2 e 3/S12909, *Crotalus adamanteus* (Samejima et al., 1987); miotoxina I e II, de *C. virirdis concolor* (Bieber et al., 1987); peptidio C, *C. viridis helleri* (Maeda et al., 1978). Os resíduos de aminoácidos que diferem da crotamina estão destacados em negrito.

Ainda que os peptídios crotamina-símile são amplamente distribuídos entre as espécies de serpentes do gênero *Crotalus*, a presença dessas miotoxinas no veneno varia de acordo com a região geográfica em que uma determinada espécie ou subespécie habita (Schenberg, 1959a; 1959b; Aird, 1985; Straight et al., 1991; Nedelkov & Bieber, 1997; Santoro et al., 1999).

A crotamina causa, quando injetada intraperitonealmente, rápida paralisia (num tempo inferior a 15min) das patas traseiras de camundongo – um efeito típico dessa toxina. Dificuldade em respirar e rigidez muscular são também produzida, sugerindo uma ação veratrina-símile (Gonçalves, 1956). Em nível molecular e celular, a crotamina induz um aumenta da corrente de sódio voltagem-dependente (mediado por canais de Na^+) por despolarização acentuada (redução do potencial de repouso) da membrana dos miócitos das fibras musculares, junto às placas motoras – um mecanismo que é prevenido pela tetrodotoxina (TTX) (Hong and Chang, 1985; Brazil and Fontana, 1993, Matavel et al., 1998). Conseqüentemente, o influxo maciço de íons sódio causa dilatação do retículo sarcoplasmáticos dos miócitos e indução lenta de mionecrose restrita às células dos músculos esqueléticos (Ownby, 1998). Esse mecanismo, pelo qual a crotamina exerce sua toxicidade, é similar ao da miotoxina-*a*, mais extensivamente estudada (Cameron and Tu, 1978; Fletcher et al., 1996, Bieber & Nedelkov, 1997). Porém, a mitoxina-*a*, que difere de somente três resíduos de aminoácidos, causa aumento da concentração de íons cálcio no espaço miofibrilar (e contração do músculo). O aumento da concentração desse íon se daría pela interação da toxina com a enzima Ca^{2+}-ATPase do retículo sarcoplasmático – impedindo a recaptação, ou através da indução da liberação de cálcio dos estoques intracelulares mantidos pela proteína calsequestrina, pela interação com uma proteína regulatória associada à calsequestrina ou, ainda, interagindo com receptores de rianodina (Utaisincharoen, 1991; Furukawa et al., 1994; Okhura et al., 1994; 1995; Yudkowisky, 1994; Hirata et al., 1999). Ainda que um panorama geral sobre os alvos celulares da crotamina e miotoxin-*a* tenha sido delineado, não está completamente definido se há uma especificidade de ação para essas toxinas, isto é, se a interação da crotamina com canais de Na^+ ou da miotoxina *a* com o estoque de Ca^{2+} é devido aos diferentes resíduos de amino ácidos que compõem as duas toxinas, porém levando ao mesmo efeito final - paralisia muscular imediata e mionecrose tardia.

1.7. Emprego das toxinas de veneno de serpentes na medicina

O mais velho relato do envenenamento humano por serpentes é registrado em papiro do antigo Egito, datando de 1600 a.C. (Hearst Medical Papyrus, 1600 B.C.). Tais escritos foram levados para a Grécia antiga (Dioscorides, 37-68 a.C.). Como ilustrado em *nidan* – os escritos Indianos ilustrados de Susrate, datado de 2500 a.C, os venenos de serpentes seríam usados para prolongar a vida. Talvez, esses tenham sido as primeiras considerações sobre o emprego do veneno de serpentes em medicina. Entretanto, somente no séc. XVI o veneno de serpente começou a ser tratado como matéria científica – no conceito ocidental, por Jacques Grevin (1568) (Devi, 1959).

Desde então, vários componentes tóxicos de veneno de serpentes serviram como modelo para o desenvolvimento de novas drogas ou têm sido usados como ferramenta biológica ou mesmo em terapia (Stocker, 1990; Harvey, 1993, Ohizumi, 1997).

Entretanto, dois exemplos são dignos de nota. Um deles, constituindo um dos maiores sucessos na busca de produtos naturais para uso farmacêutico, é o caso do desenvolvimento do anti-hipertensivo Captopril, que se deu nos laboratórios do Squibb Institute for Medical Research, USA. Esse teve como substância protótipo peptídios hipotensores, BPPs (bradikinin-potentiating peptides), do veneno de jararaca (*Bothrops jararaca*: Crotalidae), a partir do qual diversos análogos, inibidores da enzima conversora da angiotensina I (ACE) - uma carboxipeptidase, foram sintetizados e um deles, o captopril,- bem sucedido no controle da hipertensão arterial (Ferreira & Rocha e Silva, 1965; Ferreira et al., 1970; Cushman et al., 1982; Ferreira, 1994; Opie & Kowolik, 1995; Cushman & Ondetti, 1999; Ferreira, 2000). Outro exemplo importante é o emprego de α-bungarotoxina para quantificar a distribuição de receptores colinérgicos em doenças como a *myasthenia gravis* (Tsujihata et al., 1980; 2001). Aquela é uma α-neurotoxina longa, isolada do veneno de *Bungarus multicinctus*, que interage quase irreversivelmente com receptors nicotínicos de acetilcolina (nAchR) das junções neuromusculares (Chang & Lee, 1963). A toxina é, portanto, um inibidor competitivo da acetilcolina e induz no animal um quadro de distúrbio motor (bloqueio da transmissão neuro-muscular) semelhante ao de pacientes miastênicos (Kennel et al., 1993).

2. OBJETIVOS

Tendo em vista que há várias isoformas de uma mesma toxina no veneno de um único espécime de serpente, que há variação intra-específica da composição do veneno de serpentes, que há duas populações de *C. durissus terrificus* que expressam ou não a crotamina no veneno e que há uma certa complexidade no mecanismo de ação da crotamina, os seguintes objetivos foram inicialmente propostos:

Construir bibliotecas de cDNA das glândulas de veneno e de bibliotecas genômicas de *C. durissus terrificus* crotamina-positivo e crotamina-negativo, para acessar os transcritos expressos na glândula de veneno, bem como dos genes tóxicos dessas serpentes;

Isolar os cDNAs precursores da crotamina a partir da biblioteca de cDNA e verificar se esses precursores são expressos em glândulas de espécimes de cascavéis crotamina-negativos;

Isolar, identificar e analisar o(s) gene(s) da crotamina de *C. d. terrificus* crotamina-positivo e do gene/pseudogene correspondente em espécime de cascavel crotamina-negativo;

Analisar a função dos produtos dos cDNAs precursores da crotamina isolados, através da preparação de toxinas recombinantes e peptídios sintéticos derivados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção dos espécimes de serpentes C. d. terrificus e excisão dos tecidos

Espécimes de cascavéis Sul-americanas (*Crotalus durissus terrificus*) crotamina-positivo e crotamina-negativo foram obtidos do Laboratório de Herpetologia, do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil. Os animais foram capturados em localidades bem demarcadas da região sudeste e centro-oeste. A tabela 1 relaciona o local de captura dos espécimes, o número de registro atribuído a cada um e o fenótipo em relação a crotamina.

Tabela 1.
Espécimes de *C. durissus terrificus* catalogadas de acordo com a localidade e a presença de crotamina no veneno ou do gene no genoma

Espécime nº	Local da captura	Crotamina no veneno (ou gene no genoma)*
***C.d.t.* 9315**	São Luís do Paraitinga - SP	**negativo**
***C.d.t.* 9315-2**	São Luís do Praitinga - SP	**negativo**
***C.d.t.* 9705**	Martinópolis - SP	**positivo**
***C.d.t.* 9706**	Martinópolis - SP	**positivo**
***C.d.t.* 001**	Campo Mourão - PR	**positivo**
***C.d.t.* 002**	Campo Mourão - PR	**positivo**
***C.d.t.* 00081**	Machado - MG	**negativo**
***C.d.t.* 00083**	Machado - MG	**negativo**

* verificado por ensaio imunoenzimático (ELISA) do veneno ou por PCR usando primers gene-específico e DNA genômico extraído do fígado

O veneno de cada serpente foi extraído três dias antes do sacrifício dos animais e, então, liofilizado e armazenado para emprego posterior.

As serpentes foram anestesiadas com dióxido de carbono e sacrificadas por decapitação. Os tecidos como glândulas, cérebro, coração, fígado, baço, pâncreas e rins foram cuidadosamente incisados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Os órgãos foram mantidos em freezer, a – 80 °C, até o momento do processamento.

3.2. Isolamento do RNA total

Os órgãos de *C. durissus terrificus* crotamina-positivo e negativo foram excisados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e mantidos a – 80 °C até o momento do uso. Cérebro, glândulas de veneno, coração, fígado, pâncreas e rins foram macerados separadamente sob nitrogênio líquido e os tecidos pulverizados rapidamente transferidos para solução de TRIZOL (INVITROGEN Life Technologies, San Diego, CA) ou para uma mistura ácida de tiocianato de guanidina-fenol-clorofórmio (Chomczynski and Sacchi, 1987). As misturas foram completamente homogeneizadas e as fases separadas por centrifugação (12000 x g, 15 min, 4°C). As fases aquosas foram coletadas e transferidas para tubos novos. Os RNAs foram precipitados com um volume de isopropanol e coletados por centrifugação (12000 x g, 15 min, 4°C). Os RNAs foram, então, secados ao ar e ressuspendidos em água desionizada tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). A quantificação foi feita por espectrometria de UV (OD_{260nm}) (espectrofotômetro Beckman DU620). As preparações aquosas de RNA foram mantidas a – 80°C ou, para evitar degradação, os RNAs foram re-precipitados e mantidos em formamida, a – 80 °C.

3.3. Isolamento do Poli (A^+) RNA

RNA poli (A^+) – RNA mensageiro, foi preparado a partir de um par de glândulas de veneno de um único espécime adulto de *Crotalus durissus terrificus* crotamina-positivo, usando o Kit Fast Track mRNA Isolation Kit (INVITROGEN Life Technologies, San Diego, CA). As glândulas, 810 mg, foram removidas três dias após a extração do veneno, quando o nível de síntese de RNA máximo é atingido (Rottenberg *et al.*, 1971), e rapidamente congeladas em nitrogênio líquido. As glândulas foram maceradas sob nitrogênio líquido e o pó de tecido transferido para um tubo cônico contendo 15 ml de tampão de lise, posteriormente, foram seguidos os procedimentos descritos no manual de instrução do Kit.

Alternativamente, o RNA poli (A^+) das glândulas de serpente crotamina-negativa foi preparado, a partir do RNA total, através da utilização do polyA Tract mRNA Isolation Systems (Promega, Madison, WI).

3.4. Isolamento do DNA genômico

Os ácidos desoxirribonucléicos genômicos foram extraídos e purificados de aproximadamente 1 g de fígado pulverizado, sob nitrogênio líquido. Os DNAs genômicos de cada espécime foi purificado na presença de proteinase K e SDS (Ausubel et al., 1995), conforme descrito sucintamente: um grama de fígado pulverizado de cada espécime foi transferido para tubo cônico estéril contendo tampão de extração de DNA genômico (Tris.HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 100 mM, SDS 0,5 % e 10μg/ml de RNase A, livre de DNase).A suspensão foi incubada a 65 °C por 25-30 min, com homogeinização eventual. Em seguida, proteinase K foi adicionada para uma concentração final de 100 μg/ml e a mistura incubada a 50 °C, por aproximadamente 12 h. A solução foi extraída com PCI (fenol: clorofórmio: álcool isoamílico, 25:24:1), por 10 minutos, por inversão do tubo. As fases aquosa e orgânica foram separadas por centrifugação a 5000 x g, por 15 min, em temperatura ambiente. A fase aquosa foi transferida para outro tubo e a extração repetida por mais duas vezes. Uma última extração foi feita unicamente com clorofórmio e o DNA genômico precipitado com etanol absoluto, após a adição de acetato de amônio para concentração final igual a 2,2 M. O DNA filamentoso foi cuidadosamente removido com uma alça de vidro e lavado com etanol 70 %, a temperatura ambiente. Após secagem ao ar, o DNA foi solubilizado em TE (Tris.HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) e quantificado por espectrofotometria de UV (OD_{260nm}). O DNA foi mantido numa concentração de 100 μg/ml, 4°C, até o momento do uso.

3.5. Síntese do DNA complementar (cDNA)

A síntese do cDNA foi realizada usando o Kit UniZAP XR (Stratagene, LaJolla, CA). A primeira fita foi sintetizada a partir de 6.9 μg de poly(A^+) RNA. Como primeira etapa, um oligonucleotídio de timina - olido$(dT)_{18}$, ligado com um sítio de restrição para *Xho*I foi incubado com os RNAs mensageiros. A partir da associação desse linker/primer, com a cauda de poliadeninda dos mRNAs moldes, foi catalisado a síntese da primeira fita de cDNA. A DNA polimerase RNA dependente - transcriptase reversa – empregada foi a de vírus causador de mieloblatose de roedores (MMVL - RT). A síntese foi conduzida na presença de 5-metil-dCTP para hemi-metilar e proteger a primeira fita de cDNA das digestões com enzimas de restrição dos passos de clonagem subseqüentes.

3.6. Construção da biblioteca de cDNA de glândula de veneno de C. durissus terrificus crotamina –positivo

Após síntese da segunda fita de cDNA, usando DNA polimerase I de *E. coli*, as terminaçãoes do cDNA foram feitas "blunt" com *pfu* DNA polimerase. Aos cDNAs foram ligados adaptadores com sítios *Eco*RI e *Xho*I, os quais foram finalmente digeridos com *Xho*I para liberar os adaptadores *Eco*RI. Os cDNAs resultantes, com sítio *Eco*RI na terminação 5' e sítio *Xho*I na terminação 3', foram fracionados por cromatografia de filtração em gel usando a resina Sepharose CL-4B. Os cDNAs foram então ligados ao vetor UniZAP XR - um derivado do fago λ (Stratagene, LaJolla, CA) e empacotados, usando o reagente Ready-To-Go Packing Extract Kit (AmershamPharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Os bacteriófagos recombinantes empacotados foram titulados, a biblioteca primária foi amplificada e armazenada em 7% DMSO, a - 80°C.

3.7. Construção das bibliotecas genômicas de C. d. terrificus crotamina-positivo e negativo

As bibliotecas genômicas foram construídas no vetor λFIXII, usando o Kit λFIXII/*Xho*I partial Fill-in Kit (Stratagene, La Jolla, CA). Cem micro-gramas dos DNAs de alto peso molecular (HMW-genomic DNA) isolados de fígado foram digeridos parcialmente com a enzima *Sau*3AI ou, alternativamente, *Bam*HI e os produtos de digestão resolvidos por eletroforese em gel de agarose a 0,9 %, em tampão TAE. Os produtos compreendidos entre 9 e 23 kb foram eletroeluídos e precipitados com etanol absoluto. Um micrograma foi ligado no vetor lambda FIXII, com T4 DNA ligase, a 4°C, durante 20 horas. Os fagos recombinantes foram empacotados com o Kit GigaPack III (Stratagene, LaJolla, CA) e usados para infectar células de *E. coli* XL1 Blue MRA. Após amplificação, a 7% de DMSO foram adicionados às bibliotecas, as quais foram divididas e armazenadas indefinadamente a – 80°C.

3.8. Rastreamento das Bibliotecas de cDNA e genômica por PCR

Desde que o rastreamento tradicional de bibliotecas para um precursor ou gene de interesse por hibridação de placas de lise é trabalhoso e consome muito tempo, um protocolo baseado no rastreamento por PCR foi empregado (Israel, 1993, 1995). Brevemente, a biblioteca de cDNA ou genômica foi subdividida em alíquotas de 1000 unidades formadoras de placa de lise (pfu) por poço, em uma micro-placa, e propagadas por aproximadamente 6 horas.

Então, amostras de cada poço foram removidas e testadas para a presença de cDNA da crotamina ou o seu respectivo gene, usando oligonucleotídios específicos (5'crot/5crot163, para o cDNA, ou H10/ 5crot163). Poços que continham clones positivos para cDNA ou o gene da crotamina foram identificados através da síntese de um produto de PCR de 100 pares de base e ~1100 bases, respectivamente, que hibridizam com um oligonucleotídio interno como sonda.

Um dos poços positivos foi subdividido em 25 pfu por poço, re-amplificado e rastreado, novamente, do mesmo modo. No terceiro rastreamento, foi possível isolar, aleatoriamente, clones únicos positivos, desde que a biblioteca foi enriquecida de clones com cDNAs da crotamina, para a biblioteca de cDNA, ou com o gene da crotamina, no caso da biblioteca genômica.

Os oligunucleotidios usados para o rastreamento da biblioteca baseado na reação de PCR foram "sense" 5'crot (5'-CAGTGTCATTAAGAAAGGAGG-3') e "reverse" 5crot163 (5'-ATGGACTGTCGATGGAGATG-3'). Cada mistura de reação de PCR (30 µl final volume) continha 30 pmoles de cada primer específico, 0.58 U *Taq* DNA polimerase, 200 µM de cada desoxinucleotídeo - dATP, dCTP, dGTP and dTTP, 3.5 mM $MgCl_2$, 1 x PCR buffer, and 1µl DNA molde (bacteriófagos recombinantes da biblioteca). Cada etapa de rastreamento por PCR continha um tubo sem DNA molde (controle negativo) e um tubo contendo uma alíquota de uma biblioteca de cDNA da miotoxina-*a* (controle positivo). As reações de PCR foram feitas em um termociclador térmico (*Perkin Elmer* 9600) por 30 ciclos de 94°C por 1 min, para denaturar o DNA molde, 43°C por 45 s para a associação do primer, 72°C por 1 min, para polimerização, após um ciclo inicial de 94°C por 4 min. Após o final de todos os ciclos, as amostras foram deixadas polimerizando a 72°C por 7 min, e mantidas a 4°C até análise em gel de agarose.

3.9. Análise dos produtos de PCR

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TAE, visualizado com brometo de etídio e transferidos para membrana de nylon carregada positivamente (GeneScreen Plus - Du Pont, Boston, MA) através de transferência alcalina - "alkaline downward capillary transfer" (Zhou *et al.*, 1994). A transferência foi completada em 2.5 horas. A membrana foi neutralizada com 2 X SSC e pré-hibridada a 42°C por 2 horas com 10 ml de uma solução de 6X SSC, contendo 5 X solução de Denhardt, 0.05% PP_i, 100 µg/ml de DNA de células espermáticas de salmão denaturado e 0.5% SDS.

A hibridação foi feita a 42°C, durante a noite, com uma solução de 6X SSC, contendo 1X solução de Denhardt, 0.05% PP_i, 100 µl/ml tRNA de levedura, 0.5% SDS e o oligunucleotideo, interno ao produto de PCR, HO7 (5'-GGCCGCTCTAGAACTAG-3') marcado com digoxigenina, através de um nucleotídio modificado, DIG-dUTP (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany), usando a enzima TdT (Terminal deoxydinucleotidyl transferase) (Vincent *et al.*, 1982; Ausubel, *et al.* 1994). As bandas que correspondem ao produto de PCR específico foram visualizadas através de imunodetecção com o conjugado anti-digoxigenina/fosfatase alcalina (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany).

3.10. Isolamento do gene da crotamina por "genome walking"

Um outro modo de isolar o gene de interesse foi através do "genome walking". A fim de isolar o gene da crotamina usando essa técnica, o Kit Universal Genome Walking (Clontech, Palo Alto, CA) foi empregado.

Os procedimentos foram essencialmente como descrito no manual do fabricante. Brevemente, um micrograma do DNA genômico de fígado do espécime de cascavel 9706 foi digerido com cinco diferente enzimas de restrição, que corta em "blunt" (*Dra*I, *Eco*RV, *Pvu*II, *Sca*I e *Stu*I), e os produtos de digestão foram ligados aos adaptadores AP1 e AP2. As cinco bibliotecas do "genome walking" foram amplificadas com o primer sense AP1 (5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3') e o primer gene específico reverso GSP2 (5'-ACTGTCGATGGAGATGGAAAATGCTGTA-3'), usando uma mistura para LD-PCR – Long distance PCR (eLONGase Enzyme Mix, INVITROGEN Life Technologies, San Diego, CA). Os produtos de PCR foram extraídos com um volume de PCI e 1 µl de cada reação foi re-amplificado com a mesma mistura para LD-PCR, exceto que os primers foram substituídos por primers internos à seqüência amplificada, AP2, sense (5'-ACTATAGGGCACGCGTGGT-3') e 3crot163, anti-sense (5'-CATCTCCATCGACAGTCCAT-3'). Os primers GSP2 e 3crot163 foram sintetizados a partir da seqüência 3' do cDNA da crotamina (Rádis-Baptista et al., 1999). Os produtos de PCR foram purificados através de MicroSpin Column HR-400 (AmershamPharmacia Biotech, Piscataway, NJ) e clonados no vetor pCR TOPO 2.1 (INVITROGEN Life Technologies, San Diego, CA).

3.11. Isolamento e clonagem do gene crotasin

Baseado na seqüência do gene da crotamina foram sintetizados dois oligonucleotídios, que correspondem às sequências 5'-UTR e 3'-UTR (untranslated region) do gene. São eles: PRO-S2 (5'-ACACTGCAAGTCCTGAGCCT-3') e NOR-RV (5'-TAGCAGGCGGCACTCTCAGGT-3'). Esses primers foram empregados para amplificar o psudogene da crotamina a partir de 1μg de DNA genômico, isolado do fígado do espécime 93015 (*C. d. terrificus* crotamina-negativo). A mistura de reação continha 10 pmoles de cada primer, 25 μl da mistura de eLONGase Enzyme mix (INVITROGEN Life Technologies, San Diego, CA). O protocolo para o LD-PCR foi modificado para TD-PCR (touch-down PCR): um passo de denaturação antes da amplificação de 94 °C por 30 s; 10 ciclos de 94 °C por 30s, 65°C por 30 s, menos 1° C por ciclo, 68 °C por 3 min; 25 ciclos de 94 °C por 30s, 55°C por 30 s, 68 °C por 3 min e, um passo adicional de 72°C por 7 min). Novamente, o produto de PCR foi purificado em MicroSpin column HR-400 e clonado no vetor pCR2.1- TOPO (INVITROGEN Life Technologies, San Diego, CA). As construções foram usadas para transformar células competentes de *E. coli* TOPO 10. A seleção das células recombinantes foi feita em placas de LB/ampicilina contendo X-GAL e IPTG. A células contendo os plasmídios recombinantes foram propagadas em meio LB, contendo ampicilina a 50 μg/mL e o DNA plasmidial purificado por coluna de troca-iônica (Wizard Plus MiniPreps DNA purification System, Promega, Madison, WI).

3.12. Análise da expressão da crotamina em glândula de veneno por Northern Blot

O northern blot foi feito com RNA total e RNA poli(A^+) de glândulas de um único espécime de *C. durissus terrificus* crotamina-negativo e com RNA poli(A^+) de glândulas de *C. durissus terrifcus* crotamina-positivo que foi usado na construção da biblioteca de cDNA. As glândulas de *C. d. terrificus* crotamina-negativo, capturado em São Luis do Paraitinga, São Paulo, Brazil, foram excisadas e rapidamente congeladas em nitrogênio líquido. Os RNAs (10 μg de RNA total e 0.5 μg de mRNA de espécimes crotamina-positivo e crotamina-negativo), purificados como descrito acima, foram separados por eletroforese em gel de agarose desnaturante contendo tiocianato de guanidina (Goda and Minton, 1995) e transferidos para membrana de nylon positivamente carregadas (GeneScreen plus - Du Pont, Boston, MA), com 10 x SSC, por aproximadamente 12 horas.

Os RNAs foram fixados à membrana a 80°C, sob vácuo, por 30 minutos. A membrana foi pré-hibridizada a 42°C por 2 horas em 50% de formamida, 5X SSC, 5X solução de Denhardt, 0.1% n-laurilsarcosina, 0.02% SDS e 100 μg/ml de DNA de células espermáticas de salmão denaturado. A hibridização foi realizada a 42°C, durante a noite, após a adição de 250 ng do cDNA da crotamina de 350 bp, previamente marcado com DIG-dUTP pela técnica de "incorporação de desoxinucleotídios marcados por PCR" (DIG DNA labeling Kit, Roche Molecular Biochemicals, Mannhein, Germany) a 5 ml da solução de pré-hibridização. A membrana foi lavada em condições de alta estringência e as bandas reveladas com conjugado anti-DIG/fosfatase alcalina (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany).

3.13. Análise da expressão de crotamina e crotasin por RT-PCR

A análise da expressão de crotamina e o gene relacionado à crotamina nos tecidos de cascavéis crotamina-positivas e negativas foi realizada por RT-PCR, usando a mistura de reação SuperScript One-Step RT-PCR (INVITROGEN Life Technologies, San Diego, CA). Usando essa mistura, que contém a DNA polimerase RNA-dependente (transcriptase reversa) SuperScript II H^- (atividade RNase H ausente) e Taq DNA polimerase Platinum complexada com anti-corpo (INVITROGEN Life Technologies, San Diego, CA), a síntese da primeira fita de cDNA e a amplificação do produto gene-específico são feitos em um único tubo. Como material de partida para essa análise, 200 ng de RNA total de cérebro, de glândulas de veneno, de coração, de fígado, de pâncreas e de rins de *C .d. terrificus* crotamina-positivo e negativo foram empregados. As reações de transcrição reversa e de PCR foram num volume de 50 μL, contendo 25 μL da solução de enzimas, 0,2 μM de cada primer específico (H10 e CCT-MRV, para amplificação do gene do crotasin e H10/5Crot163, para amplificação do gene da crotamina). Como controle foi empregado o produto de um gene constitutivo, isto é, β-actina, cujos primers específicos foram β-AC1 (5'-GCGGGAAATCGTGCGTGACATT-3'), resíduos 2106-2127 do gene, e β-AC2 (5'-GATGGAGTTGAAGGTAGTTTCGTG -3'), resíduos 2409-2432 (Meiri et al., 1997). As reações acopladas foram feitas essencialmente como descrito no manual do fabricante, que consiste na (1) síntese do cDNA e pre'-denaturação: incubação a 50 °C, por 30 min e 94 °C, por 2 min e (2) amplificação por PCR: 94 °C, por 15 s, 50 °C, por 30 s e 72 °C, por 1 min, durante 35 ciclos, em um termociclador Perkin Elmer, modelo 2400.

Os produtos do RT-PCR foram analisados em gel de agarose a 2,0 %, em tampão TAE, contendo 0,5 μg/mL de brometo de etídio. A imagem foi registrada com o auxílio do VDS ImageMaster (AmershamPharmacia Biotech, Piscataway, NJ), usando lâmpada de UV, como fonte de excitação.

3.14. Análise da presença do gene crotasin no genoma de C. d. terrificus crotamina-positivos por AR-PCR

Desde que o gene crotasin é expresso em diferentes tecidos de cascavel crotamina-negativa, exceto glândula de veneno foi verificado se esse gene estaría presente no genoma de cascavéis variante crotamina-positiva. Essa questão foi resolvida por PCR, em que DNA genômico purificado de fígado e primers gene-específicos (H10/PSI-RV) foram utilizados. Essencialmente, 200 μg de DNA genômico e 200 μM de cada primer, num volume de 25 μl, foram submetidos a 35 ciclos de 94 °C por 45 s, 65 °C por 45 s, 72 °C por 2,5 min, precedidos de um ciclo de 94 °C por 2 min. Um ciclo final de extensão a 72 °C por 7 minutos foi executado, antes da análise da amplificação. Os produtos foram resolvidos por gel de agarose a 1 % em TAE (Tris-acetato/EDTA) e visualizados com brometo de etídio, usando o sistema VDS ImageMaster (AmershamPharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

3.15. Análise das seqüências dos DNAs

Dois caminhos foram tomados para o procedimento de seqüênciamento das diversas construções que foram utilizadas nesse trabalho.

No caso dos clones isolados das bibliotecas de cDNA, os insertos dos fagos foram excisados do vetor UniZap XR e recircularizados na presença do fago assistente ExAssist Helper phage (Stratagene, LaJolla, CA), para formar o plasmídeo pBluescript phagemid. O seqüênciameno do DNA foi executado em ambas fitas do inserto excisado, pelo método de terminação da cadeia por incorporação de dideoxinucleotídeos (Sanger *et al.*, 1977), usando o ^{T7}Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) e os primers externos (SK, M13) e internos (5'crot, 5crot 163). Alternativamente, o DNA foi fluorescentemente marcado (*ABI Prism* dye terminator cycle sequencing, *Perkin Elmer*) e o seqüenciamento do DNA feito em um seqüenciador automático (*ABI Prism 377 - Perkin Elmer*). Todos os outros seqüenciamentos, descritos nesse trabalho, foram feitos automaticamente nos analisadores *ABI Prism 377*.

3.16. Bioinformática

Diversos programas foram usados para a análise das seqüências nucleotídicas e peptídicas. As seqüências de cDNAs foram traduzidas usando programas como o CLONE 3 (Scientific & Educational Software, USA) ou o EditSeq do pacote de software da LaserGene (DNAStar Inc., Madison, Wisconsin).

As seqüências de aminoácidos e nucleotídicas foram comparadas em diversas bases de dados como o SWISSProt (http://www.expasy.ch) ou o DDBJ (http://www.ddbj.jp), através do GeneBank, mantido pelo National Center for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nih.nlm.gov), usando o algorrítimo BLAST – basic local alignment search tool (Altschul *et al.*, 1990, 1997) com parâmetros de busca em default.

Como ferramenta de alinhamento, foram empregados os programas MACAW (Multiple Alingment Construction & Analysis Workbench) (Schuller *et al.*, 1991, Lawrence *et al.*, 1993, Karlin *et al.*, 1990) e MultiAlign do pacote de software da LaserGene (*DNAStar* Inc., Madison, WI). Essas ferramenteas se valem de diferentes programas para o multi-alinhamento de seqüências e construção de cladogramas (Page & Holmes, 1998, Patthy, 1999b). Por exemplo, os alinhamentos foram realizados, com o programa CLUSTAL (Higgins & Sharp, 1988; Thompson et al, 1994; Higgins et al., 1996) pelo método do "pairwise alignment" de todas as seqüências, usando uma matriz de substituição de aminoácidos PAM 150 (percent accepted mutation) (Dayhoff et al., 1983). Os cladogramas (árvores filogenéticas que computam o grau de mudança evolutiva) das seqüências alinhadas foram construídos pelo método do "Neighbor-joining prediction method" (Saitou and Nei, 1987).

3.17. Produção de crotamina e crotasin recombinantes

Dois sistemas de expressão foram empregados para a obtenção dos peptídios recombinantes tóxicos: (1) um sistema de expressão procarioto, *QIAexpressionist* (QIAGEN, Hilden, Germany), no qual o polipeptídio recombinate é expressado, em células de *E. coli*, com um cauda de seis resíduos de histidina; (2) um eucariótico (levedura), no qual o polipeptídio, em fusão com um fator de secreção, é produzido por células de *Pichia methanolica* (INVITROGEN Life Technologies, San Diego, CA).

3.17.1. Construção, expressão e purificação de 6xHis-crotamina em E. coli

O inserto da crotamina para a construção de vetores de expressão foi preparado por PCR, a partir da seqüência completa do seu cDNA (Rádis-Baptista et al., 1999). Os primers foram desenhados de forma a compreender a seqüência da toxina matura, bem como os sítios de restrição para *Bam*HI (primer sense) e *Bgl*II (primer reverso). São eles: CR-MA5 (5'-CGCGGATCCAAGATCCTTTATCTGCTGTT-3') e CR-AS3 (5'-CATTTTTCCCTTCACCTTCTAGATTCGAACCCC-3'). Após amplificação, o inserto contendo os sítios de restrição foi digerido duplamente com *Bam*HI e *Bgl*II, e o produto purificado em coluna MicroSpin S-400 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). O Vetor, plasmídio pQE-12 (QIAGEN, Hilden, Germany) foi também duplamente digerido com as mesmas enzimas, purificado e defosforilado usando fosfatase alcalina bacteriana (BAP) (Ausubel *et al.*, 1995). Inserto e vetor, assim preparado, foram ligados usando T4 DNA ligase. O plasmídio recombinante foi usado para transformar células de *E. coli* XL1 Blue (Stratagene, LaJolla, CA), quimicamente competentes. O DNA plasmidial foi propagado e purificado - lise alcalina e purificação em coluna de troca-iônica (Wizard Plus MiniPreps DNA Purification System, Promega, Madison, WI). A fusão em fase do inserto com a cauda de histidina foi confirmada através de seqüênciamento do plasmídio purificado.

Para a expressão da toxina, culturas de *E. coli* XL1 Blue/pQE12-crotamina foram crescidas em 100 mL de LB/ampicilina (200 µg/mL), em agitador (220 rpm), a 32 °C, até alcançar uma densidade óptica a 600 nm (DO_{600nm}) entre 0.6 e 0.9. Nessa densidade celular, a toxina foi induzida, pela adição ao meio, de 1 mM de IPTG, e mantido nessa condição por mais 4,5 h. As células foram colhidas por centrifugação (12000 x g/ 4°C/ 2 min), ressuspendidas em tampão de lise (fosfato de sódio 50 mM, 100 mM NaCl, 10 mM imidazol, 1 mM PMSF, aprotinin, pepstatin, leupeptin) e rompidas por sonicação (10 pulsos de 30 s, 200 – 300 W, com intervalos de 30 s em gelo). O extrato celular foi clarificado através de centrifugação (12000 x g/ 4°C/ 20 min) e o sobrenadante foi aplicado em uma coluna de Ni^{2+}-NTA Sepharose (AmershamPharmacia Biotech, Piscataway, NJ). A 6xHis-crotamina ligou com alta afinidade com a resina e eluiu com 0.7 M de imidazol, contido no mesmo tampão acima. Após a cromatografia de afinidade, a toxina recombinante foi concentrada (e o tampão trocado pó PBS), usando Centricon YM 3 (Milipore Co., PA).

3.17.2. Construção, expressão e purificação de crotamina e crotasin em Pichia methanolica

O vetor empregado nessa etapa é o plasmídio pMetα A (INVITROGEN Life Technologies, San Diego, CA). Após clonagem, suas principais características são: um cassete de expressão consistindo do promotor forte do gene da enzima álcool oxidasee (*AUG1*), o gene de interesse, a região de terminação de transcrição de *AUG1*, o gene *ScADE2* e a seqüência 3' de *AUG1*. O cassete de expressão é excisado do vetor, por enzimas de restrição, para a integração ao cromossomo da célula microbiana.

Quatro construções foram planejadas: pMetα A-6xHisCro (para produzir uma toxina com uma cauda de hexa-histidina), pMetα A-Cro (para produzir uma toxina completamente idêntica à toxina encontrada na natureza); pMetα A-6xHisCts (para produzir uma toxina que seria um produto que o gene crotasin codificaría, porém com uma cauda de poli-histidina) e pMetα A-Cts (para produzir peptídio crotasin).

Primers foram desenhados e sintetizados, que correspondem às regiões 5'e 3' do cDNA da crotamina mais os sítios de restrição de *Xho*I, *Bam*HI e *Spe*I. Assim, obtiveram-se os primers CR-EXP (sense), CR-XRV (anti-sense, para fusão com a seqüência de poli-histidina) e CR-XRS (anti-sense, com um stop codon antes da seqüência da poli-histidina). No caso dos primers para o crotasin, a seqüência que foi tomada como molde foi aquela do exon II do gene do crotasin (*Cts-p2*), descrita nesse trabalho, e depositada no GeneBank (Accession number AF250212), contendo também sítios de restrições contíguos às seqüências dos primers. Os primers são: PS-XPS (sense), PS-REV (anti-sense, que faz fusão do produto com hexa-histidina) e PS-XAS (anti-sense, com um stop códon, antes do início da seqüência que compreende a poli-histidina).

Combinações de primers foram planejadas para a obtenção dos produtos desejados, o que foi possível por meio de TD-PCR (touch down PCR). Nessa forma de PCR, nos primeiros dez ciclos do PCR a temperatura de annealing é cerca de 5°C acima do Tm dos primers. Experimentalmente, um ciclo inicial de 94°C/3 min foi seguido de 10 ciclos de 94°C por 45 s, 63°C por 45 s, -1,5°C por ciclo e 72°C por 1 min; 25 ciclos de 94°C por 45 s, 48°C por 45 s e 72°C por 1 min, e finalmente um ciclo de extensão a 72°C por 7 min e a 4°C até remoção das reações do termociclador. Os produtos de PCR foram purificados através de micro Spin column (HR 200, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway) ou através de Kit de purificação em coluna cromatográfica (INVITROGEN Life Technologies, San Diego, CA).

Uma vez purificados, os produtos foram duplamente digeridos com as enzimas *Xho*I e *Spe*I, para toxina de fusão, ou com *Xho*I e *Bam*HI, para toxina com stop códon original. Digestão simultânea (em paralelo) foi realizada com o vetor pMetα A. Finalizada as digestões, vetor linearizado e produtos de PCR com pontas coesivas preparadas, foram novamente purificados e ligados usando T4 DNA ligase, como feito convencionalmente.

As construções foram utilizadas para transformar, por eletroporação, células competentes de E.coli (2500V, 25 μF, 200 Ω, por 5s aproximadamente). As células foram transferidas para tubos de cultura contendo SOC e incubadas a 37°C, por uma hora. Após esse tempo alíquotas da suspensão bacteriana foram transferidas para placa de Petri contendo LB/ágar/ampicilina e incubadas em estufa a 37°C, durante uma noite. Os clones que cresceram, nessas placas foram analisados para a presença dos respectivos insertos, por AR-PCR (arbitrary PCR). Uma vez que as construções foram confirmadas por PCR, os DNAs plasmidiais foram preparados em escala suficiente para o seqüenciamento de DNA e para a excisão do cassete de expressão.

Definitivamente confirmado por seqüenciamento automático de DNA (ABI Prism 377, Perkin Elmer), os cassetes de expressão foram excisados através da incubação de 20 μg de plasmídio com *Pac*I (5U por μg de DNA). Completada adigestão dos plasmídios, os fragmentos foram extraídos com fenol:clorofórmio (1:1, v/v) e precipitados com 100% de etanol. Em seguida, 3 μg do inserto foram usados para transformar células eletrocompetentes de *Pichia methanolica* (750V, 25 μF, resistência infinita). Após eletroporação, 1 ml de YPAD (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 0,01% de adenina e 2% de dextrose) foi adicionado a cada suspensão de células transformadas e mantida a 30°C, por uma hora, sem agitação. As suspensões foram centrifugadas (1500 x g/ 3 min), o sobrenadante descartado e as células ressuspendidas em 100 μl de 1 x YNB ("yeast nitrogen base" com sulfato de amônio e sem aminoácidos). Dos 100 μl, 50 foram transferidos para placas de Petri, contendo MD/ágar (1,34% de YNB, 4 x 10^{-5} % de biotina, 2% de dextrose, 1,5 % de agar).

As placas inoculadas foram incubadas a 30°C até que colônias de transformantes (Ade^{+}) fossem detectadas (~ 2 dias). As colônias foram repicadas em placas de MM/agar (metanol ao invés de dextrose), para selecionar aqueles transformantes que crescem bem em metanol.

PCR foi também empregado para confirmar quais os transformantes de *P. methanolica*, possuíam os cassetes de expressão, com os cDNAs que codificam crotamina ou crotasin, integrados em seus cromossomos (Akada et al., 2000).

Para expressar as toxinas uma colônia de cada clone foi usada para inocular 10 ml de BMDY ("buffered dextrose-complex medium", 1% de extrato de levedura, 2 % de peptona, 100 mM de tampão fosfato pH 6,0, YNB a 1,34%, biotina a 4 x 10^{-5} %, dextrose a 2%) e propagadas a 30°C, 220 rpm, até saturação (OD_{600nm} ~ 2,0). As células foram coletadas por centrifugação (1500 x g, por 3 min) e lavadas com água deionizada estéril. Então 10 ml de BMMY (buffered methanol-complex medium) foram adicionados aos tubos com as células sedimentadas, para dar início à indução da expressão das toxinas, os quais foram incubados a 30°C, 220 rpm, por cinco dias. Passagem pare uma escala de 100 mL também foi feita.

Desde que as toxinas são secretadas no meio de cultura, os meios individuais de cada clone induzido foram concentrados de aproximadamente 20 vezes em Centricon YM-3 (cut off de 3 kDa, Amicon Co.), passados em coluna de filtração em gel (Sepharose G-50) e os picos protéicos liofilizados. Amostras de 10 µl foram usadas para análise em SDS-PAGE.

3.18. Síntese de oligopeptídios a partir da seqüência da crotamina e crotasin

Os oligopeptídios sintéticos, derivados das seqüências da crotamina e do crotasin foram preparados em fase sólida, por reações de acoplamento C-terminais de amino ácidos monoméricos protegidos com t-BOC (tertbutioxicarbonil – amino ácidos), e purificados por RP-HPLC (reverse phase – high performance liquid cromatography) (Takara Biomedicals, Japan). Os pesos moleculares dos peptídios foram comprovados por espectrometria de massa – MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption/ionisation time of flight) Os seguintes oligopeptídios foram sintetizados:

SR-CTS1 – RCRSPSTSIGQDCR;

SS-CTS2 – PCPSGTTSIGQQDCR;

SI-CRT1 – ICLPPSSDFGKMDCR;

SI-CRT2 – ICAKPSSDFGKDGCR.

3.19. Imunoblot e imunodetecção

O anticorpo anti-crotamina foi desenvolvido em coelho, conforme descrito em Oguiura et al. (2000). O anticorpo anti–crotasin foi preparado a partir de um oligopeptídio sintético, CPSGTTSIGQQD (resíduos 16 a 27 do crotasin), conjugado com o carreador de hapteno KLH – keyhole limpet hemocyanin, uma proteína respiratória de molusco (Takara Biomedicals, Japan).

As toxinas e peptídios recombinantes, bem como aquela purificada de veneno, foram separadas em gel de acrilamida a 15 % (SDS-PAGE, 15%T/2,7%C) e transferidas para membrana de PVDF (Milipore) em sistema semi-seco (TransBlot SD,Bio-Rad, Ca). O sítios não específicos da membrana de PVDF foram bloqueados com 10 % de gelatina em TBS-T (tampão Tris.HCl 100 mM, pH 7,0/ 100 mM NaCl, 0,15% de Tween 20), por 1 h, a temperatura ambiente. A membranda foi enxaguada com TBS-T e incubada com anticorpos anti-crotamina (1: 6000) ou anti-crotasin (1: 3000) em TBS-T/2% de gelatina, por 1 h, a temperatura ambiente. Após incubação com um desses anticorpos primários, a membrana foi lavada duas vezes com TBS-T, por 15 min e com troca do tampão entre as lavagens. A membrana foi, então, incubada com anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (IgG-HRP) em TBS-T (1: 6000). Finalmente, a membrana foi coberta com substrato para peroxidase e os sinais da reação quimioluminescente (ECL Western blotting anlysis system, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) foram detectados com filme fotográfico, após 15 minutos de incubação.

3.20. Determinação da atividade antibiótica

A técnica empregada para análise de propriedades antibiótica de peptídios é essencialmente como descrita em Hetru & Bullet, 1997 e Steinberg & Lehrer, 1997. Cepas de bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 2523 e *Micrococcus luteus*) e Gram-negativas (*E. coli* ATCC 25922, *E coli* desinterogênica) foram testadas.

A técnica envolveu a microdiluição da subtância potencialmente antibiótica em microplaca e determinação da concentração inibitória mínima (MIC). Sucintamente, a substância foi ensaiada em microplacas de ELISA, num voluma final de 100 µl de meio de cultura (Müeller-Hinton broth - MHB, Luria Bertani's rich medium – LB ou poor broth medium – 1% de bactotriptona/0,9% NaCl).

Pré-inóculos das cepas bacterianas foram preparados em meio LB, a partir de uma colônia, por incubação a 37°C (alternativamente a 25 °C), com agitação (200 – 220 rpm). A DO_{600nm} foi determinada e uma alíquota dessa suspenção utilizada par inocular meio pobre ou MHB, a fim de se obter células bacterianas em fase logarítimica (OD_{600nm} ~ 0.6). A suspensão foi, então, diluída de 6000 vezes, com meio pobre ou MHB. Noventa microlitros das suspensões bacterianas diluídas foram transferidos para cada poço das placas de microtitulação e os peptídios a serem testados adicionados, num volume de 10 µl (em água desionizada estéril ou 0,01% de ac. Acético). As placas foram incubadas a 37 °C (ou 25 °C), com agitação, e o crescimento ou inibição do crescimento avaliado pela medida da absorbância a 600 nm, em intervalo de 12 e 24 horas, usando um leitor de microplacas. Os valores de MIC obtidos se referem àquelas concentraçõe mínimas dos peptídios na qual houve inibição do crescimento dos microorganismos testados.

3.21. Análise de diferenciação de células-tronco embrionárias de camundongo

A idéia de utilizar células-tronco embrionárias de camundongos na análise funcional de toxinas animais é coincidente com a introdução da técnica pelos Dr. Alexander Kerkis e da Dra. Irina Kerkis, professores visitantes do laboratório da Profa. Lygia da Veiga Pereira, Depto. de Biologia, Instituto de Biociências da USP (Kerkis et al., 2001).

Como os conceitos relacionados a esse tópico não foram abordados anteriormente, uma breve introdução é feita, antes da descrição da parte experimental.

O período embrionário é extremamente complexo e vulnerável durante o desenvolvimento de um organismo. Para que o desenvolvimento normal seja atingido, deve ocorrer uma série de eventos interligados (divisão celular, diferenciação, apoptose, migração de células, entre outros) que são controlados por diferentes genes. É importante que determinados genes se expressem no momento certo para iniciar a diferenciação celular correta no embrião. A maioria dos genes que controla o desenvolvimento é extremamente conservada mesmo em espécies filogeneticamente distintas. Portanto, é razoável assumir que as alterações no padrão de expressão desses genes que podem ocorrer em animais de laboratório, podem causar os mesmos efeitos em humanos.

Diferenciação de células-tronco embrionárias (ES) in vitro e formação dos corpos embrióides

A capacidade de células ES de diferenciar sob condições específicas em uma grande variedade de células, simulando *in vitro* o desenvolvimento de um embrião pré-implantado, tornou-as um modelo importante nos estudos de mecanismos da diferenciação celular (Keller, 1995). Porém, esse modelo tem sido pouco utilizado para testar os efeitos das substâncias tóxicas e biologicamente ativas no desenvolvimento embrionário *in vitro*, apesar de óbvias vantagens: células ES são células normais, possuem o cariótipo normal, uma proliferação não limitada em cultura, podem ser obtidas em quantidades suficientes e podem ser induzidas à diferenciação *in vitro* nos precursores de vários tipos de células.

Se remover os fatores que mantêm sua pluripotência, as células ES entram no programa da diferenciação. Quando cultivadas em suspensão, células ES formam espontaneamente agregados de células diferenciadas chamadas "corpos embrióides" (Ebs – do inglês, "*embryoid bodies*"). No sétimo ao décimo dia do desenvolvimento dentro do complexo Ebs ocorre contração espontânea de cardiomiócitos (Doetschman et al., 1985; Risau et al., 1988).

Em seguida, identifica-se dentro de Ebs uma grande variedade de linhagens embrionárias (hematopoiéticas, neuronal, endotelial, cardíaca e muscular) através de análises morfológicas, imuno-histoquímicas e moleculares (Schimtt et al., 1991; Wiles and Keller, 1991; Wang et al., 1992, Bain et al., 1995; Fraichard et al., 1995; Bautch et al., 1996; Ling and Nebenm 1997).

Os estudos dos genes que se expressam durante o desenvolvimento de Ebs, utilizando hibridização *in situ* de RNA, junto com o painel de genes estágio e linhagem-específicos, indicam a presença de três folhetos embrionários formados durante a gastrulação e a organogênese precoce em Ebs. Além do mais, foi mostrado que estes genes marcadores são capazes de manter *in vitro* as mesmas relações espaciais e temporais que in vivo (Leahy et al., 1999). Este programa de desenvolvimento precoce em EBs pode ser mudado sob o efeito de substâncias tóxicas e biologicamente ativas diferentes.

Experimental

As propriedades específicas de células ES de camundongos levaram à idéia de utilizá-las como um modelo para a toxicologia *in vitro*. Este modelo permite estudar os efeitos dos agentes farmacológicos na determinação precoce de linhagens celulares e na organogênese em mamíferos, assim como estudar os mecanismos da sua atuação em nível tecidual, celular e subcelular.

Os primeiros testes com toxinas de serpentes, particularmente a crotamina, objetivaram: (1) determinar a concentração tóxica e de trabalho da crotamina, empregando células ES; (2) incubar corpos embrionários (EBs) com uma solução de crotamina não tóxica; (3) obter agregados de células ES, na presença de crotamina (não incubação posterior).

Experimento I:

Para realização dos experimentos com a crotamina, as células HM-1 foram mantidas sem feeder, mas na presença de LIF (leukemia inhibitory factor), por aproximadamente 3 passagens. No experimento I, concentrações decrescentes de crotamina, cujas quantidades são compráveis às que são estabelecidas para o ácido retinóico, foram utilizadas: 4×10^{-6}, 2×10^{-6}, 10^{-6},10^{-7} M. Células HM-1 foram plaqueadas com LIF (densidade média $\sim 10^{-5}$ células/placa de 35 mm de diâmetro). No dia seguinte, quando pequenas ilhas de células foram formadas, o meio foi trocado e a solução de crotamina adicionada. As placas, nesse estágio, foram mantidas sem LIF.

Experimento II:

Corpos embrionários (EBs) foram obtidos seguindo o protocolo de Spielman et al., 1997. A suspensão de células foi gotejada sobre a tampa da placa de Petri invertida. A tampa, com as gotas (25 μl) aderidas na superfície, foi desvirada e posicionada sobre o fundo da placa preenchida com PBS. No terceiro dia, os EBs foram transferidos para outra placa, onde os EBs aderiram e se diferenciaram. A partir desse momento a solução de crotamina foi adicionada.

Experimento III:

Células ES foram obtidas e agregados dessas células foram permitidos formar, porém na presença de crotamina. Para isso, células ES foram transferidas para placas cobertas com agarose. No terceiro dia, Ebs simples e complexos são observados. Os agregados foram transferidos para placa de Petri sem agarose.

3.22. Conjugação da crotamina com o corante fluorescente Cy3

A crotamina foi conjugada com o corante fluorescente Cy3, suprido na forma bifuncional de um éster do tipo NHS, no kit FluoroLink Cy3 reactive dye pack (Amersham Pahrmacia Biotech, Piscataway, NJ) essencialmente como descrito. Um miligrama de crotamina purificada por HPLC (Prof. E. B. de Oliveira) foi ressuspendida em 1 mL de tampão carbonato/bicarbonato de sódio 100 mM, pH 9,3 e a solução transferida para um microtubo contendo o corante. A solução foi homogeneizada e incubada a temperatura ambiente por 30 minutos, com eventual homogeneização a cada 10 min. A toxina marcada foi separada do corante não conjugado por meio de filtração em gel (Sepharose G-50). As frações contendo a crotamina-Cy3 foram reunidas e concentradas e o tampão em Centricon YM-3. Durante a concentração o tampão foi trocado para PBS (tampão fosfato/NaCl). A razão entre corante e proteína (D/P) foi determinada em um espectrofotômetro Beckman DU 600, nos comprimentos de onda 552 nm, para o Cy3, e 280 nm, para a toxina. As concentrações molares do corante e da toxina são calculadas, e a razão desses valores é o número médio de moléculas do corante acopladas a cada moléula de toxina. A crotamina-Cy3 foi mantida no escuro, a 4°C, sem outras manipulações, até o momento do uso.

3.2.3. Imunocitoquímica

A metodologia empregada, para detectar em quais tipos celulares a crotamina induz a diferenciação de células-tronco embrionárias, bem como localização celular do conjugado crotamina-Cy3, foi essencialmente como descrito em Spector et al. (1998). As células nervosas foram identificadas através de marcadores proteícos do neurofilamento, com a utilização do Glial Fibrilary Acid Protein Imunohistology Kit (Sigma Genosys, Texas). As imagens foram lidas em microscópio confocal de fluorescência, com os comprimentos de onda e filtros apropriados para cada sistema de fluorocromos.

Sucintamente, corpos embrióides foram incubados com solução de crotamina, entre 10^{-7} e 10^{-8} M, por 7 a 8 dias, sobre lamínulas de vidro. O meio nutriente foi removido por aspiração e as células lavadas com salina tamponada (PBS). Metanol absoluto (previamente resfriado a –20°C) foi adicionado em quantidade suficiente para cobrir as células e a fixação procedida, por 10 minutos, a temperatura ambiente. O metanol foi removido por aspiração e as células enxagüadas com acetona gelada (-20°C) por não mais que 1 minuto, a temperatura ambiente, para permeabilização celular. As células foram reidratadas com PBS e as incubações com anticorpos primário e secundário iniciadas. As preparações foram mantidas a 4°C, no escuro, até o momento da tomada das imagens.

Para a localização celular da crotamina-Cy3 os mesmos passos de indução da diferenciação dos EBs e fixação das células foram feitos, exceto que não houve detecção indireta da estrutura celular (incubação com anticorpos).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Seqüências de nucleotídios das isoformas dos precursores de crotamina

A fim de estudar os RNAs mensageiros precursores da crotamina, uma biblioteca de cDNA foi construída a partir de glândulas de veneno de um único espécime de *C. durissus terrificus* crotamina-positivo, capturado em uma região geográfica determinada..

Para o rastreamento da biblioteca, um método baseado na alta estringência das reações de PCR foi empregado. A especificidade dos produtos de PCR, obtidos no rastreamento da biblioteca, foi comprovada através de hibridação com um oligonucleotídeo interno marcado com digoxigenina-dUTP (resultados não mostrados). Quinze clones positivos para a crotamina foram isolados e seqüênciados.

Todos os cDNAs isolados possuem seqüências nucleotídicas que variam de 340 a 360 nucleotideos. Alinhamento dessas 15 seqüências, usando o programa MACAW, resultou em um grupo de seis tipos de seqüências, de acordo com as suas respectivas características estruturais (Figura 4).

```
KA13 --------CCAGAACCAGTCTCAGCATGAAGATCCTTTATCTGCTGTTCGCATTTCTTTTCCTT   56
KA19 --------CCAGAACCAGTCTCAGCATGAAGATCCTTTATCTGCTGTTCGCATTTCTTTTCCTT   56
MK24 --------CCAGAAC-AGTCTCAGCATGAAGATCCTTTATCTGCTGTTCGCATTTCTTTTCCTT   55
MK41 -------------------------TGAAGATCCTTTATCTGCTGTTCGCATTTCTTTTCCTT   48
                                M  K  I  L  Y  L  L  F  A  F  L  F  L

MK9  GGCACGAG---GAACCAGTCTCAGCATGAAGATCCTTTATCTGCTGTTCGCATTTCTTTTCCTT   53
MK38 GGCACGAG---GAAC-AGTCTCAGCATGAAGATCCTTTATCTGCTGTTCGCATTTCTTTTCCTT   52
                                M  K  I  L  Y  L  L  F  A  F  L  F  L

KA13 GCATTCCTGTCTGAACCAGGGAATGCCTATAAACAGTGTCATAAGAAAGGAGGACACTGCTTT  115
KA19 GCATTCCTGTCTGAACCAGGGAATGCCTATAAACAGTGTCATAAGAAAGGAGGACACTGCTTT  115
MK24 GCATTCCTGTCTGAACCAGGGAATGCCTATAAACAGTGTCATAAGAAAGGAGGACACTGCTTT  118
MK41 GCATTCCTGTCTGAACCAGGGAATGCCTATAAACAGTGTCATAAGAAAGGAGGACACTGCTTT  101
      A  F  L  S  E  P  G  N  A  Y  K  Q  C  H  K  K  G  G  H  C  F

MK9  GCATTCCTGTCTGAACCAGGGAATGCCTATAAACAGTGTCATAAGAAAGGAGGACACTGCTTT  116
MK38 GCATTCCTGTCTGAACCAGGGAATGCCTATAAACAGTGTCATAAGAAAGGAGGACACTGCTTT  115
      A  F  L  S  E  P  G  N  A  Y  K  Q  C  H  K  K  G  G  H  C  F

KA13 CCCAAGGAGAAAATATGTATTCCTCCATCTTCTGACTTTGGGAAGATGGACTGTCGATGGAGA  182
KA19 CCCAAGGAGAAAATATGTATTCCTCCATCTTCTGACTTTGGGAAGATGGACTGTCGATGGAGA  182
MK24 CCCAAGGAGAAAATATGTATTCCTCCATCTTCTGACTTTGGGAAGATGGACTGTCGATGGAGA  181
MK41 CCCAAGGAGAAAATATGTATTCCTCCATCTTCTGACTTTGGGAAGATGGACTGTCGATGGAGA  164
      P  K  E  K  I  C  I  P  P  S  S  D  F  G  K  M  D  C  R  W  R

MK9  CCCAAGGAGAAAATATGTCTTCCTCCATCTTCTGACTTTGGGAAGATGGACTGTCGATGGAGA  179
MK38 CCCAAGGAGAAAATATGTCTTCCTCCATCTTCTGACTTTGGGAAGATGGACTGTCGATGGAGA  178
      P  K  E  K  I  C  L  P  P  S  S  D  F  G  K  M  D  C  R  W  R

KA13 TGGAAATGCTGTAAAAAGGGAAGTGGAAAATAATGCCATCTCCATCTAGGACCATGGATATCTT  246
KA19 TGGAAATGCTGTAAAAAGGGAAGTGGAAAATAATGCCATCTCCATCTAGGACCATGGATATCTT  246
MK24 TGGAAATGCTGTAAAAAGGGAAGTGGAAAATAATGCCATCTCCATCTAGGACCATGGATATCTT  245
MK41 TGGAAATGCTGTAAAAAGGGAAGTGGAAAATAATGCCATCTCCATCTAGGACCATGGATATCTT  228
      W  K  C  C  K  K  G  S  G  K stop

MK9  TGGAAATGCTGTAAAAAGGGAAGTGGAAAATAATGCCATCTCCATCTAGGACCATGGATATCTT  243
MK38 TGGAAATGCTGTAAAAAGGGAAGTGGAAAATAATGCCATCTCCATCTAGGACCATGGATATCTT  242
      W  K  C  C  K  K  G  S  G  K stop

KA13 CAAGATATGGCCAAGGACCTGAGAGTGCCGCCTGCTATCGCTTTATCTTTCTTTATCTAAATAAA  311
KA19 CAAGATATGGCCAAGGACCTGAGAGTGCCGCCTGCTATCGCTTTATCTTTCTTTATCTAAATAAA  311
MK24 CAAGATATGGCCAAGGACCTGAGAGTGCCGCCTGCTATTGCTTTATCTTTCTTTATCTAAATAAA  310
MK41 CAAGATATGGCCAAGGACCTGAGAGTGCCGCCTGCTATTGCTTTATCTTTCTTTATCTAAATAAA  293
MK9  CAAGATATGGCCAAGGACCTGAGAGTGCCGCCTGCTATCGCTTTATCTTTCTTTATCTAAATAAA  308
MK38 CAAGATATGGCCAAGGACCTGAGAGTGCCGCCTGCTATCGCTTTATCTTTCTTTATCTAAATAAA  307

KA13 ATTGCTACCTATCAAACGCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAA----                        350
KA19 ATTGCTACCTATCA-ACGCTAAAAAAAAAA-------------                        340
MK24 ATTGCTACCTATCAAACGCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-----                       348
MK41 ATTGCTACCTATCAAA----AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA                        332
MK9  ATTGCTACCTATCAAA----AAAAAAAAAAAAAAAAAAA----                        343
MK38 ATTGCTACCTATCAAA----AAAAAAAAAAAAAAA---------                       337
```

Figura 4. Seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidas dos precursores das isoformas da crotamina, provenientes de seis clones de cDNAs (KA13, KA19, MK24, MK41, MK9 e MK38). Os cDNAs compreendem seqüências de 340 a 350 nucleotídeos, numerados do lado direito, codificando dois precursores de isoformas da crotamina. Substituições significantes de nucleotídeos são evidenciados por retângulos e o sinal de poli-adenilação marcado em negrito. As seqüências de aminoácidos são mostradas sob as seqüências de nucleotídeos, que são mostrados com código de uma letra. Elas incluem 22 aminoácidos do peptídeo sinal, 42 da crotamina matura e um resíduo de lisina que é removido após tradução. As seqüências de cDNAs descritas dos clones KA19, MK9 e MK41, foram submetidas ao GenBank e possuem os números de acesso AF044674, AF053075 e AF055988.

Todas seqüências predizem precursores da crotamina, quando comparado, com auxílio do BLAST, com seqüências de miotoxinas depositadas na base de dados do GenBank do NCBI, apresentam cisteínas conservadas, que são envolvidas nas pontes dissulfetos, e resíduos de aminoácidos básicos conservados, característicos dessa classe de miotoxinas (Figura 5). Esses precursores de crotamina possuem 63 aminoácidos, sendo os primeiros 22 resíduos correspondentes ao peptídeo sinal, os seguintes resíduos (de 23 a 62) incluem duas isoformas da crotamina e o aminoácido 63 corresponde a um resíduo de lisina, que é removido durante o processo pós-traducional. Das seis diferentes seqüências de cDNA, duas codifcam uma isoforma da crotamina que é identica àquela seqüência de aminoácido previamente publicada por Laure (1975) e as outras quatro seqüências de cDNA codificam uma isoforma da crotamina que possue um resíduo de isoleucina na posição 19 (crotamine-Ile 19).

```
Signature                          K.CH.K.GHCFPK..IC.PPSSD.GKMDC.W+.KCCKKGS...

2895610    MKILYLLFAFLFLAFLSEPGNAYKQCHKKGGHCFPKEKICIPPSSDFGKMDCRWRWKCCKKGSGK--  65
2981144    MKILYLLFAFLFLAFLSEPGNAYKQCHKKGGHCFPKEKICLPPSSDFGKMDCRWRWKCCKKGSGK--  65
MYX1_CRODU MKILYLLFAFLFLAFLSEPGNAYKRCHIKGGHCFPKEKICIPPSSDFGKMDCPWRRKCCKKGSGK--  65
MYX2_CRODU -KILYLLFAFLFLAFLSEPGNAYKRCHIKGGHCFPKEKICIPPSSDFGKMDCPWRRKSLKKGSGK--  64
MYX3_CRODU MKILYLLFAFLFLAFLSEPGNAYKRCHIKGGHCFPKGKICIPPSSDFGKMDCPWRRKCCKKGSGK--  65
MYX4_CRODU ---------------FLSEPGNAYKQCHKKGGHCFPKEKICIPPSSDFGKMDCRWRWKCCKKRSGK--  51
MYXC_CRODU -----------------------YKQCHKKGGHCFPKEKICLPPSSDFGKMDCRWRWKCCKKGSG---  42
MYX1_CROVV -----------------------YKQCHKKGGHCFPKEKICIPPSSDLGKMDCRWKWKCCKKGSG---  42
MYX_CROAD  -----------------------YKRCHKKGGHCFPKTVICLPPSSDFGKMDCRWRWKCCKKGSVNNA  45
MYXC_CROVH -----------------------YKRCHKKGGHCFPKTVICLPPSSDFGKMDCRWKWKCCKKGSVN--  43
MYX2_CROVV -----------------------YKRCHKKEGHCFPKTVICLPPSSDFGKMDCRWKWKCCKKGSVNNA  45
MYX2_CROVC -----------------------YKRCHKKGGHCFPKEKICTPPSSDFGKMDCRWKWKCCKKGSVN--  43
MYX1_CROVC -----------------------YKRCHKKEGHCFPKTVICLPPSSDFGKMDCRWKWKCCKKGSVN--  43
CRO_Ile-19 -----------------------YKQCHKKGGHCFPKEKICLPPSSDFGKMDCRWRWKCCKKGSG---  42
```

Figura 5. Alinhamento das seqüências de aminoácidos da crotamina e várias miotoxinas de serpentes do gênero *Crotalus*. Acima das seqüências, é mostrado o consenso ("signature") dessas miotoxinas, sendo que o sinal "+" indica resíduos básicos de aminoácidos alternativos. Seqüências 2895610 e 2981144 - precursores de isoformas da crotamina de *C. durissus terrificus* (Rádis-Baptista et al., 1999); MYX1_CRODU, MYX2_CRODU, MYX3_CRODU e MYX4_CRODU - seqüências da crotamina de *C. durissus terrificus* (Smith and Schmidt, 1990); MYXC_CRODU - crotamina de *C. durissus terrificus* (Laure, 1975); CRO_Ile-19 - crotamina Ile-19 de *C. d. ruruima* (dos Santos, 1993); MYX1_CROVV - miotoxina-*a* de *C. viridis virids* (Fox *et al.*, 1979); MYX_CROAD - CAM-toxina de *C. adamanteus* (Samejima et al., 1991); MYXC_CROVH - peptídeo C de *C.v.helleri* (Maeda *et al.*, 1978); MYX1_CROVC e MYX2_CROVC - miotoxina I e II de *C. viridis concolor* (Bieber et al., 1987).

4.2. Análise por Northern blot

Desde que existe variação regional na composição do veneno das serpentes, uma análise foi feita por Northen blot do RNA total e poli(A^+) de um espécime de cascavel (*C. durissus terrificus*) crotamina-negativo e RNA poli(A^+) do espécime crotamina-positivo. Como mostrado na Figura 6, uma banda de aproximadamente 0.4 kb, correspondente ao transcrito de crotamina é observado na caneleta carregada com amostra de poli(A^+) RNA crotamina-positvo. Por outro lado, nenhuma banda foi verificada nas canaletas carregadas com amostras de RNA total e poli(A^+) de espécime crotamina-negativo, apesar da grande quantidade de amostras empregadas. As seqüências de cDNA descritas, proveniente dos clones KA19, MK9 e MK41, foram submetidas ao GenBank e possuem os números de acesso AF044674, AF053075 e AF055988.

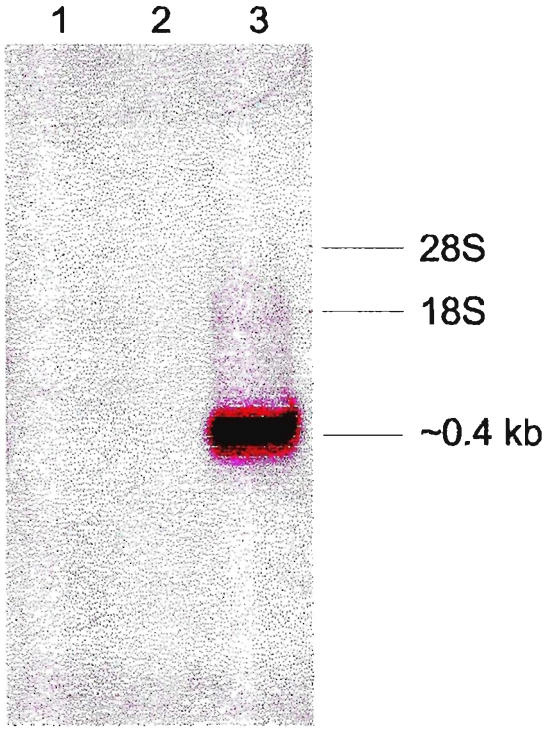


Figura 6. Análise por Northern Blot do RNA total e RNA poli(A^+) isolados de glândula de veneno de *C. d. terrificus* crotamina-positivo e crotamina-negativo. RNA total (10 μg) e RNA poli(A^+) (0,5 μg) de *C. d. terrificus* crotamina-negativo (1 e 2) e poli (A^+) (0,5 μg) de *C. d. terrificus* crotamina-positivo (3) foram hibridizados com uma sonda de cDNA da crotamina marcado com digoxigenina-dUTP (ver métodos). A migração das subunidades 18S e 28S do RNA ribossomal é indicada, bem como o tamanho relativo do RNA mensageiro da crotamina.

DISCUSSÃO

Nessa parte do trabalho, é relatado a presença de precursores de isoformas da crotamina, baseado na análise de seqüência de nucleotídeos dos cDNAs obtidos da glândula de veneno de um único espécime de *C. durissus terrificus*, capturado em uma região geográfica determinada.

Na busca de clones de cDNAs positivos para a crotamina, a biblioteca de cDNAs, construída com fagos recombinantes a partir de mRNA de glândulas de veneno, foi rastreada com um método baseado na reação de PCR (Israel, 1993, 1995). Os cDNAs agrupados para alinhamento máximo, inclui ORFs que variam de 340 a 360 nucleotídeos, que compreendem 5' UTRs de tamanhos variáveis, duas seqüências completas de cDNAs que predizem duas isoformas de precursores da crotamina, sinais de poliadenilação e, também, 3' UTRs de tamanho variáveis. Após tradução das seqüências de nucleotídeos em aminoácidos e comparação no banco de dados do OWL usando o programa BLAST, foi verificado que todas as seqüências de cDNAs codificam isoformas funcionais da crotamina, desde que apresentam seqüências inteiras do precursores dessa toxina.

Ademais, as seqüências de aminoácidos deduzidas apresentam a seqüência essêncial dos peptídios tóxicos crotamine-símile, ou das miotoxinas, isto é, KxCHxKx(2)HCx(2)Kx(3)Cx(8)Kx(2)Cx(2)[RK]xKCCKK, que representa as cisteínas conservadas, envolvidas nas pontes dissulfetos, e os aminoáciodos básicos conservados dessa classe de miotoxinas (Griffin & Aird, 1990).

Uma isoforma da crotamina descrita aqui possui a seqüência de aminoácidos idêntica àquela descrita por Laure (1975), através de microseqüenciamento de proteínas, enquanto a outra isoforma possui um resíduo de isoleucina (Ile) na posição 19 (crotamine Ile-19). Interessante, a existência de crotamina Ile-19 tem sido relatada somente no veneno de *C. durissus ruruima* (dos Santos et al., 1993) - uma subespécie de *C. durissus* que habita a região norte do Brasil, enquanto a subespécie *terrificus* é encontrada na região central e sul do país.

A determinação precisa do local de captura dos espécimes é muito importante para o estudo de toxinas, desde que a composição do veneno varia com a região e não está relacionado com das serpentes (Daltry et al., 1996). É sabido que as cascavéis (*C. d. terrificus*) podem ser classificadas adicionalmente pela presença ou ausência de crotamina em seus venenos em crotamina-positivo e crotamina-negativo (Schenberg, 1959a, b). A causa dessa diferença ainda não está esclarecida, mas, basicamente, deve ser em virtude da ausência de mRNA ou do gene da crotamina ou, bem como, um de seus componentes.

Para verificar se a falta de crotamina no veneno de espécimes de serpentes crotamina-negativo é devido a ausência de mRNA na glândula de veneno, foi feito uma análise por northern blot do RNA total e poli(A^+) de glândulas de um espécime de *C. d. terrificus* crotamina-negativo e RNA poli(A^+) de um crotamina-positivo, usando a seqüência inteira de um dos cDNAs dos precursores da crotamina como sonda. Os resultados indicaram a presença de um transcrito de aproximadamente 0.4 kb nas amostras de RNA mensageiros das glândulas de veneno de *C. d. terrificus* crotamina-positivo, que foi ausente em amostras de *C. d. terrificus* crotamina-negativo.

Em vista de nossos dados, alguns comentários devem ser feitos a respeito do trabalho de Smith & Schmidt (1990): (1) eles analisaram 4 clones e, ainda que a análise das seqüências de nucleotídeos prediz múltiplas variantes da crotamina, somente duas possuem o codon ATG e, portanto, codificando precursores funcionais; (2) essas múltiplas variantes mostram 5 a 6 substituições de aminoácidos em relação às seqüências descritas por Laure (1975) e dos Santos (1993) - uma alta taxa de substituição para um peptídeo de somente 42 aa, embora isso possa ocorrer; (3) desde que sua biblioteca foi construída a partir de glândulas de três *C. d. terrificus* de regiões desconhecidas, é difícil discutir a respeito do número de isoformas presentes em um único animal; (4) não está claro se os três animais eram todos cotamina-positivos.

As regiões codificadoras dos cDNAs da crotamina mostram um alto grau de conservação, mesmo naqueles clones em que se observa somente uma troca de nucleotídeo na posição 19 da seqüência da toxina (CTT → ATT). Em contraste, as regiões não traduzíveis 5' e 3' mostram algum grau de variação nucleotídica, ainda que se pode observar alguma similaridade com 5' e 3' UTRs da miotoxina-*a* de *C. viridis viridis* (Norris *et al.*, 1996).

Desde que há cDNAs precursores de duas isoformas da crotamina nas glândulas de veneno de um único espécime de *C. durissus terrificus*, seria interessante saber se aquele que codifica a crotamina Ile-19 sería também expresso, diferencial ou igualmente, em populações de *C. d. terrificus*.

CONCLUSÃO I

O screening por PCR é uma técnica bastante eficiente para vasculhar bibliotecas de cDNA, agilizando o processo de busca dos clones positivos e reduzindo o trabalho e material dispendidos;

A variação da composição do veneno de serpentes é um fato observável, entre espécies e dentro de uma mesma espécie. Aqui é mostrado uma variação dos mRNAs precursors da crotamina em um único espécime de cascavel;

RNA editing e modificações pós-traducionais são mecanismos de produção de variantes em diversas famílias de toxinas, contudo não é certo que a presença de cDNAs precursores com Ile na posição 19 da crotamina se trata de editing (desde que essa isoforma não foi detectada, até então, no veneno de *C. d. terrificus*). Por outro lado, é certo que o resíduo de lisina é removido após a tradução do RNA mensageiro;

Ainda, os transcritos da crotamina só são encontrados em pool de RNA mensageiros proveniente de glândulas de veneno de espécimes de *C. d. terrificus* crotamina-positivo.

4.3. Isolamento e organização estrutural do gene da crotamina (Crt-p1)

O gene da crotamina (Figura 7), número de acesso no GenBank AF223946 (*Crt-p1*, isolado de *C.d.t.* 9705) e AF223947 (*Crt-p1*, isolado de *C.d.t.* 9706), consiste de 1785 nucleotídios e, através da comparação com as seqüências de cDNA dos precursores da crotamina publicadas (Rádis-Baptista et al., 1999), é possível não só atribuir precisamente os limites dos exons e introns, mas também determinar o tamanho do transcrito primário. Esse gene contém 3 exons, contendo regiões codificadoras de 58, 124 e 13 nucleotídios (total de 195 nucleotídios), interrompidos por dois introns de 898 e 145 bp. As regiões de "splice" doadora 5' e receptora 3' estão em conformidade com a regra GT-AG, gAGGT/AGGa (Senapathy et al., 1990). O primeiro exon compreende a região 5'-UTR com elementos promotores e reguladores e 58 nucleotídios que codificam os primeiros 19 resíduos de aminoácidos (dos 22 resíduos) que caracterizam o peptídio sinal (ou seqüência líder) do precursor da crotamina; o segundo exon (124 bp) codifica os últimos três códons do peptídio sinal a e a maior parte da toxina matura (39 resíduos dos 42); o terceiro exon contém os códons dos 4 últimos resíduos carboxi-terminais da toxina (um resíduo é removido após a tradução), bem como a região 3'-UTR do cDNA da crotamina. Na região 5'-UTR do gene, o TATA Box (ATAATA) está localizada a –52 nt do códon de iniciação e outros sítios regulatórios hipotéticos como NF-κB, NF-1, SP-1 e GATA-1.

```
Crt-pl ttttcccaaaacccacccataaaaatgtgtcgcccatgatagcagtgccaaccccagatt    60
Crt-pl tccaccacttagttctaagggctcttcccaaagtccagccattggtgaacatggccgagc   120

Crt-pl attatcatcgtggactgtagagtttggacagcaattcagtaaggaattttctttgaccca   180

Crt-pl ttcggacactgcaagtcctgagcctcccatcttttatagccatagcaggttagatgttca   240


Crt-pl actaagtttgctgctcttctcagggcctttgtaacagctaacaaacaggagtgtttcaat   300

Crt-pl acaaggaagatgcaccgttgccttaggtaagaactattttgcaacagttcactgaggtga   360


Crt-pl tatgatgcaatgattacaactccataaatagagagccacgtctgtcccaggactaagatt   420

Crt-pl tggtccagaaccagtctcagcatgaagatcctttatctgctgttcgcatttcttttcctt   480
cDNA       ccagaaccagtctcagcatgaagatcctttatctgctgttcgcatttcttttcctt    56
                             M  K  I  L  Y  L  L  F  A  F  L  F  L
Crt-pl gcattcctgtctgaaccagGTaagaaataaaattactagataatttacaaaggattggta   540
cDNA   gcattcctgtctgaaccag                                             76
        A  F  L  S  E  P
Crt-pl actcactcctttttaaacaaatacgatcttcactgaaagtaggataatcttcaacatctt   600
Crt-pl tttgttttactttacagaaatagctttgaacagtatagactattgacagcatgagcctcc   660
Crt-pl aaagatttgaaaaatatgccattgatttttcttttcattcacaattcttgaaagagcttt   720
Crt-pl attggggtttttgttagtgtagcttattttgggggggtacgcttcactttagtattggtt   780
Crt-pl taccaaattctcagccaaatatgttttgtctgaataaggaggcacaatagagaaacagtt   840
Crt-pl tggtctaagtgattagagcaaaacactgcaactctgggtactgagttccagtcccacctt   900
Crt-pl gggcctgaaagctgactgagtgaatttggctaaactgacaggttttgataaaaagaaaag   960
Crt-pl aatataagttactattgtttctacttggaaactgcttctggcctttgtgcttggaggtgg  1020
Crt-pl aaagaatgatactatgaattttgggggtttactgattaaaacggatttgtttgaaaaatg  1080
Crt-pl gcttattcccacttaatacagaaaatgccaaaaatttgaaaaatccaatttcatgcccat  1140
Crt-pl tttactgcaacagggaatcggaagtcaacgccttttgtttctcccccccactttccacat  1200
Crt-pl ttccccttcccctatagttgttccttactatttgctttttattttgatatttttatgttc  1260
Crt-pl taaatgaataagaatataaattgataaaggaatcctgcagttctgtagaagaaggtagtg  1320
Crt-pl tcttggaaggaaaaatatatttaaatattaaggaatctttactcatcgtttacctgtctc  1380
Crt-pl ctctttttcttttcatAGggaatgcctataaacagtgtcataagaaaggaggacactgct  1440
cDNA                     ggaatgcctataaacagtgtcataagaaaggaggacactgct   118
                         G  N  A  Y  K  Q  C  H  K  K  G  G  H  C
Crt-pl ttcccaaggagaaaatatgtcttcctccatcttctgactttgggaagatggactgtcgat  1500
cDNA   ttcccaaggagaaaatatgtcttcctccatcttctgactttgggaagatggactgtcgat   174
       F  D  K  E  K  I  C  L  P  P  S  S  D  F  G  K  M  D  C  R
Crt-pl ggagatggaaatgctgtaaaaaGTaagaaaactaatagagatactacagatagagtacat  1560
cDNA   ggagatggaaatgctgtaaaaa                                         199
       W  R  W  K  C  C  K  K
Crt-pl catgagattctctgcctgatattgtctgcattcacaaagctttgcaaagcaaagaattta  1620
Crt-pl ctttaaactcactttgatcaacttattattttttttcatttgtatAGgggaagtggaaaa  1680
cDNA                                                  gggaagtggaaaa   212
                                                       G  S  G  K
Crt-pl taatgccatctccatctaggaccatggatatcttcaagatatggccaagggacctgagag  1740
cDNA   taatgccatctccatctaggaccatggatatcttcaagatatggccaagggacctgagag   272
       Stop
Crt-pl tgcctgctatcgctttatctttctttatctaaataaaattg                     1781
CDNA   tgcctgctatcgctttatctttctttatctaaataaaattgctacctatcaacgct       331
```

Figura 7. Seqüência nucleotídica do gene da crotamina (*Crt-pl*). O gene foi alinhado com o cDNA precursor de uma das isoformas da crotamina para atribuição dos limites entre os exons e os introns. Os elementos reguladores prováveis estão evidenciados por retângulos. Os exons se encontram sublinhados e a seqüência de aminoácidos é mostrada abaixo, em código de uma letra.

4.4. Identificação do gene crotasin (Cts-p2) – um gene intra-específico relacionado ao gene da crotamina

Foi demonstrado previamente que os transcritos do gene da crotamina são presentes somente em pool de mRNAs isolado do veneno da glândula de veneno de espécimes de cascavel crotamina positivo, mas não de crotamina-negativo (Rádis-Baptista et al., 1999). Entretanto, análise por Southern blot de DNA genômico, extraído e purificado do fígado de espécimes de *C. d. terrificus* crotamina-positivo e –negativo, indicou a presença do gene da crotamina ou um gene relacionado à crotamina em ambos os genomas (Oguiura et al., 1998). Esse fato vinha a indicar a presença e um provável gene defectivo da crotamina no genoma de cascavel crotamina-negativa, ou a presença de um gene relacionado a aquele.

Para isolar o gene relacionado ao *Crt-p1*, do genoma de cascavel crotamina–negativa, primers de oligonucleotídios, cujas seqüências flanqueiam o gene *Crt-p1*, foram sintetizados e empregados em LD-PCR (PCR de longa distância – ver métodos) usando, como molde, DNA genômico isolado de fígado. Essa reação rendeu um produto de ~ 2.5 kb (2482 nt), ~ 0,7 kb mais longo que o gene *Crt-p1*, de ~ 1.8 kb (1785 nt). Comparação dessa seqüência gênica amplificada com o gene *Crt-p1* revelou a presença do mesmo tipo de organização gênica, isto é, três exons interrompidos por dois introns de diferentes tamanhos e fases (Figura 8 e Tabela 2). Também, os mesmos elementos reguladores teóricos e sítios de processamento ("splice site") estão presentes, sugerindo que se trata de um gene funcional – o que foi compravado adiante. Por outro lado, um alto grau de divergência é observado no exon II de ambos genes (59 % de similaridade) (Tabela 3). Inserções e deleções também são detectadas, não só nos exons como nos introns. Inserções variam de um a centenas de nucleotídios - uma inserção de 760 bp no intron I decorre de uma duplicação de um segmento intrônico. A região codificadora (exônica), num total de 189 nt, compreende o peptídio sinal (66 nucleotídios), e o produto maturo (123 nucleotídios). Há um a deleção de seis nucleotídios (dois códons), que não alterou a fase de leitura, mas que permite formar um produto dois aminoácidos mais curto que a crotamina, de 43 resíduos. Na região que concerne à crotamina propriamente dita, substituições que totalizam 51 bases, das 123 presentes, resulta em substituições predominantemente não sinônimas, originando genes parálogos, com somente 11 aminoácidos conservados, dentre eles todos os seis resíduos de cisteína. Em decorrência desse achado (e com base em experimentos adicionais obtidos), foi dado a esse gene o nome de crotasin (*Cts-p2*) – número de acesso no GenBank AF250212.

Figura 8. Comparação entre as seqüências nucleotídicas do gene da crotamina (*Crt-p1*) e do gene do crotasin (*Cts-p2*). Os elementos que podem ligar proteínas regulatórias estão destacados por retângulos. Os nucleotídios do gene *Cts-p2,* que diferem do gene *Crt-p1,* estão evidenciados em preto. Os exons estão sublinhados e abaixo estão representadas as seqüências de aminoácidos dos dois genes. Os sítios de clivagem 5'-doador e 3'-aceptor estão em negrito, nos limites dos exons e dos introns.

```
                                TATA Box
Crt-p1 ttttcccaaaacccacccataaaaatgtgtcgcccatgatagcagtgccaaccccagatttccac    65
Cts-p2 ----------------------------------------------------ccgaccccgat------    12

Crt-p1 cacttagttctaagggctcttcccaaagtccagccattggtgaacatggccgagcattatcatcg   130
Cts-p2 ------------------------------------cca-t-gt-a-----gcc-------------g    32
                                                NF-KappaB
Crt-p1 tggactgtagagtttggacagcaattcagtaaggaattttcttttgacccattcggacactgcaag   195
Cts-p2 tgtgctg---------------------------gaattcgcccttt-----------cactgcaag    60

Crt-p1 tcctgagcctcccatcttttatagccatagcaggttagatgttcaactaagtttgctgctcttct   260
Cts-p2 tcctgagcctcccatcttttata-----tagcaggttagatgttcaactaagtctgctgctctcct   121
       NF-1                                  Sol
Crt-p1 cagggcctttgtaacagctaacaaacaggagtgtttcaatacaaggaagatgcaccgttgcctta   325
Cts-p2 cagggcttttgtaacagctaacaaataggagtgtttcaatacaaggaagatgcaccgttgcctta   186
                                                                TATA Box
Crt-p1 ggtaagaactattttgcaacagttcactgaggtgatatgatgcaatgattacaactccataaata   390
Cts-p2 ggtaagaactattttgcaacagttcactgaggtgatatgatgcaatgattacaactccataaata   251

Crt-p1 gagagccacgtctgtcccaggactaagatttggtccagaaccagtctcagcatgaagatccttta   455
                                                            M  K  I  L  Y
Cts-p2 gagagccacgtctgtcccagga-taagatttggtccagaaccagtctcagcatgaagatccttta   316
                                                            M  K  I  L  Y

Crt-p1 tctgctgttcgcatttcttttccttgcattcctgtctgaaccaggtaagaaataaaattactaga   520
         L  L  F  A  F  L  L  L  A  F  L  S  E  P
Cts-p2 tctgctgt-cgcatttcttttccttgcattcctgtctgaa-caggtaagaaataaaattact---   381
         L  L  S  A  F  L  L  L  A  F  L  S  E  S

Crt-p1 taatt-tacaaaggattggtaactcactccttttaaacaaatacgatcttcactgaaagtagga   584
Cts-p2 ---tt-tacaaaggattggtaactcactccttttaaacaaatacgatcttcactgaaagtagga   446

Crt-p1 taatcttcaacatcttttgttttactttacagaaatagctttgaacagtatagactattgacag   649
Cts-p2 taatcttcaacatcttttgttttactttacagaaatagctttgaacagtatagac-attga---   511

Crt-p1 catgagcctcccaaagatttgaa-------------------------------------------   671
Cts-p2 catgagcctcccaaagatttgaa-------------------------------------------   576

Crt-p1 ------------------------------------------------------------------   671
Cts-p2 ------------------------------------------------------------------   641

Crt-p1 ------------------------------------------------------------------   671
Cts-p2 ------------------------------------------------------------------   706

Crt-p1 ------------------------------------------------------------------   671
Cts-p2 ------------------------------------------------------------------   771

Crp-p1 ------------------------------------------------------------------   671
Cts-p2 ------------------------------------------------------------------   836

Crt-p1 ------------------------------------------------------------------   671
Cts-p2 ------------------------------------------------------------------   901

Crt-p1 ------------------------------------------------------------------   671
Cts-p2 ------------------------------------------------------------------   966

Crt-p1 ------------------------------------------------------------------   671
Cts-p2 ------------------------------------------------------------------  1031

Crt-p1 ------------------------------------------------------------------   671
Cts-p2 ------------------------------------------------------------------  1096
```

```
Crt-p1 ------------------------------------------------------------------  671
Cts-p2 [redacted]  1161

Crt-p1 ------------------------------------------------------------------  671
Cts-p2 [redacted]  1226

Crt-p1 ------------------------------------------------------------------  671
Cts-p2 [redacted]  1291

Crt-p1 ------------------------------------------------------------------  671
Cts-p2 [redacted]  1356

Crt-p1 ---------------------------------------------------aaatatgccatt  684
Cts-p2 [redacted]aaatatgccatt  1421

Crt-p1 gatttttcttttcattcacaattcttgaaagagctttattggggtttttgttagtgtagcttatt  749
Cts-p2 ga[redacted]ttttctttt[redacted]attcacaattcttgaaataactttattgggg[redacted]ttttgtt[redacted]tgtagcttatt  1486

Crt-p1 ttgggggggtacgcttcactttagtattggtttaccaaattctcagccaaatatgttttgtctga  814
Cts-p2 tt[redacted]gg[redacted]tacgcttcactttagtattg[redacted]tttacc[redacted]aattctcagccaaatatgttttgt[redacted]ga  1550

Crt-p1 ataaggaggcacaatagagaaacagtttggtctaagtgattagagcaaaacactgcaactctggg  879
Cts-p2 ataaggaggca[redacted]a[redacted]t[redacted]gagaaaca[redacted]tttggtcta[redacted]gtgattagagcaaaacac[redacted]caactctggg  1614

Crp-p1 tactgagttccagtcccaccttgggcctgaaagctgactgagtgaatttggctaaactgacaggt  944
Cts-p2 tactgagttc[redacted]a[redacted]tcccaccttgggcctgaaagctgactgagtgaatttggctaaactgacag[redacted]t  1678

Crt-p1 tttgataaaaagaaaagaatataagttactattgtttctacttggaaactgcttctggcctttgt  1009
Cts-p2 tttgataaaa[redacted]gaaaagaataaaagc[redacted]a[redacted]tattgtttctacttggaaactgctt[redacted]tgt  1733

Crt-p1 gcttggaggtggaaagaatgatactatgaattttgggggtttactgattaaaacggatt--tgtt  1072
Cts-p2 gcttg[redacted]g[redacted]g[redacted]g[redacted]aa[redacted]aatgatactatga[redacted]ttt[redacted]ggggtttactgatta[redacted]a[redacted]g[redacted]tt[redacted]t[redacted]  1796

Crt-p1 tgaaaaatggcttattcccacttaatacagaaaatgccaaaaatttgaaaaatccaatttcatgc  1137
Cts-p2 [redacted]ga[redacted]aaatggct[redacted]ttc[redacted]act[redacted]aatacagaaa[redacted]tgc[redacted]aaaa[redacted]ttt[redacted]a[redacted]a[redacted]t[redacted]a[redacted]tttcatgc  1857

Crt-p1 cc-attttactgcaacagggaatcggaagtcaacgccttttgtttctcccccccactttccacat  1201
Cts-p2 c[redacted]attttt[redacted]tgcaacagggaatcggaagtcaacgccttttgtttct[redacted]cccccccactttccacat  1922

Crt-p1 ttcccctt--------tccctatagttgttccttactatttgctttttattttgatatttttatg  1258
Cts-p2 ttcccctt[redacted]tccc[redacted]at[redacted]gttgttccttactatttgctttttattt[redacted]atatttttatg  1987

Crt-p1 ttctaaatgaataagaatataaattgataaaggaatcctgcagttctgtagaagaaggtagtgtc  1323
Cts-p2 tt[redacted]taaatgaataagaatataaat[redacted]gataaaggaatcctgca[redacted]ttctgtagaagaaggtagt[redacted]tc  2052

Crt-p1 ttggaaggaaaaatatatttaaatattaaggaatctttactcatcgtttacctgtctcctctttt  1388
Cts-p2 ttggaagg[redacted]aaaatatatttaaatattaaggaatctttactcatcgtttacctgtctcctctttt  2117

Crt-p1 tcttttcatagggaatgcctataaacagtgtcataagaaaggaggacactgctttcccaaggaga  1453
                   G  N  A  Y  K  Q  C  H  K  K  G  G  H  C  F  D  K  E
Cts-p2 tcttttcatagggaatgcc[redacted]a[redacted]acagtgtc[redacted]t[redacted]g[redacted]ac[redacted]gga[redacted]ctgc[redacted]at[redacted]cca[redacted]  2179
                   G  N  A  Q  P  Q  C  R  W  L  D  G  F  C  H  S  S

Crt-p1 aaatatgtcttcctccatcttctgactttgggaagatggactgtcgatggagatggaaatgctgt  1518
       K  I  C  L  P  P  S  S  D  F  G  K  M  D  C  R  W  R  W  K  C  C
Cts-p2 [redacted]tgtc[redacted]ct[redacted]a[redacted]ct[redacted]ct[redacted]g[redacted]ttggg[redacted]ag[redacted]ggactgtc[redacted]tgc[redacted]ga[redacted]tgctg[redacted]  2241
       P     C  P  S  G  T  T  S  I  G  Q  Q  D  C  L  W  Y  E  S  C  C

Crt-p1 aaaaagtaagaaaa-------ctaatagagatactacagatagagtacatcatgagattctctgc  1576
        K  K
Cts-p2 ataccgtaagaaaa[redacted]ctaatagagatactacagat[redacted]agtacat[redacted]atgagattctctgc  2306
        I  P

Crt-p1 ctgatattgtctgcattcacaaagctttgcaaagcaaagaatttactttaaactcactttgatca  1641
Cts-p2 ctgatattgtttgcattcacaaagctttgcaaagca[redacted]agaatttactttaaactcactttgatca  2370

Crt-p1 acttattattttttt-tcatttgtatagggaagtggaaaataatgccatctccatctaggacca  1706
                                   G  S  G  K  *
Cts-p2 acttattattttttt[redacted]tcatttgtatag[redacted]ga[redacted]tg[redacted]aaaataatgccatctccatctaggacca  2435
                                   R  Y  E  K  *

Crt-p1 tggatatcttcaagatatggccaagggacctgagagtgccgcctgctatcgctttatctttcttt  1771
Cts-p2 tggatatcttcaagatatggccaagg[redacted]acctgagagtgccgcctgcta  2482

Crt-p1 atctaaataaaattg  1785
```

Tabela 2. Comparação entre os exons e introns de Crt-p1 e Cts-p2

	Ctr-p1	*Cts-p2*
Tamanho (bp)	*1785*	*2482*
Exon I	*441 (5'-UTR) + 58 (CS)**	*302 (5'-UTR) + 58 (CS)*
Intron I	*898*	*1762*
Exon II	*124*	*118*
Intron II	*145*	*152*
Exon III	*13 (CS) + 104 (3'-UTR)*	*13 (CS) + 73 (3'-UTR)*

CS – seqüência codificadora; 3'- e 5'-UTR – região não traduzível 3' e 5'

Tabela 3. Grau de similaridade entre os exons e os introns de Crt-p1 e Cts-p2

	No. de bases trocadas/No. de bases totais	*Similaridade (%) em relação ao Crt-p1*
Peptídio sinal	*2/66*	*96,9*
Região codificadora crotamina	*51/123*	*59,5*
Introns	*81/1043*	*93,4*
5'-UTR	*29/441*	*93,4*
3'-UTR	*0/104*	*100*

4.5. Análise da expressão do gene Cts-p2 em C. d. terrificus por RT-PCR

A fim de verificar se o gene crotasin é expresso na glândula de veneno ou em outros tecidos da serpente, RT-PCR foi usado, empregando RNA total e primers específicos ao gene. A expressão de *Cts-p2* foi avaliada em seis diferentes órgãos de cascavel crotamina-negativa: cérebro, glândula de veneno, coração, fígado, pâncreas e rins. Conforme visto pela Figura 9, crotasin é majoritariamente expresso em pâncreas, seguido de coração, fígado e rins, enquanto é muito pouco expresso em glândula de veneno.

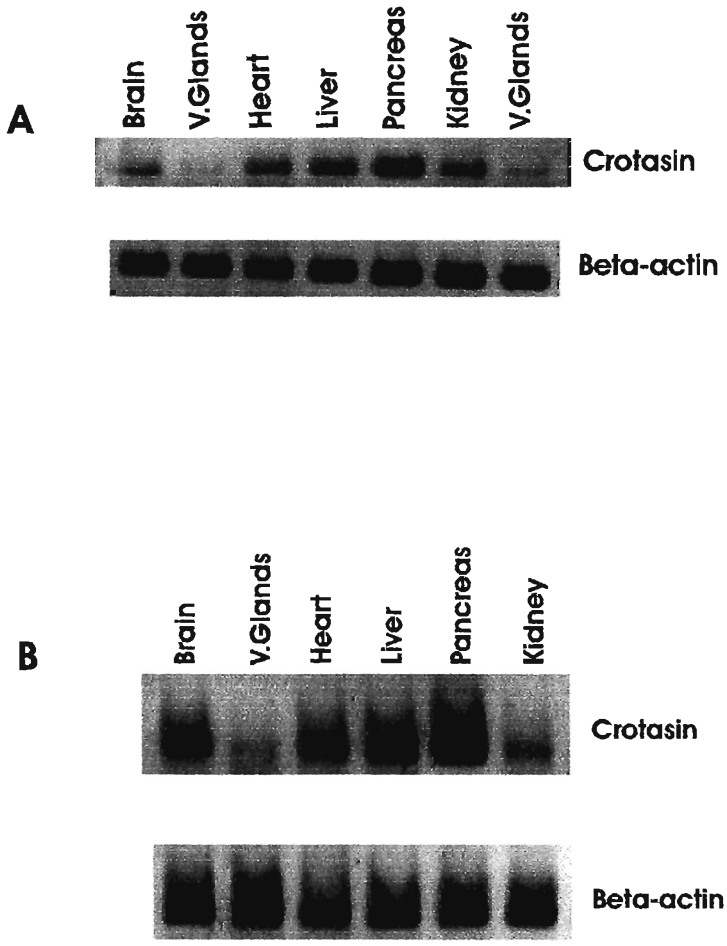


Figura 9. Expressão do crotasin em diferentes tecidos de *C. d. terrificus* crotamina-negativo. RNAs mensageiros de cérebro, glândulas de veneno, coração, fígado, pâncreas e rins foram isolados e utilizados no RT-PCR, com os primers específicos para o crotasin (H10 e CTS-RV). Como controle, um segmento da β-actina foi transcrito de forma reversa e amplificado com primers específicos. Em A, a reação de transcrição reversa foi feita separadamente da reação de amplificação. Em B, a reação de transcrição reversa e de amplificação foram procedidas em um único tubo.

4.6. Detecção do gene Cts-p2 no genoma de C. d. terrificus crotamina-positivo

Desde que *Cts-p2* é expresso em diferentes tecidos de cascavel crotamina-negativa, uma busca foi feita no genoma de *C. d. terrificus crotamina-positivo* para a presença desse gene. Usando DNA genômico de fígado de vários espécimes de *C.d.terrificus* crotamina-positivo e –negativo (como controle) e os primers específicos ao gene *Cts-p2* (primer sense H10 e anti-sense CTS-MRV), numa reação de PCR convencional, produtos de ~ 1.3 kb são obtidos, compatíveis com um segmento gênico que compreende o início da seqüência nucleotídica do peptídio sinal e da porção 3' final do exon 2 (correspondendo à porção carboxi-terminal da toxina madura). Porém, surpreendentemente, sem a duplicação do segmento intrônico, que caracteriza o gene Cts-p2 (Figura 10). A identidade desse produto foi confirmada por seqüênciamento do produto de PCR obtido do genoma de ambas variantes de cascavéis (resultados não mostrados).

DISCUSSÃO

A organização estrutural do gene da crotamina é muito similar àquela da maioria dos genes de toxinas: (a) o primeiro exon contém, além da região 5'-UTR, o peptídio sinal quase completo, seguido por um intron relativamente longo (~ 0,7 kb); (b) o segundo exon codifica a maior parte da toxina matura e é sucedido por um segundo intron curto (145 nt), e (c) o terceiro exon compreendendo a porção C-terminal da toxina e a região 3'-UTR do cDNA. Uma peculiaridade do gene *Crt-p1* é a fase dos introns que difere de outras toxinas: a terminação 3' dos exons I e III são interrompidos após o prmeiro nucleotídio do último códon (intron fase 1), enquanto o exon II tem sua terminação 3' interrompido pelo intron após o segundo nucleotídio do códon (intron fase 2). Os exons de outras toxinas, como os dos genes de neurotoxinas pós-sinápticas e de isoformas de cardiotoxinas (Fuse et al., 1990; Chang et al., 1997a; 1997b Afifiyan et al., 1999), são simétricos, isto é, os exons são interrompidos por introns de mesmas fases – nesses últimos casos, introns de fase 1.A Figura 11 mostra esquematicamente o tipo de organização gênica de *Crt-p1*, comparando esse gene com aquele de uma pequena toxina básica, i.e., o gene da cardiotoxina de *Naja naja sputatrix* (Lauchumanam et al., 1998), cuja atividade farmacológica não é relaciona à da crotamina.

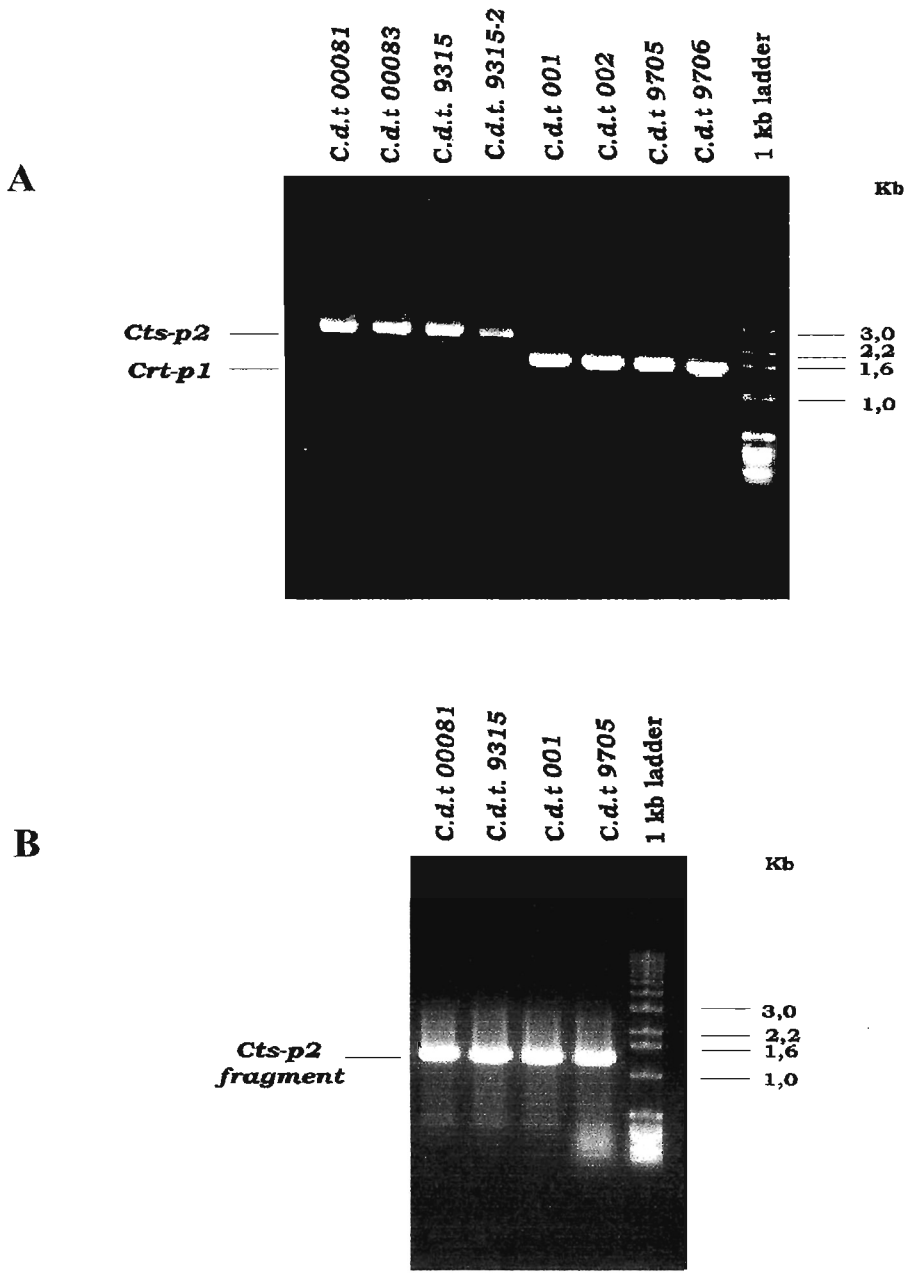


Figura 10. Identificação do gene crotasin (*Cts-p2*) no genoma de *C. durissus terrificus* crotamina-negativo e crotamina-positivo. DNAs genômicos isolados e purificados de fígado de cascavéis crotamina-positiva e negativa foram usados como molde, em uma reação de PCR (ver métodos). *C.d.t. 00081, 00083, 9315 e 9315-2* se referem a DNAs genômicos de *C. d. terrificus* crotamina-negativo, enquanto *C.d.t. 001, 002, 9705 e 9706*, aos de *C. d. terrificus* crotamina-positivo. Em A, são mostrados os produtos de amplificação que correspondem aos genes *Crt-p1* e *Cts-p2*. Em B, são mostrados fragmentos de *Cts-p2* amplificados com primers específicos e internos ao gene.

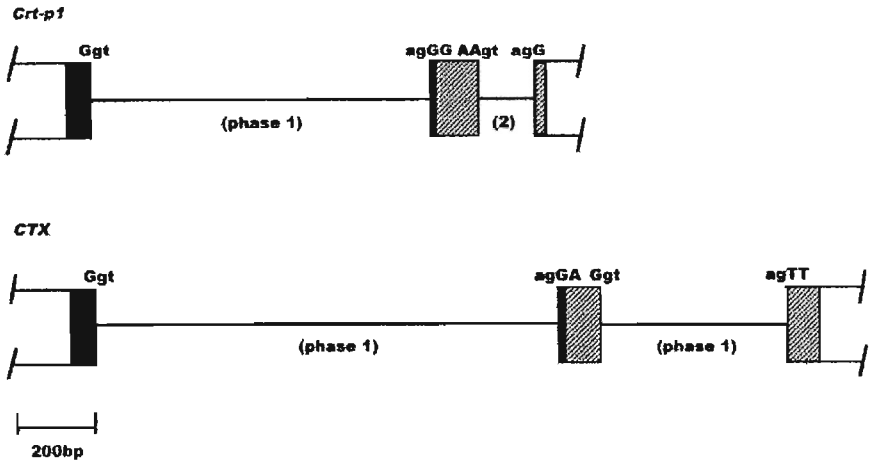


Figura 11. Organização Estrutural do gene da crotamina (*Crt-p1*) e comparação com o gene da cardiotoxina (*CTX*). O gene da crotamina (*Crt-p1*), do trabalho descrito aqui, e o gene da cardiotoxina - *CTX*, de *Naja naja sputatrix* (Lachumanan et al., 1998) são apresentados esquematicamente, nos quais os retângulos pretos indicam seqüências codificadoras para os respectivos peptídios sinais, enquanto os retângulos em malha representam as seqüências codificadoras para a toxina matura de ambos genes. As junções dos exons e introns são descritas, bem

Ainda que o gene da crotamina tenha sido isolado de dois espécimes diferentes de *C. d. terrificus* crotamina-positivo (*C.d.t.* 9705 e *C.d.t.* 9706) somente um tipo de gene codificando a crotamina foi isolado e identificado por duas técnicas diferentes, mesmo que uma busca intensiva tenha sido feita. Esse fato foi surpreendente desde que seis diferentes tipos de cDNAs precursores da crotamina foram encontrados (Rádis-Baptista et al., 1999). Dentre esses, precursores de duas isoformas da crotamina e quatro precursores com pequenas variações nucleotídicas na região 5'- e 3'-UTR. Conseqüentemente, sería esperado, como uma possível organização gênica, uma distribuição em "tandem repeat" do gene da crotamina. De fato, ao contrário de uma organização em tandem, a maior parte dos genes de toxinas é responsável também pela codificação de uma única molécula de cDNA e, portanto uma única cópia de peptídio tóxico por molécula de cDNA (e.g., Becerril et al., 1997; Lauchumanan et al., 1998, Chang et al., 1999). Contudo, em alguns casos, como as sarafotoxinas do veneno de Astractaspis (Ducancel et al., 1993), o próprio cDNA de toxinas se apresenta na forma de rosário, isto é, várias cópias do peptídio estão contindas na mesma molécula de cDNA. Ainda que a família da miotoxina crotamina-símile apresenta diversas variantes, somente uma pequena divergência das seqüências de aminoácidos tem sido observada (Figura 3).

Do gênero Crotalus, habitando as pradarias do oeste Americano (*Crotalus viridis viridis*), aos pampas Argentinos (*Crotalus durissus*), as miotoxinas dos venenos desses espécimes não mutaram muito - conservam 86 % de similaridade entre suas seqüências de aminoácidos (Ownby, 1998) – sugerindo que essas toxinas constituem produtos de uma origem recente. Considerando que tais pequenas toxinas básicas evoluíram recentemente, é de grande interesse traçar, baseado na organização gênica de *Crt-p1*, como tais toxinas têm evoluído.

Tem sido sugerido que a estrutura de "gene em peças" é uma forma primitiva de organização gência, na qual "proteínas em peças" são traduzidas (Blake, 1978). Esse conceito original é concordante com a "teoria exônica do gene" (Gilbert, 1987), onde embaralhamento dos exons ("exon shuffling") possui um papel primordial na evolução de proteínas, dando origem a explosção da diversidade protéica. Enquanto embaralhamento de exons ou de domínios protéicos ("exon or domain shuffling") apresenta um papel preponderante na evolução de muitos genes antigos ou modernos, somente exons simétricos, interrompidos por introns de mesma fase – principalmente fase 0 e 1, podem sofrer embaralhamento sem mudança da leitura de fase (Patthy, 1987). Em adição, embaralhamento de exons ou domínios de proteínas é restrito ao sortimento de domínios em proteínas modulares (Patthy, 1999a). Evidentemente, no caso específico da crotamina, um protomódulo pode ser identificado, desde que o gene do peptídio tóxico consiste de um único módulo (domínio estrutural) e um peptídio sinal, compreendendo assim um estágio de modularização.

Em relação à presença de um intron relativamente longo interrompendo os exons do gene *Crt-p1*, é interessante notar que pelo exposto acima, os introns possuem papel na recombinação gênica – exon shuffling se dá pela recombinação intrônica (Patthy, 1999b) não se tratando de "junk DNA". Por exemplo, tem sido observado que, em *Drosophila melanogaster*, a taxa de recombinação é associada ao tamanho do intron (Carvalho & Clark, 1999). Ademais, em *Conus sp* – um molusco que apresenta uma "biblioteca de peptídios tóxicos" na sua glândula de veneno, a seqüência líder, a pró-região e a região da toxina matura do propeptídio são também separada por introns relativamente longos, e tal organização permitiría diferentes taxas de mutações nos três exons separados (Oliveira et al., 1999).

A clonagem e caracterização do gene da crotamina permitiram isolar e identificar o pseudogene, naquele momento, da crotamina ou um gene desconhecido relacionado ao gene da crotamina. Empregando DNA genômico do fígado de cascavel crotamina-negativa e primers específicos às regiões não-codificadoras de *Crt-p1* foi obtido um produto de aproximadamente 2,5 kb, numa reação de LD-PCR. Comparação e análise entre esse segmento gênico e o gene da crotamina reveleram que ambos apresentam a mesma organização gênica geral, isto é, o segmento gênico isolado do genoma de espécime de cascavel crotamina-negativo apresenta também três exons, cujos exon I e II são interrompidos por um intron relativamente longo (1768 nt) e os exons II e III por intron curto (152 bp). O primeiro exon compreende a porção 5'-UTR e a maior parte do peptídio sinal, o segundo exon codifica os três últimos resíduos carboxi-terminais do peptídio sinal e a quase totalidade do provável peptídio, e o terceiro e último exon compreende os quatro resíduos carboxi-terminais restantes e a região 3'-UTR. Também esse gene provável possue introns de diferentes fases e tamanho, isto é, como no caso do gene *Crt-p1*, o primeiro intron de fase 1 e o segundo intron curto de fase 2 flanqueiam um exon assimétrico. Curiosamente, nesse caso particular o intron I é ~ 0,8 kb maior que o intron correspondente no gene da crotamina, em função de um segmento intrônico duplicado. Como anotado anteriormente, esse tipo de organização estrutual do gene de toxinas permite que diferentes taxas de mutação e divergência ocorram nos exons. Por exemplo, a similaridade entre os exons considerados é de 62,8 %, enquanto a divergência entre os introns é de 7,7 %. Por outro lado, é de aceitação geral que a taxa de evolução dos introns é maior que aquela dos exons (Kimura, 1983; Li, 1997), de modo que os genes de toxinas de *C. d. terrificus*, descritos aqui e outros, tais quais os genes de isoenzimas de PLA_2, em *Trimerusurus* (habu snake) (John et al., 1994; Nakashima et al., 1995; Kordis & Gubensek, 1996; Ohno et al., 1998), não se incluem nessa regra. Na verdade genes de toxinas não estão sujeito à mesma pressão evolutiva que a maioria dos genes (Patthy, 1999b). Em adição, hipermutação de aminoácidos (evolução acelerada), em determinados segmentos gênicos, é a base para diversificação de várias famílias de proteínas, cujos genes sofreram duplicação.

Esse mecanismo de diversificação provê um meio do hospedeiro aumentar seu repertório protéico para determinados alvos celulares. Por exemplo, a evolução acelerada, restrita a alguns exons, também é o mecanismo de diversificação de membros da família das elafinas – inibidores de elastase (Tamechika et al., 1996), dos sítios de reconhecimento de antígeno dos complexos de histocompatibilidade principal (MHC) (Hughes et al., 1990), de serpinas (serine protease inhibitors) de parasitas (Hill et al., 1987), bem como tioninas – uma família de peptídios antibióticos de plantas (Castagnaro et al., 1992).

Inicialmente, foi pensado que essa seqüência gênica, de ~ 2,5 kb, fosse o pseudogene da crotamina, em virtude do alto grau de divergência em relação ao gene da crotamina. Entretanto, foi observado que (a) os elementos reguladores teóricos, tal como o TATA Box (a –58 bp dp códon de iniciação), permanecem intactos (b) os sítios de clivagem 5'-doador e 3'-aceptor da junção exon/intron estão conservados; (c) não há truncamento em decorrência de um stop códon que poderia ser formado aleatoriamente (c) há a falta de seis nucleotídios no exons II (correspondendo a dois códons) – o que formaria um produto mais curto em dois resíduos de aminoácidos, em relação à crotamina, entretanto há preservação da fase de leitura do peptídio (d) os seis resíduos de cisteínas - responsáveis pela conformação do peptídio tóxico, também estão preservadas. Logo, a hipótese inicial de um gene defectivo da crotamina foi descartada.

Baseado nesses fatos, a investigação sobre a habilidade de tal gene ser expresso, em vários tecidos de cascavel crotamina-negativa foi iniciada. Os ácidos ribonucléicos totais (RNA) e mensageiros (mRNA) de cérebro, glândula de veneno, coração, fígado, pâncres e rins de cascavel crotamina-negativa foram isolados e utilizados numa reação de transcrição reversa com PCR acoplada (RT-PCR). Primers de oligonucleotídios específicos à seqüência do peptídio sinal (exon I) e porção terminal da toxina matura (exon II) foram empregados. Com essa análise pôde ser verificado que, não só o gene relacionado a crotamina é transcrito - isto é, o gene é expresso, mas também há transcrição diferencial nos órgãos.

A expressão desse gene relacionado acrotamina, crotasin (*Cts-p2*), é majotitária no pâncreas, seguido no coração, no fígado e nos rins, sendo parcamente detectado na glândula de veneno. Esse achado é bastante interessante, visto que as glândulas de veneno constituem um tecido secretor relacionadado a outras glândulas digestivas, como ao pâncreas.

Por exemplo, há uma ligação evolutiva entre toxinas sintetizadas nas glândulas de veneno e componentes não tóxicos presentes em outros tecidos, como as fosfolipases, onde essas podem exercer uma multiplicidade de atividades biológicas não tóxicas. Contudo, não é sabido se esse fato é uma ligação entre a emergência de toxinas e sua diversidade funcional. O presente caso pode ser um exemplo da origem de uma toxina a partir da diversidade funcional de um gene cuja expressão é predominante em outros tecidos, exceto glândulas de veneno, ainda que sua função seja desconhecida até o momento.

Visto que o gene crotasin é expresso em diferentes órgãos de *C. d. terrificus* crotamina-negativo, foi investigado se esse gene era contido no genoma de cascavéis crotamina-positivo. Surpreendentemente o genoma dos espécimes de *C. d. terrificus* crotamina-positivo possuem ambos genes (*Crt-p1* e *Cts-p2*), enquanto os espécimes crotamina-negativos somente o gene *Cts-p2*.

Com base na análise do cladograma da família das pequenas miotoxinas básicas crotamina-símile, que compreende seqüências aminoacídicas de toxinas isoladas de cascavéis do oeste Norte-Americano, bem como da América do Sul, é notado que não há grande divergência, isto é, os membros são bem conservados (compartilham 86 % de similaridade). Em contraste, o peptídio crotasin é altamente divergente – somente onze resíduos de aminoácidos são conservados em relação à crotamina. Ainda, ao contrário dos membros dessa família e, em particular, da crotamina, o crotasin não é positivamente carregado. De fato, o crotasin é ligeiramente ácido (pI teórico menor que 7), devido a presença de somente um resíduo de lisina e quatro de glutamina, ao passo que a crotamina possue dez e um, respectivamente.

Tomado como um todo, não fica difícil inferir que *Crt-p1* originou por duplicação de um gene ancestral, que é também comum ao *Cts-p2*. Dessa forma *Crt-p1* e *Cts-p2* são gene parólogos que surgiram por evolução acelerada (ou seleção positiva Darwiniana) do exon II, sendo a crotamina (e peptídios da mesma família) o produto mais recente desse processo. Essa evolução acelerada é permitida e restrita a um exon, em função da organização estrutural do gene. Tal arranjo gênico tem atendido eficientemente a evolução de peptídio tóxicos como é atestado pela semelhança estrutural entre genes isolados de animais filogeneticamente distintos.

Por exemplo, os genes da γ-toxina do veneno de escorpiões do gênero *Tityus* (Becerril, 1996; 1997), de toxinas de veneno que agem em canais de K^+ de escorpiões da espécie *Buthus martensis* (Zeng et al., 2001), de peptídios bioativos - variantes de dermaseptin- da pele de anfíbios (Vouille et al., 1997), bem como de toxinas de *Conus sp*, como já mencionado, compartilham todos o mesmo arranjo gênico que a crotamina e o crotasin, diferindo quanto à simetria do exon (ou fases dos introns) e quanto à presença de um terceiro exon (exon III).

CONCLUSÃO II

A crotamina é codificada por um único gene (*Crt-p1*), constituído por três exons e dois introns de diferentes fases e comprimentos. O gene *Crt-p1* está unicamente presente no genoma de espécimes de cascavéis crotamina-positivos.

Investigação sobre a razão da ausência do gene da crotamina em espécimes de cascavéis crotamina-negativa levou a descoberta não de um gene defectivo (e.g., um pseudogene), mas a de um gene parólogo, crotasin (*Cts-p2*), altamente divergente e com a mesma organização gênica.

Genes constituídos por três exons (ou eventualmente dois), cujo exon I codifica, além da porção 5'-UTR, a maior parte de um peptídio sinal, os segundos exons compreendendo toda ou a maior parte da toxina matura (dependendo do (poli)peptídio) e, um terceiro exon (ausente em alguns casos) que codifica a porção carboxi-terminal da toxina e a região 3'-UTR, são característicos dos genes de toxinas e peptídios biologicamente ativos, presentes no genoma de animais filogeneticamente distintos. Essa estrutura gênica indica que tal organização atende, de forma eficiente, a evolução de toxinas e a manutenção de um típico "cassete de secreção".

Baseado na observação que *Cts-p2* é: (i) expresso em diferentes tecidos; (ii) altamente divergente dos membros da família de miotoxinas crotamina-símile; (iii) parte de ambos os genomas das variantes de cascavéis; conclui-se que *Crt-p1* e *Crt-p2* originaram por duplicação de um gene ancestral comum. A organização estrutural desses genes permitiu que o exon II sofresse hipermutação dando origem a genes parólogos, com propriedades bioquímicas distintas. Sendo assim, o gene da crotamina, bem como seu produto, sería provavelmente o resultado mais recente desse processo evolutivo.

Por fim, a falta de crotamina no veneno de cascavéis crotamina-negativa é, portanto, conseqüência da ausência de *Crt-p1* nos seus genomas.

4.7. Comparação do produto do gene crotasin com peptídios e domínios protéicos

Como primeira etapa na elucidação da função biológica do produto do gene crotasin, uma busca em banco de proteínas foi feita, conforme descrito em métodos. Dois grupos de domínios e de peptídios mostram certa similaridade com o crotasin (Figura 12): (1) domínio rico em cisteína de receptores de fatores de crescimento de hepatócito (HGFR) e (2) galinacinas, peptídio antibióticos encontrados em linfócitos de *Gallus gallus*.

A

```
YKQCHKKGGHCFPKEKICLPPSSDFGKMDCRWRWKCCKKGS---G     Crotamine
YKQCHKKGGHCFPKEKICIPPSSDFGKMDCRWRWKCCKKGS---G     Crotamine-Ile 19
YKQCQKKGGHCFPKEKICIPPSSDLGKMDCRWKWKCCKKGS---G     Myotoxin-
YKRCHKKEGHCFPKTVICLPPSSDFGKMDCRWKWKCCKKGSVNNA     Myotoxin 2 and 3
YKRCHKKEGHCFPKTVICLPPSSDFGKMDCRWKWKCCKKGSVN       Myotoxin I
YKRCHKKGGHCFPKEKICIPPSSDFGKMDCRWKWKCCKKGSVN       Myotoxin II
YKRCHKKEGHCFPKTVICLPPSSDFGKMDCRWKWKCCKKGSVNNA     S12909
YKRCHKKGGHCFPKTVICLPPSSDFGKMDCRWKWKCCKKGSVN       Toxic peptide C
QPQCRWLDGFC--HSSPCPSGTTSIGQQDCLWYESCCI--PRYEK     Crotasin
```

B

```
QPQCRWLDGFC-HSSPCPSGTTSIGQQDCLWYESCCIPR-YEK     Crotasin
--NCGWSKNHCSTKQECLNEE---------WIQETCPPAVYE-     HGFrpre|African frog|CRS
--QCGWCHDKCVRSEECLSGT---------WTQQICLPAIY-K     HGF-SF r CRS
--QCGWCEGRCTRANQCPPSV---------WTQEYCLPVV-TK     HGFr|Fugu rubripes|CRS
--ECGWCHNRCVHSNECPSGI---------WTQEICLPAVY-K     HGFr|R. novergicus|CRS
--QCGWCHDKCVRSEECLSGT---------WTQQICLPAIY-K     Met proto-onco|H. s.|CRS
--QCGWCHNCCVRFDECPSGT---------WTQEICLPAVY-K     Met proto-onco|M. m.|CRS
--QCGWCHDKCVRSEECLSGT---------WTQQICLPAIY-K     Receptor TYK|H. s.|CRS
--RCGWCGQQCLRAPECNGGT---------WTQETCLPRVY -     TYK |G. gallus|CRS
--QCGWCHNRCVHSNECPSGT---------WTQEICLPAVY-K     c-met |R. novergicus|CRS
```

Figura 12. Alinhamento do produto do gene crotasin com os peptídios crotamina-símile e com segmentos cisteína-ricos dos domínios extra-celulares de receptores para HGF. Os peptídios e os domínios protéicos foram alinhados como descrito em métodos. Em **A**, estão alinhados os mesmos peptídios que aqueles da Figura 3 e o crotasin. Em **B**, estão alinhados o crotasin e segmentos ricos em cisteína (CRS) de receptores para HGF de vários vertebrados: HGFr pre[African frog], GenBank Accession number JC5248; HGF/SFr proto oncogene, P08581; HGFr [*Fugu rubripes*], T30811; HGFr [*Rattus novergicus*], AAB19189; cMet proto oncogene [*Homo sapiens*], NP_000236; cMet proto oncogene [*Mus musculus*], NP_032671; receptor TYK [*Homo sapiens*], AAB54047; TYK (tyrosine kinase receptor) [*Gallus gallus*], CAA58863; c-met (proto oncogene) [*Rattus novergicus*], CAA65582. Os resíduos de aminoácidos que coincidem exatamente com o consenso estão assinalados em preto.

```
Crotamine          YKQ-CHKKGGHCFPKEKICLPPSSDFGKMDCRWR-WKCCKKGSG
Myotoxin-a         YKQ-CHKKGGHCFPKEKICIPPSSDLGKMDCRWK-WKCCKKGSG
Crotasin           QPQ-CRWLDGFC--HSSPCPSGTTSIGQQDCLWY-ESCCIPRYEK
Consenso               C------C------C-------G---C-----KCCKK
Pontes S-S

HBD-1 Human    GLGHRSDHYNCVSSGGQCLY--SACPIFTKIQGT--CYRGKAKCCK
HBD-2 Human    GIGDPV---TCLKSGAICHP--VFCPRRYKQIGT--CGLPGTKCCKKP
HBD-3 Human    GIINTLQKYYCRVRGGRCAV--LSCLPKEEQIGK--CSTRGRKCCRRKK
TAP_Bovine     GVGNPVS---CVRNKGICVP--IRCPGSMKQIGT--CVGRAVKCCRKK
LAP_Bovine     GVRNS---QSCRRNKGICVP--IRCPGSMRQIGT--CLGAQVKCCRRK
Consenso               C------C------C-------G---C-----KCCKK
                                                        KCCRR
Pontes S-S
```

Figura 13. Elementos comuns entre os membros das famílias dos peptídios crotamina-símile e dos peptídios antimicrobianos beta-defensinas. A seqüência primária dos peptídios maturos são mostrados em código de uma letra. As atribuições das pontes dissulfetos são indicadas por linhas de pareamento (1-5, 2-4 e 3-6). HBD1 a 3, human beta-defensin, GenBank accession number, Q09753, 0152263, NP_061131; TAP_Bovine, Tracheal antimicrobial peptide, P25068; LAP_Bovine, Lingual antimicrobial peptide, Q28880.

```
                 Pre-                                  ↓                          Peptide
AAC19036     MKILYLLFAFLFLAF------------LSEPGNAYKQCHKKGGHCFPKEKICIPPSSDFGKMDCRWRW-KCCKKGSGK
AAC02995     MKILYLLFAFLFLAF------------LSEPGNAYKQCHKKGGHCFPKEKICLPPSSDFGKMDCRWRW-KCCKKGSGK
JC5324       MKILYLLFAFLFLAF------------LSEPGNAYKQCQKKGGHCFPKEKICIPPSSDIGKMDCRWKW-KCCKKGSGK
P24331       MKILYLLFAFLFLAF------------LSEPGNAYKRCHIKGGHCFPKEKICIPPSSDFGKMDCPWRR-KCCKKGSGK
P24333       MKILYLLFAFLFLAF------------LSEPGNAYKRCHIKGGHCFPKGKICIPPSSDFGKMDCPWRR-KCCKKGSGK
CROTASIN     MKILYLLSAFLFLAF------------LSESGNAQPCCRWLLCFCH--SSPC-PSGTSICQQDCLWYE-SCCIPRYEK
NP_061131    MRIHYLLFAFLLVLLSPPAA---FSKKINNPV---S-CLRKGCRCWN---RCIGNTRQICS--CGVPFIKCCKRK
AAK26259     MRVLYLLFSFLFIFLMPLPG---VFGGIGDPV---T-CLKNCAICHP--VFCPRRYKQICT--CGLPGTKCCKKP
015263       MRVLYLLFSFLFIFLMPLPG---VFGGIGDPV---T-CLKSCAICHP--VFCPRRYKQICT--CGLPGTKCCKKP
AAC39175     MRLHFLLLVFLLMVLLPVPG---LLKNIGNSV---S-CLRNKCVCMP--GKCAPKMKQICT--CGMPQVKCCKRK
P25068       MRLHFLLIALLFLVLSAWSG---FTQGVGNPV---S-CVRNKCICVP--IRCPGSMKQICT--CVGRAVKCCFKK
CAA95992     MRVLYLLFSFLFIFLMPLPG---VFGGIGDPV---T-CLKSCAICHP--VFCPRRYKQICT--CGLPGTKCCKKP
AAB33727     MRLHFLLIALLFLVLSAGSG---FTQGVRNSQ---S-CRRNKCICVP--IRCPGSMRQICT--CLGAQVKCCRRK
P46156       MKIVYILLPFIIL LAQGAAGSSQALGRKSD------CFRKSCFCAF--LKCPSLTLISGK--C-SRFYICCKRIW-G
P46158       MKIIYILFSILFLALQVSPGLSSP--RRDM-------LFCKGCSCHF--GGCPSHLIKVCS--C-FGFRSCCKWPWNA
Q09753       MRTSYIILFTICIILSEMASGGNFLTGLGHRSDHYN-CVSSGCQCLY--SACPIFTKIQCT--CYRGKAKCCKK
                                      ↑
                 Pre-                 Pro-                                   Peptide
```

Figura 14. Alinhamento dos precursores dos peptídios crotamina-símile e dos pré-pro-peptídios da família das defensinas. O alinhamento foi feito com o programa CLUSTAL , como descrito em métodos. Gaps foram introduzidos para máximo alinhamento. Os resíduos de aminoácidos que são comuns aos diferentes membros alinhados, estão representados em preto. Beta-defensin 3 [*H. sapiens*], GenBank accession no. NP_061131; beta-defensin 2 [*H. sapiens*], O15263; beta-defensin 2 [*Macaca mulatta*], AAK26259; beta-defensin 1 [*H.sapiens*], Q09753; TAP, tracheal antimicrobial peptide [*Bos taurus*], P25068; LAP - lingual antimicrobial peptide, bovine [*Bos taurus*], AAB33727; SAP - skin antimicrobial peptide *H. sapiens*], CAA95992; gallinacin 1 precursor [*G. gallus*], P46156; gallinacin 2 precursor [*Gallus gallus*], P46158; pre-pro-beta defensin 1 [*Sus scrofa*], AAC39175. Membros da família dos peptídios crotamina-símile são os precursores daqueles das figuras 3 e 5.Com setas estão indicadas as posições de processamento dos pre-peptídios crotamina-símile e dos pre-pro-peptídios antimicrobianos.

4.8. Produção de crotamina e crotasin recombinantes

Com a finalidade de avaliar se tais funções – atividade antibiótica ou de quimio modulação (quimiocitocina) - são atributos do peptídio crotasin, já que esse não havia anteriormente sido descrito, isolado ou identificado, bem como se a crotamina possui alguma atividade similar a essas, foi conduzida a construção de vetores de expressão para a produção dos peptídios em sistemas procariótico e eucariótico.

A Figura 9.1, no apêndice, mostra a região do sítio de clonagem do plasmídio pQE-12 e o eletroesferograma da construção, mostrando a fase de leitura correta dos elementos do vetor com a mensagem da crotamina (cDNA). Na figura 15, são comparadas as seqüências primárias da crotamina e 6xHis-crotamina, assinaladas algumas características bioquímicas de ambas toxinas e é apresentado o gel de SDS-PAGE da toxina recombinante purificada. A produção estimada de 6xHis-crotamina, empregando *E. coli*, alcança níveis de 10 a 15 mg/L. O resultado da detecção imunológica é mostrado também na figura 15, no qual fica demonstrado que a toxina recombinante é reconhecida por anticorpo policlonal desenvolvido em coelho. Testes *in vivo* com hexa-hisitdina-crotamina, em solução fisiológica, (injeção intraperitoneal em camundongos) foram negativos, isto é o peptídio é, não foi detectado nenhuma atividade biológica.

Nas figuras 9.2, 9.3 e 9.4, no apêndice, são mostrados os sítios de clonagem do vetor de expressão pMetα A e os eletroferogramas das construções com os peptídios de *C. d. terrificus* em estudo, indicando a correta leitura de fase das menssagens da crotamina e crotasin e os elementos do vetor. Células de *Pichia methanolica* recombinantes, isto é, com o cassete de expressão integrado no cromossomo, foram obtidas, como descrito em métodos. Expressão da crotamina e hexa-hisitidina crotamina, nesse sistema, em volume de até 0,5 ℓ, foi infrutífera. No caso do crotasin, um lote de aproximadamente 0,5 mg, foi obtido num volume de cultura de 0,1 ℓ. Imunoblot do peptídio recombinante com anticorpo desenvolvido em coelho, contra oligopeptídio sintético derivado de um segmento do crotasin, foi negativo.

A

Crotamine YKQCHKKGGHCFPKEKICLPPSSDFGKMDCRWRWKCCKKGSG
6xHis-Crotamine **RGS**YKQCHKKGGHCFPKEKICLPPSSDFGKMDCRWRWKCCKKGSG**RSHHHHHH**

	No. de resísuos	MW(kDa)	no. de resíduos básicos	pI
Crotamine	42	5,0	12	9,55
6xHis-crotamine	53	6,6	14	9,88

B

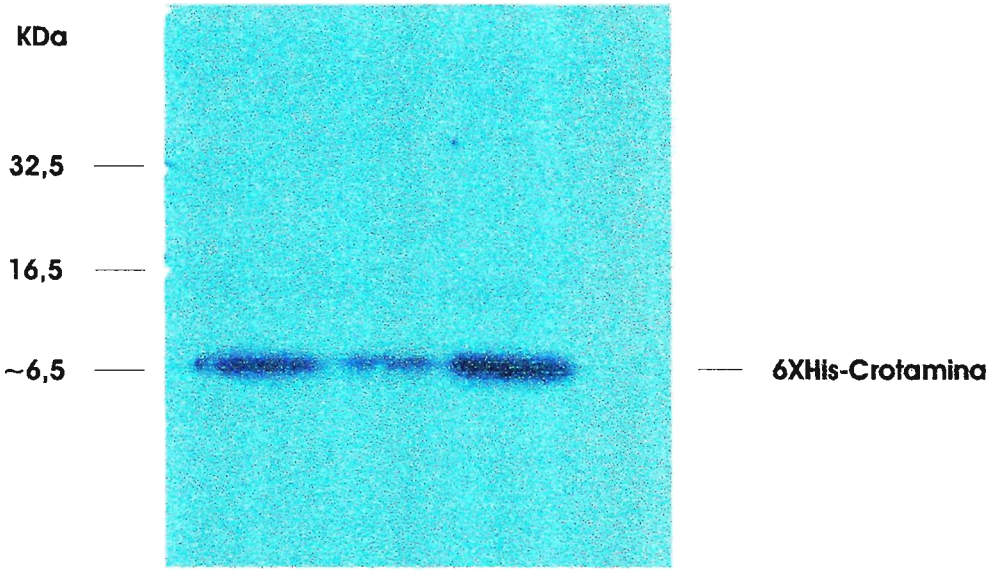


Figura 15. Propriedades química e biológica da crotamina recombinante, 6xHis-crotamina. Em A, são indicados alguns parâmetros da crotamina de veneno e 6xHis-crotamina. Os valores foram obtidos com o programa EDITSeq, após análise das seqüências nucleotídicas dos cDNAs. Em B, é mostrado o imunoblot da crotamina recombinante, após detecção em filme de Raio-X.

4.9. Determinação da atividade antibiótica

A tabela 4 sumariza o resultado dos testes de atividade antibiótica usando Müller-Hinton broth e meio pobre como meios de cultura para as cepas desafiadas. A crotamina purificada do veneno de *C. d. terrificus*, apresenta atividade contra *E. coli* ATCC 25922, mas somente uma fraca ou nehuma atividade contra *S. aureus* ATCC 2523. Em contraste, crotasin, possue uma atividade residual contra *S. aureus*, e nenhuma atividade contra *E. coli*. O resultado de atividade antimicrobiana da crotamina é diferente quando meio pobre (bactopeptona 1 % / NaCl 0,9%) é usado. Nessa condição cepas de *E. coli* são resistentes à crotamina. Testes dos oligopeptídios sintéticos, derivados das moléculas de crotamina e crotasin, indicaram que somente *M. luteus* é sensível a um único derivado do crotasin (Tabela5).

Tabela 4. Concentração inibitória mínima (MIC) da crotamina e crotasin

Peptídio	*Staphylococcus aureus* ***ATCC 2523*** *Gram (+)*	*E. coli* ***ATCC 25922*** *Gram (-)*
Crotamina	***>200 (μg/ml) (~50 μM)***	***25 (μg/ml) (~ 6 μM)***
Crotasin	***100 (μg/ml)***	***>200 (μg/ml)***

> >200 (μg/ml) significa que há resitência à susbtância pelo organismo testado

Tabela 5. Atividade antimicrobiana dos peptídios sintéticos derivados das moléculas de crotamina e do crotasin

Peptídios derivados	***E. coli*** *desinterogênica* ***Gram (-)***	***M. luteus*** ***Gram (+)***
SR-CTS1 – RCRSPSTSIGQDCR	*S/ ativ.* (1mg/ml)*	*< 6 μM (0,01mg/ml)*
SS-CTS2 – PCPSGTTSIGQQDCR	*S/ ativ. (1mg/ml)*	*S/ ativ. (1mg/ml)*
SI-CRT1 – ICLPPSSDFGKMDCR	*S/ ativ. (1mg/ml)*	*S/ ativ. (1mg/ml)*
SI-CRT2 – ICAKPSSDFGKDGCR	*S/ ativ. (2mg/ml)*	*S/ ativ. (2mg/ml)*

**S/ ativ.- nenhuma atividade bacteriostática ou microbicida na concentração usada*

4.11. Análise de diferenciação de células-tronco embrionárias de camundongo

Os primeiros ensaios utilizando células embrionárias de camundongo foram realizados com a crotamina purificada de veneno. Uma série de três tipos de experimentos foram inicialmente conduzidos: no experimento 1, descrito em métodos, no quinto dia, placas controle contendo LIF, as ilhas de células cresceram e se fundiram, mantendo as características de seu cultivo. Em placas sem LIF, todas as células se diferenciaram. Contudo, placas contendo células ES com solução de crotamina (4×10^{-6}) apresentam muitas células mortas e ausência de ilhas. No experimento 2, a partir do quarto dia, placas em que EBs foram incubados com 10^{-7} M de crotamina começaram a se diferenciar, permitindo observadar ilhas de células com precursores semelhantes a células sangüíneas. No experimento 3, a incubação prévia com crotamina (10^{-7} M) também permite observar a presença de células diferenciadas em relação ao controle. As Figuras 16A a 16F mostram parte desses resultados iniciais usando células-tronco.

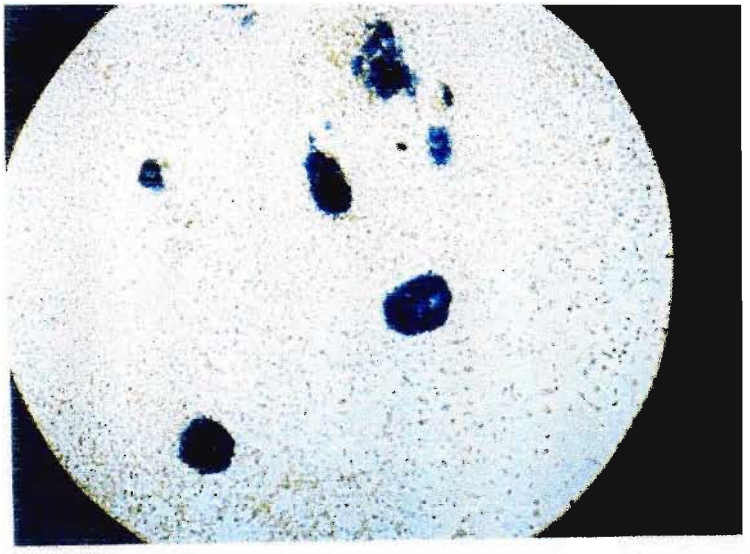
Ensaios subseqüentes indicaram que pelo menos dois tipos celulares são induzidos à diferenciação quando crotamina, na concentração de 10^{-7}, é adicionada à câmara de cultura dos Ebs. Utilizando anticorpos contra marcadores celulares, foi possível demonstrar que um dos tipos celulares, no qual a crotamina induz essa diferenciação, na concentração ente 10^{-7} – 10^{-8}, é de células nervosas (Figura 17).

4.12. Localização do conjugado crotamina-Cy3 em células-tronco embrionárias

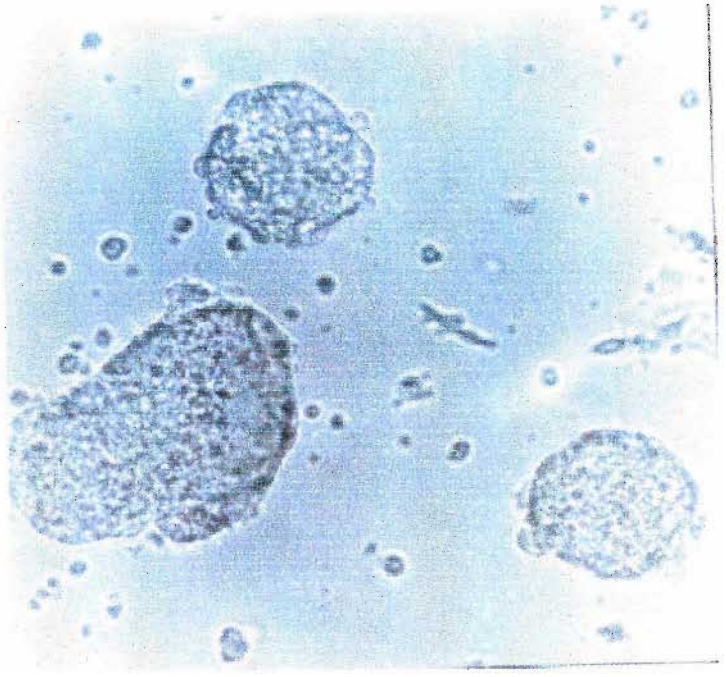
Crotamina conjugada com Cy3, um corante fluorescente, indica que o peptídio alcança e se concentra no núcleo de um determinado grupo de células dos EBS complexos (Figura 18).

Figura 16. Microscopia de fluorescência de corpos embrióides controle e tratados com solução de crotamina. Em A são mostrados vários corpos embrióides corados para fosfatase alcalina (magnificação: 40X); em B, mesmo que em A (100X); em C, um corpo embrióde corado e ampliado de 150 X; em D, diferenciação de EBs induzida por 10^{-6} M de crotamina (aumento: 150X); em E, diferenciação de EBs induzida por 4 x 10^{-6} M de crotamina (aumento: 150X); em F, EBs diferenciados, provavelmente em células da glia, por 2 x 10^{-6} M de crotamina.

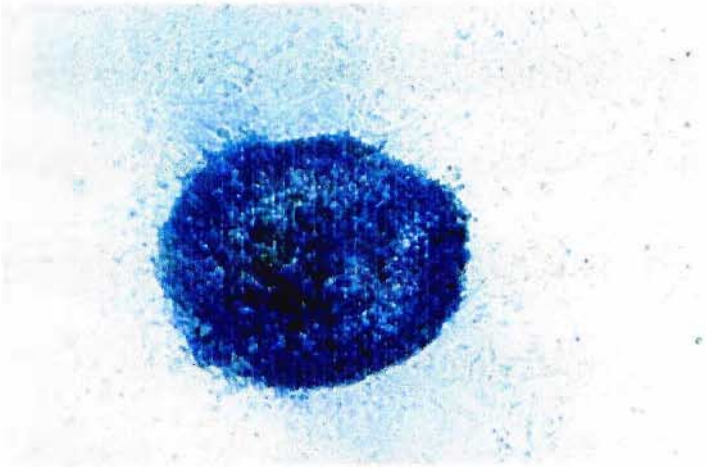
A



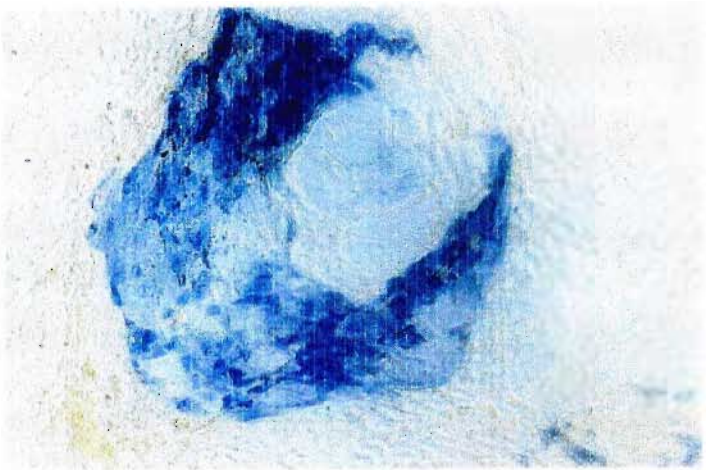
B



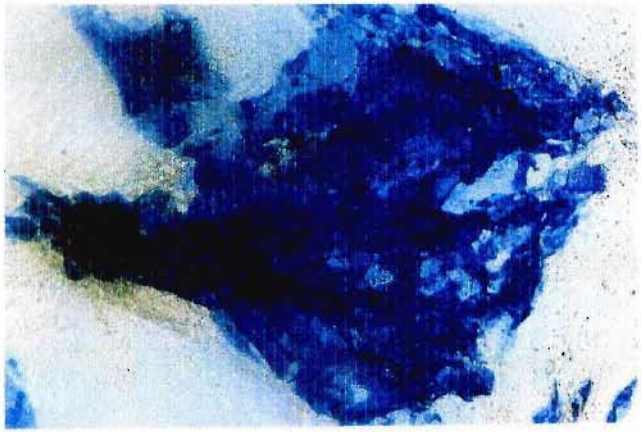
C



D



E



F

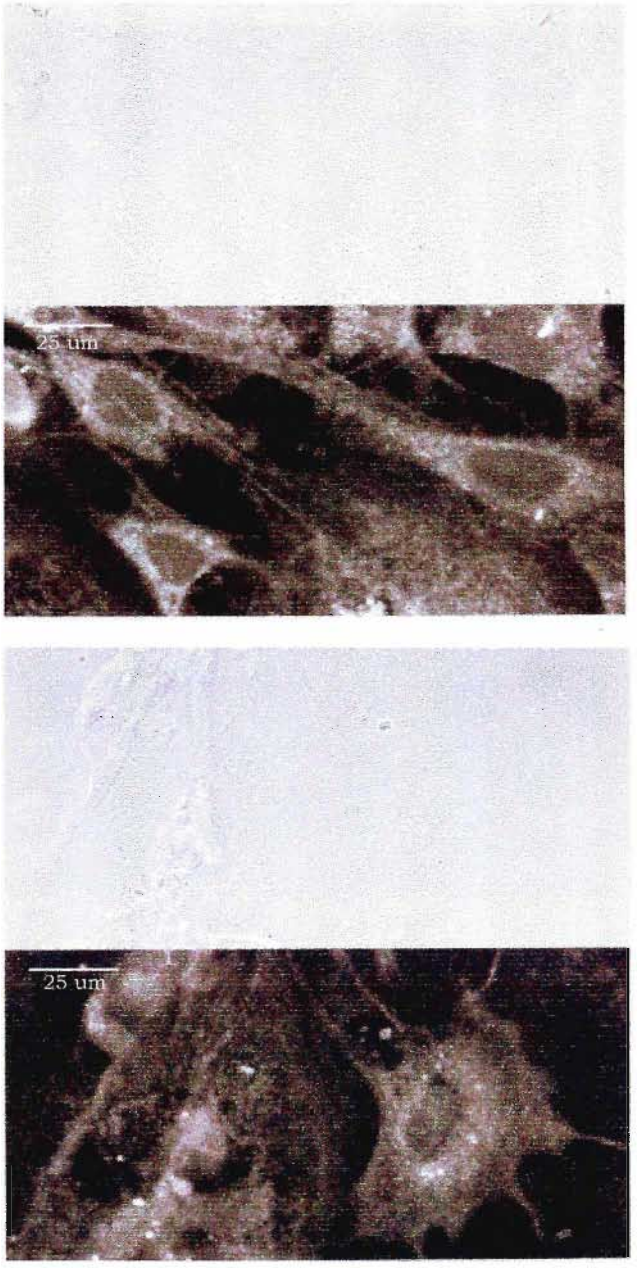


Figura 17. Microscopia de contraste de fase e confocal de corpos embrióides diferenciados por crotamina. Corpos embrióides foram incubados com uma solução de crotamina entre 10^{-7} e 10^{-8} M, entre 7 e 8 dias. As células foram fixadas e incubadas com anticorpo anti-neurofilamento (anti-GFAP). Após incubação com anticorpo secundário anti-IgG de camundong-FITC, as imagens foram registradas. As imagens foram tomadas de diferentes experimentos conduzidos em paralelo.

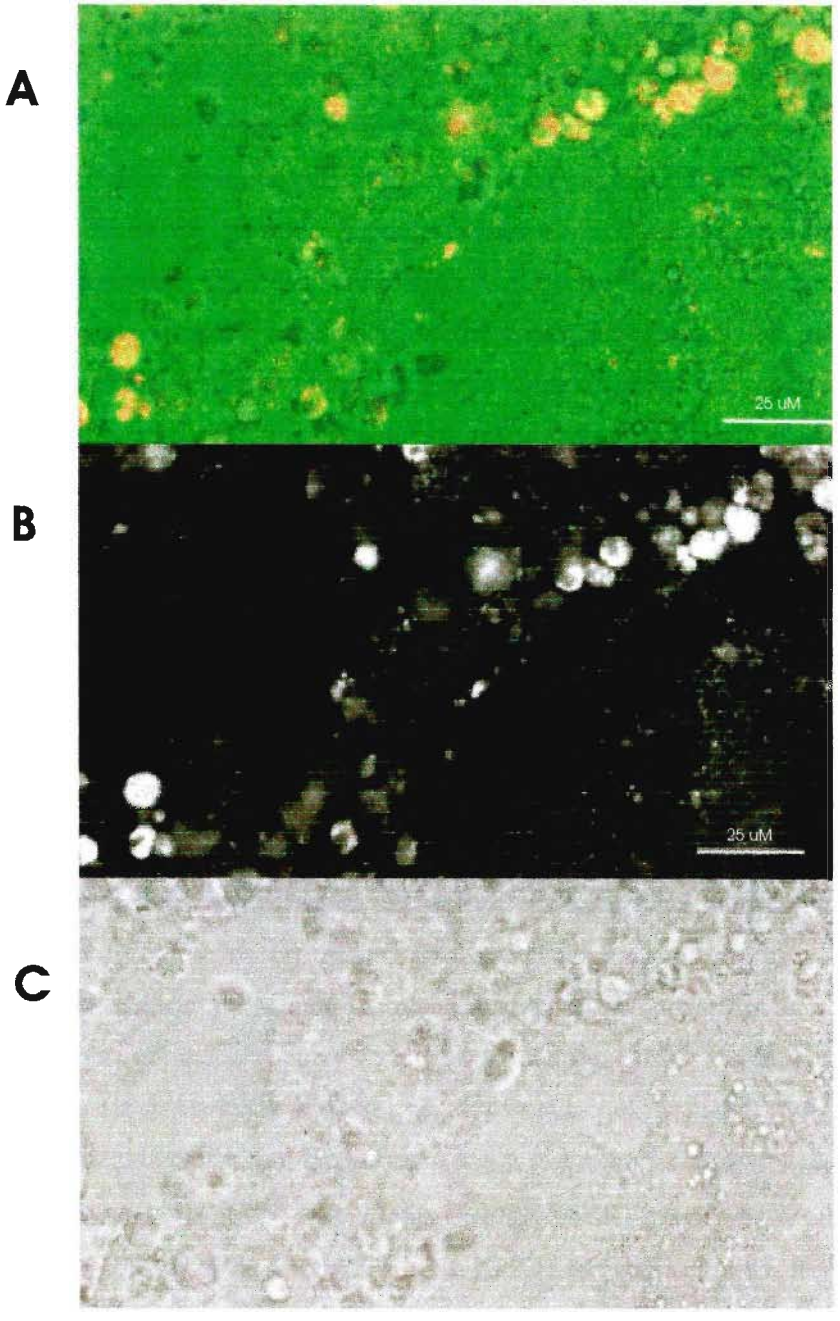


Figura 18. Localização do conjugado crotamina-Cy3 em núcleos de células pluripotentes (corpos embrióides). Corpos embrióides foram incubados com uma solução 10^{-7} - 10^{-8} de crotamina-Cy3, e visualizados antes da diferenciação. Em A é mostrado uma imagem obtida em microscópio de fluorescência usando um filtro laranja (568-574 nm); em B, mesma imagem que em A, porém sem a seleção de um filtro específico; em C, mesma imagem que em A, porém visualizada em contraste de fase.

DISCUSSÃO

Uma vez que o transcritos do crotasin são encontrados em diferentes tecidos de *C. durissus terrificus* e seu gene no genoma de ambos espécies de cascavéis (crotamina-positivo e negativo), foi especulado que esse peptídio teria evidentemente uma função não relacionada à atividade tóxica do seu congênere – a crotamina. Como ponto de partida para o acessso da função do crotasin, uma busca de seqüências nucleotídicas e peptídicas homólogas ao crotasin, em banco de DNA (GenBank, http://www.ncbi.nih.nlm.gov) e proteínas (Swissprot, http://www.expasy.ch) foi conduzida. Como visto anteriormente, a seqüência nucleotídica do gene crotasin preserva alguma similaridade com o próprio gene da crotamina (Figura 8), entretanto a seqüência peptídica possui baixa similaridade com os membros da família das miotoxinas crotamina-símile (Figura 9). Mesmo em banco de proteína e de DNA a busca foi sem sucesso aparente. Entretanto, foi verificada uma pequena similaridade do crotasin com peptídios antibióticos de *Gallus gallus* e com determinados domínios protéicos dos receptores para fatores de crescimento de hepatócitos (HGFr) (Figura 12). Considerando a similaridade com peptídios antibióticos de *Gallus gallus*, a análise filogenética do peptídio crotasin e de membros da família das miotoxinas crotamina-símile revela que essa tal similaridade é maior com peptídios antibióticos denominados defensinas (Figura 13 e 14). As defensinas compreendem uma família de peptídios antibióticos (e eventualmente citotóxicos), presentes em mamíferos, que faz parte do sistema inato de defesa do organismo, isto é, que faz parte da primeira linha de defesa contra microorganismos patógenos como bactérias Gram-negativas e Gram-positivas fungos e vírus encapsulados (Lehrer at al., 1993; Boman, 1995; Andreu & Rivas, 1998; Ganz & Lehrer, 1998; Hancock & Diamond, 2000; Hancock & Scott, 2000; Gura, 2001). Trata-se de moléculas catiônicas, anfipáticas (regiões carregadas e hidrofóbicas separadas), entre 30 e 34 aminoácidos, ricos em resíduos de arginina (R) e com seis cisteínas arranjadas em três pontes S-S invariantes. Dependendo do padrão em que as pontes são arranjadas, da distruibuição dos peptídios nos tecidos e da organização estrutural dos genes, são classificadas em α- e β-defensinas.

Em humanos, as α-defensinas são expressas em neutrófilos (linfócitos polimorfonucleares – HDEFA1, HDEFA3, HDEFA4) e células de Paneth (das microvilosidades intestinais – HDEFA5, HDEFA6), enquanto as β-defensinas (HBD-1, HBD-2, HBD-3) são expressas majoritariamente em tecidos epiteliais (Lehrer & Ganz, 1999).

Devido a natureza anfipática, as defensinas se inserem na MP e interagem com lipopolissacáridios (LPS), formando poros e canais na membrana celular bacteriana, o que causa extravasamento dos componentes celulares e íons, e consequentemente a morte dos patógenos (Oren & Shai, 1998). Em adição ao amplo espectro antibiótico, há evidências que as β-defensinas agem como quimiocinas, as quais sinalizam para células dendríticas imaturas e para linfócitos T de memória, bem com outras respostas inflamatóras, servindo, desse modo, de ponte entre o sistema imune inato (imediato) e o sistema imune adaptativo (Yang et al., 1999; Scott et al, 2000a). Certas defensinas, em adição a atividade antibiótica, também possuem atividade mitogênica, corticostática e efeitos citotóxicos (Lehrer et al, 1993; Boman, 1995; Scott et al., 2000a). Outras famílias de peptídios antibióticos, que apresentam características comuns e conservadas entre si, mas com propriedades biológicas particulares, são amplamente distribuídas entre organismos filogeneticamente não relacionados, como insetos, plantas e vertebrados.

Na verdade mais de 600 estruturas estão catalogadas, distribuídas em quase duas dezenas de Filo (http://www.bbcm.univ.triste.it/~tossi/pag1.htm).

Por outro lado, alinhamento de domínios de diversos membros da família do HGFr permite, cosiderando as mutações conservadas, atingir uma similaridadede até 40%, nos trechos que se alinham com o crotasin (Figura 13). Os receptores para fatores de crescimento de hepatócitos são compostos por duas subunidades (αβ) ligadas por ponte dissulfeto, totalizando (190 kD). A subunidade α é extracelular, enquanto a β compreende um domínio de ligação de HGF, um domínio transmembrana e um segmento citoplasmático com o domínio de tirosina quinase. Ambas subunidades originam da glicolisação e clivagem proteolítica de um precursor comum, codificado por um único gene - o *c-Met* proto oncogene. A transdução de sinal, seguido da interação do ligante, induz auto-fosofrilação do domínio quinase e a geração de IP3 e a estimulação da cascata *Ras*, através da atividade *Ras*-guanina. HGFr é altamente expresso no fígado, em células epiteliais e endoteliais, bem como outros tecidos. Esses receptores mediam a sinalização de quimiocinas (fator de crescimento de hepatócitos ou scatter factor) em diferentes processos celulares, como regeneração tecidual e diferenciação celular. Sua ativação descontrolada leva a formação de tumores, principalmente epiteliais (Comoglio & Graziani, 1994; Zarnegar, 1995).

Um dos meios de controlar atividade dos HGFr sería pela inibição da atividade quinase da porção carboxi-terminal intracelular do receptor (Bardelli et al., 1999). Um outro modo sería a liberação de receptores solúveis circulantes, isto é, receptores não ancorados à membrana, os quais complexariam ou seqüestrariam a citocina, impedindo a transdução de sinal (Fernadez-Bortran, 1991).

Tomado esses fatos em consideração, duas hipóteses se seguiram para investigar a função, ou funções, dos peptídios crotamina e crotasin de *C. d. terrificus*: (1) baseado na análise filogenética das defensinas, das miotoxinas crotamina-símile e do crotasin, foi sugerido que esses últimos seriam membros altamente divergentes dos primeiros, cuja atividade antibiótica ainda podería ser detectada; (2) em virtude da similaridade do crotasin com domínio rico em cisteína, uma outra hipótese que se seguiu foi a de que o crotasin agiria como modulador celular na remodelagem tecidual. O crotasin complexaría com HGF ou SF, nos tecidos, controlando a atividade de seus receptores. A crotamina sendo um congênere desse peptídio também poderia apresentar outra função que não (cito)tóxica.

Para testar essas duas hipóteses principais, foi conduzida a produção de crotamina e crotasin em sistemas de expressão procariótico (*E. coli*) e eucariótico (*Pichia methanolica*), bem como a síntese química de oligopeptídios derivados. Inicialmente, usando *E. coli*, uma toxina de fusão com uma cauda de hexa-histidina (6xHis-crotamina) foi obtida. A toxina recombinante, cuja produção chega a atingir 15 mg/L de cultura em aproximadamente 5 horas de indução, é contida majoritariamente em corpúsculos de inclusão. Entretanto uma fração do total produzido pela célula é encontrada na forma solúvel. Essa fração solúvel foi purificada em cromatografia de afinidade em metal e concentrada. A 6xHis-crotamina reage positivamente com anticorpo policlonal anti-crotamina, mas não apresenta atividade biológica quando testada *in vivo*. Esses fatos indicam que epitopos da crotamina recombinante são acessíveis pelo anticorpo, mas a conformação do peptídio está comprometida, já que não é ativo. Dado que aquisição da conformação correta de (poli-) peptídios produzidos em *E. coli* é um ponto crucial na produção de qualquer polipeptídio e a probabilidade de se obter uma conformação correta é inversamente proporcional ao número de pontes dissulfeto (a crotamina possue 3 pontes S-S), foi tentada a produção em sistema eucariótico.

O sistema escolhido utiliza células da levedura metanotrófica *P. methanolica* e uma construção que permite produzir polipeptídios de fusão com α–factor, direcionando o produto para o meio extracelular – fase em a conformação correta do polipeptídio é adquirida. Cassetes de expressão em que a crotamina e o crotasin estão em fusão com α–factor somente ou também com hexa-histidina, foram integrados ao cromossomo de células de *P. methanolica*. As inserções foram confirmadas por PCR. Produção dos peptídios recombinantes, em escala piloto de 0,1 a 0,5 L, foi realizada. O meio concentrado foi aplicado em colunas de gel filtração e os picos liofilizados. No caso da crotamina, ou 6xHis-crotamina, a produção foi insignificante ou nula. No caso do crotasin, um baixo rendimento foi obtido (< 1 mg/L), mas que permitiu a continuação dos experimentos. Imunodetecção do crotasin foi negativa. A razão disso seria a falta de acessibilidade ao peptídio pelo anticorpo, mesmo que o anticorpo tenha sido desenvolvido contra oligopeptídio sintético correspondente à porção mais hidrofílica do crotasin.

Os testes antibióticos iniciais, com o crotasin recombinante e a crotamina purificada do veneno, mostra que o peptídio de tecidos e o de veneno apresentam atividade microbicidade seletiva. O crotasin possui determinada atividade contra bactérias Gram-positivas e a crotamina contra Gram-negativas. Atividade contra fungos não foi testada, até o momento – o que será de grande interesse. Essa seletividade se deve as propriedades químicas intrínsicas dessas moléculas, como, por exemplo, a carga líquida do peptídio - a crotamina é carregada positivamente (pI> 9,0), enquanto no crotasin as cargas são quase neutras (pI < 7,0) – e também aos componentes da parede celular das cepas – Gram-negativas, contendo principalmente lipopolissacarídes (LPS) e Gram-positivas ac lipoteicóico (LTA) e peptidioglicanos. Desde que as algumas defensinas possuem atividade antibiótica e citotóxica em regiões diferentes da mesma molécula, oligopeptídios derivados de determinadas regiões da crotamina e do crotasin foram sintetizados. Teste de atividade antimicrobiana com esses oligopeptídios foi positivo somente para um deles - o SR-CTS1, e essa atividade está de acordo com o espectro de ação do crotasin, ou seja, contra patógenos Gram-positivos. O oligopeptídio SR-CTS foi desenhado tendo o crotasin como modelo e possui alguns resíduos neutros substituídos por resíduos positivos (arginina).

Como ocorre com a maioria das defensinas e peptídios antibióticos catiônicos, os peptídios sintéticos e a crotamina foram sensíveis à pesença de sal. Isso é notado quando essas substâncias são testadas na presença de MHB e de meio pobre.

O meio pobre contém 0,9 % de NaCl, concentração que é aproximadamente 3 vezes maior que aquela do MHB. A inibição da atividade microbicida das defensinas por sal é evidenciada em pacientes que sofrem de fibrose cística. Nessa doença congênita, canais de íons cloreto defectivos permitem que haja um aumento da salinidade do fluido alveolar, impedindo, assim, a atividade microbicida das β-defensinas, vindo causar infecção pulmonar (Goldman et al., 1997; Singh et al., 1998).

É sabido que membros da família das defensinas possuem, além da atividade antibiótica, outras propriedades as quais permitem modular a migração celular em processo inflamatório, modular e integrar respostas imunológicas e modular a proliferação celular. Por exemplo, foi visto que os peptídios catiônicos de neutrófilos induzem a liberação de histamina de mastócitos, por um mecanismo semelhante ao dos peptídios de veneno, isto é, não lítico e independente da ativação de receptores para imunoglobulina E (IgE) (Befus et al., 1999). É visto que peptídios catiônicos antibióticos apresentam atividade mitogênica (promotora de crescimento), direcionada para células epiteliais e fibroblastos, participando no processo de cicatrização (Murphy et al. 1993; Gallo et al, 1994). Aumento da síntese de DNA, também, é observado em determinadas linhagens celulares (Bateman et al., 1991). Agindo como quimiocinas, as β-defensinas atraem células T e dendríticas imaturas para o local de infecção, conectando, dessa forma, o sistema imune inato (imediato) e o sistema imune adaptativo (humoral) (Yang et al., 1999).

Tendo em mente que peptídios catiônicos agem como mediadores celulares e a fim de testar a segunda hipótese surgida no desenvolvimento do presente trabalho, isto é, se a crotamina e o crotasin possuem alguma propriedade de sinalizadores celulares (quimiocinas) ou de modular tais sinais, células-tronco embrionárias ("Embryonic Stem cells") de camundongo foram utilizadas.

Na verdade, ensaios de atividade quimiotática podem ser feitos com leucócitos, tais como monócitos, linfócitos ou neutrófilos, em câmaras que permitem migração de tais células em respostas a sinais químicos (câmara de quimiotaxia) (Anne Pereira, 1999). Entretanto, a iniciativa inédita de utilizar células-tronco na avaliação de substâncias tóxicas, em geral, e peptídios tóxicos de venenos animais, em particular, culmina com a busca de sistemas sensíveis para acessar processos apoptóticos, de proliferação e de diferenciação celulares induzidos por essas toxinas.

Os corpos embrióides ("embryoid bodies"), são agregados de células formados espontaneamente a partir de células-tronco ("stem cells") cultivadas em suspensão. As células-tronco são células normais pluripotentes, isto é, capazes de se diferenciar em um número variado de células sob determinadas condições. Quando fatores inibidores são removidos da cultura (e. g., LIF), células ES entram no programa de diferenciação e corpos embriódes são formados. Entre o sétimo e o décimo dia do desenvolvimento dos Ebs ocorre contração espontânea de cardiomiócitos. Após, identifica-se, dentro do complexo Ebs, uma grande variedade de linhagens embrionárias (hematopoiéticas, neuronal, endotelial, cardíaca e muscular), que pode ser comprovada por várias técnicas (análises morfológicas, imuno-histoquímica, RT-PCR).

Inicialmente, crotamina purificada do veneno de cascavel foi empregada no conjunto de experimentos que visaram detectar a capacidade de peptídos tóxicos em sinalizar respostas celulares de citotoxicidade, proliferação ou diferenciação. Como esperado, a crotamina é citotóxica quando Ebs foram incubados com concentrações acima de 10^{-6} mM de toxina. Em concentrações mais altas que 2 - 4 x 10^{-6} M, as células–tronco se degeneram e morrem. Entretanto, surpreendentemente, concentrações sub-micromolares de crotamina promovem diferenciação de EBs, em pelo menos dois tipos celulares principais. Utilizando anticorpos contra marcadores celulares específicos, como anti-neurofilamentos do citoesqueleto, um dos dois tipos celulares preliminarmente identificado, resultantes da indução de diferenciação de EBs por crotamina, indicou se tratar de células nervosas. Interessante, Cy3-crotamina, isto é, crotamina conjugada a um o corante fluorescente, mostra que esse peptídio se concentra no núcleo de determinadas células dos corpos embrióides. Entretanto, o mecanismo molecular detalhado sobre como esse processo de diferenciação se dá e porque a crotamina induz a diferenciação de células embrionárias em células nervosas, permanecem para ser estudados em detalhe. Vale lembrar que fatores de crescimento de nervo (NGF) são componentes relativamente abundandes no veneno de serpentes. Contudo NGFs de veneno não compartilham nenhuma similaridade estrutual ou propriedade biológica comum com os peptídios da família da crotamina. Por outro lado, é verificado por "gene array analysis", que híbridos (moléculas quiméricas) de cecropina-melitina (duas defensinas) induzem a expressão de um conjunto de 35 genes, incluindo fatores de transcrição (Scott et al., 2000).

Foi demonstrado que defensinas de neutrófilos humanos estão entre os mais potentes inibidores de proteína kinase C, o que pode influenciar drasticamente a transdução de sinais nas células (Charp et al., 1988). Ainda, defensinas HNP de neutrófilos, uma vez internalizados, interagirem com o DNA, portanto ganhando acesso ao núcleo, porém o efeito final, ao contrário de proliferação ou diferenciação, é o de morte celular de células procarióticas e malignas (Gera et al., 1991, Johnstone et al., 2000).

Em adição, nada tem sido relatado sobre a indução da proliferação ou da diferenciação celular, por algum peptídio catiônico, mesmo em células hematopoiéticas, com as quais as defensinas possuem uma estreita conexão e com os quais desempenham papel fundamental nos processos inflamatório e imune, como compilado por Hancock & Diamond, 2000. Porém, digno de nota é o fato de que um dos tipos celulares, que a crotamina induz a diferenciação dos Ebs, se assemelha a precursores de células sangüíneas (Kerkis et al., comunicação pessoal). Se esse achado poderia indicar um novo papel dos peptídos catiônicos crotamina-defensina-símile, isto é, o recrutamento de mais células precursoras das polimorfonucleares para o sistema de defesa imediata, permanece para ser verificado.

O estudo conduzido até aqui, com os peptídios tóxicos de *C. d. terrificus*, bem como alguns de seus derivados sintéticos, vem corroborar a idéia de que durante a evolução, domínios protéicos conservados, que formam estruturas tridimensionais similares, cujas seqüências primárias nem sempre apresentam total identidade, foram recrutados para exercerem diferentes funções celulares, porém num mesmo nivel celular e de maneira orquestrada. Nesse contexto, é bastante significante a multifuncionalidade dos peptídios antibióticos catiônicos, que dependendo da composição da molécula, em termos da distribuição dos resíduos de aminoácidos, bem como da sua concentração no local de ação, além de antimicrobianos, podem ser citotóxicos, quimiotáticos, inibidores enzimáticos, mitogênicos, liberadores de histamina, ativadores de canais iônicos e indutores de morte celular (Lehrer et al, 1993 e referências acima). Por exemplo, pardaxin, um peptídio de 33 mer, é uma neurotoxina isolada tecido epitelial de pavões do Mar Vermelho (*Pardachirus marmoratus*) e do oeste do Pacífico (*Pardachirus pavoninus*) que, dependendo da concentração possue uma variedade de atividades biológicas, inclusive uma atividade microbicida (Shai, 1994).

Isso poderia demonstrar a ancestralidade dessas moléculas e a versatilidade de seus domínios protéicos – inicialmente podem ter sido selecionadas no combate imediato a invasores patógenos e, posteriormente, agindo de maneira integrada e sinérgica, no recrutamento de células auxiliares no combate a esses patógenos. Disso também resulta a anterioridade à resposta humoral (Boman, 1996).

A dualidade funcional de biomoléculas é algo sabido e as propriedades catalíticas dos tRNAs (ribozimas), nos "self-splicing introns" do grupo I, é um exemplo dessa característica e um provável indicador de ancestralidade (Patthy, 1999b). Há pouco tempo, Ebens et al. (1996), mostrou que o HGF/SF (hepatocyte growth factor/scatter factor), um polipeptídio ligante para o receptor c-Met (HGFr), não só é mitógeno, como também neurotrófico para neurônios motor e fator essencial derivado do músculo para a manutenção desses neurônios motor .

É razoável pensar que, num período de explosão da diversidade protéica e biológica, as biomoléculas fixaríam características multifuncionais - de integração e comunicação celular, bem como contribuiriam para a capacidade essencial das células se defenderem de patógenos, em um ambiente hostil e de complexidade emergente. De fato, mecanismos de defesa das células, em adição a outras funções biológicas, parecem ter sido desempenhados, nos primórdios da evolução, pelas ribonucleases, que clivam os RNAs exógenos introduzidos por microorganismos invasores nas células hospedeiras, que poderiam ser vírus de RNA. Sucessivamente, diversas moléculas com propriedades enzimáticas, como a lisozima - que atua sobre a parede celular de bactérias Gram positivas, desempenharam, conjuntamente, o papel no "patrulhamento" das células contra infecções por microorganismos. A partir daí, durante o curso da evolução do sistema de defesa celular inato, peptídios antibióticos têm sido selecionados, os quais agem sinergicamente com outros polipeptídios – ou seus fragmentos -, tais como a lactoferritina, a hemoglobina e a catepsina G (Elsbach, 1990; Parish et al., 2000).

Surpreendentemente, trechos ricos em cisteínas da ribonuclease se alinham, não só oa peptídios crotamina-símile, mas as outras citotoxinas de serpentes (e.g., PLA2) e de insetos (Strydom, 1977), sugerindo uma pressão evolutiva no emprego de domínios ricos em cisteína que formam α-hélice ou β-sheet, alternadas por regiões hidrofílicas e hidrofóbicas, para a interação com membranas.

```
Crotamine        YKQCHKKGGHCFPKEKICLPPSSDFGKMDCRWRWKCCKKGSG

Ribonuclease     QAICSQGQVTCKNGQTNCYQSYSTMSITDCRET-GSSKVPNC.....
```

Figura 19. Alinhamento da ribonuclease pancreática bovina e a crotamina de veneno de cascavel Sul-Americana. De acordo com Strydom (1977).

Tais domínios estruturais permitem mimetizar diversos efeitos farmacológicos e patológicos que são relacionados com eventos relacionados às membranas. Notadamente, regiões citotóxicas comuns, nas quais anfipaticidade ou segmentos carregados alternados por regiões hidrofóbicas são presentes, já haviam sido também identificados entre peptídios tóxicos de répteis/serpentes (peptídios crotamina-símile, PLA_2s miotóxicas e cardiotoxinas), de anfíbios (magainina – um peptídio antibiótico de *Xenopus leavis*) de insetos (melitina de *Apis mellifera*) e de microorganismos (δ-hemolisina, aerolisina) (Manjunatha Kini & Evans, 1989). Na verdade, a anfipaticidade - um lado da molécula hidrofóbica e outra hidrofílica - ou segmentos positivos alternados por regiões hidrofóbicas de peptídios catiônicos farmacologicamente ativos constituem arranjos moleculares que implicam uma interação membrana-específica – notar que só vírus encapsulados são suceptíveis às defensinas (Epand et al., 1995; Shai, 1995, White et al., 1995; Blazyk et al., 2001). Os peptídios catiônicos foram selecionados de forma a atuarem sobre as membranas celulares causando formação de poros, o que induz um potencial de ação transiente devido ao extravazamento de íons e, conseqüentemente, morte celular (Cociancich et al., 1993a; Wimley et al., 1994).

Por outro lado, a convergência desse mecanismo de ação - formação de poros e potencial de ação transiente, culmina com o aparecimento de outros peptídios catiônicos, como os da família da crotamina, que agem seletivamente em canais de sódio, aumentando a condutância do potencial de ação (decorrente do favorecimento do estado aberto do canal), ou alterando o fluxo de íons cálcio. Também, a convergência multifuncional deu origem as corticostatinas, que constituem um grupo de peptídios defensina-símile, antibióticos, que agem sobre canais de cálcio, regulando o volume de enterócitos e que se ligam especificamente a receptores para ACTH (MacLeod et al., 1991; Conlo & Sower, 1996; Bateman et al., 1996).

Mesmo não compartilhando semelhança na seqüência primária, peptídios como γ-tionina de plantas (Vernon, 1992), charybdotoxina de escorpião (Miller, 1995; Cestele & Catterall, 2000), defensina de insetos (Conciancich et al., 1993), drosomicina (peptídio antibiótico de *Drosophila*) (Fehlbaum et al., 1994), entre outros, compartilham semelhança em suas esruturas tridimensionais - um domínio CSαβ (cysteine stabilized αβ) (Figura 20) e possuem a capacidadede de formar poros na membrana (ação antibiótica) ou a propriedade de agirem em canais iônicos de Na^+, K^+, Ca^{2+} e Cl^- (Dimarcq et al., 1998; Froy & Gurevitz, 1998).

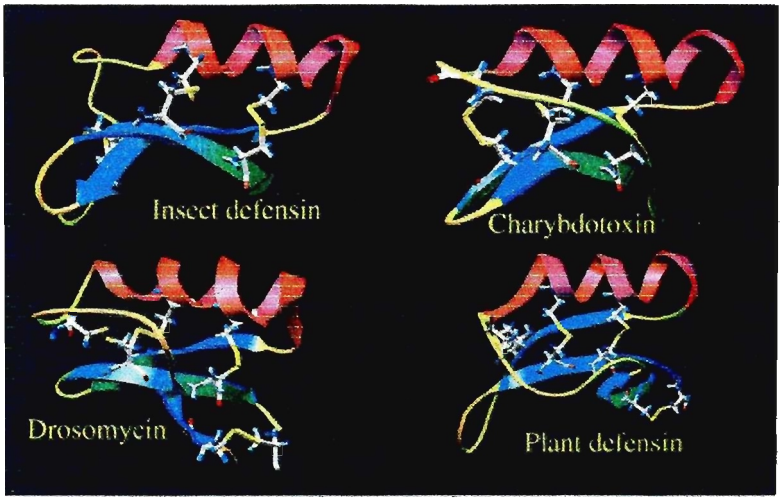


Figura 20. Peptídos antibióticos e tóxicos com motivos CSαβ. Conforme extraído de Dimarcq et al. (1998). De acordo com os autores, as coordenadas foram obtidas do Brookhaven Protein Data Bank (http://www.rcsb.org/pdb) e as estruturas desenhadas com o programa Swiss PDBviewer (http://www.expasy.ch). Insect defensin, de insetos do gênero *Phormia* (accession number 1ICA); charybdotoxin, do escorião do gênero *Leirus* (2CRD); drosomycin, de *Drosophila* (1MYN); plant defensin, de plantas do gênero *Raphanus* (1AYJ).

Assim, o que se evidencia é fundamentalmente a capacidade desses peptídios, principalmente catiônicos, com domínios de α-hélice e β-sheet, atuarem sobre a membrana celular, alterando seu potencial, seja indiretamente – formação de poros, seja especificamente sobre canais iônicos.

O fato de domínios estruturais protéicos similares serem utlizados para executar diferentes funções não é novo e vários exemplos corroboram tal observação. Em relação a isso, recentemente, uma proteína de membrana envolvida no crescimento e remodelagem ósseos, denominada Robo-1 ("***Rodent Bone 1***"), que compatilha similaridade de seus domínios protéicos com aqueles de uma família de proteínas caracterizadas por elementos de múltiplas funções, tais como os ativadores de receptores da uroquinase-plasminogênio, CD59, Ly-6 e fosfolipases A_2 de *C. d. terrificus* (Staton Noel et al., 1998). Em adição, domínios do tipo "three-finger" são partes não só de toxinas de serpentes, mas também de receptores celulares do tipo tirosina quinase, como o ActRII, os quais modulam, entre outros processos celulares, a proliferação e a diferenciação (Greenwald et al., 1999). É, assim, concebido que a similaridade entre receptores ou seus domínios e toxinas indicariam que esses mesmos domínios, com estruturas tridimensionais estáveis, são suceptíves à evolução, resultando em uma gama de proteínas efetoras e receptoras Alternativamente, *lynx1*, um componente divergente da mesma família do RoBo1/Ly6, compartilhando alta similaridade à superfamília da α-bungarotoxina – uma neurotoxina da serpente *Bungarus multicinctus*, mantém a mesma propriedade da toxina, isto é, age sobre receptores de acetilcolina do tipo nicotínicos (nAChR), porém funciona como um modulador endógeno da atividade do nAChR, em sistema nervoso central de mamíferos (Miwa et al., 1999).

Outro exemplo digno de nota compreende uma neurotoxina, α-latrotoxina, do veneno de aranhas viúva-negra (*Latrodectus tredecimguttatus*), que exerce seu efeito tóxico no sistema nervoso central de vertebrados, devido a exocitose maciça e descontrolada de neurotransmissores. A α-latrotoxina compartilha similaridade de seqüência com peptídios glucagon-símile (GLP-1, glucagon, polipeptídio vasoativo intestinal, secretina, peptídio ativador de adenilato ciclase da glândula pituitária), os quais interagem com receptores ligados à proteína G (Holz & Habener). Portanto, essa toxina não só apresenta atividade neurotóxica, mas também mostram atividade sobre o sistema endócrino, estimulando a exocitose de epinefrina ou de insulina das células pancreáticas. Esses exemplos demonstram a grande versatilidade de domínios protéicos conservados e a alta capacidade de interação e comunicação de moléculas que os possuem.

Tomado como um todo, o presente trabalho vem indicar dois aspectos fundamentais que caracterizam a mutifuncinalidade dos peptídios crotamina-defensina-símile: (1) devido à organização gênica – introns relativamente longos, interrompendo alguns - de um a quatro - códons N-terminais de uma seqüência líder e flanqueando um segundo exon, há uma permissividade de evolução acelerada da porção matura do peptídio (restrita a um exon), fornencendo a base evolutiva para a produção de moléculas com um amplo espectro de atividade, bem como a co-evolução dessas moléculas peptídicas com seus alvos; (2) devido à possibilidade de evolução acelerada de peptídios policatiônicos, em razão da organização gênica, há não só divergência de uma molécula ancestral comum – como atestado pela evolução dos genes parálogos crotasin/crotamina, mas também pela convergência evolutiva de funções atribuídas a uma mesma molécula. No caso aqui discutido, tal convergência evolutiva é tipificada pela capacidade de modulação do potencial de membrana celular, bem como pela capacidade de interferir com processos celulares de proliferação e diferenciação, ao nível daquela estrutura celular. E tal capacidade é decorrente da concentração do peptídio no seu local de ação.

CONCLUSÕES III

A produção de toxinas recombinantes, peptídios tóxicos de cascavel, requer um ambiente (celular) favorável para a formação correta das pontes dissulfeto. Utilizando células procarióticas, como *E. coli*, a produção é alta, entretanto o peptídio é desprovido de atividade biológica, ainda que seja reconhecido pelo anticorpo específico. Por outro lado, o emprego de células eucarióticas, como *P. methanolica*, produz peptídios ativos, porém com rendimento muito baixo.

Comparação de seqüências peptídicas em bases de dados de proteína e de genes podem fornecer algumas idéias sobre funções prováveis de peptídios ainda não descritos.No presente caso modulador de sinais químicos – no controle da proliferação e da diferenciação celulares, em eucariotos, ou no controle de proliferação celular em procariotos – atividade microbicida.

Ensaios de atividade antibiótica com os peptídios crotamina e crotasin indicam que essas moléculas possuem a capacidade de controle da proliferação microbiana. Peptídios sintéticos derivados dessas moléculas, com substituições de alguns aminoácidos, permite melhor a atividade microbicida (resistência a sal, p.e.) ou aniquila completamente essa atividade.

Utilização de testes sensíveis para a análise de citoxidade ou proliferação celular em eucariotos, empregando células-tronco embrionárias de camundongo, indica que peptídios catiônicos como a crotamina são citotóxicos em com concentrações da ordem de milimolar, enquanto são capazes de induzir a diferenciação de complexos de EBs, quando expostos a concentrações micromolares.

A diferenciação de corpos embrióides, induzida por crotamina, permite identificar dois tipos celulares: precursores de células sangüíneas e células nervosas. A razão disso deve ser explorada em detalhes.

A propriedade multifuncional de peptídios catiônicos é um fato decorrente da versatilidade dos seus domínios estruturais protéicos, que permitem a modulação de potencial de membrana, quer seja formando poros na membrana (canais iônicos transitórios), quer seja agindo diretamente sobre canais. Formação de poros culmina com a morte de células procarióticas e eucarióticas malignas, ao passo que a interação com canais iônicos ou receptores celulares modula a transmissão de impulsos nervosos e a transdução de sinais, conectando diferentes tipos celulares.

A organização gênica de peptídios catiônicos tóxicos - e de peptídios catiônicos antibióticos-, permite não só a evolução acelerada da região matura da molécula, circunscrita ao exon II, dando origem a gene parálogos, mas também permite que haja evolução convergente de funções – como atestado aqui.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tomado como um todo o presente trabalho apresenta o estudo de genes de miotoxinas e um novo gene relacionado a esses de uma serpente brasileira, bem como considerações evolutivas sobre a função do produto desses genes.

A análise atenta não deixa dúvidas que os componentes moleculares agem de maneira integrada, não só por estabelecer conexões individuais entre moléculas, mas também pela propriedade intrínseca de multi-funcionalidade nas interações. A evolução coordenada na diversificação dos genes de uma família, em decorrência da sua organização gênica, permite um aprimoramento do repertório de moléculas farmacologicamente ativas, para intervenções bioquímicas entre células, tecidos e organismos.

O mesmo sendo válido para os componentes biológicos no contexto ecológico, isto é, quanto maior a complexidade de interações moleculares, maior é a complexidade na cadeia de interações entre organismos.

Essas inter-relações moleculares e biológicas são extremamente importantes na composição de veneno, desde que indica uma co-evolução entre moléculas efetoras "tóxicas" e receptores celulares e, consequentemente, entre presa e predador. Portanto, uma visão global do estudo, podería fornecer suporte, que contribuiría, em parte, para a preservação de espécies pertencentes à biodiversidade nacional. Pois só a partir do momento que se conhece a complexidade genética e farmacológica dos organismos que compõem os diferentes ambientes, se pode preservar a ambos – o complexo de organismos e o ambiente que os contém.

6. PERSPECTIVAS

Os peptídios catiônicos tóxicos e antibióticos constituem superfamílias distintas, mas com um "scaffold" básico de seis cisteínas dispostas em três pontes dissulfetos conservadas. Esse arranjo estrutural básico permite uma diversidade de moléculas similares com múltiplas funções, cuja ação converge para um mesmo nível celular – a membrana plasmática.

Diversos grupos e companhias têm expbrado a versatilidade multifuncional dos peptídios catiônicos para sintetizar diferentes oligopeptídios, por meio da variação dos resíduos de aminoácidos da estrutura básica. Tais modificações moleculares da estrutura original visam, entre outros aspectos, (*i*) ampliar ou modificar o espectro de ação contra microorganismos, (*ii*) aumentar a tolerância a sais, (*iii*) diminuir a citotoxicidade contra células normais e (*iv*) melhorar a capacidade de reconhecimento e de controle da proliferação de células malignas (as membranas celulares de células malignas são constitutivamente diferentes das células não transformadas). Isso tem sido conseguido com relativo sucesso e centenas de patentes estão depositadas no U. S. Patent Office (http://www.uspto.gov).

M. Zasloff, quem isolou o primeiro peptídio antibiótico da pele de anfíbio (magainin – escudo, do hebraico) (Bevins & Zasloff, 1990), é o fundador da Magainin Pharmaceuticals Inc, Plymouth Meeting, PA (http://www.genaera.com), empresa dedicada ao desenvolvimento de medicamentos anti-tumor e contra infecções, a partir de peptídios e produtos naturais.

Os vários oligopeptídios sob a patente US4774318 compartilham similaridade com a família da crotamina e das defensinas e, são derivados de peptídios de veneno de serpente com atividade de deter a proliferação celular.

Em decorrência à crescente resistência dos microorganismos patógenos aos antibióticos convencionais, se faz necessária a busca de novos agentes microbicidas – lacuna que os peptídios catiônicos podem preencher, quer seja pela molécula original ou seus derivados. Não menos importante é a busca de moléculas capazes de controlar a atividade de receptores de tirosina quinase e, conseqüêntemente o crescimento celular descontrolado (Fazekas et al., 2001; Longati et al, 2001).

A partir dos resultados apresentados aqui, o que se pretende é, entre outros pontos: (1) determinar a solução-estrutura da crotamina e crotasin, e atribuir as funções biológicas aos domínios protéicos; (2) investigar profundamente as diversas funções da crotamina e do crotasin sobre células procarióticas e células pluripotentes, bem como tumorogênicas; (3) obter um número maior de derivados desses peptídios e testar para diferentes atividades, tais como: antibiótica, inibidor de crescimento de tumor, fator trófico; (4) isolar novas estruturas do veneno e dos tecidos de serpentes com essas duas propriedades principais – antibiótica e moduladora da proliferação e da diferenciação celulares; (5) pleitear a propriedade intelectual das descobertas realizadas, através da investigação e produção desses peptídios, bem com seus derivados sintéticos ou recombinantes.

7. REFERÊNCIAS

AFIFIYAN, F.; ARMUGAM, A.; TAN, C.H.; GOPALAKRISHNAKONE, P. & JEYASEELAN, K. Postsynaptic alpha-neurotoxin gene of the spitting cobra, *Naja naja sputatrix*: structure, organization, and phylogenetic analysis. **Genome Res.** 9 (3):259-266, 1999.

AIRD, S. D.; KRUGGEL, G. & KAISER, I. I. Multiple myotoxin sequences from the venom of a single prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*). **Toxicon** 29:265-268, 1991.

AIRD, S.T. A quantitative assessment of variation in venom constituents within and between three nominal rattlesnake subspecies. **Toxicon** 23 (6): 1000-1004, 1985.

AKADA, R; MURAKANE, T & NISHIZAWA, Y. DNA extraction method for screening yeast clones by PCR. **BioTechniques** 28:668-674, 2000.

ALEXANDER, A.; GROTHUSEN, J.; ZEPEDA, H. & SCWARTZMAN, R.J. Gyrotoxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme. **Toxicon** 26: 953-960, 1988.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W. & LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucl. Ac. Res.** 25:3389-3402, 1997.

ALTSCHUL, S.F; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W. & LIPMAN, D. L. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Evol.** 215:403-410, 1990.

ANNE PEREIRA, H. Assay for measurement of chemotactic activity. *In*: SHAFER, W. M. (ed.) Methods in Molecular Biology, Vol 78: **Antibacterial Peptide Protocols**, Humana Press Inc., Towa, NJ, 1997, p. 233-246.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J. A. & STRUHL, K. **Current Protocols in Molecular Biology**, Wiley Interscience, New York, 1995.

BAIN, G.; KITCHENS, D.; YAO, M.; HUETTNER, J.E.; & GOTTLIEB, D.L. Embrionic stem cells express neuronal properties *in vitro*. **Dev. Biol.** 168(2): 342-357, 1995.

BARDELLI, A.; LONGATI, P.; WILLIAMS, T. A.; BENVENUTI, S. & COMOGLIO, P. M. A peptide representing the carboxyl-terminal tail of the met receptor inhibits kinase activity and invasive growth. **J. Biol. Chem.** 274(41):29274-29281, 1999.

BARRIO, A. Gyrotoxin, a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Acta Physiol. Latinoamericana** 11: 224, 1961

BATEMAN, A; MacLEOD, J.; LEMBESSIS, P.; HU, J.; ESCH, F. & SOLOMON, S. The isolation and characterization of a novel corticostatin/defensin-like peptides from the kidney. **J. Biol. Chem.** 271(18):10654-10659, 1996.

BAUCHOT, R. **Snakes. A Natural History**, Sterling Publishing Co., New York, USA, 1994.

BAUTCH, V.L.; STANFORD, W.L.; RAPOPORT, R., RUSSEL, S.; BYRUM, R.S. & FUTCH, T.A. Blood island formation in attached cultures of murine embryonic stem cells. **Dev. Dyn.** 205: 1-12, 1996.

BDOLAH, A.; WOLLBERG, Z. & KOCHVA, E. Sarafotoxins: a new group of cardiotoxic peptides from the venom of *Atractaspis*. *In*: (HARVEY, A. L., ed.) **Snake Toxins**, Pergamon Press, New York, 1991, p. 415.

BECERRIL, B.; CORONA, M.; CORONAS, F. I.; ZAMUDIO, F.; CALDERON-ARANDA, E. S.; FLETCHER, P. L.; MARTIN, B. M. & POSSANI, L. D.Toxic peptides and genes encoding toxin gamma of the Brazilian scorpions *Tityus bahiensis* and *Tityus stigmurus*. **Biochem. J.** 313:753-760, 1996.

BECERRIL, B.; MARANGONI, S. & POSSANI, L. D. Toxins and genes isolated from scorpions of the genus *Tityus*. **Toxicon** 35(6):821-835, 1997.

BEFUS, A. D.; MOWAT, C.; GILCHRIST, M.; HU, J.; SOLOMON, S. & BATEMAN, A. Neutrophil defensins induce histamine secretion from mast cells: mechanism of action. **J. Immunol.** 163(2), 947-953, 1999.

BIEBER, A. L. & NEDELKOV, D. Structural, biological and biochemical studies of myotoxin *a* and homologous myotoxin. **J. Toxicol. -Toxin Reviews**. 16:33-52, 1997.

BIEBER, A. L.; McPARLAND, R. H. & BECKER, R. R. Amino acid sequences of myotoxins from *Crotalus viridis concolor* venom. **Toxicon** 25:677-680, 1987.

BEVINS, C. L. & ZASLOFF, M. Peptides from frog skin. **Ann. Rev. Biochem.** 59:395-414, 1990.

BLAKE, C.C.F., Do genes-in-pieces imply proteins-in-pieces? **Nature** 273: 267-, 1987.

BLAZYK, J.; WIEGAND, R.; KLEIN, J.; HAMMER, J.; EPAND, R. M.; EPAND, R. F.; MALOY, W. L. & KARI, U. P. A novel linear amphipathic beta-sheet cationic antimicrobial peptide with enhanced selectivity for bacterial lipids. **J. Biol. Chem.** 276(30):27899-27906, 2001.

BOBER, M. A.; GLENN, J.L; STRAIGHT, R. C. & OWNBY, C. L. Detection of myotoxin-*a* like proteins in various snake venoms. **Toxicon** 26, 665-673, 1988.

BOMAN, H. G. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. **Annu. Rev. Immunol.** 13:61-92, 1995.

BOMAN, H. G. Peptides Antibiotics: Holy or heretics grails of innat immunity? **Scand. J. Immunol.** 43: 475-482, 1996.

BOUCHIER, C.; BOULAIN, J. C.; BON, C. & MENEZ, A. Analysis of cDNAs encoding the two subunits of crotoxin, a phospholipase A2 neurotoxin from rattlesnake venom: the acidic non enzymatic subunit derives from a phospholipase A2-like precursor. **Biochim. Biophys. Acta.** 1088(3):401-408, 1991.

BOUCHIER, C.; DUCANCEL, F.; GUIGNERY-FRELAT, G.; BON, C.; BOULAIN, J. C. & MENEZ, A. Cloning and sequencing of cDNAs encoding the two subunits of Crotoxin. **Nucl. Acid. Res.** 16(18):9050-, 1988.

BRAZIL, O. V. & FONTANA, M. D. Toxins as tools in the study of sodium channel distribution in the muscle fibre membrane. **Toxicon** 31:1085-1098, 1993.

BRAZIL, O. V. Neurotoxins from the South American rattlesnake venom. **J. Formosan. Med. Assoc.** 71:394-400, 1972.

BREATHNACH, R. & CHAMBOM, P. Organization and expression of eucaryotic split gene coding for proteins. **Annu. Rev. Biochem.** 50:349-383, 1981.

CAMERON, D. L. and TU, A. T. Chemical and functional homology of myotoxin *a* from prairie rattlesnake venom and crotamine from South American rattlesnake venom. **Biochem. Biophys. Acta** 532:147-154, 1978.

CAMPBELL, J. A. & LAMAR, W. W. **The venomous reptiles of Latin America**, Comstock Publishing Associates, New York, 1989, p. 330-346.

CARVALHO, A.B. & CLARK, A.G. Intron size and natural selection. **Nature** 401:344, 1999.

CARVALHO, D. D.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B. & NOVELLO, J. C. Isolation and characterization of a new lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. **Biochem. Biol. Intl.** 44 (5):933-938, 1998.

CASTAGNARO, A.; MARANA, C.; CARBONERO, P. & GARCIA-OLMEDO, F. Extreme divergence of a novel wheat thionin generated by a mutational burst specifically affecting the mature protein domain of the precursor. **J. Mol. Biol.** 224(4):1003-1009, 1992.

CESTELE, S. & CATTERALL, W. A. Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. **Biochimie** 82:883-892, 2000.

CHANG, C. C. & LEE, C.Y. Isolation of neurotoxins from the venom of *Bungarus multicinctus* and their mode of neuromuscular blocking action. **Arch. Int. Pharmacodyn.** 144:241-257, 1963.

CHANG, C. C. & LEE, J. D. Crotoxin, the neurotoxin of South American rattlesnake venom, is a presynaptic toxin acting like β-bungarotoxin. **Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.** 296:159-168, 1977.

CHANG, L.; CHOU, Y.; LIN, S.; WU, B.; LIN, J.; HONG, E.; SUN, Y. & HSIAO, C. A novel neurotoxin, cobrotoxin *b*, from *Naja naja atra* (Taiwan Cobra) venom: purification, characterization, and gene organization. **J. Biochem.** 122:1252-1259, 1997a.

CHANG, L.; LIN, J.; CHOU, Y. & HONG, E. Genomic structures of cardiotoxin 4 and cobrotoxin from *Naja naja atra* (Taiwan cobra). **Biochem. Bioph. Res. Comm.** 239:756-762, 1997b.

CHANG, L.; LIN, S.; HUANG, H. & HSIAO, M. Genetic organization of alpha-bungarotoxins from *Bungarus multicinctus* (Taiwan banded krait): evidence showing that the production of alpha-bungarotoxin isotoxins is not derived from edited mRNAs. **Nucleic Acids Res.** 27 (20): 3970-3975 1999.

CHARP, P. A.; RICE, W. G.; RAYNOR, R. L.; REIMUND, E.; KINKADE, J. M.; GANZ, T.; SELSTED, M. E.; LEHRER, R. I. & KUO, J. F. Inhibition of protein kinase C by defensins, antibiotic peptides from human neutrophils. **Biochem. Pharmacol.** 37(5):951-956, 1988.

CHIAPPINELLI, V. A. Neurotoxins acting on acetylcholine receptors. *In* (HARVEY, A. L., ed.) **Natural and Synthetic Neurotoxins**, Academic Press Inc., San Diego, 1993, p. 65.

CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chlorofom extraction. **Anal. Biochem.** 162:156-159, 1987.

COCIANCICH, S.; GHAZI, A.; HETRU, C.; HOFFMANN, J. A. & LETELLIER, L. Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*. **J. Biol. Chem.** 268(26):19239-19245, 1993a.

COCIANCICH, S.; GOYFFON, M.; BONTEMS, F.; BULET, P.; BOUET, F.; MENEZ, A. & HOFFMANN, J. Purification and characterization of a scorpion defensin, a 4kDa antibacterial peptide presenting structural similarities with insect defensins and scorpion toxins. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 194:17-22, 1993b.

COMOGLIO, P. M. & GRAZIANI, A. Hepatocyte growth factor and hepatocyte growth factor receptor. *In*: (Nicola, N. A., ed.) **Guidebook to cytokines and their receptors**, Oxford University press, Oxford, 1994. p.182-187.

CUSHMAN, D. W. & ONDETTI, M. A. Design of angiotensin converting enzyme inhibitors. **Nature Med.** 1999 (10):1110-1113, 1999.

CUSHMAN, D. W.; CHEUNG, H. S.; SABO, E. F. & ONDETTI, M. A. Development and design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme. **Am. J. Cardiol.** 49(6):1390-1394, 1982.

DALTRY, A. A.; WÜSTER, W. & THORPE, R. S. Diet and snake venom evolution. **Nature** 379:537-540, 1996.

DAYHOFF, M. O.; BARKER, W. C. & HUNT, L. T. Establishing homologies in protein sequences. **Meth. Enzymol.** 91:524-545, 1983.

DE SOUZA, S.J.; LONG, M.; KLEIN, R.J.; ROY, S.; LIN, S. & GILBERT, W. Toward a resolution of the introns early/late debate: only phase zero introns are correlated with the structure of ancient proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 95:5094-5099, 1998.

DEVI, A. The protein and nonprotein constituents of Snake Venoms. *In* (BÜCHERL, W; BUCKLEY, E. E. & DEULOFEU, V., eds.) **Venomous Animals and Their Venoms**, Academic Press, New York, 1959. p. 119-160.

DIMARCQ, J. L.; BULET, P.; HETRU, C. & HOFFMANN, J. Cysteine-rich antimicrobial peptides in invertebrates. **Biopolymers** 47(6):465-477, 1998.

DOETSCHMAN, T.; EISTETTER, H.; KATZ, M; SCHIMDT, W. & KEMLER, R. The *in vitro* development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk saac, blood islands and myocardium. **J. Embryol. Exptl. Morph.** 87:27-45, 1985.

DOS SANTOS, M. C.; MORHY, L.; FERREIRA, L. C. L. & OLIVEIRA, E. B. Purification and propeties of a crotamine analog from *Crotalus durissus ruruima* venom. **Toxicon** 31:166-, 1993

DUCANCEL, F.; MATRE, V.; DUPONT, C.; LAJEUNESSE, E.; WOLLBERG, Z.; BDOLAH, A.; KOCHVA, E.; BOULAIN, J. C. & MENEZ, A. Cloning and sequence analysis of cDNAs encoding precursors of sarafotoxins. Evidence for an unusual "rosary-type" organization. **J. Biol. Chem.** 268(5):3052-3055, 1993.

EBENS, A.; BROSE, K.; LEONARDO, E. D.; HANSON, M. G.; BLADT, F.; BIRCHMEIER, C.; BARRES, B. A. & TESSIER-LAVIGNE, M. Hepatocyte growth factor/scatter factor is an axonal chemoattractant and a neurotrophic factor for spinal motor neurons. **Neuron** 17(6):1157-1172, 1996.

ELSBACH, P. Antibiotics from within: antibacterials from human and animal sources. **Trends Biotechnol.** 8(1):26-30, 1990.

ENGLE, C. M.; BECKER, R. R.; BAILEY, T. & BIEBER, A. L.Characterization of two myotoxin proteins from venom of *Crotalus viridis viridis*. **J. Toxicol. -Toxin Rev.** 2:267-283, 1983.

EPAND, R. M.; SHAI, Y.; SEGREST, J. P. & ANANTHARAMAIAH, G. M. Mechanisms for the modulation of membrane bilayer properties by amphipathic helical peptides. **Biopolymers** 37(5):319-338, 1995.

FAZEKAS, K.; JANOVICS, A.; DÖME, B.; KOSKA, P; ALBINI, A.; &TÍMÁR, J. Effect of HGF-like basic hexapeptides on angiogenesis. **Microvasc. Res.** 62:440-444, 2001.

FEHLBAUM, P.; BULET, P.; MICHAUT, L.; LAGUEUX, M.; BROEKAERT, W. F.; HETRU, C. & HOFFMANN, J. A. Insect immunity. Septic injury of Drosophila induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. **J. Biol. Chem.** 269(52):33159-33163, 1994.

FERNADEZ-BORTRAN, R. Soluble cytokine receptors: their role in immunoregulation. **Faseb J.** 5:2567-2574, 1991.

FERREIRA S.H, & ROCHA e SILVA, M. Potentiation of bradykinin and eledoisin by BPF (bradykinin potentiating factor) from *Bothrops jararaca* venom. **Experientia** 21(6):347-349, 1965.

FERREIRA, S. H. Angiotensin converting enzyme: history and relevance. **Semin Perinatol.** 24(1):7-10, 2000.

FERREIRA, S. H. University discoveries and intellectual property rights: from *Bothrops jararaca* bradykinin potentiating peptides to angiotensin converting enzyme inhibitors. **Braz J Med Biol Res.** 27(8):1693-1698, 1994

FERREIRA, S. H.; BARTELT, D. C. & GREENE, L. J. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. **Biochemistry** 9(13):2583-2593, 1970.

FLETCHER, J. E.; HUBERT, M.; WIELAND, S. J.; GONG, Q. & JIANG, M. Similarities and differences in mechanisms of cardiotoxins, melittin and other myotoxins. **Toxicon** 34:1301-1311, 1996.

FORTES-DIAS, C. L.; LIN, Y.; EWELL, J.; DINIZ, C. R. & LIU, T. Y. A phospholipase A_2 inhibitor from the plasma of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). Protein structure, genomic structure, and mechanism of action. **J. Biol. Chem.** 269(22):15646-15651, 1994.

FOX, J. W.; ELZINGA, M. & TU, A. T. Amino acid sequence and disulfide bond assignment of myotoxin *a* isolated from the venom of prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*). **Biochemistry** 18:678-684, 1979.

FRAICHARD, A; CHASSANDE, O.; BILBAUT, G.; DEHAY, C.; SAVATIER, P.; & SAMARUT, J. In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cell and functional neurons. **J. Cell. Sci.** 108: 3181-3188, 1995.

FROY, O & GUREVITZ, M. Membrane potential modulators: a thread of scarlet from plants to humans. **FASEB J.** 12:1793-1796, 1998.

FURUKAWA, K.; FUNAYAMA, K.; OHKURA, M.; OSHIMA, Y.; TU, A. T. & OHIZUMI, Y. Ca^{2+} release induced by myotoxin a, a radio-labellable probe having novel Ca^{2+} release properties in sarcoplasmatic reticulum. **Br. J. Pharmacol.** 113:233-239, 1994.

FUSE, N.; TSUCHIYA, T.; NONOMURA, Y.; MENEZ, A. & TAMIYA, T. Structure of the snake short-chain neurotoxin, erabutoxin c, precursor gene. **Eur. J. Biochem.** 193:629-633, 1990.

GALLO, R. L.; ONO, M.; POVSIC, T.; PAGE, C.; ERIKSSON, E.; KLAGSBRUN, M. & BERNFIELD, M. Syndecans, cell surface heparan sulfate proteoglycans, are induced by a proline-rich antimicrobial peptide from wounds. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 91(23):11035-11039, 1994.

GANZ, T. & LEHRER, R. I. Antimicrobial peptides of vertebrates. **Curr. Op. Immunol.** 10:41-44, 1998.

GERA, J. F. & LICHTENSTEIN, A. Human neutrophil peptide defensins induce single strand DNA breaks in target cells. **Cell Immunol.** 138(1):108-120, 1991.

GILBERT, W. The exon theory of genes. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.** 52:901-905, 1987.

GIORGI, R.; BERNARDI, M. M. & CURY, Y. Analgesic effect evoked by low molecular weight substances extracted from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon.** 31(10):1257-1265, 1993.

GODA, S. K. & MINTON, N. P. A simple procedure for gel electrophoresis and northern blotting of RNA. **Nucl. Ac. Res.** 23:3357-3358, 1995.

GOLDMAN, M. J.; ANDERSON, G. M.; STOLZENBERG, E. D.; KARI, U. P.; ZASLOFF, M. & WILSON, J. M. Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. **Cell** 88:553-560, 1988.

GONÇALVES, J.M., 1956. Purification and properties of crotamine. *In*: (BUCLEY, E.E. & PORGES, N., eds.) **Venoms**, American Association for the Advancement of Science, Washington, D.C., 1956, p. 261-274.

GREENE, H. W. *Snakes. The Evolution of mistery in Nature.* ***University of California Press, CA, USA, 1997.***

GREENWALD, J.; FISCHER, W. H.; VALE, W. W. & CHOE, S. Three-finger toxin fold for the extracellular ligand-binding domain of the type II activin receptor serine kinase. **Nat. Struct. Biol.** 6(1):18-22, 1999.

GRIFFIN, P. R. & AIRD, S. D. A new small myotoxin from the venom of the prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*). **FEBS Lett.** 274:43-47, 1990.

GURA, T. Ancient systems gets new respects. **Science** 291:2068-2071, 2001.

HAGWOOD, B. J. & SANTANA DE SÁ, S. Changes in spontaneous and evoked release of transmitters induced by the crotoxin complex and its component phospholipase A_2 at the frog neuromuscular junction. **Neuroscience** 4:293-303, 1979.

HANCOCK, R. E. W. & DIAMOND, G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. **Trends Microbiol.** 8(9): 402-410, 2000a.

HANCOCK, R. E. W. & SCOTT, M. G. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. **Proc. Natl. Acad. Sci USA** 97(16): 8856-8861, 2000b.

HARVEY, A. L.; ANDERSON, A. F. & ROWAN, E. G. Toxin affecting ion channels. *In*: (HARVEY, A. L., ed.) **Natural and Synthetic Neurotoxins**, Academic Press Inc., San Diego, 1993, p. 129

HETRU, C & BULET, P. (1997). Strategies for the isolation and characterization of antimicrobial peptides of invertebrates. *In*: (SHAFER, W. M., ed) Methods in Molecular Biology, Vol 78: **Antibacterial Peptide Protocols**, Humana Press Inc., Towa, NJ, 1997, p. 35-50.

HIGGINS, D. G. & SHARP, P. M. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignments on a microcomputer. Gene 73:237-244, 1988.

HIGGINS, D. G.; THOMPSON, J. D. & GIBSON, T. J. Using CLUSTAL for multiple sequence alingments. **Meth. Enzymol.** 266:383-402, 1996.

HILL, R. E. & HASTIE, N. D. Accelerated evolution in the reactive centre regions of serine protease inhibitors. **Nature** 326(6108):96-99, 1987.

HIRATA, Y.; NORIMICHI, N.; OKHURA, M. & OHIZUMI, Y. Identification of 30 kDa protein for Ca^{2+} releasing action of myotoxin-a with a mechanism common to DIDS in skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. **Biocem. Biophys. Acta** 1451:132-140, 1999.

HOGE, A. R. & ROMANO-HOGE, S. A. R.W. L. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil, 2ª ed., **Memórias do Instituto Butantan** 42/43:373-496, 1978/1979.

HOLZ, G.G. & HABENER, J. F. Black widow spider –latrotoxin: a presynaptic neurotoxin that shares structural homology with the glucagon-like peptide-1 family of insulin secretagogic hormones. **Comp. Biochem. Physiol.** 121:177-184, 1998.

HONG, S. J. & CHANG, C. Electrophysiological studies of myotoxin-*a* isolated from prairie rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom on murine skeletal muscle. **Toxicon** 23:927-937, 1985.

HUGHES, A. L.; OTA, T. & NEI, M. Positive Darwinian selection promotes charge profile diversity in the antigen-binding cleft of class I major-histocompatibility-complex molecules. **Mol. Biol. Evol.** 7(6):515-524, 1990.

ISRAEL, D. I. A PCR-based method for high stringency screening of DNA libraries. **Nucl. Ac. Res.** 21:2627-2631, 1993.

ISRAEL, D. I.A PCR-based method for screening DNA Libraries. *In*: (DIFFENBACH, C. W. and DVEKSLER, G. S., eds.) **PCR Primer. A laboratory Manual**, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1995.

JERUSALINSKY, D & HARVEY, A. L. Toxins from mamba: small proteins with selectivities for different subtypes of muscarinic acetylcholine receptors. **TIPS** 15:424-430, 1994.

JOHN, T.R., SMITH, L.A., KAISER, I.I. Genomic sequences encoding the acidic and basic subunits of Mojave toxin: unusually high sequence identity of non-coding regions. **Gene** 139(2): 229-234, 1994.

JOHNSTONE, S. A.; GELMON, K.; MAYER, L. D.; HANCOCK, R. E. & BALLY, M. B. In vitro characterization of the anticancer activity of membrane-active cationic peptides I. Peptide-mediated cytotoxicity and peptide-enhanced cytotoxic activity of doxorubicin against wild-type and p-glycoprotein over-expressing tumor cell lines. **Anticancer Drug Des.** 15(2):151-160, 2000.

KARLIN, S. & ALTSCHUL, S. F. Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 87:2264-2268, 1997.

KATTAH, L.S.; SANTORO, M.M.; DINIZ, C.R. & DE LIMA M. E. Crotoxin, the major toxin from the rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*, inhibits ^{3}H-choline uptake in guinea pig ileum. **Braz. J. Med. Biol. Res**. 33: 1093-1097, 2000.

KELLER, G.M. *In vitro* differentiation of embryonic stem cells. **Curr. Opin. Cell Biol.** 7:862-869, 1995.

KENNEL, P. F.; POINDRON, P.; WARTER, J. M. & FONTENEAU, P. Alpha-bungarotoxin sensitization in experimental autoimmune myasthenia gravis. **Muscle Nerve** 16(5):461-465, 1993.

KERKIS, A.; SOUKOIAN, M.; KERKIS, I; MERCKEL, C.; MELLO, M. R. B. & PEREIRA, L. V. Células Tronco-Embrionárias. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** 20:20-25, 2001.

KIMURA, M. Rare variant alleles in the light of the neutral theory. **Mol. Biol. Evol.** 1(1):84-93, 1983.

KOCHVA, E.; BDOLAH, A. & WOLLBER, G. Z. Sarafotoxins and endothelins: evolution, structure and function. **Toxicon** 31(5):541-568, 1993.

KOCHVA, F. H. & GANS, C. The venom gland of *Vipera palaestinae* with comments on the glands of some other viperines. Acta Anat. 62:365-370, 1966.

KORDIS, D. & GUBENSEK, F. Ammodytoxin C gene helps to elucidate the irregular structure of Crotalinae group II phospholipase A_2 genes. **Eur J Biochem.** 240:83-90, 1996.

KORDIS, D.; BDOLAH, A. & GUBENSEK, F. Positive Darwinian selection in *Vipera palaestinae* phospholipase A2 genes is unexpectedly limited to the third exon. **Bioch. Bioph. Res. Comm.** 251, 613-619, 1998.

KORNALIK, F. The influence of snake venom proteins on blood coagulation. *In*: (HARVEY, A. L., ed.) **Snake Toxins**, Pergamon Press, New York, 1991. p. 323.

KOSTIZA, T. & MEIER, J. Nerve growth factors from snake venoms: chemical properties, mode of action and biological significance. **Toxicon** 34(7):787-806, 1996.

LAUCHUMANAN, R.; ARMUGAM, A.; TAN, C.H. & JEYASEELAN, K. Structure and organization of the cardiotoxin genes in *Naja naja sputatrix*. **FEBS Letters** 433:119-124, 1998.

LAURE, C. J. Die Primärstruktur des Crotamines. **Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.** 356:213-215, 1975.

LAWRENCE C. E.; ALTSCHUL, S. F.; BOGUSKI, M. S.; LIU, S. J.; NEUWAD, A. F. & WOOTON, J. C. Detecting subtle sequence signals: a Gibbs sampling strategy for multiply alignment. **Science** 262:208-214, 1993.

LEAHY, A.; XIONG, J-W.; KUHNER, F.; & STUHLMANN, H. Use of developmental marker genes to define temporal and spatial patterns of differentiation during embryoid body formation. **J. Exp. Zool.** 284: 67-81, 1999.

LEDUC, M. & BON, C. Cloning of subunits of convulxin, a collagen-like platelet-aggregating proteinfrom *Crotalus durissus terrificus* venom. **Biochem. J.** 15;333:389-393, 1998.

LEE, C. Y. Chemistry and pharmacology of polypeptide toxins in snake venoms. **A. Rev. Pharmacol.** 12:265-286, 1972.

LEHRER, R. I. & GANZ, T. Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. **Curr. Op. Immunol.** 11:23-27, 1999.

LEHRER, R. I. LICHTENSTEIN, A. K. & GANZ, T. Defensisn: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. **Annu. Rev. Immunol.** 11:105-128, 1993.

LI, W-H. **Molecular Evolution**, Sinauer Associates, MA, 1997.

LING, V. & NEBEN, S. In vitro differentiation of embryonic stem cells: immunophenotypic analysis of cultured embryoid bodies. **J. Cell Physiol.** 171:104-105, 1997.

LIPPS B.V. Biological and immunological properties of nerve growth factor from snake venoms. **J. Nat. Toxins.** 7:121-130, 1998.

LIU, C. Z. & HUANG, T. F. Crovidisin, a collagen-binding protein isolated from snake venom of *Crotalus viridis*, prevents platelet-collagen interaction. **Arch. Biochem. Biophys.** 337(2):291-299, 1997.

LONG, M.; DE SOUZA, S.J. & GILBERT, W. Evolution of the intron-exon structure of eucaryotic gene. **Curr. Opin. Gent. Dev.** 5(6): 774-778, 1995.

LONGATI, P.; COMOGLIO, P. M. & BARDELLI, A. Receptor tyrosine kinases as therapeutic targets: the model of the MET oncogene. **Curr. Drug Targets** 2(1):41-55, 2001.

MACLEOD, R. J.; HAMILTON, J. R.; BATEMAN, A.; BELCOURT, D.; HU, J.; BENNETT, H. P. & SOLOMON, S. Corticostatic peptides cause nifedipine-sensitive volume reduction in jejunal villus enterocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 88(2):552-556, 1991.

MAEDA, N.; TAMYA, N.; PATTABHIRAMAN, T. R. & RUSSEL, F. E. Some chemical properties of the venom of the rattlesnake, *Crotalus viridis helleri.* **Toxicon** 16:431-441, 1978.

MANJUNATHA KINI, R. (ed) **Venom phospholipase A_2 enzymes. Structure, function and mechanism**, John Wiley & Sons, England, 1997.

MANJUNHATA KINI, R. & EVANS, H. J. A commom cytolytic region in myotoxins, hemolysins, cardiotoxins and antibacterial peptides. **Int. J. Peptide Protein Res.** 34:277-286, 1989.

MARSH, N. & WHALER, B. The effects of snake venoms on the cardiovascular and haemostatic mechanisms. **Int. J. Biochem.** 9(4):217-220, 1978.

MATAVEL, A. C., FERREIRA-ALVES, D. L., BEIRAO, P. S., CRUZ, J. S. Tension generation and increase in voltage-activated Na^+ current by crotamine. **Eur. J. Pharmacol.** 348(2-3):167-173, 1998.

MEBS, D. & HUCHO, F. Toxins acting on ion channels and synapses. In: (SHIER, W. T. & MEBS, D., eds.) **Handbook of Toxinology**, Marcel Dekker, New York, 1990.

MEBS, D. and KORNARLIK, F. Intraspecific variation in content of a basic toxin in eastern diamond rattlesnake (*Crotalus adamanteus*) venom. **Toxicon** 22:831-833, 1984.

MEIER, J. Venomous and Poisonous Animals – A Biologist's view. *In*: (MEIER, J & WHITE, J., eds.) **Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons**, CRC Press Inc., Boca Raton, p. 1- 8, 1995.

MILLER, C. The charybdotoxin family of K^+ channel-blocking peptides. **Neuron** 15:5-10, 1993.

MIWA, J.M.; IBANEZ-TALLON, I.; CRABTREE, G. W.; SÁNCHEZ, R.; SALI, A.; ROLE, L. W.; & HEINTZ, N. Lynx1, an endogenous toxin-like modulator of nicotinic acetylcholine receptors in the mammalian CNS. **Neuron** 23:105-114, 1999.

MURPHY, C. J.; FOSTER, B. A.; MANNIS, M. J.; SELSTED, M. E. & REID, T. W. Defensins are mitogenic for epithelial cells and fibroblasts. **J. Cell. Physiol.** 155(2):408-413, 1993.

NAKASHIMA, K.; NOBUHISA, I.; DESHIMARU, M.; NAKAI, M.; OGAWA, T.; SHIMOHIGASHI, Y.; FUKUMAKI, Y.; HATTORI, M.; SAKAKI, Y. & HATTORI, S. Accelerated evolution in the protein-coding regions is universal in crotalinae snake venom gland phospholipase A_2 isozyme genes. **Proc Natl Acad Sci USA**. 92:5605-5609, 1995.

NAKASHIMA, K.; OGAWA, T.; ODA, N.; HATTORI, M.; SAKAKI, Y.; KIHARA, H. & OHNO, M. Accelerated evolution of *Trimeresurus flavoriridis* venom gland phospholipase A_2 isozymes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 90:5964-5968, 1993.

NEDELKOV, D. & BIEBER, A. L. Detection of isomers of rattlesnake myotoxins by capillary elctrophoresis and matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry. **J. Chromat.** 781:429-434, 1997.

NICOLAS, P. & MOR, A. Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defense system of vertebrates. **Annu. Rev. Microbiol.** 49:277-304, 1995.

NIEDERGANG, F.; ALCOVER, A.; KNIGHT, C. G.; FARNDALE, R.W.; BARNES, M. J.; FRANCISCHETTI, I. M.; BON, C. & LEDUC, M. Convulxin binding to platelet receptor GPVI: competition with collagen related peptides. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 273(1):246-250, 2000.

NORRIS, J. W.; FRY, R. M. & TU, A. T.The nucleotide sequence of the translated and untranslated regions of a cDNA for myotoxin-*a* from the venom of prairie rattlesnake (*Crotalus viridid viridis*). **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 230:607-610, 1997.

OGAWA, T.; NAKASHIMA, K.; NOBUHISA, I.; DESHIMARU, M.; SHIMOHIGASHI, Y.; FUKUMAKI, Y.; SAKAKI, Y.; HATTORI, S. & OHNO, M. Accelerated evolution of snake venom phospholipase A_2 isozymes for acquisition of diverse physiological functions. Toxicon. 34 (11-12): 1229-1236,

OGUIURA, N.; CAMARGO, M. E.; DA SILVA, A R. & HORTON, D. S. Quantification of crotamine, a small basic myotoxin, in South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom by enzyme-linked immunosorbent assay with parallel-lines analysis. **Toxicon** 38(3):443-448, 2000.

OGUIURA, N.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; GREGO, K. F. & YAMANE, T. (1998). Genomic characterization of crotamine gene by Southern blot in South American rattlesnake, *Crotalus durissus terrificus*. *In:* V Simpósio da Sociedade Brasileira de Toxinologia, Angra dos Reis, RJ, Brasil. **Toxicon**, Elsevier Science Ltd., 1998. p 186.

OHIZUMI, Y. Application of physiologically active substances isolated from natural resources to pharmacological studies. **Jpn. J. Pharmacol.** 73:263-289, 1997.

OHKURA, M.; FURUKAWA, K.; OIKAWA, K. & OHIZUMI, Y. The properties of specific binding site of ^{125}I-radioiodinated myotoxin-*a*, a novel Ca^{2+} releasing agent, in skeletal muscle sarcoplasmatic reticulum. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 273:934-939, 1995.

OHKURA, M.; FURUKAWA, K.; TU, A. T. & OHIZUMI, Y. Calsequestrin is a major binding protein of myotoxin-*a* and an endogenous Ca^{2+} releaser in sarcoplasmatic reticulum. **Eur. J. Pharmacol.** 268:R1-R2, 1994.

OHNO, M.; MÉNEZ, R.; OGAWA, T.; DANSE, J.M.; SHIMOHIGASHI, Y.; FROMEN, C.; DUCANCEL, F.; ZINN-JUSTIN, S.; LE DU, M.H.; BOULAIN, J.C.; TAMYIA, T. & MÉNEZ, A. Molecular evolution of snake toxins: Is the functional diversity of snake toxins associated with a mechanism of accelerated evolution? **Prog. Nucl. Ac. Res. Mol. Biol.** 59:309-364, 1998.

OLIVEIRA, B. M.; WALKER, C.; CARTIER, G.E.; HOOPER, D.; SANTOS, A.D.; SCHOENFELD, R.; SHETTY, R.; WATKINS, M.; BANDYOPADHYAY, P. & HILLYARD, D.R. Specification of cone snails and interspecific hyperdivergency of their venom peptides. Potential evolutionary significance of introns. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 223-237, 1999.

OPIE, L.H. & KOWOLIK, H. The discovery of captopril: from large animals to small molecules. **Cardiovasc. Res.** 30:18-25, 1995.

OREN, Z. & SHAI, Y. Mode of action of linear amphipatic α-helical antimicrobial peptides. **Biopolimers** 47: 451-463, 1998.

OWNBY, C. L. Locally acting agents: myotoxins, hemorrhagic toxins and dermonecrotic factors. *In*: (SHIER, W.T & MEBS, D., eds.) **Handbook of Toxinology**, Marcel Dekker, 1990, p 601.

OWNBY, C. L.; CAMERON, M. S.; & TU, A. T. Isolation of myotoxin component from rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. **Am. J. Pathol.** 85:149-166, 1976.

OWNBY, C.L., 1998. Strucuture, function and biophysical aspects of the myotoxins from snake venoms. **J. Toxicol.-Toxin Reviews** 17(2):213-218, 1998.

PAGE, R. D. M & HOLMES, E. C. **Molecular Evolution. A Phylogenetic Approach**, Blackwell Science Ltd, Oxford, UK, 1998.

PARISH, C. A.; JIANG, H.; TOKIWA, Y.; BEROVA, N.; NAKANISHI, K.; McCABE, D.; ZUCKERMAN, W.; XIA, M. M. & GABAY, J. E. Broad-spectrum antimicrobial activity of hemoglobin. **Bioorg. Med. Chem.** 9(2):377-382, 2001.

PATTHY, L Genome evolution and the evolution of exon-shuffling - a review. **Gene** 328(1):103-14, 1999a.

PATTHY, L. Exons - original building blocks of proteins? **Bioessay** 13(4):187-92, 1996.

PATTHY, L. Intron-dependent evolution: prefered types of exons and introns. **FEBS Lett.** 214(1): 1-7, 1987

PATTHY, L. **Protein Evolution**, Blackwell Science, Oxford, London, 1999b.

PERALES, J.; VILLELA, C.; DOMONT, G. B.; CHOUMET, V.; SALIOU, B.; MOUSSATCHE, H.; BON, C. & FAURE, G. Molecular structure and mechanism of action of the crotoxin inhibitor from Crotalus durissus terrificus serum. **Eur. J. Biochem.** 227(1-2):19-26, 1995.

POOK, C. E.; WÜSTER, W. & THORPE, R. S. Historical Biogeography of the Western Rattlesnake (Serpentes: Viperidae: *Crotalus viridis*), Inferred from Mitochondrial DNA Sequence Information. **Mol. Phylog. Evol.** 15(2):269-282, 2000.

PRADO-FRANCESCHI, J. & BRAZIL, O.V. Convulxin, a new toxin from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon** 19(6):875-887, 1981.

PRELLE, K.; WOBUS, A.M.; KREBS, O.; BLUM, W. F. & WOLF, E. Overexpression of Insulin-like growth factor II in mouse embryonic cells promotes myogenic differentiation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 277: 631-638, 2000.

RÁDIS-BAPTISTA, G.; OGUIURA, N.; HAYASHI, M.A.F.; CAMARGO, M.E.; GREGO, K.F.; OLIVEIRA, E.B. & YAMANE, T. Nucleotide sequence of crotamine isoform precursors from a single South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). **Toxicon** 37:973-984, 1999.

RISAU, W.; SARIOLA, H.; ZERWES, H.G.; EKBLOM, P., KEMLER, R. & DOETSCHMAN, T. Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryonic bodies. **Development** 102: 471-478, 1988.

ROTTENBERG, D., BAMBERGER, E. S. & KOCHVA, E. Studies on ribonucleic acid synthesis in the venom glands of *Vipera palaestinae* (Ophidiae, Reptilia). **Biocehm . J.** 121:609-612, 1971.

SAITOU, N. & NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.** 4:406-425.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIATS, T. **Molecular cloning. A laboratory manual**, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.

SAMEJIMA, Y., AOKI, Y and MEBS, D. (1987) Amino acids sequence of a myotoxin from venom of the eastern diamondbackrattlesnake (*Crotalus adamanteus*) **Toxicon** 29:461-468.

SANGER, F.; NICKLEN, S. & COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 74:5463-5467, 1977.

SANTORO, M. L.; SOUSA-E-SILVA, M. C.; GONCALVES, L. R.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; CARDOSO, D. F.; LAPORTA-FERREIRA, I. L.; SAIKI, M.; PERES, C. A. & SANO-MARTINS, I. S. Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus, C. durissus cascavella and C. durissus collilineatus*). **Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.** 122(1): 61-73, 1999.

SARKAR, N. K. & DEVI, A. Enzymes in Snake Venoms. *In* (BÜCHERL, W; BUCKLEY, E. E. & DEULOFEU, V., eds.) **Venomous Animals and Their Venoms**, Academic Press, New York, 1959. p. 167-211.

SCHENBERG, S. Geographical pattern of crotamine distribution in the same rallesnake subspecies. **Science** 129:1361-1363, 1959b.

SCHENBERG, S.Análise da crotamina no veneno individual de cascavéis recebidas pelo Instituto Butantan. **Mem. Inst. Butantan** 29:213-226, 1959a.

SCHIMDT, R.M.; BRUYNS, E.; & SNODGRASS, H.R. Hematopoietic development of embryonic stem cells *in vitro*. Cytokine and receptor gene expression. **Genes Dev.** 5:728-740, 1991.

SCHULLER, G. D.; ALTSCHUL, S. F. & LIPMAN, D .J. Wokbench for multiple alignment construction and Analysis. **Proteins: structure, functions, and genetics** 9:180-190, 1991.

SCOTT, M. G. & HANCOCK, R. E. W. Cationic antimicrobial peptides and their multifunctional role in the immune system. **Crit. Rev. Immunol.** 20:407-431, 2000a.

SCOTT, M. G.; ROSENBERGER, C. M.; GOLD, M. R.; FINLAY, B. B. & HANCOCK RE. An alpha-helical cationic antimicrobial peptide selectively modulates macrophage responses to lipopolysaccharide and directly alters macrophage gene expression. **J Immunol.** 165(6):3358-3365, 2000b.

SEKI, C.; VIDAL, J. C. & BARRIO, A. Purification of gyroxin from a South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom. **Toxicon** 18(3):235-47, 1980.

SENAPATHY, P.; SHAPIRO, M. B. & HARRIS, N. L. Splice junctions, branch point sites, and exons: sequence statistics, identification, and application to genome project. **Meth. Enzimol.** 183:252-278, 1990.

SHAI Y. Pardaxin: channel formation by a shark repellant peptide from fish. **Toxicology** 87(1-3):109-129, 1994.

SHAI, Y. Molecular recognition between membrane-spanning polypeptides. **Trends Biochem. Sci.** 20(11):460-464, 1995.

SINGH, P. K.; JIA, H. P.; WILES, K.; HESSELBERTH, J.; LIU, L.; CONWAY, B. A; GREENBERG, E. P.; VALORE, E. V.; WELSH, M. J.; GANZ, T.; TACK, B. F. & McCRAY, P. B. Production of beta-defensins by human airway epithelia. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 95(25):14961-14966, 1998.

SLOTTA, K. H. & FRANKEL-CONRAT, H. L. Schlangengifte. III. Mitteil: Reinigung und Kristallisation des Klapperschlangengiftes. **Ber. Deutsch. Chem.** 71:1076-1081, 1938.

SMITH, J. J., TRAVIS, S. M.; GREENBERG, E. P. & WELSH, M. J. **Cell** 85: 229-236

SMITH, L. A. & SCHMIDT, J. J. Cloning and nucleotide sequences of crotamine genes. **Toxicon** 28:575-585, 1990.

SPECTOR, D. L.; GOLDMAN, R. D.; LEINWAND, L. A. **Cells. A Laboratory Manual**, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1998.

SPIELMAN, H.; POHL, I.; DORNING, B.; LIEBSCH, M.; & MOLDENHAUER, F. The embryonic stem cell test, an *in vitro* embryotoxicity test using two permanent mouse cell lines: 3T3 fibroblasts and embryonic stem cells. ***In Vitro* Toxic.** 10 (1): 119-127, 1997.

STATON NOEL, L.; CHAMPION, B. R.; HOLLEY, C. L.; SIMMONS, C. J.; MORRIS, D. C; PAYNE, J. A., LEAN, J. M.; CHAMBERS, T. J.; ZAMAN, G.; LANYON, L. E.; SUVA, L.J. & MILLER, L. R. RoBo-1, a Novel Member of the Urokinase Plasminogen Activator Receptor/CD59/Ly-6/Snake Toxin Family Selectively Expressed in Rat Bone and Growth Plate Cartilage. **J. Biol. Chem.** 273:3878-3883, 1998.

STEINBERG, D. A. & LEHRER, R. I. Designer Assays for Antimicrobial peptides: disputing the "one-size-fits-all" theory. *In*: (SHAFER, W. M., ed) Methods in Molecular Biology, Vol 78: **Antibacterial Peptide Protocols**, Humana Press Inc., Towa, NJ, 1997, p 169-186.

STOCKER, K. (ed) **Medical Use of Snake Venoms**, CRC Press Inc., Boca Raton, 1990

STRAIGHT, R. C. North-south regional variation in phospholipase A activity in the venom of *Crotalus ruber*. **Comp. Biochem. Physiol.** 103B:635-639, 1992.

STRAIGHT, R. C.; GLENN, J. L.; WOLT, T. B. & WOLFE, M. C. Reginal differences in content of small basic peptide toxins in the venom of *Crotalus adamanteus* and *Crotalus horridus*. **Comp. Biochem. Physiol.** 100B:51-58, 1991.

STRYDOM, D. J. Homology of functionally diverse proteins. **J. Mol. Evol.** 9:349-361, 1977.

TAMECHIKA, I.; ITAKURA, M.; SARUTA, Y.; FURUKAWA, M.; KATO, A.; TACHIBANA, S. & HIROSE, S. Accelerated evolution in inhibitor domains of porcine elafin family members. **J. Biol. Chem.** 271(12):7012-7018, 1996.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G. & GIBSON, T. J. CLUSTALW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alingment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucl. Ac. Res.** 22:4673-4680, 1994.

TSUJIHATA, M.; HAZAMA, R.; ISHII, N.; IDE, Y. & TAKAMORI, M. Ultrastructural localization of acetylcholine receptor at the motor endplate: myasthenia gravis and other neuromuscular diseases. **Neurology** 30(11):1203-1211, 1980.

TSUJIHATA, M.; ITO, H.; SATOH, A.; YOSHIMURA, T.; MOTOMURA, M. & NAKAMURA, T. Semiquantitative measurement of acetylcholine receptor at the motor end-plate in myasthenia gravis. **Intern. Med.** 40(5):376-381, 2001.

UTAISINCHAROEN, P.; BAKER, B. & TU, A.T. Binding of Myotoxin *a* to sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase: a structural study. **Biochem.** 30:8211-8216, 1991.

VERNON, L. P. Pyrularia thionin. Physical properties, binding to phospholipid bilayers and cellular responses. **Adv. Exp. Med. Biol.** 391:279-291, 1996.

VINCENT, C.; TCHEN, P.; COHEN-SOLAL, M. & KOURILSKY, P. Synthesis of 8-(2-4 dinitrophenyl 2-6 aminohexyl) amino-adenosine 5' triphosphate: biological properties and potential uses. **Nucl. Ac. Res.** 10:6787-6796, 1982.

VOGEL, C. W. Snake venom constituients affecting the complement system. *In*: (STOCKER, K., ed.) **Medical Use of Snake Venoms**, CRC Press Inc., Boca Raton, 1990, p 79

VOGT, W. Cobra venom factor: the complement-activating protein of cobra venom. *In*: (TU, A. T., ed.) **Handbook of Natural Toxins**, Vol. 5, Marcel Dekker, New York, 1991, p 147.

VOUILLE, V.; AMICHE, M. & NICOLAS, P. Structure of genes for dermaseptins B, an antimicrobial peptides from frog skin. Exon 1-encoded prepropeptide is conserved in genes for peptides of highly different structures and activities. **FEBS Lett.** 414(1):27-32, 1997.

WANG, R.; CLARK, R.; & BAUTCH, V.A. Embryonic stem cell-derived cystic embryoid bodies from vascular channels: an *in vitro* model of blood vessel development. **Development** 144:303-316, 1992.

WHITE, S. H.; WIMLEY, W. C. & SELSTED, M. E. Structure, function, and membrane integration of defensins. **Curr. Opin. Struct. Biol.** 5(4):521-527, 1995.

WIMLEY, W. C.; SELSTED, M. E. & WHITE, S. H. Interactions between human defensins and lipid bilayers: evidence for formation of multimeric pores. **Protein Sci.** 3(9):1362-1373, 1994.

YANG, D.; CHERTOV, O; BYKOVSKAIA, S. N.; CHEN, Q.; BUFFO, M. J.; SHOGAN, J.; ANDERSON, M.; SCHRÖDER, J. M.; WANG, J. M., HOWARD, O. M. Z. & OPPENHEIM, J. J. β-defensins: linking innate and adaptative immunity through dendritic and T cell CCR6. **Science** 286:525-528, 1999.

YEO, M.S.; JEYASEELAN, K.; CHUNG, M.C.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; TAN, C.H. & WONG, H.A., 1993. Molecular cloning of a cardiotoxin structural gene from Malayan spitting cobra (*Naja naja sputatrix*). **Toxicon** 31:53-60, 1993.

YUDKOWISKY, M.L.; BEECH, J. & FLETCHER, J.E. Myotoxin-*a* reduces the threshold for calcium-induced release in skeletal muscle. **Toxicon** 32(3):273-278, 1994.

ZARNEGAR, R. Regulation of HGF and HGFR gene expression. **EXS** 74:33-49, 1995.

ZENG, X. C.; ZHU, Z. H.; LI, W. X.; ZHU, S. Y.; PENG, F.; MAO, X. & LIU, H. Molecular cloning and genomic organization of a K(+) channel toxin from the Chinese scorpion *Buthus martensii* Karsch. **Toxicon** 39(2-3):407-410, 2001.

ZHOU, M. Y., XUE, D. GOMEZ-SANCHEZ, E. P. & GOMEZ-SANCHEZ, E. Improved downward capillary transfer for blotting of DNA and RNA. **BioTechniques** 16:58-59, 1994.

ZHOU, Q.; DANGELMAIER, C. & SMITH, J. B. The hemorrhagin catrocollastatin inhibits collagen-induced platelet aggregation by binding to collagen via its disintegrin-like domain. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 219(3):720-726, 1996.

EcoRI/RG8 *BamHI*/*BglII* 6xHis *HindIII*

ATGAGAGGATCCAGATCTCATCACCATCACCATCACCATTAAGCTTAATTAAGCTGAG

Stop

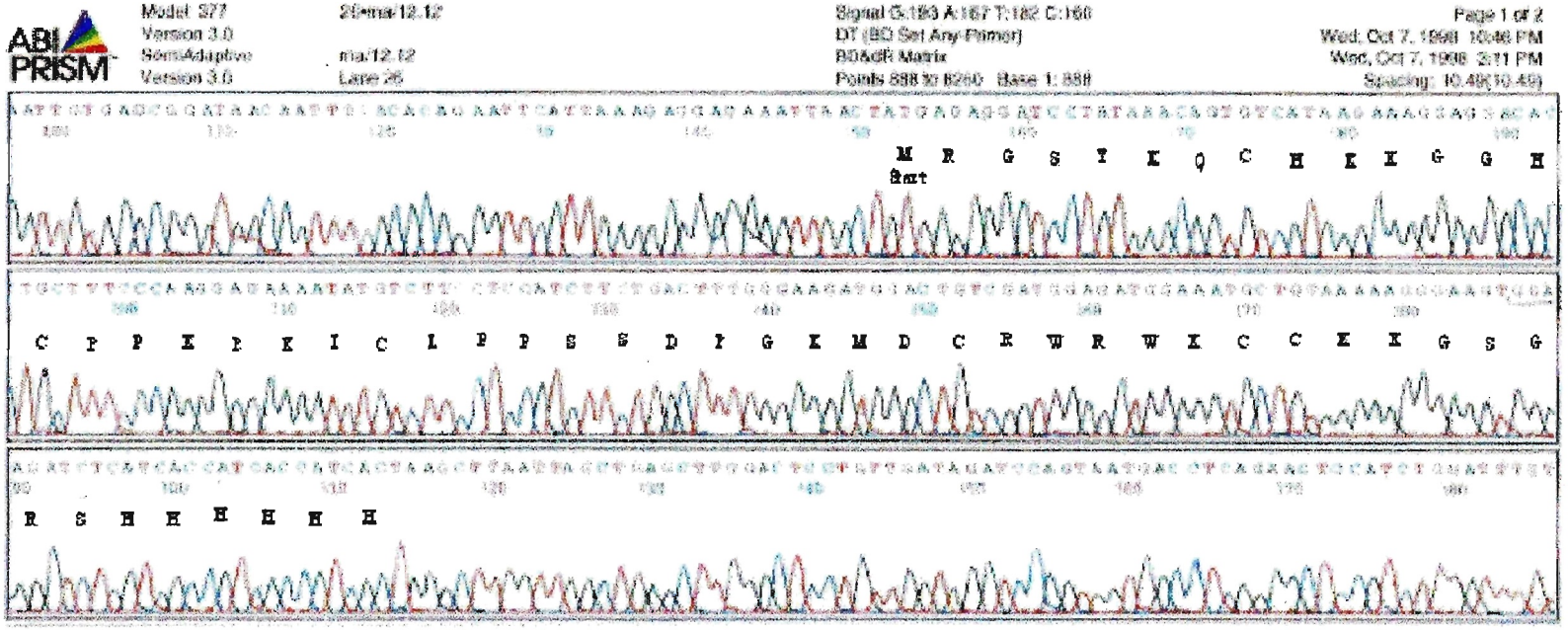


Figura A.9.1. Sítio de clonagem do vetor pQE12 e eletroferograma da construção pQE12/crotamina. Esse vetor é empregado para a expressão de polipeptídios em células de *E. coli*. A mensagem traduzida está escrita sob a seqüência de nucleotídios.

pMETα A MCS
Primer binding sites
α-factor secretion signal
Variable region
Multiple cloning site
V5 epitope
Polyhistidine tag

```
                                        AUG1 Forward priming site
1081  TAGAAGTTTT ATTTAACATC AGTTTCAATT TACATCTTTA TTTATTAACG AAATCTTTAC

                                                                  Sac I
1141  GAATTAACTC AATCAAAACT TTTACGAAAA AAAAATCTTA CTATTAAGAG CTCAAA ATG
                                                                      Met
                                   α-factor signal sequence
1200  AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCT GTT TTA TTC GCA GCA TCC TCC GCA
      Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser Ala

1248  TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT GAA ACG GCA CAA ATT
      Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln Ile

1296  CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT TTA GAA GGG GAT TTC GAT
      Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe Asp

1344  GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT AAC GGG TTA TTG TTT
      Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu Phe
                          α-factor Forward priming site
1392  ATA AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA TCT
      Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val Ser
      Xho I        Kex2 signal cleavage          EcoR I   Pml I        Sfi I/Xma III*   BamH I
1440  CTC GAG AAA AGA GAG GCT GAA GC[T] GAATTCACGT GGCCCAGCCG GCCGTGGATC
      Leu Glu Lys Arg Glu Ala▲Glu Ala▲
                          Ste 13 signal cleavage
            Sal I        Sac II  Not I/Xma III*   Spe I          V5 epitope
1494  CACGCGTCGT CGACCCGCGG CGGCCGCCAG CTTACTAGTA GGT AAG CCT ATC CCT
                                                  Gly Lys Pro Ile Pro
                                                      Polyhistidine (6xHis) region
1549  AAC CCT CTC CTC GGT CTC GAT TCT ACG CGT ACC GGT CAT CAT CAC CAT
      Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr Arg Thr Gly His His His His

1597  CAC CAT TGA TCTAG TATACAATTC TAGGGCTGCC TGTTTGGATA TTTTTATAAT
      His His ***
                          AUG1 Reverse priming site
1651  TTTTGAGAGT TTGCCAACTA ATGTTTTTCT CTTCTATGAT ATTTATCATG
```

*The *Xma* III sites are unique to the polylinker.

Boxed nucleotide indicates the variable region.

Version A
24-0914

Figura A.9.2. Sítio de clonagem do vetor pMetα A. Esse vetor foi usado para a expressão de crotamina e crotasin em *Pichia methanolica*.

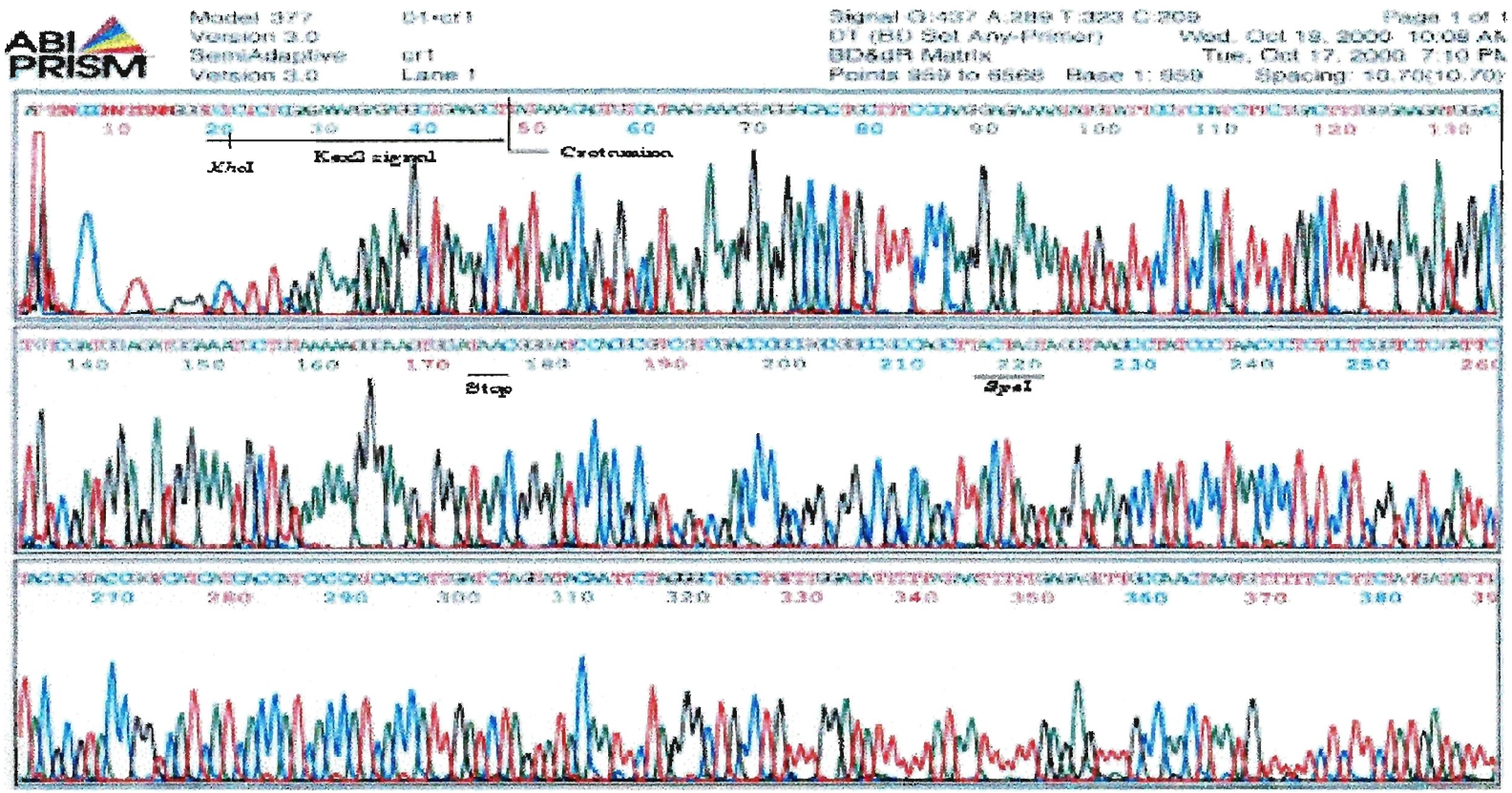


Figura A.9.3. Eletro-ferograma da construção pMetα A/crotamina, no qual é mostrado a fusão correta do inserto com os elementos do vetor para expressão em *Pichia methanolica*.

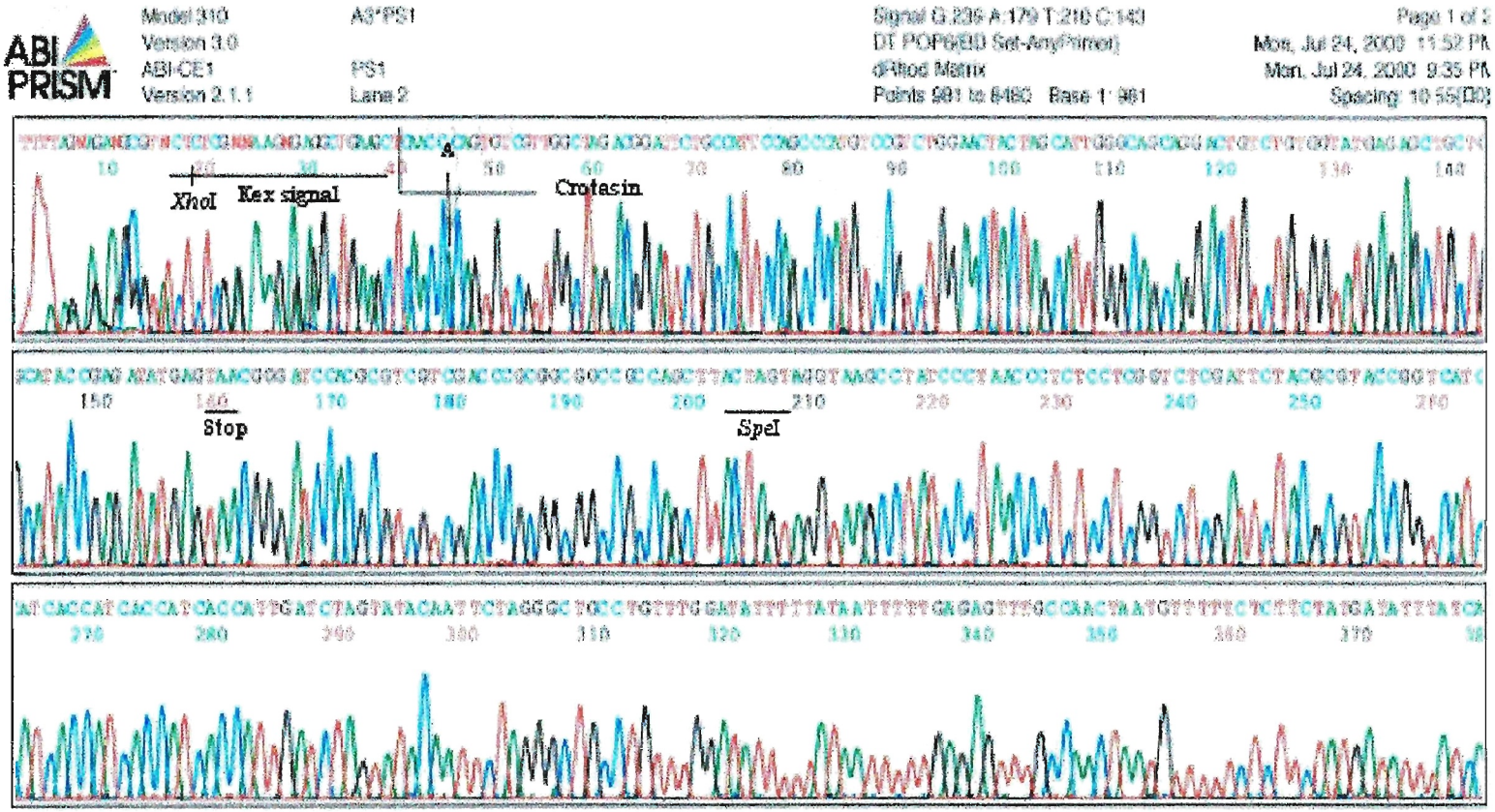


Figura A.9.4. Eletro- ferograma da construção pMetα A/crotasin, em que é mostrado a fusão correta do inserto com os elementos do vetor para expressão em *Pichia methanolica*.

TAKARA SHUZO CO., LTD.

Sunaiku 2257 Noji, Kusatsu, Shiga, 525-0055 Japan

Bioproducts Operations & Manufacturing

Phone : Kusatsu 077-565-5960
Fax : Kusatsu 077-565-6965

Advanced Biomedical Center

Phone : Kusatsu 077-587-9200
Fax : Kusatsu 077-587-9267

Gene Analysis Center

Phone : Kusatsu 077-565-6962
Fax : Kusatsu 077-565-6973

TaKaRa BIOMEDICALS

Certificate of Analysis

Product Name: Custom Peptide

Product #: 311152 Lot #: O09050T1

Sequence: Cys - Pro - Ser - Gly - Thr - Thr - Ser - Ile - Gly - Gln - Gln - Asp

Molecular Weight: 1193.3 amu

Mass Spectral Analysis: MALDI-TOF "Exhibits correct MW" (see attached MS spectrogram)

HPLC Analysis: Peptide Purity: > 90.0% (see attached RP-HPLC chromatogram)

Solubility: 1mg/ml in water

Appearance: White lyophilized powder

Counter Ion: Trifluoroacetate

Date of Mfg: 09/22/00

Remarks: Not for human use, research purposes only.

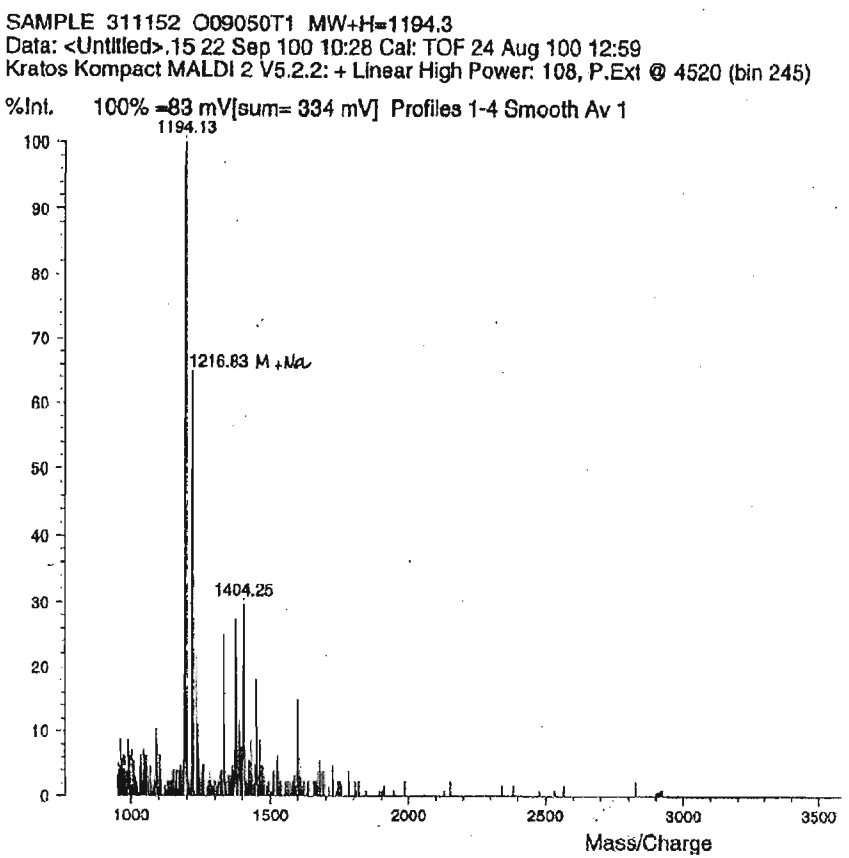


Figura A.9.5. Certificado de análise do peptídio sintético, derivado de um segmento do crotasin, e espectro de análise do MALDI-TOF.

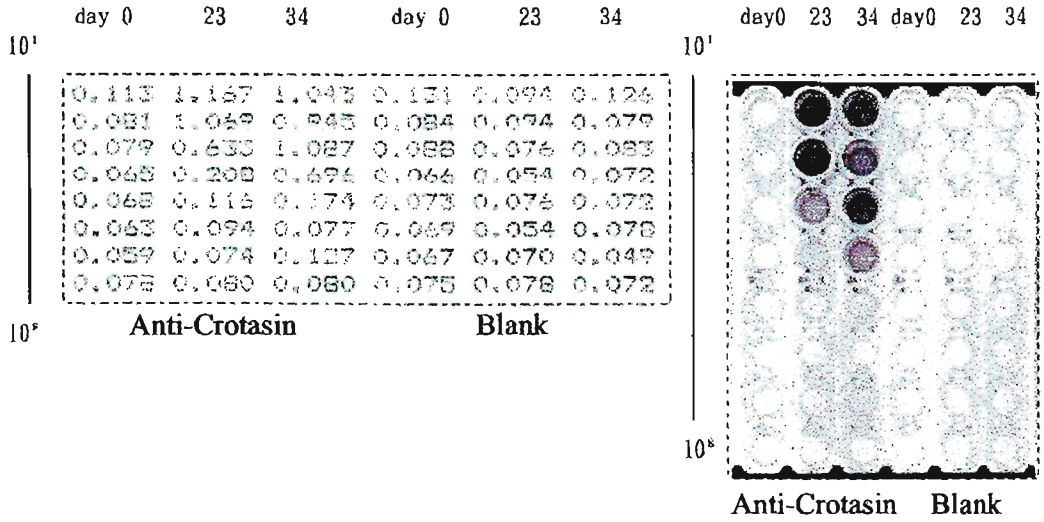


Figura A.9.6. Titulação do anticorpo anti-crotasin desenvolvido em coelho. Um peptídio sintético foi derivado de um segmento do crotasin e conjugado com KLH (ver métodos). A preparação do anticorpo foi feito comercialmente, de acordo com os métodos usuais. Amostras de soro do coelho foram coletadas no dia 0, 23 e 34 da injeção do antígeno e titulado com anti-IgG de coelho-peroxidase (IgG-POD). A tabela indica os valores obtidos para uma diluição de até 10^8 do anticorpo, referente ao ELISA que é mostrado ao lado.