CÍCERA MARIA GOMES

**Análise do transcriptoma do fígado da serpente *Bothrops jararaca*
utilizando *expressed sequences tags* (ESTs)**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/ IPT,
para obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia.

São Paulo
2013

CÍCERA MARIA GOMES

**Análise do transcriptoma do fígado da serpente *Bothrops jararaca*
utilizando *expressed sequences tags* (ESTs)**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/ IPT,
para obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Anita Mitico Tanaka
Azevedo

Versão original

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Gomes, Cícera Maria.

Análise do transcriptoma do fígado da serpente *Bothrops jararaca* utilizando *expressed sequence tags* (ESTs) / Cícera Maria Gomes. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Dra. Anita Mitico Tanaka Azevedo.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Estudo da composição molecular do fígado da *Bothrops jararaca* utilizando biologia molecular.

Versão do título para o inglês: Analysis of transcriptome of the liver of *Bothrops jararaca* using expressed sequence tags (ESTs).

1. *Bothrops jararaca* 2. Transcriptoma 3. *Expressed sequence tags*
4. Fígado I. Azevedo, Dra. Anita Mitico Tanaka II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0212/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Cícera Maria Gomes.

Título da Dissertação: *Análise do transcriptoma do fígado da serpente *Bothrops jararaca* utilizando expressed sequence tags (ESTs).*

Orientador(a): Dra. Aníta Mitico Tanaka Azevedo.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Identificação de genes de proteínas plasmáticas em fígado de serpente *Bothrops jararaca* adulta e jovem utilizando estudos transcriptômico e proteômico", protocolo nº 931/12, sob a responsabilidade de Anita Mitico Tanaka Azevedo e Patrícia Abujamra – que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 8/8/12.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie
06/2012 - 07/2014 Laboratório de Herpetologia	6 serpentes <i>Bothrops jararaca</i> ; 1 serpente <i>Sibynomorphus mikanii</i> ; 1 serpente <i>Oxyrhopus guibei</i> ; 1 serpente <i>Philodrias patagoniensis</i>

São Paulo, 16 de agosto de 2012

Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

2ª via

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Identificação de genes de proteínas plasmáticas em fígado de serpente *Crotalus durissus terrificus* adulta utilizando estudos transcriptômico e proteômico" protocolo nº 794/11, sob a responsabilidade de Anita Mitico Tanaka Azevedo e Cícera Maria Gomes, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 10/02/2011.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie
03/2011 -07/2012 Laboratório de Fisiopatologia	06 serpentes <i>Crotalus durissus terrificus</i>

São Paulo, 17 de março de 2011.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

“Dedico este trabalho à minha família que tanto amo, meu porto seguro.

Aos meus pais Antônia Maria da Silva Gomes e José Geraldo Gomes, que sempre acreditaram em mim, e sempre fizeram o melhor pela minha educação.

Às minhas irmãs Cristiane Maria Gomes e Thais Maria Gomes, minhas companheiras de sempre.

Sem vocês nada disso seria possível.

E claro ao meu cachorro Theo por sua alegria toda vez que chego em casa.”

***“In memoriam de Faustemira das Graças
Cruz Alves Pereira que rezou por mim e
me deu força para continuar em meu
caminho.”***

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que direta ou indiretamente tenham contribuído para o término do mestrado e especialmente para a conclusão deste trabalho, que é apenas o início de um longo caminho a ser percorrido, a começar pela minha orientadora Dra. Anita Mitico Tanaka-Azevedo pelos seus ensinamentos, por ter confiado a mim este trabalho e por ter me aceito no seu grupo de trabalho com quem tive a oportunidade de aprender muito, e foi muito importante para o meu crescimento profissional.

À Professora Dra. Aparecida Sadae Tanaka, minha co-orientadora, que me acompanhou durante toda a realização deste trabalho, por seu exemplo de profissionalismo, seriedade à pesquisa, e por sempre me fazer enxergar mais longe.

Ao amigo Dr. Diego de Souza Buarque que me acompanhou durante todas as fases deste trabalho, obrigada por sua ajuda e companhia em todos os momentos, “inclusive quando escapamos do raio”. Obrigada pela paciência.

Aos amigos Tatiane Sanches Soares e Felipe Araújo de Oliveira, meus parceiros de todos os momentos, “meu triângulo”, obrigada por poder sempre contar com vocês e por vocês sempre me aguentarem durante meus momentos, sou privilegiada por poder contar com vocês!

A todos os companheiros do laboratório do Infar e do Instituto Butantan que me ajudaram de diferentes maneiras durante a realização deste trabalho, Gabriela Catalano, Lucyla Tiemi “que sempre tem uma bala para mim”, Patrícia Andrade, Thyago Cardoso “por me fazer sempre rir”, Stephen Lu, Karla Oliveira, Ricardo Torquato e Karen de Moraes Zani.

À Dra Kathleen Fernandes Grego do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, pela ajuda na coleta do fígado das serpentes *B. jararaca*.

À Professora Glória por sua colaboração e orientação na parte de bioinformática.

Aos funcionários do Infar, em especial à técnica Jucilene Barbosa da Silva, pelo sequenciamento e por sua amizade.

Às minhas amigas, Andréa Carvalho e Fernanda Soma por sempre me entenderem e me apoiarem durante todas as fases deste trabalho, que sempre estiveram presentes, mesmo à distância quando eu precisava, e sempre me fizeram companhia, à nossas tardes na Starbucks, aos filmes e, claro, aos shows que sempre fizeram parte dessas nossas histórias. Valeu meninas!

À minha eterna amiga Tais Costa de Oliveira, que mesmo eu estando longe, e não muito presente, ainda é minha amiga, que mesmo me achando “louca” ainda assim consegue me entender. Porque amizade é assim!

Aos meus amigos do Laboratório de Genética do Instituto Butantan, Dra. Sueli “Sesso”, Fernando e Prof. Dr. Carlos Marandová, que não estiveram ao meu lado diretamente no mestrado, mas com quem pude aprender muito durante essa minha jornada. Obrigada por vocês me ajudarem quando eu precisei e por estarem ao meu lado, quando eu mais precisei!

À minha família, que me deu à base e sempre me incentivaram ao longo desta jornada, pelo apoio constante, pelo ombro, pela palavra certa, por serem meus anjos, pelo amor incondicional, Antônia Maria da Silva Gomes e José Geraldo Gomes. Obrigada!

À minha irmã Cristiane Maria Gomes, que sempre esteve presente, mesmo quando brava comigo, sempre me ajudou. Valeu pelo apoio!

À minha irmã Thais Maria Gomes, pela sua companhia, pelas nossas conversas, pelos seus bolos, e por sempre fazer algo para eu comer, que eu adoro!

Ao programa de Pós Graduação Interunidades em Biotecnologia, USP/Butantan/IPT.

À CNPq pela concessão da bolsa de mestrado, e às agências de fomento FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro.

A Deus pelo dom da vida e pela concretização deste trabalho para a conquista de mais uma etapa importante de minha vida.

“Se eu vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes”.

Isaac Newton

“É a jornada que importa não é o ponto de chegada”.

Autor Desconhecido

“Considerai que é suma alegria, meus irmãos, quando passais por diversas provações, sabendo que a prova da vossa fé produz a paciência. Mas é preciso que a paciência efetue a sua obra, a fim de serdes perfeitos e íntegros, sem fraqueza alguma. Se alguém precisa de sabedoria, peça-a Deus – que a todos dá liberalmente, com simplicidade e sem recriminação - e ser-lhe- á dada.”

Epístola de São Thiago 1: 2-5

RESUMO

GOMES, C. M. **Análise do transcriptoma do fígado da serpente *Bothrops jararaca* utilizando *expressed sequence tags* (ESTs).** 2013. 122 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Bothrops jararaca é uma das principais serpentes responsáveis por acidentes ofídicos em São Paulo. O efeito do envenenamento pode ser local ou sistêmico, os quais são mediados por uma variedade de componentes do veneno. Considerando que, em animais vertebrados, o fígado desempenha atividades metabólicas essenciais, além de ser o principal órgão responsável pela síntese de proteínas do plasma, a obtenção do transcriptoma deste é de extrema importância para o estudo destas proteínas. Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar o perfil de expressão de RNA no fígado de *B. jararaca*. Para isto foram obtidas 1700 sequências nucleotídicas denominadas Expressed Sequences Tags (ESTs). As sequências de nucleotídeos foram reunidas em 260 contigs, que foram submetidos ao banco de dados NCBI GenBank usando os algoritmos Blastx e Blastn. Dos transcritos tiveram hit com banco de dados NR enquanto 30,5% das ESTs não tiveram homologia. De acordo com a análise do *Gene Ontology* (GO), os transcritos foram designados para processo biológico, componente celular e função molecular. A maioria dos transcritos foram agrupados em processo biológico, distribuídos em processo metabólico, processo celular e regulação biológica. No entanto, as atividades de ligação proteica, catalítica e de atividade regulatória enzimática foram as principais categorias relacionadas à função molecular. A análise do componente celular apresentou maior número de transcritos envolvidos com a parte celular, região extracelular e restrito a membrana de organela. O maior grupo de transcritos foi relacionado a inibidores de metaloproteases, inibidores de serinoproteases e inibidores de PLA₂. Estudos de expressão gênica de alguns alvos selecionados na biblioteca de cDNA de *B. jararaca* foram realizados para comparação da expressão entre serpentes jovens e adultas. Esses resultados fornecem dados que poderão auxiliar nos estudos filogenéticos entre as diferentes espécies de serpentes e investigar a diferença no padrão da expressão gênica, fornecendo dados importantes sobre a biologia desses animais, contribuindo assim para a elucidação da fisiologia desses animais. Além disso, será útil na identificação de moléculas que possam ser candidatas a alvos terapêuticos.

Palavras-chave: *Bothrops jararaca*. Transcriptoma. *Expressed Sequence Tags*. Fígado.

ABSTRACT

GOMES, C. M. **Analysys of transcriptome of the liver of *Bothrops jararaca* using expressed sequence tags (ESTs)**. 2013. 122 p. Masters thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Bothrops jararaca is the main responsible for snake bites in São Paulo. There are both local and systemic envenomation effects, which are mediated by a variety of venom components. Considering that in vertebrate animals the liver is an important organ responsible for synthesis of plasma proteins, it would be valuable to get transcriptomic information about it. Thus, the aim of this work was to analyze expression profile at RNA level in *B. jararaca* liver. For this purpose, we sequenced 1700 Expressed Sequence Tags (ESTs) from a cDNA library of *B. jararaca* liver. Nucleotide sequences were assembled into 260 contigs, which were submitted to the GenBank NCBI database using BLASTX and BLASTN algorithms. Transcripts showed 43% hits with NR database while 30.5% of ESTs had no homology. According to Gene ontology (GO) analysis, transcripts were assigned for biological process, cellular component and molecular function. Majority of transcripts were classified in biological process category distributed in metabolic process, cellular processes and biological regulation, whereas binding and catalytic activities were the main category in molecular function. Cellular component analysis identified transcripts related to cell part, extracellular region and membrane-bounded organelle. The major group of transcripts was related to metalloproteinase inhibitors, followed by serine proteinase inhibitors and phospholipase A₂ inhibitors. Studies of gene expression of some selected targets in the cDNA library of *B. jararaca*, by real time PCR were performed to compare expression in juvenile and adult snake specimens. Our results will help in studies of phylogenetic relationships between different snake species, and investigate differences in gene expression pattern. In addition, our findings are also helpful in the identification of active compounds for development of improved therapeutics for snake bites

Keywords: *Bothrops jararaca*. Transcriptome. Expressed Sequence Tags. Liver.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Filogenia de 761 espécies de serpentes da superfamília Colubroidea	24
Figura 2- <i>Bothrops jararaca</i> e sua distribuição geográfica.	26
Figura 3- Compostos do veneno de serpentes.....	28
Quadro 1- Alguns grupos de proteínas e peptídeos encontrados nos venenos de serpentes, incluindo <i>B. jararaca</i> e sua importância clínica.....	30
Figura 4- Processo fisiológico da hemostasia.	36
Figura 5- Representação esquemática das diferentes classes de metaloproteases	38
Figura 6- Fígado da <i>B. jararaca</i>	40
Figura 7- Moléculas presentes nos venenos de serpentes que afetam a coagulação sanguínea.....	46
Figura 8- Moléculas presentes nos venenos de serpentes que afetam a agregação plaquetária.....	46
Quadro 2- Sequência de oligonucleotídeos usados em PCR quantitativo em tempo real e semi-quantitativo	63
Figura 9- Distribuição do tamanho dos <i>clusters</i> encontrados na biblioteca de cDNA da <i>B. jararaca</i>	65
Figura 10- Sequências de nucleotídeos e de aminoácidos traduzida dos <i>clusters</i> com maior frequência na biblioteca de cDNA do fígado de <i>B. jararaca</i>	66
Figura 11- Classificação das ESTs utilizando as categorias do <i>Gene Ontology</i>	72
Figura 12- Análise da sequência de aminoácidos de Bj46a (BJ-Liver_asb-739).....	75
Figura 13- Comparação da expressão de BJ46a em indivíduos adultos e jovens por PCR tempo real.....	77
Figura 14- Análise das sequências de aminoácidos de PLI- γ de diferentes espécies de animais (cluster-BJ-Liver_asb-686	79
Figura 15- Análise da sequência de aminoácidos de PLI- α de diferentes espécies de animais (cluster-BJ-Liver_asb-486)	81

Figura 16- Comparação da expressão de γ -PLI em indivíduos jovens e adultos por PCR tempo real.	83
Figura 17- Comparação da expressão de α -PLI em indivíduos jovens e adultos por PCR tempo real.....	83
Figura 18- Análise da sequência de aminoácidos da α -1-antitripsina de diferentes espécies de animais (cluster-BJ-Liver_asb-306).....	85
Figura 19- Análise da sequência de aminoácidos do inibidor C1 de diferentes espécies de animais (Cluster-BJ-Liver_asb-132)	88
Figura 20- Comparação da expressão de α -1-antitripsina em indivíduos jovens e adultos por PCR em tempo real	90
Figura 21- Comparação da expressão de C1 inibidor de serinoprotease em indivíduos jovens e adultos por PCR em tempo real.....	91
Quadro A1- Descrição dos <i>clusters</i> identificados na biblioteca de cDNA do fígado de <i>B. jararaca</i>	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Análise do sequenciamento da biblioteca de cDNA.....	64
Tabela 2- Análise da comparação das ESTs de <i>B. jararaca</i> com os diferentes bancos de dados.....	66
Tabela 3- Classificação funcional dos clusters obtidos a partir do sequenciamento da biblioteca de cDNA de <i>B. jararaca</i>	70
Tabela 4- Descrição dos <i>contigs</i> relacionados aos inibidores de proteases, fatores da coagulação e do complemento.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A₂₈₀	Absorbância em 280 nm
A₂₆₀	Absorbância em 260 nm
ACE	Enzima conversora de angiotensina
ADAMs	Desintegrinas e Metaloproteases
AHF-1	Fator anti-hemorrágico-1
ATP	Adenosina trifosfato
BJ46a	Fator anti-hemorrágico isolado de <i>B. jararaca</i>
BK	Peptídeo hipotensor bradicinina
BPPs	Peptídeos potenciadores de bradicinina
BPTI	Tripsina pancreática bovina do tipo Kunitz
Ca²⁺	Cálcio
Ct	<i>Threshold cycle</i>
cDNA	<i>DNA complementar</i>
CRISP	Proteínas secretórias ricas em cisteína
CTLs	Lectinas tipo C
CTLD	Domínio tipo lectina C
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTT	Ditiotreitol
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
FAD	Flavina adenina dinucleotideo
FMN	Flavina mononucleotideo
g	Força da gravidade
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HSF	<i>Habu serum factor</i>
kDa	Kilodalton
LB	Meio de cultura Luria Bertani
LAAO	L-aminoácido oxidase
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MgSO₄	Sulfato de magnésio

Min	Minuto
NFG	Fator de crescimento neural
NH₃	Amônia
OMS	Organização Mundial da Saúde
PLA₂	Fosfolipase A ₂
PLIs	Inibidores de fosfolipase A ₂
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SVMPs	Metaloproteases de veneno de serpentes
SVMPIs	Inibidores de metaloproteases do veneno de serpentes
SVSPs	Serinoproteases do veneno de serpentes
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
μL	Microlitro
μg	Micrograma

LISTA DE SÍMBOLOS

BASES NITROGENADAS DOS NUCLEOTÍDEOS

Adenina	A
Citosina	C
Guanina	T
Timina	G

Aminoácido	Símbolo
Alanina	A
Arginina	R
Asparagina	N
Ácido aspártico	D
Cisteína	C
Glutamina	Q
Ácido Glutâmico	E
Glicina	G
Histidina	H
Isoleucina	I
Leucina	L
Lisina	K
Metionina	M
Fenilalanina	F
Prolina	P
Serina	S
Treonina	T
Triptofano	W
Tirosina	Y
Valina	V

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 Serpentes	23
1.2 <i>Bothrops jararaca</i>	25
1.3 Moléculas do veneno de serpentes	27
1.3.1 L- aminoácido oxidase (LAAO)	31
1.3.2 Proteínas secretórias ricas em cisteína (CRISPs)	32
1.3.3 Fatores de crescimento	32
1.3.4 Peptídeos Potenciadores de Bradicinina (BPPs)	33
1.3.5 Hialuronidase	33
1.3.6 Lectinas do tipo C (CTLs)	34
1.3.7 Fosfolipase A ₂ (PLA ₂)	34
1.3.8 Serinoproteases	35
1.3.9 Metaloproteases	37
1.4 Fígado	39
1.5 Inibidores naturais presentes no fígado	41
1.6 Hemostasia	44
1.7 Transcriptoma em serpentes	47
2 OBJETIVOS	49
2.1 Objetivos gerais	49
2.2 Objetivos específicos	49
3 MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1 Materiais	50
3.1.1 Animais	50
3.1.2 Biblioteca de cDNA	50
3.1.3 Sequenciamento de DNA e PCR tempo real	51
3.1.4 Bactérias	51
3.2 Métodos	51
3.2.1 Coleta do fígado de <i>B. jararaca</i>	51
3.2.2 Extração do RNA total do fígado	51

3.2.3 Construção da biblioteca de cDNA do fígado da <i>B. jararaca</i>	52
3.2.4 Excisão dos clones da biblioteca de cDNA	56
3.2.5 Mini-preparação de DNA plasmidial	56
3.2.6 Sequenciamento automático de DNA plasmidial de clones isolados da biblioteca de fígado da <i>B. jararaca</i>	57
3.2.7 Análise das ESTs	57
3.2.8 Análise filogenética	60
3.2.9 Análise da expressão de transcritos do fígado de <i>B. jararaca</i>	60
3.2.9.1 Extração do RNA para confecção do cDNA das serpentes e análise da expressão gênica	60
3.2.9.2 Análise da expressão em <i>B. jararaca</i> por PCR em Tempo Real	61
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
4.1 Análise da biblioteca de cDNA do fígado da <i>B. jararaca</i>	64
4.2 BJ46a, fator anti-hemorrágico	74
4.3 Inibidor de fosfolipase A2 (PLI)	77
4.4 Inibidores de serinoproteases	84
5 CONCLUSÃO	92
REFERÊNCIAS	93
APÊNDICE - Descrição dos clusters identificados na biblioteca de cDNA do fígado da <i>B. jararaca</i>	117

1 INTRODUÇÃO

1.1 Serpentes

A ordem Squamata é composta principalmente por lagartos e serpentes, sendo que estas últimas são representadas por cerca de 3.200 espécies. Esses animais são encontrados em quase todo o mundo e habitam desde as regiões temperadas até as regiões tropicais (ZUG; VITT, CALDWELL, 2001).

As serpentes estão agrupadas em seis superfamílias: Acrochordoidea, Uropeltoidea, Pythonoidea, Boidae, Colubroidea e Typhlopoidea (MATTISON, 2007; UETZ et al., 2011; ZUG; VITT, CALDWELL, 2001). Dentre estas, a maioria das espécies pertencem à superfamília Colubroidea, como podemos visualizar na Figura 1, sendo, considerada uma das radiações filogenéticas mais evidentes e bem conhecidas de vertebrados terrestres. A família Viperidae pertence a essa superfamília sendo composta por 308 espécies, na qual estão inseridas as serpentes do gênero *Bothrops*. Esse gênero engloba mais de 30 espécies e subespécies, distribuídas entre a América Central e a América do Sul. Os membros desse gênero são responsáveis por aproximadamente 90% dos acidentes ofídicos no Brasil, os quais são denominados acidentes botrópicos (BRASIL, 2010; PYRON et al., 2011).

Figura 1- Filogenia de 761 espécies de serpentes da superfamília Colubroidea.

Fonte: Pyron et al., 2011.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recentemente incorporou os acidentes ofídicos às doenças negligenciadas, estimadas em 421 mil envenenamentos e 20 mil mortes no ano de 2010. Acredita-se, no entanto, que esses dados podem ser

superiores, com aproximadamente 1,8 milhão de envenenamentos e 94 mil mortes. Com isso, nota-se que esses acidentes são de grande impacto para saúde pública, principalmente em áreas rurais de países tropicais e subtropicais, como África, América Latina, Ásia e Oceania (OMS, 2010).

No Brasil, cerca de 30 mil acidentes ofídicos foram registrados no ano de 2010, sendo destes, 145 casos com mortes documentadas. Apesar do elevado número de acidentes, a taxa de letalidade corresponde a somente 0,31% dos casos (BRASIL, 2012).

Os acidentes botrópicos são caracterizados por extensos efeitos locais, incluindo dor, formação de edema, inflamação, hemorragia e necrose (CARDOSO et al., 1993; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1989, 2003; GUTIÉRREZ; RUCAVADO, 2000). Além disso, ocorrem ações sistêmicas que incluem coagulopatia, hemorragia interna, choque circulatório e problemas no sistema renal (FRANÇA; MÁLAQUE, 2003; GUTIÉRREZ; ESCALANTE; RUCAVADO, 2009; GUTIÉRREZ et al., 2010; PINHO; YO; BURDMANN, 2008; SGRIGNOLLI et al., 2011).

1.2 *Bothrops jararaca*

Bothrops jararaca (*B. jararaca*) é uma espécie predominantemente noturna e terrestre (Sazima, 1988) e encontra-se em diversos ambientes: florestas tropicais, semi-tropicais, campos abertos e cerrados (SAZIMA, 1992). Essa espécie ocorre do sul da Bahia ao norte da Argentina e Paraguai, distribuindo-se no Brasil nos estados de Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, leste do Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Figura 2 A) (MELGAREJO, 2003).

Estes animais possuem hábitos predominantemente noturnos ou crepusculares, são ágeis, sobem com facilidade em arbustos e telhados baixos, têm grande capacidade adaptativa, ocupando e colonizando áreas silvestres, agrícolas, suburbanas e até urbanas (BRASIL, 2001; MELGAREJO, 2003).

O seu padrão de coloração é muito variável, com manchas marrons escuras dispostas em faixas entremeadas por áreas claras, cinzas, oliváceas, amareladas ou beges (CAMPBELL; LAMAR, 1989). As manchas escuras de formas triangulares

distribuem-se em ambos os lados do corpo, de modo que os ápices dos triângulos ficam sobre a linha média dorsal, dispendo-se em oposição total ou parcial, ou justaposto. As manchas claras são mais difusas, mas não há um padrão rígido ao longo do corpo. A parte ventral do corpo é clara, de um bege ligeiramente esverdeado ou amarelado, ou ainda uniformemente acinzentada (Figura 2B) (SAZIMA, 1992).

Figura 2- *Bothrops jararaca* e sua distribuição geográfica.

A

B

(A) Distribuição geográfica da *B. jararaca*, a área laranja representa a distribuição da serpente *B. jararaca*. **(B)** *B. jararaca*.

Fonte: **(A)** < http://www.cobrasbrasileiras.com.br/bothrops_jararaca.html > **(B)** foto de Dra. Kathleen Fernandes Grego.

As manifestações clínicas de pacientes envenenados por *B. jararaca* são decorrentes principalmente de três atividades do veneno botrópico: 1) proteolítica, com formação de edema inflamatório no local da picada; 2) hemorrágica, com danos do endotélio e sangramento sistêmico; e 3) coagulante, com consumo dos fatores da coagulação e perturbação da hemostasia (MATSUI; FUJIMURA; TITANI, 2000; RIBEIRO; JORGE, 1997; SANO-MARTINS et al., 1997; SANTORO; SANO-MARTINS, 2004; VARANDA; GIANNINI, 1999).

Esses efeitos são mediados por uma série de componentes do veneno, tais como: metaloproteinases, fosfolipase A₂ (PLA₂), serinoproteinases, e outros compostos tóxicos presentes no veneno dessas serpentes (ALAM; QASIM; ALAM, 1996; FOX et al., 2006; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995; KINI, 2006; MONTECUCCO; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 2008).

1.3 Moléculas do veneno de serpentes

O veneno das serpentes é uma mistura complexa, composta por mais de 100 proteínas e peptídeos tóxicos e não tóxicos, assim como toxinas não proteicas como

lipídeos, hidrocarbonetos, amins e outras moléculas orgânicas e inorgânicas pequenas (Figura 3). (Markland, 1997, 1998, Warrell, 2010).

Figura 3- Compostos do veneno de serpentes.

CRISPs (Proteínas secretórias ricas em cisteína); CVF (Fator de veneno da cobra); PLA₂ (Fosfolipase A₂); Fator de crescimento neural (NGF) e Fator de crescimento endotelial (VEGF).
 Fonte: Modificado de Ramos e Selistre-de-Araújo, 2006.

A composição quantitativa e qualitativa das toxinas presentes nos venenos pode variar de acordo com inúmeros fatores, tais como: espécie, idade, período sazonal, dimorfismo sexual, dieta e distribuição geográfica (ANDRADE; ABE, 1999; CHIPPAUX; WILLIAMS; WHITE, 1991; DALTRY; WÜSTER; THORPE, 1996; FOX; SERRANO, 2008; RICHARDS; BARLOW; WÜSTER, 2012; SASA, 1999; ZELANIS et al., 2010, 2011).

As proteínas presentes nos venenos são originadas por uma série de eventos, como, por exemplo, quando um gene que expressa uma determinada proteína envolvida em um processo regulador chave é duplicado, gerando um novo gene, sendo seletivamente expresso na glândula de veneno (FRY et al., 2006, 2009, 2012). Em muitos casos, esses genes de toxinas foram amplificados para a obtenção de famílias multigênicas com novas características funcionais e estruturais (FRY et al., 2003, 2005; KORDIS; GUBENSEK, 2000). Esse processo, conhecido por evolução acelerada, é um dos fatores que contribuem para a diversificação do potencial biológico das toxinas, permitindo assim que as serpentes adaptem-se frente a diferentes alvos/presas (JUÁREZ et al., 2008; LI ; FRY; KINI, 2005; NAKASHIMA et al., 1995).

As proteínas tóxicas dos venenos desempenham diversas funções, como o auxílio na captura da presa, no qual um grande número de toxinas altera a fisiologia desta, que sucumbe. Além disso, existem proteínas que possuem especificidade para vários receptores teciduais humanos, que atuam no envenenamento afetando os sistemas nervoso, cardiovascular e hemostático, podendo também causar necrose tecidual (HUTTON; WARRELL, 1993; KINI, 2006; WARRELL, 2010; WHITE, 2005). Outras toxinas também podem ainda atuar sinergicamente, aumentando a atividade ou difusão das mesmas (KARDONG, 1996).

Os principais grupos de moléculas presentes no veneno das serpentes da família Viperidae são: metaloproteases de veneno de serpentes (SVMPs), fosfolipases A₂ (PLA₂), serinoproteases de veneno de serpentes (SVSPs), lectinas do tipo C, L-aminoácido oxidases (LAAO), hialuronidases, fatores de crescimento, proteínas secretórias ricas em cisteína (CRISP) e peptídeos potenciadores de bradicinina (BPPs). Além dessas moléculas, existe ainda uma variedade de enzimas e peptídeos encontrados nos venenos das serpentes do gênero *Bothrops*, como apresentados no

quadro 1 (Junqueira-de- Azevedo; Ho, 2002; Kashima et al., 2004; Cidade et al., 2006, Valente et al., 2009; Cardoso et al., 2010; Rodrigues et al., 2012; Zelanis et al., 2012).

As proteínas mais abundantes no veneno de *B. jararaca* estão descritas a seguir.

Quadro 1 - Alguns grupos de proteínas e peptídeos encontrados nos venenos de serpentes, incluindo *B. jararaca* e sua importância clínica.

Exemplo de Toxina	Serpente (família)	Função	
Inibidores da enzima conversora de Angiotensina	<i>Viperidae</i>	Hipotensão	
Desintegrinas e Metaloproteinases (ADAM)	Hemorraginas (atrolisinas e jararagina); Procoagulantes (fibrolase, ecarina, veneno da víbora de Russell's ativador do fator X)	<i>Viperidae</i> e <i>Elapidae</i>	Dano endotelial, hemorragia, necrose
Fator do veneno de cobra, complemento C3	Fator de veneno de cobra	<i>Elapidae</i> e <i>Viperidae</i>	Dano tecidual
Lectinas dependentes de cálcio	<i>Rhodocytin</i>	<i>Viperidae</i> e <i>Elapidae</i>	Efeito plaquetário
Proteínas secretórias ricas em cisteína		<i>Elapidae</i> , <i>Viperidae</i> , <i>Colubridae</i>	Inibição da musculatura lisa
Inibidores de cisteíno protease	Cistatina	<i>Viperidae</i> e <i>Elapidae</i>	Inibidor de metaloproteinases
Ativadores do fator V e X		<i>Viperidae</i> e <i>Elapidae</i>	Coagulopatias
Calicreína		<i>Viperidae</i>	Hipotensão
L- aminoácido oxidases		<i>Muitas serpentes</i>	Apoptose
Peptídeos natriuréticos		<i>Elapidae</i> e <i>Viperidae</i>	Hipotensão

Fator de crescimento neural (NFG)		Muitas serpentes	Desconhecida
Fosfolipases A ₂	β bungarotoxina	Encontrada na maioria das serpentes	Inflamação, hemólise, necrose, agregação plaquetária, mitotoxicidade
Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)	VEGF-homólogo	<i>Viperidae</i>	Dano endotelial, permeabilidade, edema, hipotensão.

Fonte: Modificado de Warrell, 2010.

1.3.1 L- aminoácido oxidase (LAAO)

As L- aminoácido oxidases encontradas nos venenos de serpentes (LAAOs) são flavoenzimas com massa molecular de 110-150 kDa (DU; CLEMETSON, 2002). Os efeitos deletérios desta proteína ocorrem via produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e amônia (NH₃), durante a oxidação dos α-ceto-aminoácidos. As LAAOs são proteínas citotóxicas, que inibem a agregação plaquetária, possuem atividade antibacteriana e antiviral (LI; YU; LIAN, 1994; NAUMANN et al., 2011; SUN et al., 2010; ZHANG et al., 2003) e podem causar apoptose em diferentes tipos celulares (ZULIANI et al., 2009).

As LAAOs estão presentes em diferentes espécies como, bactérias, fungos, plantas e no veneno das serpentes *Viperidae*, *Elapidae* e *Crotalidae* (DU; CLEMETSON, 2002; MANDAL; BHATTACHARYYA, 2008; SUN et al., 2010). Geralmente essas proteínas encontram-se na forma de um homodímero de glicoproteína ligado a FAD (flavina adenina dinucleotídeo) ou FMN (flavina mononucleotídeo) (DOLEY; KINI, 2009; LU; CLEMETSON; CLEMETSON, 2005a; SANT'ANA et al., 2008; WEI et al., 2009). As flavinas presentes nas LAAOs são responsáveis pela coloração amarelada do veneno das serpentes, além de contribuir para a toxicidade do veneno (CISCOTTO et al., 2009; DE VIEIRA SANTOS et al., 2008; STÁBELI et al., 2007).

1.3.2 Proteínas secretórias ricas em cisteína (CRISPs)

As proteínas secretórias ricas em cisteína dos venenos de serpentes (CRISPs) contêm 16 resíduos de cisteínas que formam 8 pontes dissulfeto e possuem massa molecular de 20-30 kDa (MACKESSY, 2002; ROKITA et al., 2011; YAMAZAKI; MORITA, 2004). Essas proteínas são amplamente distribuídas no veneno de lagartos e de serpentes, inclusive do gênero *Bothrops* (CARDOSO et al., 2010; CIDADE et al., 2006; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO & HO, 2002; VALENTE et al., 2009).

Embora o papel funcional das CRISPs no veneno não seja bem compreendido, essas proteínas são conhecidas por bloquearem os canais iônicos, como canais de cálcio, inibindo a contração da musculatura lisa (YAMAZAKI; HYODO; MORITA, 2003).

1.3.3 Fatores de crescimento

Os fatores de crescimento presentes nos venenos de serpentes incluem o fator de crescimento endotelial vascular (svVEGF) e o fator de crescimento neural (NFG) que, embora não sejam componentes majoritários no veneno das serpentes, apresentam diversas atividades biológicas (KOSTIZA; MEIER, 1996; YAMAZAKI; MORITA, 2006) e em diversas espécies de serpentes (JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO et al., 2001; SUTO et al., 2005; TOKUNAGA; YAMAZAKI; MORITA, 2005; TRUMMAL et al., 2011; ZELANIS et al., 2012).

O VEGF atua na permeabilidade vascular (JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO et al., 2001) e acredita-se que atue potencializando a atividade de outros componentes tóxicos dos venenos, além de um potente efeito hipotensor, podendo estar envolvido na resposta local e sistêmica no envenenamento (YAMAZAKI et al., 2009).

Os NFGs são proteínas necessárias para a manutenção dos neurônios embrionários e sensoriais simpáticos (KOSTIZA; MEIER, 1996). O fator de crescimento neural de serpente não é bem conhecido, e sua atividade no veneno não foi esclarecida. A presença deste transcrito foi identificada em biblioteca de cDNA de glândula de serpentes machos de *B. jararaca* (ZELANIS et al., 2012). Além disso, a presença desta proteína foi observada somente em camundongos machos por Thoenen

e Barde (1980) que demonstraram o papel modulador do NGF nesses animais. Desta forma, essa proteína pode estar associada ao dimorfismo sexual (FURTADO; TRAVAGLIA-CARDOSO; ROCHA, 2006; MENEZES et al., 2006).

1.3.4 Peptídeos Potenciadores de Bradicinina (BPPs)

Duas importantes contribuições médicas foram obtidas com estudos de moléculas que participam do envenenamento por *B. jararaca*: o peptídeo hipotensor bradicinina (BK) (ROCHA E SILVA; BERALDO; ROSENFELD, 1949) e os peptídeos potenciadores de bradicinina (BPPs) (FERREIRA; BARTELT; GREENE, 1970; HAYASHI; CAMARGO, 2005).

Os BPPs são oligopeptídeos que variam de 5 a 14 resíduos de aminoácidos e possuem em comum um resíduo de ácido piroglutâmico e um resíduo de prolina. A atividade biológica destes BPPs é geralmente evidenciada pelo aumento da contração do íleo isolado de cobaia induzida por bradicinina. A propriedade anti-hipertensiva dos BPPs de veneno de serpentes foi demonstrada tanto em modelos animais como em humanos (GAVRAS et al., 1974; IANZER et al., 2004; KRIEGER et al., 1971). A ação farmacológica dos peptídeos BPPs ocorre via inibição da enzima conversora de angiotensina (ACE) (NG; VANE, 1970). O BPP foi essencial para o desenvolvimento do primeiro medicamento para o tratamento da hipertensão humana, o captopril®, um inibidor comercial da ACE, a partir de um BPP isolado do veneno da *B. jararaca* (FERNANDEZ; NESHICH; CAMARGO, 2004; ONDETTI; CUSHMAN, 1981).

1.3.5 Hialuronidase

A atividade da enzima hialuronidase é conhecida em diferentes serpentes da família Viperidae, incluindo *B. alternatus* (urutu), *B. jararaca* e *B. pauloensis* (CARDOSO et al., 2010; CIDADE et al., 2006; RODRIGUES et al., 2012). O papel dessa proteína no veneno está relacionado à destruição da matriz extracelular pela degradação do ácido hialurônico, facilitando assim a difusão das toxinas. Entretanto,

quando testada isoladamente, essa enzima não apresentou efeito tóxico (GIRISH et al., 2002, 2004; KEMPARAJU; GIRISH, 2006; KEMPARAJU; GIRISH; NAGARAJU, 2010).

1.3.6 Lectinas do tipo C (CTLs)

As lectinas do tipo C (C- type lectins - CTLs) foram isoladas de diferentes espécies de serpentes (AROCAS et al., 1997; DE-CARVALHO; MARANGONI; NOVELLO, 2002; DÖRMANN et al., 2001; OZEKI et al., 1994; ZINGALI et al., 1993). Essas proteínas apresentam diversos papéis, como na adesão celular, na endocitose e na neutralização de patógenos (OGAWA et al., 2005).

As CLTs são glicoproteínas compostas por duas subunidades idênticas ligadas covalentemente, sendo cada constituída de 135-141 resíduos de aminoácidos, contendo um domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) (DRICKAMER, 1999). Na presença de Ca^{2+} , as lectinas medeiam à interação célula-célula e o reconhecimento de patógenos (WEIS; TAYLOR; DRICKAMER, 1998). A maioria das lectinas encontradas em venenos de serpentes não apresenta o *loop* de ligação com o cálcio e nem todas se ligam a carboidratos (CLEMETSON; LU; CLEMETSON, 2005).

As CTLs podem atuar como antitrombóticos e como anticoagulantes, inibindo fatores da coagulação sanguínea, o que resulta em hemorragia. Por outro lado, algumas CTLs podem ativar alguns fatores da coagulação sanguínea sem a necessidade de cofator proteico (LU et al., 2002; LU et al., 2005b). Devido ao consumo excessivo dos fatores da coagulação sanguínea, as CTLs procoagulantes conduzem à coagulação sanguínea, causando distúrbios da hemostasia e, conseqüentemente, hemorragia (ARLINGHAUS; EBLE, 2012).

1.3.7 Fosfolipase A₂ (PLA₂)

As fosfolipases A₂ (PLA₂s) constituem uma superfamília de enzimas, secretadas ou citosólicas, que catalisam a hidrólise da ligação éster sn-2 dos fosfolipídeos, liberando ácidos graxos livres e lisofosfolipídeos (DENNIS, 1997; KINI, 2003; SCHALOSKE; DENNIS, 2006).

As PLA₂s do veneno de serpentes são divididas em dois grupos (I e II) baseados em suas sequências de aminoácidos e no padrão das suas pontes dissulfeto (HEINRIKSON; KRUEGER; KEIM, 1977). As PLA₂s tipo I estão presentes em venenos de serpentes da família Elapidae e Hydrophidae e as do tipo II estão presentes em venenos de serpentes Viperidae e Crotalidae (KIHARA, 1976; LAMBEAU; LAZDUNSKI, 1999; OWNBY, 1998).

As PLA₂s desempenham diversas funções fisiológicas como digestão de lipídeos, proliferação e migração celular e atividade antibacteriana (BUCKLAND; WILTON, 2000; DIZ FILHO et al., 2009; LAMBEAU; LAZDUNSKI, 1999; NEVALAINEN; GRAHAM; SCOTT, 2008). Essas enzimas possuem também um amplo espectro de efeitos farmacológicos, incluindo neurotoxicidade, miotoxicidade, cardiotoxicidade, efeitos hemolíticos, efeitos convulsivos, atividade anticoagulante e antiplaquetária, formação de edema e danos teciduais (OGAWA et al., 1996; KINI, 2003, 2006).

1.3.8 Serinoproteases

As serinoproteases são enzimas proteolíticas que desempenham papéis fundamentais em diversos processos biológicos que variam desde a digestão ao controle da coagulação sanguínea, do sistema imunológico e do sistema inflamatório (NEURATH, 1984).

As serinoproteases estão agrupadas em seis grandes clãs e subdivididas em famílias com base em suas sequências e semelhanças funcionais segundo a classificação do banco de dados MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>) (RAWLINGS; TOLLE; BARRET, 2012).

As serinoproteases do veneno da serpente (SVSPs) são exclusivamente do clã PA família S1 das quimotripsinas, que contêm em seu sítio ativo a tríade catalítica histidina, ácido aspártico e serina (BARRETT; RAWLINGS, 1995, KANG et al., 2011), sendo abundantes nos venenos das serpentes das famílias Viperidae, Crotalidae, Elapidae e Colubridae (SERRANO; MAROUN, 2005).

As SVSPs regulam as principais reações biológicas da cascata de coagulação sanguínea, do sistema fibrinolítico e da ativação plaquetária (MURAKAMI; ARNI, 2005).

As SVSPs são consideradas proteases não tóxicas, no entanto podem contribuir para a letalidade quando associadas a outros componentes do veneno, como, por exemplo, as metaloproteases (SERRANO; MAROUN, 2005).

1.3.9 Metaloproteases

As metaloproteases do veneno das serpentes (SVMPs) são proteínas multimodulares com atividade de endopeptidase. Possuem um domínio conservado para ligação do zinco (HEXXHXXGXXHD), sendo sua atividade inibida pela presença de quelantes de zinco, e por isso são chamadas de zinco-metaloproteases (FOX; SERRANO, 2008a; RAMOS; SELISTRE-DE-ARAUJO, 2006; RAWLINGS; TOLLE; BARRET, 2012).

As SVMPs são divididas em três classes, de acordo com a organização dos seus domínios: grupo P-I, P-II e P-III (Figura 5). As SVMPs P-I são as metaloproteases mais simples contendo somente o domínio catalítico da metaloprotease. As SVMPs P-II contêm o domínio catalítico metaloprotease seguido de um domínio tipo desintegrina. As SVMPs P-III, além de conter os domínios metaloprotease e tipo desintegrina, apresentam também o domínio rico em cisteína. Além dessas, uma quarta classe, denominada de P-IV, atualmente foi reclassificada como pertencente à classe P-III. Essas enzimas apresentam dois domínios lectina tipo C, conectados por pontes dissulfeto ao domínio rico em cisteína (FOX; SERRANO, 2008a, 2009).

Figura 5- Representação esquemática das diferentes classes de metaloproteases.

P (pré-domínio); Pro (pró- domínio); Proteinase (domínio metaloproteases); S (domínio espaçador); Dis (domínio desintegrina); Dis-like (domínio semelhante à desintegrina); Cys-rich (domínio rico em cisteína); Lec (domínio semelhante à lectina); SVMPs P-III do veneno da *C. atrox* (VAP); Ativador do fator X da víbora *Lebetina* (VLFXA).

Fonte: Modificado de Fox e Serrano, 2005.

As SVMPs correspondem a cerca de 30% da composição do veneno das Viperidae (CIDADE et al., 2006; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO; HO, 2002; TERRA et al., 2009; VALENTE et al., 2009), sugerindo um papel importante no processo de envenenamento. Essas enzimas estão relacionadas à toxicidade do veneno com funções na formação de edema, na inflamação, no sangramento, na coagulação intravascular e na necrose (BJARNASON; FOX, 1994; FOX; SERRANO, 2009; TAKEDA; TAKEYA; IWANAGA, 2012). Essas proteínas são consideradas os fatores

primários responsáveis pela hemorragia local e sistêmica (GUTIÉRREZ et al., 2005; TAKEYA; IWANAGA, 1998).

As SVMPs atuam principalmente na degradação dos componentes da membrana basal nos capilares, causando o rompimento das paredes dos vasos e a liberação do sangue (GUTIÉRREZ et al., 2005). É importante destacar que a hemorragia local e a necrose tecidual causada por viperídeos são atividades atribuídas às SVMPs de todas as classes. Sendo que as SVMPs P-III têm uma maior contribuição dentre as três classes (FOX; SERRANO, 2005).

As SVMPs atuam em uma variedade de substratos, incluindo proteínas plasmáticas, componentes da matriz extracelular localizados na membrana basal da microvasculatura e do estroma, proteínas de células endoteliais e de células de resposta inflamatória, assim como em proteínas envolvidas na agregação plaquetária (FOX; SERRANO, 2005, 2008b, 2009).

1.4 Fígado

A maioria dos inibidores das proteínas plasmáticas, dos fatores da coagulação e do sistema complemento são sintetizados no fígado, podendo ser encontrados no plasma e no veneno das serpentes (CIDADE et al., 2006; CHENG et al., 2012; DAVIS-III; LU; MEJIA, 2010; EARL et al., 2012; KINI, 2005; TAKAHASHI; SUZUKI; IWANAGA, 1972; TAKAHASHI; IWANAGA; SUZUKI, 1974). O fígado nas serpentes se situa ao longo do esôfago, estendendo-se do coração ao piloro, onde alcança o pâncreas. A parte externa do fígado é convexa e prende-se pela sua concavidade interior ao esôfago, onde se notam os canalículos hepáticos, os quais formam o canal hepático dando origem ao colédoco. Este último se conecta ao pâncreas e se junta ao seu conduto em seu ponto terminal no intestino (Figura 6) (PRADO, 1945; ZUG; VITT; CALDWELL, 2001).

Figura 6- Fígado da *B. jararaca*.

Fonte: Cedida por: Dra. Kathleen Fernandes Grego.

O fígado é revestido por tecido conjuntivo, formado por aproximadamente 78% de um tipo de célula parenquimatosa, os hepatócitos, os quais funcionam em conjunto com os colangiócitos (célula epitelial biliar), as células endoteliais, células de Kupffer (macrófagos residentes do fígado), as *pit* células (células “natural killer”) e as células estreladas hepáticas. O hepatócito possui retículo endoplasmático abundante, tanto liso quanto rugoso, o qual forma agregados dispersos no citoplasma, designados corpos basofílicos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; LEMAIGRE; ZARET, 2004; SI-TAYEB; LEMAIGRE; DUNCAN, 2010).

O fígado é um órgão que desempenha importante papel nas atividades vitais do organismo, como no metabolismo de carboidratos, lipídios e aminoácidos. Além disso, o fígado participa do metabolismo de drogas, na secreção da bile, nos mecanismos de defesa e na síntese de proteínas plasmáticas incluindo os fatores de coagulação, os componentes do sistema complemento e os inibidores de proteases (GUYTON; HALL, 2006; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; SI-TAYEB; LEMAIGRE; DUNCAN, 2010; SHIOJIRI, 1984).

Para contrapor aos efeitos das moléculas do veneno, o plasma da serpente *B. jararaca* é rico em inibidores (CHUDZINSKI, 1989), que geralmente são sintetizados no fígado.

1.5 Inibidores naturais presentes no fígado

Os inibidores naturais de venenos de serpentes desempenham um papel significativo na capacidade de neutralizar os efeitos deletérios induzidos por toxinas presentes no veneno (Sánchez; Rodríguez-Acosta, 2008). Assim, a resistência das serpentes contra a ação das toxinas presentes no próprio veneno vem sendo estudada há anos (FAURE, 2000a).

Inúmeros estudos têm demonstrado o efeito inibitório do soro de diferentes espécies de serpentes peçonhentas e não peçonhentas (DOMONT; PERALES; MOUSSATCHÉ, 1991; OVADIA; KOCHVA, 1977; PORAN; COSS; BENJAMINE, 1987; THWIN; GOPALAKRISHNAKONE, 1998).

Dois mecanismos podem ser responsáveis pela imunidade natural ao veneno presente em alguns animais: 1) mutação no gene que codifica para o alvo da toxina, tornando-o insensível à toxina (BARCHAN et al., 1992; BURDEN; HARTZELL; YOSHIKAMI, 1975; OHANA et al. 1991); 2) presença de proteínas neutralizantes para hemorraginas, neurotoxinas e miotoxinas no sangue das serpentes e de outros animais (BORKOW; GUTIÉRREZ; OVADIA, 1997; CLARK; VORIS, 1969; LOMONTE et al., 2009; OMORI-SATOH, 1972; OMORI-SATOH; YAMAKAWA; MEBS, 1977; OYAMA et al., 2009; STRAIGHT; GLENN; SNYDER, 1976; PHILPOT et al., 1978).

Atualmente, sabe-se que as moléculas responsáveis pela neutralização da ação do veneno são proteínas, as quais podem estar presentes em fluidos ou tecidos corporais, e são classificadas em diferentes famílias, como proteínas anti-hemorrágicas (inibidores de metaloproteases), inibidores de PLA₂s e inibidores de serinoproteases (DOMONT; PERALES; MOUSSATCHÉ, 1991; NEVES-FERREIRA et al. 2009; PÉREZ; SÁNCHEZ, 1999; PERALES, 2005).

Dentre as moléculas citadas, inúmeros inibidores de metaloproteases do veneno de serpentes (SVMPIs) foram isolados e caracterizados de plasma de serpentes

peçonhentas e não peçonhentas (BERGER; PINTO; GUIMARÃES, 2008; BIARDI et al., 2011; BORKOW; GUTIÉRREZ; OVADIA, 1994; CERQUEIRA; LEMOS, 2000; PATIÑO et al., 2010; TOMIHARA et al., 1988; VALENTE et al., 2001; WAGSTAFF et al., 2008). Todos os SVMPIs caracterizados conferem proteção através da inibição das metaloproteases do veneno, reduzindo ou eliminando a atividade hemorrágica do veneno total ou de toxinas purificadas do veneno (BIARDI, 2011; PERALES et al., 2005).

Os SVMPIs são glicoproteínas ácidas cujo mecanismo de interação se estabelece através de ligações não covalentes, formando um complexo com enzimas do veneno, tornando-o inativo. Eles podem ser encontrados como moléculas monoméricas ou diméricas, com exceção da erinacina, uma estrutura complexa composta por várias cadeias polipeptídicas, ligadas por ponte dissulfeto e interações não covalentes (NEVES-FERREIRA et al., 2009; OMORI-SATOH; YAMAKAWA; MEBS, 2000; PERALES et al., 2005).

Os SVMPIs são classificados em três famílias: a) família da Cistatina, como por exemplo, o HSF (*Habu serum factor*), inibidor isolado da serpente *Trimeresurus flavoviridis* e o Bj46a (fator anti-hemorrágico) isolado da serpente *B. jararaca* (VALENTE et al., 2001; YAMAKAWA; OMORI-SATOH, et al., 1972); b) família das Imunoglobulinas, na qual todos os inibidores foram isolados do soro ou plasma de mamíferos. Dentre estes inibidores encontram-se o inibidor isolado do *Didelphis virginiana* (CATANESE; KRESS, 1992), o AHF-1 (Fator anti-hemorrágico-1) a partir do mangusto (*Herpestes edwardsii*) (QI et al., 1994, 1995), os fatores anti-hemorrágicos, denominados inibidores DM43, DM40 e DM43b de gambá (*Didelphis marsupialis*) (NEVES-FERREIRA et al., 1997, 2000, 2002) e o fator anti-hemorrágico denominado PO41 de marsupiais brasileiros (*Philander opossum*) (JURGILAS et al., 2003); c) a família das Ficolinas/Opsoninas, que são inibidores de alta massa molecular isolados do plasma e do extrato do músculo de *Erinaceus europaeus* (DE WIT; WESTROM, 1987; MEBS et al., 1996; OMORI-SATOH et al., 2000).

Outra classe importante de moléculas antiveneno são os inibidores de fosfolipase A₂ (PLIs), que são glicoproteínas multiméricas encontradas no soro das serpentes. Estes inibidores possuem papel na neutralização de neurotoxinas e miotoxinas,

formando complexos solúveis com as enzimas PLA₂s e inibindo a sua atividade. Além disso, estão presentes na circulação com a função de proteger as serpentes contra a ação do seu próprio veneno (DUNN; BROADY, 2001; FAURE, 2000a; FAURE et al., 2000b; FORTES-DIAS, 2002; KIHARA, 1976; LAMBEAU; LAZDUNSKI, 1999).

Três tipos de PLIs (PLI- α , PLI- β e PLI- γ) foram isolados e purificados do plasma da serpente japonesa *Gloydius brevicaudus* (renomeada *Agkistrodon blomhoffi siniticus*) (OHKURA, 1997). O PLI- α é uma glicoproteína trimérica que contém um domínio tipo lectina C (CTLD). Este inibidor apresenta inibição específica para PLA₂s ácidas do grupo II da própria serpente. Os PLI- α podem inibir a atividade miotóxica induzida pelas PLA₂s e foram isoladas de diversas serpentes (INOUE et al., 1991, 1997; LISANO et al., 1997; NOBUHISA et al., 1998; OHKURA et al., 1993). Os PLI- β são compostos por três subunidades idênticas com 50 kDa, com 33% de identidade com um domínio rico em leucina encontrado em uma proteína denominada α_2 -glicoproteína de humanos. Possuem atividade de inibição para as PLA₂s básicas do grupo II do próprio veneno da serpente (OHKURA et al., 1997; OKUMURA et al., 1998). Os PLI- β foram identificados em um número muito restrito de serpentes, com um pequeno espectro de distribuição, em *Agkistrodon blomhoffi siniticus*, em uma serpente não peçonhenta *Elaphe quadrivirgata* (OKUMURA et al., 1998, 2002) e em glândulas de *Lachesis muta* (LIMA et al., 2011).

O PLI- γ contém duas subunidades homólogas, PLI- γ -A e PLI- γ -B, cada uma das quais possui duas repetições em tandem de um padrão de cisteína característico do motivo 3FTx (*three-finger toxin*) (OHKURA et al., 1994; OKUMURA et al., 1999a, b). Os PLI- γ inibem todos os grupos de PLA₂s (I, II e III) (INOUE et al., 1997; OHKURA et al., 1999; OKUMURA et al., 1999a; THWIN et al., 2000). Os PLI- γ s constituem a classe com maior distribuição de PLIs, tendo sido encontrados no sangue de diversas serpentes das famílias Viperidae, Elapidae, Pythonidae e Colubridae (LIZANO; DOMONT; PERALES, 2003).

Alguns inibidores de serinoproteases também já foram encontrados em serpentes, sendo isolados e agrupados de acordo com a atividade proteolítica inibida: calicreína, tripsina, plasmina e quimotripsina (TAKAHASHI et al., 1974). Inibidores de serinoproteases foram isolados dos venenos de serpentes da família Viperidae e

Elapidae (FILIPPOVICH et al., 2002; GUO et al., 2001; LIU; WU; LO, 1983; LI; SUN; GREENAWAY, 2006; RITONJA; TURK; GUBENSEK, 1983; SHAFQAT; ZAIDI; JÖRNVALL, 1990a; SHAFQAT et al., 1990b; SCHWEITZ et al., 1994) os quais são em grande parte inibidores de serinoproteases pertencentes à família de inibidores de tripsina pancreática bovina tipo Kunitz (BPTI) (CHENG et al., 2012; LASKOWSKI, 1986; LASKOWSKI; KATO, 1980).

Os inibidores tipo Kunitz são caracterizados por conter um domínio conservado de aproximadamente 60 resíduos de aminoácidos, estabilizado por três pontes de dissulfeto. Os inibidores tipo Kunitz/BPTI de serpente foram divididos em dois grupos com base na sua função: Inibidor de tripsina e inibidor de quimotripsina. Os inibidores tipo Kunitz/BPTI de serpentes são bem específicos, sendo que muitos membros desta família, presentes nos venenos de serpentes, não são tóxicos, atuando primariamente como inibidores de serinoproteases. Por outro lado, existem outros inibidores tipo Kunitz/BPTI que apresentam efeitos neurotóxicos, sendo potentes e específicos (CARDLE; DUFTON, 1997; ZUPUNSKI; KORDIS; GUBENSEK, 2003).

O estudo de inibidores de proteases no plasma de serpentes pode levar ao desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para uma variedade de doenças (DE MORAIS et al., 2009; EARL et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2011; SANTOS-FILHO et al., 2011; SOARES et al., 2003; ZHANG et al., 2001; ZHANG et al., 2007). Portanto, faz-se necessário a identificação de moléculas do fígado para entender o processo de inibição de toxinas por proteínas do plasma de *B. jararaca*. Além disso, estes estudos podem contribuir tanto para a formulação de antivenenos eficientes para o tratamento de acidentes ofídicos, como para a compreensão do mecanismo de ação destas proteínas na homeostasia (NEVES-FERREIRA et al., 2009).

1.6 Hemostasia

A hemostasia pode ser definida como um processo fisiológico complexo, que tem por objetivo manter o sangue circulante em estado fluido, evitando o extravasamento, levando à hemorragia ou então à obstrução do fluxo pela presença de trombos (BATTY; SMITH, 2010; FURIE; FURIE, 1988).

Os componentes do sistema hemostático incluem as plaquetas, os vasos, as proteínas da coagulação sanguínea, os anticoagulantes naturais e o sistema fibrinolítico. O equilíbrio da hemostasia é garantido por uma variedade de mecanismos, envolvendo interações entre proteínas, respostas celulares complexas e regulação do fluxo sanguíneo (FRANCO, 2001; TRIPLETT, 2000).

Diversas moléculas dos venenos das serpentes afetam o sistema hemostático para imobilizar e matar a presa (KINI, 2011; MARKLAND; SWENSON, 2010; YAMADA; SEKIYA; MORITA, 1997). Estas proteínas podem ter funções coagulantes como enzimas do tipo-trombina e toxinas ativadoras de protrombina; anticoagulantes: toxinas ativadoras de proteína C (Figura 7), ou interferir na agregação plaquetária: desintegrinas, ativadores fibrinolíticos e hemorraginas (Figura 8) (MARKLAND, 1998; MARSH; WILLIAMS, 2005).

A presença de inibidores de enzimas da coagulação sanguínea auxilia no controle da hemostasia nas serpentes, contribuindo para tornar a coagulação sanguínea destes animais mais lenta quando comparada a dos mamíferos (HACKETT; HANN, 1967; NAHAS et al., 1973, 1981, 1983).

Visto que as proteínas plasmáticas, incluindo a maioria dos fatores da coagulação sanguínea, são sintetizadas no fígado, o conhecimento das moléculas produzidas por este órgão é extremamente importante. No entanto, o principal entrave para se estudar o fígado das serpentes é a escassez de dados, tanto genômicos como transcriptômicos (CASTOE et al., 2011). A maior parte dos estudos nessa área está relacionada à glândula de veneno. Portanto, a identificação de moléculas do fígado é um desafio que auxiliará no entendimento dos diferentes processos fisiológicos na serpente, como por exemplo, a coagulação sanguínea.

Figura 7- Moléculas presentes nos venenos de serpentes que afetam a coagulação sanguínea.

As proteases interferem por ativação de fatores específicos (flechas grossas), enquanto outros fatores interferem por ligação (blocos vermelhos). Proteases procoagulantes (caixas verdes); proteases coagulantes e proteases que afetam a fibrinólise (caixas vermelhas); PLA₂s (caixas azuis); proteínas não enzimáticas (caixas amarelas).

Fonte: Kini, 2011.

Figura 8- Moléculas presentes nos venenos de serpentes que afetam a agregação plaquetária.

Enzimas que induzem ou inibem a agregação plaquetária são mostradas nas caixas amarelas e roxas, respectivamente. Proteínas não enzimáticas que induzem e inibem a agregação plaquetária são mostradas nas caixas verdes e rosas, respectivamente. Fonte: Kini, 2011.

1.7 Transcriptoma em serpentes

Com base na literatura científica recente pode-se definir a bioinformática como o estudo de dois fluxos de informações, um em biologia molecular e o outro baseado no método científico, da hipótese e desenho de experimentos à análise dos resultados (ALTMAN, 1998), que consiste no uso de sistemas computacionais nas análises de caracterização molecular integrando modelos matemáticos e estatísticos para interpretar os dados biológicos (KOIDE; PANG; BALIGA, 2009; PROSDOCIMI et al., 2002).

A determinação da estrutura do DNA por Watson e Crick (1953) permitiu o surgimento de um novo ramo de pesquisa, a Genética Molecular, que aliada às técnicas de sequenciamento de DNA, desenvolvidas por Sanger e Coulson (1975), possibilitou uma rápida evolução nas técnicas moleculares, o que levou a um aumento no sequenciamento de DNA em larga escala e os sequenciamentos de genoma foram possíveis (Sterky; Lundeberg, 2000).

O transcriptoma é o conjunto completo de transcritos de um organismo, tecido ou célula, para uma dada condição fisiológica ou patológica (DIAS CORREIA; DIAS CORREIA, 2007; PASSOS; NGUYEN; JORDAN, 2000). Compreender o transcriptoma é essencial para interpretar os elementos funcionais do genoma e revelar os componentes moleculares de células e tecidos, e também para a compreensão de processos envolvidos no desenvolvimento e na evolução de doenças. O transcriptoma permite obter um catálogo de transcritos, incluindo RNA codificante (mRNAs) e não-codificantes (rRNAs, tRNAs, RNA estruturais, RNAs regulatórios e outros tipos de RNAs), assim é possível determinar a estrutura de transcrição dos genes, os padrões de *splicing* e de outras modificações pós-transcricionais. É possível também quantificar as diferenças nos níveis de expressão de cada transcrito durante o desenvolvimento e em diferentes condições (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009), uma vez que as alterações nos níveis de expressão estão diretamente relacionadas às modificações na fisiologia, metabolismo e consequentemente ao processo de adaptação celular (VAN VLIET, 2010).

Em 1991, Adams e colaboradores realizaram o primeiro sequenciamento de DNA em larga escala a partir de bibliotecas de cDNA do cérebro humano. As sequências obtidas foram denominadas *Expressed Sequence Tags* (ESTs). O sequenciamento de ESTs é importante para determinar o nível e a complexidade da expressão gênica na amostra analisada (OKUBO et al., 1992). Elas também podem auxiliar na predição de regiões transcritas das sequências do genoma, bem como na detecção de polimorfismos, os quais são importantes na caracterização de doenças genéticas (LANDEGREN; NILSSON; KWOK, 1998). Isso ressalta a importância do sequenciamento de cDNA como um complemento ao sequenciamento do genoma, e, na ausência deste, representa uma ótima ferramenta para a obtenção de informações relevantes em diversos organismos (STERKY; LUNDEBERG, 2000).

Na área toxinológica, inúmeros trabalhos foram realizados utilizando ESTs para o estudo das glândulas de venenos de *Bothrops* (JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO; HO, 2002; KASHIMA et al., 2004; NEIVA et al., 2009; VALENTE et al., 2009), *B. jararaca* (CIDADE et al., 2006), *Crotalus durissus collineatus* (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2009), *Lachesis muta* (JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO et al., 2006), *Micrurus corallinus* (LEÃO; HO; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, 2009), *Philodryas olfersii* (CHING et al., 2006), *Bungarus multicinctus* e *Naja atra* (JIANG et al., 2011). Estes estudos geraram informações sobre o repertório de toxinas presentes no veneno.

No entanto, a compreensão da biologia desses animais é escassa, necessitando de estudos utilizando outros órgãos de serpentes, como por exemplo, o fígado. Deste modo, o estudo da expressão gênica no fígado através do transcriptoma pode contribuir para o melhor entendimento dos processos biológicos desses vertebrados, possibilitando também a identificação de moléculas-alvo na formulação de antivenenos eficientes para o tratamento de acidentes ofídicos (NEVES-FERREIRA et al., 2009).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Obter transcritos produzidos no fígado da serpente *B. jararaca*, visando identificar moléculas envolvidas na coagulação sanguínea e transcritos que codificam para inibidores de proteases presentes no veneno da serpente.

2.2 Objetivos específicos

- Construção da biblioteca de cDNA do fígado de *B. jararaca* adulta;
- sequenciamento de ESTs da biblioteca de cDNA de *B. jararaca* e análise através de programas de bioinformática;
- análise do perfil de expressão de alguns transcritos do fígado de *B. jararaca*, para comparação entre os indivíduos jovem e adulto de *B. jararaca*, por PCR quantitativo em tempo real.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Animais

Neste trabalho foram utilizadas serpentes adultas fêmeas da espécie *B. jararaca*. Os procedimentos adotados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB), sob o protocolo nº 794/11 e nº 931/12, em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro (COBEA). As serpentes foram coletadas da natureza, recebidas e mantidas pelo Laboratório de Herpetologia, responsável pelo biotério de serpentes do Instituto Butantan.

As serpentes recém-chegadas ao Instituto passaram por uma triagem em que foi verificada a procedência do animal e a sua localidade para obtenção das informações para o biotério. Após esta análise, o animal foi clinicamente examinado, pesado, medido, e um manejo profilático que consta de um banho de imersão em triclorfon a 0,2% (ectoparasiticida) e vermifugação contra diferentes nematódeos (ivermectina – 2 mg/Kg), trematódeos e cestódeos (praziquantel – 8 mg/Kg) foi realizado. Após estes procedimentos, a serpente foi encaminhada para a primeira quarentena, onde permaneceu por, no mínimo, 30 dias. A serpente foi mantida em gaiola plástica, com papelão e água *ad libitum* em sala com ar condicionado (25 °C).

3.1.2 Biblioteca de cDNA

O *Smart cDNA library Construction Kit* utilizado para a construção da biblioteca de cDNA foi obtido da empresa Clontech (Mountain View, CA). Os extratos de empacotamento *Gigapack III Gold Packaging Extract* foram obtidos da empresa Stratagene.

3.1.3 Sequenciamento de DNA e PCR tempo real

Os reagentes *Big Dye terminator V 3.1 cycle sequencing kit* e o *SYBR® Green PCR Master Mix* utilizados no sequenciamento de DNA e PCR quantitativo, respectivamente, foram adquiridos da empresa Applied Biosystems (Carlsbad, CA).

3.1.4 Bactérias

Linhagem de Escherichia coli XL1-Blue (endA1, gyrA96, hsdR17, lac –, recA1, relA1, supE44, thi-1, [F' lacI qZ ΔM15, proAB, Tn10]) foi usada para amplificação e titulação das bibliotecas de cDNA. Linhagem de *Escherichia coli* BM25.8 (supE44, thi Δ(lac–proAB) [F' traD36, proAB+, lacIqZ ΔM15] λimm434 (kanR)P1 (camR) hsdR (rk12–mk12–)) foi usada para a excisão dos clones da biblioteca de cDNA. Ambas as linhagens foram adquiridas da empresa Clontech (Mountain View, CA).

3.2 Métodos

3.2.1 Coleta do fígado de *B. jararaca*

As serpentes *B. jararaca* foram sacrificadas com dióxido de carbono (CO₂), de acordo com as normas éticas da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) (nº 794/11 e nº 931/12). Após o sacrifício foi realizada a retirada do fígado da serpente através de um corte longitudinal. O fígado foi então fracionado em porções, algumas foram armazenadas em nitrogênio líquido e outras frações do tecido foram colocadas em TRIZOL® (Invitrogen, Carlsbad, CA) e congeladas, para posterior extração do RNA total.

3.2.2 Extração do RNA total do fígado

Nesta etapa, as porções do fígado estocadas em nitrogênio líquido foram maceradas e o RNA total foi extraído com a utilização do *RNeasy Mini Kit®* (Qiagen,

USA) de acordo com instruções do fabricante. A concentração dos RNAs extraídos foi determinada em equipamento *Nanovue plus* (GE Healthcare) e o grau de pureza foram avaliados pela relação 260/280 nm. Deste modo, a construção da biblioteca de cDNA foi feita com preparações de RNAs com relação $\geq 1,9$.

3.2.3 Construção da biblioteca de cDNA do fígado da *B. jararaca*

A biblioteca de cDNAs de fígado da *B. jararaca* foi construída utilizando o *SmartTM cDNA Library Construction Kit* (Clontech) seguindo instruções do fabricante. Resumidamente, o cDNA foi sintetizado a partir do RNA, através da *SMARTScribeTM MMLV Reverse Transcriptase*. Foram utilizados oligonucleotídeos específicos contendo sítios para a enzima de restrição *SfiI* ligados em ambas extremidades da dupla fita de cDNA. Em seguida, o cDNA foi amplificado por PCR, digerido com *SfiI* e fracionado em coluna Chromaspin 400. Os fragmentos do cDNA mais longos que 400 pb foram coletados e ligados no fago λ TriplEx2 do sistema *SMART Library Construction Kit* (Clontech), o qual foi submetido à reação de empacotamento de fagos usando o kit *Gigapack III Gold packaging Extract*, (Stratagene). A biblioteca foi então amplificada e titulada. As etapas acima foram realizadas de acordo com o seguinte protocolo:

- 1. Síntese da primeira fita de cDNA:** Além do RNA (1 μ g em 3 μ L), foram adicionados em um tubo estéril, outros componentes utilizados para a construção da primeira fita de cDNA: 1 μ L de CDSIII/3' PCR primer e 1 μ L do oligonucleotídeo *SMART IV*. A reação foi incubada a 72 °C por 2 minutos. Após esta etapa, foram adicionados 2 μ L de tampão de primeira fita 5 vezes concentrado, 1 μ L de DTT 20 mM, 1 μ L de dNTP mix 10 mM e 1 μ L de transcriptase reversa *powerscript*. O tubo foi então mantido a 42 °C por 1 hora e em seguida a 4 °C por 5 minutos.
- 2. Amplificação do cDNA:** Em um tubo estéril foram adicionados 2 μ L de cDNA fita simples da reação anterior, 80 μ L de água deionizada, 10 μ L de tampão de PCR 2 *advantage*, 2 μ L de CDS III/ 3' PCR primer, 2 μ L de mix polimerase *advantage*

(50 vezes concentrado). Em seguida, a mistura foi submetida à reação de PCR de acordo com o seguinte programa: 23 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 68 °C por 6 minutos.

3. Digestão com proteinase K: Em um tubo estéril foram adicionados 50 µL do cDNA fita dupla e 2 µL de proteinase K (20 µg/µL). A mistura foi então incubada a 45 °C por 20 minutos e após esta etapa foram adicionados 50 µL de água deionizada. Em seguida, foram adicionados 100 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (1:1:1) e homogeneizados por inversão por 2 minutos. A mistura foi então centrifugada por 5 minutos a 12.500 x *g* e o sobrenadante foi cuidadosamente transferido para um tubo de microcentrifuga estéril. Finalmente, foram adicionados 100 µL de clorofórmio: álcool isoamílico e a mistura foi centrifugada como na etapa anterior. O sobrenadante foi então transferido para um tubo de 0,5 mL estéril e foram acrescidos de 10 µL de solução de acetato de sódio (3 M), 1,3 µL de solução de glicogênio (20 µg/ µL) e 260 µL de etanol 95%. A amostra foi centrifugada por 20 minutos a 12.500 x *g*, a temperatura ambiente e o *pellet* foi então lavado com etanol 80%. Para evaporação do etanol residual, o *pellet* foi deixado à temperatura ambiente por aproximadamente 10 minutos e em seguida, dissolvido em 79 µL de água deionizada.

4. Digestão com enzima de restrição *Sfi*I: Aos 79 µL da solução de cDNA da reação anterior, foram adicionados 10 µL de tampão de reação para *Sfi*I 10 vezes concentrado, 10 µL da enzima *Sfi*I (20 U/µL) e 1 µL de solução de albumina sérica bovina (BSA). O tubo foi incubado a 50 °C por 2 horas e em seguida foram adicionados 2 µL de solução de xileno cianol 1%.

5. Fracionamento do cDNA utilizando a coluna *CHROMA SPIN 400*: Primeiramente, a coluna Chroma Spin 400 foi lavada com 700 µL de tampão de fracionamento (Clontech). Em seguida, foram aplicados 100 µL da solução contendo o cDNA-*Sfi* I digerido e a amostra adsorvida foi eluída com 600 µL de tampão de coluna, que foram coletados em 1 gota por tubo em um total de 16

tubos. Os cDNAs contidos nas frações foram verificados por eletroforese em gel de agarose 1,1%. A partir dessa etapa, foi feito um *pool* das quatro primeiras frações contendo os fragmentos de cDNA com tamanhos maiores que 400 pares de bases. Após esta etapa, foram adicionados ao tubo 14 µL de solução de acetato de sódio 3 M pH 4,8, 1,3 µL de solução de glicogênio 20 mg/mL e 350 µL etanol 95% (-20 °C). O cDNA foi incubado a -20 °C por 5 horas. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 12.500 x *g* por 20 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido cuidadosamente e o *pellet* foi seco por 10 minutos e dissolvido em 7 µL de água deionizada.

6. Ligação do cDNA ao vetor λTriPlex2: A ligação foi feita com 1,5 µL de solução de cDNA (~100 ng), 1 µL de vetor (500 ng/ µL), 0,5 µL de tampão de ligação 10 vezes concentrado, 0,5 µL de solução de ATP (10 mM), 0,5 µL de T4 DNA ligase (400 U/µL) e 1,0 µL de água deionizada. Os componentes da ligação foram incubados a 16 °C por 18 horas. A ligação foi misturada ao extrato de empacotamento de fagos λ (Stratagene, USA) de acordo com instruções do fabricante.

7. Empacotamento do vetor λTriPlex2: Primeiramente, foram adicionados 3 µL do produto da ligação a uma alíquota de 50 µL do extrato de empacotamento. A mistura foi então incubada a 22°C por 2 horas. Em seguida, foram adicionados 500 µL de tampão de diluição de fagos λ (Tris-HCl 35 mM pH 7,5 contendo NaCl 0,1 M, MgSO₄ · 7 H₂O 10 mM e gelatina 0,01%) e 20 µL de clorofórmio, e a mistura foi agitada brandamente. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 12.000 x *g* por 30 segundos e o sobrenadante contendo os fagos foi transferido para outro tubo estéril.

8. Titulação da biblioteca de cDNA: Uma colônia da linhagem de *Escherichia coli* XL1-Blue foi inoculada em 15 mL de meio LB (Luria Bertani) /MgSO₄/maltose e incubada a 37 °C, sob agitação a 150 x *g* por 18 horas. As células foram centrifugadas a 2.700 x *g* por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e o *pellet*

ressuspensão em 7,5 mL de MgSO_4 10 mM estéril. Os fagos empacotados (5 μL) foram incubados com 200 μL da cultura de bactéria da linhagem de *E. coli* XL1-Blue a 37 °C por 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 3 mL de meio LB/ MgSO_4 *top agar* e a mistura colocada em placas contendo meio LB/ MgSO_4 ágar (90 mm). As placas foram incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente e em seguida, incubadas a 37 °C por 18 horas.

9. Amplificação da biblioteca de cDNA: Uma colônia isolada de bactéria *E. coli* XL1-Blue foi inoculada em 15 mL de LB/ MgSO_4 contendo maltose e incubada a 37 °C, por 18 horas, sob agitação. As células foram então centrifugadas a 2.600 x *g* por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e o *pellet* ressuspensão em 7,5 mL de solução de MgSO_4 10 mM. Após esta etapa, os fagos empacotados foram incubados com 500 μL da cultura bacteriana. A mistura foi incubada a 37°C por 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 4,5 mL de meio LB/ MgSO_4 top Agar. A mistura foi então colocada em placas contendo LB/ MgSO_4 ágar (150 mm). As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos e em seguida, a 37 °C por 18 horas. Após esta etapa, foram adicionados 12 mL de tampão de diluição para fago λ (tampão Tris-HCl 35 mM pH 7,5 contendo NaCl 0,1 M; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 10 mM; gelatina 0,01%) a cada placa, as quais foram incubadas a 4 °C, por 18 horas. As placas foram então incubadas sob agitação 100 x *g* por 1 hora à temperatura ambiente. Os fagos foram coletados em um tubo de 50 mL estéril e em seguida, foi adicionado clorofórmio (proporção de 1:1). O tubo foi agitado por 2 minutos e centrifugado a 2.700 x *g* por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado em tubo estéril de 50 mL, a partir do qual foram feitas alíquotas de 1 mL. Às alíquotas foram adicionados DMSO para concentração final de 7%. Finalmente, as bibliotecas amplificadas foram tituladas como descrito anteriormente.

3.2.4 Excisão dos clones da biblioteca de cDNA

Para a excisão de clones da biblioteca de cDNA de fígado de *B. jararaca*, uma colônia isolada de bactéria da linhagem de *E. coli* BM 25.8 foi inoculada em 2 mL de meio LB sem antibiótico e incubada sob agitação a 180 rpm, a 31 °C até atingir uma OD₆₀₀ de 1,3. Após esta etapa, foi adicionado solução de cloreto de magnésio (MgCl₂ – concentração final de 10 mM) à cultura bacteriana. Em seguida, a cultura foi incubada com a biblioteca de cDNA por 30 minutos a 31 °C, e acrescida de 400 µL de meio LB com incubação adicional de 1 hora a 31 °C, sob agitação (900 rpm). Por fim, as bactérias contendo plasmídeos λTriplEx2 foram espalhadas (1-10 µL) em placas de meio LB contendo ampicilina (200 µg/mL) (Sigma-Aldrich, USA), as quais foram incubadas por 18 horas a 31 °C para a obtenção dos clones isolados contendo plasmídeos pTriplEx2 contendo os insertos de DNA.

3.2.5 Mini-preparação de DNA plasmidial

Os DNAs plasmidiais dos clones excisados foram purificados por mini-preparações de DNA plasmidial (minipreps) de acordo com a metodologia descrita por Sambrook e Russel (1989). Colônias isoladas de bactéria da linhagem de *E. coli* BM 25.8 contendo o plasmídeo pTriplEx2 foram inoculadas em placas de 96 poços (Axigen, USA) contendo 250 µL de meio LB - ampicilina 200 µg/mL em cada poço. A placa foi incubada, sob agitação (200 rpm), a 37 °C durante a noite. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação a 2.950 x *g* por 2 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 20 µL de solução 1 (tampão de suspensão: Tris-HCl 25 mM, pH 8,0 contendo glicose 50 mM, EDTA 10 mM e RNase 100 µg/mL) e homogeneizado. Em seguida, foram adicionados 50 µL da solução 2 (solução de lise: SDS 1%; NaOH 0,2 M), com homogeneização por inversão e incubação por 5 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 50 µL da solução 3 (solução de neutralização: acetato de potássio 3 M; ácido acético 5 M gelado), com incubação a 4 °C por 30 minutos. Após centrifugação a 2.950 x *g* a 4 °C por 30 minutos, o sobrenadante de cada poço foi coletado e transferido para uma nova

placa de 96 poços, Em seguida, o DNA foi precipitado com 100 µL de isopropanol por poço com centrifugação a 2.950 x g a 4 °C por 45 minutos. O sobrenadante foi descartado e em seguida o *pellet* foi lavado com 200 µL de etanol 70% e centrifugado nas mesmas condições anteriormente descritas. O sobrenadante foi novamente descartado e a placa foi então incubada por 10 minutos a 60 °C para evaporação do etanol residual e o DNA plasmidial dissolvido em 5 µL de água estéril (para cada poço).

3.2.6 Sequenciamento automático de DNA plasmidial de clones isolados da biblioteca de fígado da *B. jararaca*

Para o sequenciamento dos clones isolados foram utilizados 2 µL de *Big Dye* (Applied Biosystems, USA), 1 µL de oligonucleotídeo LD insert 5' (10 pmol/µL - 5'GAGCCCTTCGCGCGTAACACAACC - 3'), 1 µL de tampão de sequenciamento (Tris-HCl 200 mM pH 9,0 contendo MgCl₂ 5 mM), 5 µL do DNA plasmidial purificado e 1 µL de água estéril, para reação com volume final de 10 µL. O programa utilizado para a reação de sequenciamento foi: 35 ciclos x (96 °C - 10 s, 50 °C - 10 s e 60 °C - 4 min). Os produtos de reações foram então precipitados por incubação com 100 µL de etanol 80%, a 4 °C por 30 minutos, em seguida, centrifugados a 2.950 x g a 4 °C por 45 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 200 µL de etanol 70%. As placas foram então centrifugadas a 2950 x g a 4 °C por 30 minutos e o sobrenadante descartado. Esse passo foi repetido mais uma vez. Para a evaporação do etanol residual, a placa de 96 poços foi incubada a 60 °C por 10 minutos. As reações de sequenciamento foram então dissolvidas em 10 µL de *Hi Dye formamide* (Applied Biosystems, USA) e aplicadas em um sequenciador automático de DNA – ABI-Prism 3130 (Applied Biosystems, USA).

3.2.7 Análise das ESTs

Esta análise contou com a colaboração da Profa. Dra. Glória Braz do Instituto de Química Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Os cromatogramas gerados no sequenciamento dos clones da biblioteca de cDNA foram analisados utilizando programas de bioinformática de autoria do Dr. José Marcos Ribeiro (NIAID – NIH, USA). Para o processamento e análise das sequências, foi utilizado *pipeline* denominado dCAS – *Desktop Annotation System* (GUO et al., 2009), que sistematiza e otimiza uma série de programas de domínio público.

Inicialmente, as sequências de nucleotídeos foram analisadas e as mesmas foram atribuídas qualidade de base (foram aceitos trechos de sequências com 80% de qualidade, igual ou superior a 20) (com o programa Phred), (EWING et al., 1998; EWING ; GREEN, 1998). Em seguida, um programa denominado “stripper” foi utilizado para remoção total de sequências do vetor e *primers* e ainda as extremidades da sequência com baixa qualidade. Após esta etapa, as sequências menores que 100 pares de bases foram excluídas das análises. As sequências de nucleotídeos foram agrupadas em *clusters* (conjunto de sequências contíguas) com o auxílio do programa CAP3 (HUANG; MADAN, 1999). Para o agrupamento das ESTs em clusters foi utilizado o valor de 80% de identidade entre as ESTs e sobreposição de no mínimo 80 nucleotídeos. As sequências únicas (que não foram agrupadas em nenhum contig) foram receberam a denominação de *singletons*.

Os *clusters* foram então comparados com sequências depositadas em bancos de dados com o auxílio do algoritmo Blast (ALTSCHUL; GISH, 1999) e para esta análise foi considerado um valor mínimo de confiabilidade de $e\text{-value} = 10^{-5}$. Os contigs foram comparados aos seguintes bancos de dados: *Non- Redundant* (NR) que contem todas as sequências do RefSeq (*Reference sequence*), o RefSeq é um banco de dados que possui uma coleção de sequências de DNA, RNA, e proteína. *Conserved Domain Database* (CDD) (MARCHLER-BAUER et al., 2002); *Protein families* (Pfam), que possui um banco de dados com domínios proteicos mantidos pelo HMM (Howard Hughes Medical Institute) (BATEMAN et al., 2000); *Orthologous eukariotic domains* (Kog), um banco de dados usado na identificação de proteínas parálogas ou ortólogas (TATUSOV et al., 2003); *Simple modular architecture tool* (Smart), um banco de dados de famílias de domínios proteicos (SCHULTZ et al., 2000), utilizando o rpsBlast; *Mit-pla*, banco de dados mitocôndrias e plasmídeos do NCBI; *rRNA*, banco de dados de RNA ribossomal do NCBI utilizando o BlastN; *Gene Ontology* (GO) (ASHBURNER et al., 2000) utilizando

o programa Blast2GO (CONSECA et al., 2005), cujo objetivo é unificar as nomenclaturas e facilitar a classificação funcional das moléculas. Além disso, os contigs foram submetidos a um subconjunto do *Non-Redundant Database* (NR), denominado *NR-light*, usando o Blastx. Este subconjunto de dados *non-redundant* compreende proteínas de organismos: "[Tribolium" "[Apis m" "[Anopheles" "[Aedes" "[Culex" "[Ixodes" "[Amblyomma" "[Ornithod" "[Argas" "[Rhipicephalus" "[Boophilus" "[Phlebotomus" "[Lutzomyia" "[Simulium" "[Rhodnius" "[Panstrongylus" "[Triatoma" "[Dipetalogaster" "[Mus m" "[Nasonia" "[Strongylocentrotus" "[Daphnia" "[Homo sa" "[Arabidopsis" "[Escherichia" "[Pseudomonas" "[Streptococcus" "[Acyrtosiphon" "[Pediculus" "[Ciona" "[Danio" "[Caenorhabditis el" "[Drosophila mela" "[Plasmodium" "[Haemaphysalis" "[Cimex " "[Rickettsia " "[Asaia " "[Klebsiella " "[Serratia " "[Enterobacter " "[Trypanosoma " "[Leishmania " "virus]" "[Saccharomyces" "[Neurospora" "[Aplysia " "[Babesia " "[Toxoplasma" "[Nocardia " "[Rhodococcus " "[Streptomyces " "[Ceratitis " "[Hyalomma " "[Brugia" "[Branchiostoma " [Bos ta" "[Gallus g" "[Hydra " "[Oriza sa" "[Nephila " "[Titus " "[Sus sc" "[Rattus ra" "[Canis fa" "[Argiope" "[Araneus " "[Acanthoscurria " "[Agelenopsis" "[Schistosoma" "[Bombyx mor" "[Solenopsis " "[Lasius " "[Linepithema " "[Pogonomyrmex " "[Camponotus " "[Harpegnathos " "[Atta " "[Bombus " "[Phoneutria " "[Scolopendra " "[Crotalus " "[Agkistrodon " "[Bungarus " "[Bothrops" "[Anolis ".

Para a descrição funcional dos contigs, a organização dos resultados obtidos pela análise por Blast, a informação do tamanho dos contigs e a classificação funcional foram utilizados programas cedidos pelo Dr. José M. Ribeiro. O programa conhecido por *Assemble Joiner* foi utilizado para extrair as sequências codificantes (CDSs) a partir dos *contigs* eliminando as regiões 5' e 3' não traduzidas e corrigindo os “*frameshifts*” através da substituição dos códons de terminação no meio das sequências, bem como excluir os códons truncados substituindo a trinca desconhecida por X na sequência de aminoácidos. Além deste, também foi utilizado um programa denominado *Classifier* que forneceu a classificação funcional dos *contigs* com base no conjunto de resultados do Blast.

3.2.8 Análise filogenética

Para a análise filogenética dos alvos selecionados da biblioteca de cDNA do fígado de *B. jararaca* foi utilizada a ferramenta Blast disponível no site expasy, especificamente o SIB BLAST Network Service (<http://web.expasy.org/blast/>) para busca das sequências com e-value igual ou abaixo de 10^{-5} . Após a seleção das sequências foi realizado alinhamento das sequências de aminoácidos utilizando o programa *ClustalW*, disponível no site (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) e, em seguida, foi utilizado o editor de sequências *jalview* disponível em (<http://www.jalview.org/>) para ajuste dos alinhamentos. De posse das sequências selecionadas, a análise filogenética foi realizada utilizando o programa MEGA 5 (*Molecular evolutionary genetics analysis*) pelo método *neighbor - joining* (NJ). A confiabilidade das árvores NJ foi avaliada por análise *bootstrap* com o número de replicatas igual a 1000 (TAMURA et al., 2011).

3.2.9 Análise da expressão de transcritos do fígado de *B. jararaca*

O PCR quantitativo foi utilizado para quantificação da expressão de transcritos selecionados da biblioteca do fígado da *B. jararaca*, assim como para a comparação da expressão gênica entre a *B. jararaca* adulta e jovem. Todas as serpentes utilizadas foram do sexo feminino.

3.2.9.1 Extração do RNA para síntese do cDNA das serpentes e análise da expressão gênica

Para a extração do RNA total do fígado das serpentes foram utilizados tecidos armazenados em 500 µL de Trizol® a -70 °C. Após o descongelamento das amostras, estas foram maceradas utilizando homogeneizador para tubos de microcentrífuga (Sigma Aldrich, Alemanha) e em seguida foram adicionados mais 500 µL de Trizol®. As amostras foram então incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente e centrifugadas a 12.000 x g a 4 °C por 10 minutos, o sobrenadante foi transferido para um tubo de

microcentrífuga de 1,5 mL livre de RNase. Em seguida, foram adicionados 200 µL de cloróformio, a mistura foi agitada manualmente por 15 segundos e incubada a temperatura ambiente por 3 minutos. As amostras foram então centrifugadas a 12.000 x *g* a 4 °C por 15 minutos. Após a centrifugação observou-se a formação de três fases: a fase superior aquosa contendo o RNA, a qual foi transferida para outro tubo livre de RNase. Para a precipitação do RNA, foram adicionados 0,5 mL de isopropanol gelado à fase aquosa. Seguiu-se com incubação a temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugadas a 12000 x *g* a 4 °C por 10 minutos. Removeu-se o sobrenadante e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 50%. Em seguida, centrifugou-se a 7500 x *g* a 4 °C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o RNA sedimentado foi mantido por 10 minutos a temperatura ambiente para a evaporação do etanol residual. O RNA foi dissolvido em 20 µL de água livre de nucleases e incubado por a 55 °C por 10 minutos. O cDNA foi então sintetizado utilizando a transcriptase reversa *IMPROM-II*TM (Promega,USA) de acordo com as especificações do fabricante. O cDNA foi utilizado na quantificação da expressão de transcritos do fígado das serpentes por PCR tempo real.

3.2.9.2 Análise da expressão em *B. jararaca* por PCR em Tempo Real

As preparações de cDNAs de indivíduos jovens e adultos de *B. jararaca* foram utilizadas para avaliar a expressão gênica de: fator anti-hemorrágico Bj46a (Bj46a), inibidor fosfolipase gama (PLI- γ), inibidor fosfolipase alfa (PLI- α), C1 inibidor, alfa 1 anti-tripsina e surfactante pulmonar, por PCR quantitativo em tempo real. Os experimentos foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Livak e Schmittgen (2001) para o cálculo do $2^{-\Delta\Delta C_t}$ e obtenção da expressão relativa dos transcritos. Para a determinação da expressão do RNAm de cada transcrito selecionado, utilizou-se 150 nM de cada oligonucleotídeo, 6 µL de *SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, USA), 5 µg de cDNA do indivíduo jovem e adulto do fígado de *B. jararaca* e água livre de nuclease suficiente para um volume final de reação de 12 µL. O gene da β -actina foi utilizado como referência endógena. A validação dos oligonucleotídeos foi determinada utilizando curvas padrão (obtidas por quantificação absoluta). As

sequências dos oligonucleotídeos utilizados para o PCR semi-quantitativo e para o PCR quantitativo em tempo real estão mostradas no Quadro 2.

Os experimentos de PCR quantitativos em tempo real foram realizados em termocilador tipo *7500 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, USA) utilizando o seguinte programa: 95 °C por 10 minutos e 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto, seguidos de uma curva de dissociação, a qual foi utilizada para confirmar a especificidade das amplificações através da ausência de formação de dímeros de oligonucleotídeos ou qualquer outro produto inespecífico da reação.

Os dados obtidos foram analisados, utilizando-se o programa *Sequence Detection Software v.1. 2.3* (Applied Biosystems, USA). Cada reação foi realizada em triplicata.

Para a obtenção da curva padrão, foram feitas diluições seriadas da preparação de cDNAs de cada alvo, para a obtenção da curva de eficiência, ou seja valores diferentes de C_T com os quais foi construída uma curva de C_T por concentração de cDNA cópias/ μ L. As reações que apresentaram inclinação da reta “*slope*” entre 3,1 e 3,5 foram consideradas dentro do padrão de eficiência aceitável.

Para a quantificação relativa da expressão gênica, foi utilizado o método comparativo com ciclo de *threshold* (C_T) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). A fórmula utilizada foi $2^{-\Delta\Delta C_t}$, onde o $\Delta C_t = C_{t \text{ gene de interesse}} - C_{t \text{ gene de referência}}$ (onde C_t : é o número de ciclos necessários para atingir o limiar de fluorescência acima do valor de fundo – ruído) que relaciona o valor do gene de interesse comparado ao gene de referência que neste caso foi o β - actina.

Para todas as reações foram realizadas as curvas de dissociação (*melting*), que foi utilizada para confirmar a especificidade da amplificação e confirmar a ausência de formação de dímeros de *primer* ou qualquer outro produto inespecífico da reação.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism5, de acordo com Teste *t- Student* para grupos independentes e a diferença de expressão em serpentes jovens e adultas foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

Quadro 2- Sequência de oligonucleotídeos usados em PCR quantitativo em tempo real e PCR semi-quantitativo.

Alvo	Sequência
<i>β- actina forward</i>	5'-GGCCAACAGAGAGAAGATGACCC-3
<i>β- actina reverse</i>	5'-TCGGTCAAGTCACGGCCA-3'
<i>Bj46a forward</i>	5'-TCAAGAGGGCAGCACAAGAAT-3'
<i>Bj46a reverse</i>	5'-AGTCCGACTCAAACGTTCATC -3'
<i>PLI-γ forward</i>	5'-CCAGAAGATGTATGTGGCAAGG -3
<i>PLI-γ reverse</i>	5'-TTTGGTCGGGAGAGGGGC -3'
<i>PLI-α forward</i>	5'-GGGAGACCGAATAGGCTGTT-3'
<i>PLI-α reverse</i>	5'-CAAGCGGGATCAGGTGTAGGT-3'
<i>C1- forward</i>	5'-TCGCTCCAATGAACCAGTCG-3'
<i>C1-reverse</i>	5'-TGACCCGTCCCAGAAAGATTG-3'
<i>Alfa-1 antitripsina forward</i>	5'- CTTACCTCACCATTCAACAACCTTCT-3'
<i>Alfa-1 antitripsina reverse</i>	5'- TGGACCCTTGCTGCTTTGC-3'

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise da biblioteca de cDNA do fígado da *B. jararaca*

A biblioteca de cDNA obtida do fígado da *B. jararaca* apresentou um título de $4,8 \times 10^8$ pfu/mL (biblioteca amplificada). Foram sequenciados 1778 clones e, após análise e atribuição de qualidade de bases e etapas de processamento, restaram 853 sequências (ESTs) de alta qualidade. As ESTs foram então submetidas ao programa CAP3 gerando 260 *clusters*, dos quais 199 (76,58%) foram formados por sequências únicas denominadas *singletons* e 61 *contigs* (23,46%) com duas ou mais ESTs (Tabela 1 e Apêndice A1).

Tabela 1- Análise do sequenciamento da biblioteca de cDNA

Sequenciamento	Número sequências
ESTs obtidas	1778
ESTs com alta qualidade	853
<i>Contigs</i>	61
<i>Singletons</i>	199
<i>Singletons+ Contigs</i>	260
Média do tamanho das ESTs formando os <i>contigs</i>	507 pb

O tamanho médio dos *clusters* foi de 507 pb, sendo o menor formado por 100 pb e o maior por 1319 pb (Figura 9).

Figura 9- Distribuição do tamanho dos *clusters* encontrados na biblioteca de cDNA de fígado da *B. jararaca*.

As sequências foram submetidas a vários bancos de dados utilizando os diferentes algoritmos do *Blast* (Tabela 2). Após análise no banco não redundante (NR), a distribuição dos *clusters* foi: 43% (113 clusters) apresentaram *hits* com proteínas descritas, 26,5% foram transcritos que codificam para proteínas de função desconhecida e 30,5 % não tiveram similaridade. É possível que o número reduzido de transcritos com similaridade no banco de dados NR seja um reflexo do baixo número de sequências ofídicas disponíveis e pelo fato de não haver um genoma completo de serpentes (CASTOE et al., 2011).

Tabela 2- Análise da comparação das ESTs de *B. jararaca* com os diferentes bancos de dados.

Banco de dados		Número de clusters com hit	Número de clusters sem hit	Desconhecidas
Blastx	NR	113	78	69
	SWISSP	95	113	53
Blastn	Miti-pla	21	---	239
Rpsblast	CDD	88	45	127
	Pfam	84	54	122
	Kog	66	38	156
	Smart	34	76	150
	Prk	14	94	152

Entre os 260 *clusters* foi observado um *contig* (*BJ-Liver_asb-744*), formado por 416 ESTs, cuja sequência de aminoácidos predita não apresenta similaridade com nenhuma proteína presente nos diferentes bancos de dados. Quando este *contig* foi submetido ao banco Miti-pla, foi observada similaridade a um transcrito ribossomal 16S da serpente *Sistrurus catenatus edwardsi* (Figura 10). O segundo maior *contig* (*BJ-Liver_asb-757*), formado por 30 ESTs, apresentou similaridade para albumina sérica, uma das proteínas mais abundantes do soro sanguíneo, a qual é sintetizada pelo fígado (Figura 10).

Figura 10- Sequências de nucleotídeos e de aminoácidos traduzida dos *clusters* com maior frequência na biblioteca de cDNA do fígado de *B. jararaca*.

Cluster *BJ-Liver_asb-744*

```

1      CATGGTTTAGCAAGTAATGCAAGACAAGAAGAATCACAGTCTTCCCCCCCCGAAACCGAAT
1      H  G  L  A  S  N  A  R  Q  E  E  S  Q  S  S  P  P  K  P  N

61     GAGCTATTTTCAAGCAGTCTAACGGACGCACCTTCTGTGTAGCAAAACAGTGGAAGAC
21     E  L  F  S  S  S  L  T  D  A  P  F  C  V  A  K  Q  W  K  D

121    TTAAAAATAGAGGTGAAACGCCTATCGAATTCGGAGATAGCTGGCTACCCCAAACAGAAT
41     L  K  I  E  V  K  R  L  S  N  S  E  I  A  G  Y  P  K  Q  N

181    CTAAGTTCTACTTTAGAAATAGCCCATTAACCAATTAATATCTAAAGATAGTCAATAGAGG

```

61 L S S T L E * P I N Q L I S K D S Q * R
 241 TACAGCTCTACTGACCCAGGACACAACCTGAATTTGTAAGGAAACCATCCGCCTTTAACCC
 81 Y S S T D P G H N L N L * G N H P P L T
 301 CGTAGGCCCTCAAGCAGCCACCCAAAAAATATCGTCAAAGAATTAACCTAAATAATCCC
 101 R R P S S S H P K K Y R Q R I N L N N P
 361 AACACTAGATAAACTTCAAATTAACCTAAAGGTAAATCTACAAAAGTAGATACTATTATG
 121 N T R * N F K L T K G K S T K V D T I M
 421 CTAAAACTAATAATAAGACACCCTCTCTCCACGCACCCCTCCACTAGAAACAGAAAAACT
 141 L K L I I R H P L S T H P S T R N R K T
 481 ACTAGTAATTAACAGACCACAAAAGGCAAACAATCAACCCATGTACACCTTTAAACCCAC
 161 T S N * Q T T K G K Q S T H V H L * T H
 541 TGTAACACCAACACAGGGGCGTAAAAAGAAAGATTGACTGTTATAAAAGGAACCTCGGCA
 181 C N T N T G A * K R K I D C Y K R N S A
 601 ACCCCGGGCTTCAACTGTTTAAACAAAAACATAACCTTCAGCCACCCAAAAAATATCGTC
 201 T P G F N C L T K T * P S A T Q K N I V
 661 AAAGAATTAACCTAAATAATCCCAACACTAGATAAACTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
 221 K E L T * I I P T L D K T S K K K K K K
 721 AAAAAAAAAA
 241 K K K

Cluster *BJ-Liver_asb-757*

1 CTTTCTACTATGGAAAATGATGCAAGGTCTCCTGATCTGCCCCCAGCATCTGGAGAAATC
 1 L S T M E N D A R S P D L P P A S G E I
 61 TTAAAGGAGACAGAAGCATGTAAATTGTATGCTGAACATGGAGATGGACACAAGGAAAGC
 21 L K E T E A C K L Y A E H G D G H K E S
 121 TTCCTCTTTATTTTAAACAAGAAATCATCCTGAACTTCCTAAACTGCTTGATGTAGAAATT
 41 F L F I L T R N H P E L P K L L D V E I
 181 TTTAATAAATATAAAGTATTGCTGGAAAAATGCTGCAAATTAGAAGACCACGTACAGTGT
 61 F N K Y K V L L E K C C K L E D H V Q C
 241 TTGCATACAGGGGAAGAACAACCTTAAATTATATATTACTAAGATTACAGATGTTGTGAAG
 81 L H T G E E Q L K L Y I T K I T D V V K
 301 AATAATTGTGATAATTATAAAGAAATAGGAGGGTACTTCTTCCAAAATGTATATTTGATC
 101 N N C D N Y K E I G G Y F F Q N V Y L I
 361 AAGTATAGCAAAATTATACCACAGGCTCCAACCTTCAAATCTAATCGAGTTCACCAAAAAG
 121 K Y S K I I P Q A P T S N L I E F T K K
 421 GTGGCAAAGTTTGCTGATAAATGCTGTCAATTTAGATAGTAATCACCAAGTCTCATGTGCT
 141 V A K F A D K C C H L D S N H Q V S C A
 481 TTAGAAAATATGGATAAAATGATATCATCTGTATGTAAATATCACGGAGAACATTTTCATA

```

161      L E N M D K M I S S V C K Y H G E H F I
541      AACAAACAACCTTTGCCATTGCTGTGATTCCTCCTTTATCAGTCGTTGGGAGTGTATCAGT
181      N K Q L C H C C D S S F I S R W E C I S

601      AACTTAGGACCAGATCCATCACATGTCCCTCCTCCATTCAAACCTAAAGCACTGGATGCT
201      N L G P D P S H V P P P F K P K A L D A

661      CCTGAAAATTTGTGCTCACCCAATGAAGAGACTGTGCAGGAAAGTAAACAAGGTTTGCTT
221      P E N L C S P N E E T V Q E S K Q G L L

721      AGCGACTTGATGAAATCCAAACCTAATATGTCAGATGAATCACTTGCTTCTGCAATTGAA
241      S D L M K S K P N M S D E S L A S A I E

781      GCTTTCCGTAACCTCCAGACAGATTGCTGTGCAGCTGAAAACAAAAAGGAATGCTTTGAC
261      A F R N L Q T D C C A A E N K K E C F D

841      ACAAAGGGTCAAAAACCTGGTTGAAGACATCCAAAATGATCATATAATCCAGTAATTTTCT
281      T K G Q K L V E D I Q N D H I I Q * F S

901      AAGCTTCCACAATGGAAGAATGCTGGAGATAAAGAATCCAGACGTTCCCAAACATCCTTG
301      K L P Q W K N A G D K E S R R S Q T S L

961      GTTGCTGCTTTTCATATCAACCTTCTAATGCCAAGAACAACGAATTCTGGTGTAATAAATTA
321      V A A F I S T F * C Q E Q R I L V * K L

1021     CTTCTTATGAAGTAATCTTTAAAA
341      L L M K * S L K

```

Região sublinhada representa sequência 16S (Cluster *BJ-Liver_asb-744*) e de albumina (Cluster *BJ-Liver_asb- 757*).

Outros genes constitutivos, tais como os relacionados ao citoesqueleto e à síntese de proteínas, também foram detectados. Estes constituem a maioria dos transcritos no fígado de *B. jararaca*, assim como no transcriptoma de fígado humano (YAMASHITA et al., 2000).

Os *clusters* obtidos a partir das ESTs do fígado de *B. jararaca* foram distribuídos de acordo com a classificação taxonômica. Observou-se que o maior percentual dos *clusters* foi relacionado ao réptil *Anolis lizard* (*Anolis carolinensis*) (16,5%). Este resultado foi semelhante ao encontrado com análise dos transcritos do fígado da *Burmese Python* (*Python molurus bivittatus*) (CASTOE et al., 2011), provavelmente devido a disponibilidade do genoma deste réptil (ALFÖLDI et al., 2011). Em seguida, outra classe abundante de *clusters* foi relacionada às sequências de *B. jararaca* e outras serpentes, representando 7,7 % dos *clusters*.

Embora alguns transcriptomas de glândulas de veneno de serpentes, incluindo *B. jararaca*, estejam disponíveis (CARDOSO et al., 2010; CIDADE et al., 2006; LEÃO; HO; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, 2009; RODRIGUES et al., 2012), há apenas duas fontes relevantes de sequências de nucleotídeos para o estudo dos transcritos em fígado de serpentes, o transcriptoma da *Thamnophis sirtalis* e da *Python molurus bivittatus* (SCHWARTZ et al., 2010; CASTOE et al., 2011), as quais são espécies não peçonhentas. No entanto, até o momento não existem bancos de dados de fígado de serpente peçonhenta, de forma a aumentar a relevância deste estudo na compreensão da fisiologia destes animais. Além disso, a *B. jararaca* representa um importante modelo para estudos, uma vez que esta é uma das serpentes peçonhentas mais abundantes, além de ser responsável por alto índice de acidentes ofídicos no Brasil (ZELANIS et al., 2012).

Os *clusters* foram também classificados de acordo com a sua função predita (Tabela 5). A partir desta análise foi possível observar que a maior parte dos transcritos (161 clusters) foi relacionada à função desconhecida, de forma que estes transcritos podem representar novas moléculas do fígado de *B. jararaca*.

O segundo maior *cluster* encontrado está relacionado à maquinaria da síntese proteica (15 contigs), seguido do grupo relacionado ao metabolismo energético (9 contigs). Além disso, destacam-se dois grupos, um relacionado ao metabolismo de lipídeos, que contém 3 contigs, transcritos que codificam para inibidores de fosfolipase A₂, e outro de inibidores de proteinases secretados, que é composto por inibidores de serinoproteases e metaloproteases (Tabela 3).

Tabela 3- Classificação funcional dos *clusters* obtidos a partir do sequenciamento da biblioteca de cDNA de fígado de *B. jararaca*.

Classificação	Número de <i>clusters</i>	Número de ESTs	EST's / <i>clusters</i>
Fator de Transcrição	2	14	7,00
Maquinaria da síntese proteica	15	16	1,00
Maquinaria da modificação de proteínas	4	4	1,00
Transporte /armazenamento	4	7	1,75
Metabolismo oxidante/ detoxificação	2	2	1,00
Metabolismo de carboidratos	5	10	2,00
Metabolismo de nucleotídeos	3	3	1,00
Metabolismo de aminoácidos	2	3	1,50
Metabolismo de lipídeos	6	51	8,50
Metabolismo intermediário	1	1	1,00
Transdução de sinal	4	4	1,00
Matriz extracelular/ Adesão celular	6	7	1,11
Citoesqueleto	4	5	1,25
Elemento transponível	1	2	2,00
Metabolismo energético	9	18	2,00
Desconhecida	161	655	4,07
Desconhecida, conservada	15	26	1,70
Imunidade	2	2	1,00
Viral	2	3	1,50
Inibidor de proteinases secretadas	7	13	2,00
Armazenamento	1	3	3,00
Transdução de sinal, Apoptose	4	4	1,00
Total	260	853	

Dentre o grupo de transcritos que codifica para proteínas secretadas foram observados inibidores de proteases, fatores do complemento e da coagulação sanguínea (Tabela 4). De uma forma geral, os transcritos codificando proteínas em *B. jararaca* que representam as características da função hepática, como encontrado por Yamashita et al. (2000) para o transcriptoma do fígado humano, demonstrando a complexidade deste órgão e o seu papel multifuncional (YU et al., 2010).

Tabela 4- Descrição dos *contigs* relacionados aos inibidores de proteases, fatores da coagulação e do complemento.

Descrição do <i>contig</i>	<i>contig</i>
Inibidor Inter-alfa tripsina	BJ-Liver_asb-306
Inibidor Inter-alfa tripsina	BJ-Liver_asb-380
alfa-2-macroglobulina-símile	BJ-Liver_asb-52
Similar ao cofator de heparina II	BJ-Liver_asb-89
Plasma protease C1 inibidor-símile	BJ-Liver_asb-132
Angiotensinogênio	BJ-Liver_asb-576
Inibidor de Proteína Z-dependente	BJ-Liver_asb-631
Proteína de ligação do ácido hialurônico 2	Bj-Liver_asb-167
Fator anti-hemorrágico BJ46a	BJ-Liver_asb-739
Plasminogênio	BJ-Liver_asb-187
Proteína de ligação C4b-cadeia α	BJ-Liver_asb-626
Fator do complemento C9	BJ-Liver_asb-214
β -fibrinogênio	BJ-Liver_asb-387
β - fibrinogênio	BJ-Liver_asb-201

A análise do *Gene Ontology* (Figura 11) revelou um grande número de transcritos relacionados às proteínas de ligação, seguido de atividade catalítica e atividade regulatória de enzimas (Figura 11A). Este resultado corrobora Castoe et al. (2011), exceto pela atividade regulatória de enzimas, que representa 14% dos transcritos no fígado da *B. jararaca*, enquanto no fígado da *Python molurus bivittatus*, representa 2,1%.

De acordo com a anotação dos transcritos quanto ao componente celular, foram obtidos transcritos relacionados à parte celular (82%), restrito à membrana de organela (46%) e parte da região extracelular (37%) (Figura 11 B). Estes resultados diferem dos encontrados no transcriptoma da *Python molurus bivittatus*, que possui somente 0,8% dos transcritos relacionados à região extracelular e 28% das sequências relacionadas à função intracelular (CASTOE et al., 2011).

A maior parte das ESTs foi agrupada na categoria de processo biológico (Figura 11C), incluindo os grupos de metabolismo e processo celular, corroborando os resultados obtidos para a espécie de serpente não peçonhenta *Python molurus bivittatus* (CASTOE et al., 2011).

Figura 11- Classificação das ESTs utilizando as categorias do *Gene Ontology*.

A) Função molecular. B) Componente celular. C) Processo biológico.

A partir da análise das ESTs da biblioteca de cDNA do fígado foram selecionados transcritos para análise da expressão gênica por PCR em tempo real. Estas moléculas foram escolhidas em função da composição do veneno da *B. jararaca*, que é rico em enzimas como: metaloproteinases, serinoproteases e fosfolipase A_2 . Assim, os transcritos selecionados para a análise da expressão gênica em fígado foram os que apresentam similaridade com inibidores dessas enzimas.

4.2 BJ46a, fator anti-hemorrágico

Os transcritos que codificam para inibidores de metaloproteases foram os mais abundantes na biblioteca de fígado de *B. jararaca*, dentre eles, o fator anti-hemorrágico BJ46a, o qual é um potente inibidor de metaloproteases e tem atividade inibitória contra o veneno (VALENTE et al., 2001). Na biblioteca foi encontrado um *contig* formado por 4 ESTs codificadoras para BJ46a.

O alinhamento de parte da sequência de BJ46a (BJ-Liver_asb-739) obtida neste transcriptoma com outras sequências similares à esta proteína está demonstrado na Figura 12-A. Os aminoácidos conservados entre elas estão marcados em preto confirmando assim a semelhança desta sequência com proteínas de outras espécies de serpentes (VALENTE et al., 2001), apresentando regiões altamente conservadas. Além disto, ficaram evidenciadas as diferenças entre as espécies mais distantes como: *Anolis carolinensis* (largato) e *Gallus gallus* (ave). A similaridade entre as sequências também pode ser verificado na árvore filogenética, mostrando a proximidade evolutiva entre as serpentes e uma maior divergência evolucionária entre as outras espécies (Figura 12-B).

Figura 12- Análise da sequência de aminoácidos de Bj46a (BJ-Liver_asb-739).

(A) Múltiplo alinhamento do BJ46a com proteínas de outras espécies de animais. Regiões conservadas estão marcadas em preto, regiões com resíduos de aminoácidos semelhantes estão marcados em cinza. (B) Árvore de distância utilizando *Neighbor-joining*. Valor da porcentagem do *bootstrap* indicados nos nodos são baseados em replicatas de 1000. Bj46a obtido da biblioteca de cDNA do fígado de *B. jararaca* (BJ-Liver_asb-739) *G. breviceaudus* (*Gloydus breviceaudus siniticus* - Q5KQS2); *P. favoviridis* (*Probothrops flavoviridis* - P29695); *G. Blomhoffii* (*Gloydus blomhoffii* - Q5KQS1); *A. carolinensis* (*Anolis carolinensis* - H9GD70); *G. gallus* (*Gallus gallus* - E1BZE1).

A diferença de expressão do transcrito que codifica para o BJ46a entre os indivíduos jovens e adultos de *B. jararaca* não foi estatisticamente significativa (Figura 13). Este resultado pode estar relacionado ao fato de que o número de transcritos codificando para metaloproteases seja elevado em várias fases da vida desta serpente (CIDADE et al., 2006; ZELANIS et al., 2012).

A função desse inibidor ainda não foi totalmente compreendida e pouco se sabe sobre o mecanismo do BJ46a na inibição de metaloproteases. Alguns possíveis papéis desta proteína na adesão e migração celular, assim como na apoptose, no processo inflamatório e na doença de Alzheimer já foram sugeridos (YAMAMOTO et al., 1999). No entanto, sabe-se que ela desempenha um papel na inibição da atividade proteolítica das metaloproteases e conseqüentemente no controle da hemorragia (OMORI-SATOH, 1977; TANIZAKI et al., 1991; WEISSENBERG et al., 1992). A elucidação da função

fisiológica deste fator, bem como a identificação dos seus alvos presentes no veneno, são necessárias, uma vez que este inibidor possivelmente desempenhe um papel na proteção da serpente contra o seu próprio veneno.

Figura 13- Comparação da expressão gênica de BJ46a em indivíduos adultos e jovens por PCR tempo real.

Fêmeas adultas e jovens de *B. jararaca* foram utilizadas para análise. Todos os dados foram normalizados com β -actina, representando a média ($n = 3$) de triplicatas $\pm$ desvio padrão. Teste t para grupos independentes foi utilizado para análise estatística. ns: sem variação estatística.

4.3 Inibidor de fosfolipase A₂ (PLI)

Na biblioteca de cDNA de fígado de *B. jararaca* foram encontrados 2 *contigs* relacionados a inibidores de gama fosfolipase A₂ (PLI- γ) (cluster- BJ-Liver_asb-686 e cluster- BJ-Liver_asb-132), de 12 e 3 ESTs, respectivamente. Além disso, também foi observado um *singleton* composto pelo transcrito de alfa fosfolipase A₂ (PLI- α) (cluster- BJ-Liver_asb-486).

O múltiplo alinhamento e a árvore filogenética do PLI- γ , com os melhores *hits* de sequências selecionadas após análise utilizando o BlastX, demonstram a proximidade evolucionária desta proteína. Novamente, a semelhança entre as sequências das espécies de serpentes e a obtida neste transcriptoma é bastante evidente, havendo a substituição de apenas alguns aminoácidos entre elas. Cabe notar ainda que foi

observada uma maior diferença entre as sequências de aminoácidos de PLI- γ de *B. jararaca* com as espécies de *A. carolinensis* e do *B. taurus* (Figura 14A).

Alguns estudos sobre a evolução das PLA2 em serpentes verificaram que as regiões proteicas codificadoras possuem maior taxa mutacional do que as regiões não codificadoras, e que as substituições ocorrem nas regiões maduras da proteína, resultando assim em proteínas com atividades fisiológicas diversas (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2009; CHIJIWA et al., 2003, 2005; KINI; CHAN, 1999; NAKASHIMA et al., 1993, 1995; OGAWA et al., 1996).

Não há dados na literatura sobre as diferenças entre os PLIs de diferentes espécies animais. De acordo com a árvore filogenética notam-se também certa homogeneidade entre as PLIs, de forma que são observados dois ramos, sendo o primeiro formado pelas serpentes e um segundo por *Anolis carolinensis* e *Gallus gallus* (Figura 14 A e B).

Figura 14 - Análise das sequências de aminoácidos de PLI- γ de diferentes espécies de animais (cluster-BJ-Liver_asb-686).

A

<i>B.neuwiedi</i>	---MKSLHTICLLFIFV-----ARGNSRSCDLCHNIGKDCDGYEQECSSPEDVCGKVFLEIS54
<i>B.erythromelas</i>	---MKSLHTICLLFIFV-----ARGNSRSCDLCHNIGEDCDGYEQECSSPEDVCGKVFLEIS54
<i>B.jararacussu</i>	---MKSLHTICLLFIFV-----ARGNSRSCDFCHNIGKDCDGYEQECSSPEDVCGKVFLEIS54
<i>B.alternatus</i>	---MKSLHTICLLFIFV-----ARGNSRSCDFCHNVGKDCDGYEQECSSPEDVCGKVFLEIS54
<i>L.muta</i>	---MKSLHTICLLFIFV-----ARGNSRSCDFCHNIGKDCDGYEQECSSPEDVCGKVFLEIS54
<i>B.mojoeni</i>	---MKSLHTICLLFIFV-----ARGNSRSCDFCHNIGKDCDGYEQECSSPEDVCGKVFLEIS54
<i>P.elegans</i>	---MKSLHTICLLFIFV-----ARGNSRSCDFCHNIGADCEGFQHECSPEDVCGKVFLEIS54
<i>B.jararaca</i>	---MKSLHTICLLFIFI-----ARGNSRSCDFCHNIGKDCDGYEQECSSPEDVCGKVFLEIS54
<i>G.gallus</i>	---MKLFLGFSFLTLFL-----DSATMLQCEVCHSIGRSCSGHLETCSGNADTCGIIILHEVT54
<i>A.carolinensis</i>	---FLFLGAS-----LECEECMALGRNCHGNKICTCTPEKDSGIIISMDTM42
<i>B.taurus</i>	MKPETLLATTLLCTLLGLEPRSVIAGYPLSCEVCVGDGPNCRGKLQTCAPDEDSCTVVVTETN64
<i>B.neuwiedi</i>	SASLSVRTVHKNCFSSSI CKLGQIDVNI GHQSYIRGRINCCEKEPCEDQP-----FPGLPLSR112
<i>B.erythromelas</i>	SASLSVRTVHKNCFSSSI CKLGQIDVNI GHQSYIRGRINCCEKEPCEDQP-----FPGLPLSR112
<i>B.jararacussu</i>	SASLSVRTVHKNCFSSSI CKLGQIDVNI GHHSYIRGRINCCEKEPCEDQP-----FPGLPLSR112
<i>B.alternatus</i>	SASLSVRTVHKNCFSSSI CKLGQIDVNI GHHSYIRGRINCCEKEPCEDQP-----FPGLPLSR112
<i>L.muta</i>	SASLSVRTVHKNCFSSSI CKLGQIDVNI GHHSYIRGRVNCCEKEPCEDQP-----FPGLPLSR112
<i>B.mojoeni</i>	SASLSVRTVHKNCFSSSI CKLGQIDVNI GHHSYIRGGINCCEKEPCEDQP-----FPGLPLSR112
<i>P.elegans</i>	SASLSFRTVHKNCFSSSLCKLRHFDVNI GHDSYIRGRINCCEKEPCEDQS-----FPGLPLSQ112
<i>B.jararaca</i>	SASLSVRTVHKNCFSSSI CKLGQIDVNI GHHSYIRGRINCCEKEPCEDQP-----FPGLPLSR112
<i>G.gallus</i>	IGGMAIPSSIKTCVPSTVCQMGPTVMNYGKV-KARSHLACCVGDACRTAS-----VSLPPEN110
<i>A.carolinensis</i>	AFPNRQTGVMTCTIQSKLCTLGISSLNMGKAGISRTDTMCCTGDDCKKSPPPCKLTFTYIVPPRN106
<i>B.taurus</i>	RKASLAVTSYKGCSSNCESGLFGFTVNHENYMGSKRRCCQKDGCCNQDP-----LPFAVRN121
<i>B.neuwiedi</i>	-PNGYYCPGALGLFSEDSTEYEA-ICHGTETKCIDIVGHRHENFFSAVPEDFTYNLKGCVSSC173
<i>B.erythromelas</i>	-PNGYYCPGALGLFTEDSTEYEA-ICHGTETKCIDIVGHRHENFFSAVPEDFTYNLKGCVSSC173
<i>B.jararacussu</i>	-PNGYYCPGALGLFTEDSTEYEA-ICHGTETKCIDIVGHRHENFFSAVPEDFTYNLKGCVSSC169
<i>B.alternatus</i>	-PNGYYCPGALGLFTEDSTEYEA-ICHGTETKCIDIVGHRHENFFSAVPEDFTYNLKGCVSSC169
<i>L.muta</i>	-PNGYYCPGALGLFTEDSTEYEA-ICHGTETKCIDIVGHRHENFFSAVPEDFTYNLKGCVSSC169
<i>B.mojoeni</i>	-PNGYYCPGALGLFTEDSTEYEA-ICHGTETKCIDIVGHRHENFFSAVPEDFTYNLKGCVSSC169
<i>P.elegans</i>	-PNGYYCPGSLGLFTKDSTEFEA-ICKGTETKCIDIVGHRHENFFSAVPEDFTYNLKGCVSSC169
<i>B.jararaca</i>	-PNGYYCPGALGLFTEDSTEYEA-ICATHEENRNRYLQKVECKDA---FKDAYNLKGCVSSC169
<i>G.gallus</i>	NVPNGFQCPACYSVDSFQCHNETV-NCTGSENQCVDLAGLMNTGG---LTVKAAMKGCTTISEC170
<i>A.carolinensis</i>	TTLNGVSCPACHALES-ECKEEII-KCTGNENRCFELSG-----143
<i>B.taurus</i>	HTENGLRCPSCITAFETETCTATAEALCVGEETHCVAMSGLMRPAG----DKFAVQGCCTKTAC180
<i>B.neuwiedi</i>	PLLSLSNATREENRNYLEKVECKDAIRLASL-----204
<i>B.erythromelas</i>	PLLSLSNATREENRNYLEKVECKDAIRLASL-----204
<i>B.jararacussu</i>	PLLSLSNANREANRNYLEKVECKDAIRLASL-----200
<i>B.alternatus</i>	PLLSLSNANREANRNYLEKVECKDAIRLASL-----200
<i>L.muta</i>	PLLSLSNATREENRNYLQKVECKDAIRLASL-----200
<i>B.mojoeni</i>	PLLSLSNATHEQNRYLEKVECKDAIRLASL-----200
<i>P.elegans</i>	PLLSLSNATHEENRNYLEKVECKDAIQVEKQ-----200
<i>B.jararaca</i>	PLLSLSNHGTETKCIDIVGHRHEHFPGLTSL-----200
<i>G.gallus</i>	SVAGDGKNNLGVMIDIKIKRYQCHPPTTLEMLSSGLVSPQSLFFPALSGFLEKLLF-----226
<i>A.carolinensis</i>	-----203
<i>B.taurus</i>	HSKPGTLVPSGARLFTIKKTSCL-----203

(A) Múltiplo alinhamento da PLI- γ . Regiões conservadas estão marcadas em preto, regiões com resíduos de aminoácidos semelhantes estão marcadas em cinza. (B) Árvore da distância entre as espécies utilizando *Neighbor-joining*. Os valores das porcentagens do *bootstrap* indicados nos nodos são baseados em replicatas de 1000. *B. neuwiedi* (*Bothrops neuwiedi* - A8I4N8); *B. erythromelas* (*Bothrops erythromelas* - A8I4K9); *B. jararacussu* (*Bothrops jararacussu* - A8I4M3); *B. alternatus* (*Bothrops alternatus* - A8I4K5); *L. muta* (*Lachesis muta muta* - P60592); *B. moojeni* (*Bothrops moojeni* - A8I4N1); *P. elegans* (*Protobothrops elegans* - D9N4B5); *B. jararaca* sequência obtida da biblioteca de cDNA de *B. jararaca* representando o PLI- γ (BJ-Liver_asb-686); *G. gallus* (*Gallus gallus* - E1C001); *A. carolinenses* (*Anolis carolinensis* - H9G8Z2); *B. taurus* (*Bos taurus* - E1BFZ1).

Quanto ao alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos de PLI- α , nota-se uma maior diferença desta sequência quando comparada com as sequências das outras serpentes (Figura 15A). Estas diferenças também foram observadas na árvore filogenética, que formou ramos diferentes entre as espécies, mantendo no mesmo ramo apenas as sequências das serpentes do gênero *Bothrops*, exceto por *B. jararaca*, que foi colocada em um ramo à parte (Figura 15B).

Figura 15 - Análise da sequência de aminoácidos de PLI- α de diferentes espécies de animais (cluster-BJ-Liver_asb-486).

A

B

(A) Múltiplo alinhamento da PLI- α . Regiões conservadas estão marcadas em preto, regiões com resíduos de aminoácidos semelhantes estão marcados em cinza. (B) Árvore da distância entre as espécies utilizando *Neighbor-joining*. Os valores das porcentagens do *bootstrap* indicados nos nodos são baseados em replicatas de 1000. *B. neuwiedi* (*Bothrops neuwiedi* - B1A4Q2); *B. jararacussu* (*Bothrops jararacussu* - B1A4P2); *B. moojeni* (*Bothrops moojeni* - B1A4P); *B. erythromelas* (*Bothrops erythromelas* - B1A4N2PE); *L. muta* (*Lachesis muta muta* - B1A4R0PE); *A. nummifer* (*Atropoides nummifer* - A1XRN2PE); *G. brevicadus* (*Gloydus brevicadus siniticus* - Q9PVT6); *C. durissus* (*Crotalus durissus terrificus* - B1A4Q6PE). *B. jararaca* representa a sequência obtida no transcriptoma do fígado de *B. Jararaca* (BJ-Liver_asb-486).

Quanto à expressão gênica dos transcritos que codificam para PLI- γ (Figura 16) e PLI- α (Figura 17) em serpentes jovens e adultas de *B. jararaca*, foi observado expressão de aproximadamente 30 vezes maior no indivíduo adulto em relação à serpente jovem para ambos os transcritos, estes resultados mostraram diferença de expressão estatisticamente significativa.

O PLI- γ , na circulação das serpentes é um mecanismo preventivo contra o envenenamento acidental através da inibição de fosfolipases, caso ocorra extravasamento do veneno das glândulas de veneno, o PLI- α também inibe e neutraliza as PLA2s ácidas e atua como uma proteína protetora contra o próprio veneno da serpente (KINKAWA et al., 2010).

Antunes et al. (2010) observaram uma maior atividade de PLA₂ no veneno de *B. jararaca* recém-nascidas quando comparada ao animal adulto. Corroborando estes dados, Zelanis et al. (2012) demonstraram que indivíduos jovens apresentam 12,9% de PLA2, enquanto a serpente adulta possui 3,6% em glândulas de *B. jararaca* na glândula de veneno. No entanto, Kinkawa et al. (2010) verificaram que a quantidade de PLA2 não influencia a expressão de PLIs no fígado em *Gloydius brevicaudus siniticus* (*G. brevicaudus*). Desta forma, a expressão de PLI- γ o PLI- α parece ser induzida por outros fatores, uma vez que ambos os transcritos apresentaram uma expressão maior em indivíduos adultos e uma menor expressão nos indivíduos jovens.

Figura 16- Comparação da expressão gênica de γ -PLI em indivíduos jovens e adultos por PCR tempo real.

Fêmeas adultas e jovens de *B. jararaca* foram utilizadas. Todos os dados foram normalizados com β -actina, representando a média ($n = 3$) de triplicatas $\pm$ desvio padrão. O teste *t-Student* foi utilizado para análise estatística de grupos independentes, ** diferenças significativas $p < 0,01$.

Figura 17- Comparação da expressão gênica de α -PLI em indivíduos jovens e adultos por PCR tempo real.

Fêmeas adultas e jovens de *B. jararaca* foram utilizadas. Todos os dados foram normalizados com β -actina, representando a média ($n = 3$) de triplicatas $\pm$ desvio padrão. O teste *t-Student* foi utilizado para análise estatística de grupos independentes, * diferenças significativas $p < 0,05$.

4.4 Inibidores de serinoproteases

Inibidores de serinoproteases são amplamente distribuídos entre animais, plantas e microorganismos (Bode; Huber, 1992). Alguns dos transcritos destes inibidores identificados neste transcriptoma foram selecionados para análise da expressão gênica, uma vez que inúmeros componentes presentes no veneno de serpentes já foram caracterizados como serinoproteases e interferem na hemostasia (KANG et al., 2011; POTEMPA; KORZUS; TRAVIS, 1994).

A atividade das serinoproteases é controlada por uma série de inibidores de proteases da família das serpinas (BODE; HUBER, 1992; CHENG et al., 2012; HUBER; CARREL, 1989). Dentre eles destacam-se dois transcritos, um similar à α -1-antitripsina e outro ao inibidor de C1 (cluster-BJ-Liver_asb-306 e cluster-BJ-Liver_asb-132).

O inibidor α -1-antitripsina está envolvido numa série de processos proteolíticos, seu papel primário é a inibição da elastase de neutrófilos (HUBER; CARRELL, 1989; JOHNSON; TRAVIS, 1978; MAST et al., 1991; PERLMUTTER et al., 1990; TRAVIS; SALVESEN, 1983). Foi encontrado um fragmento do inibidor α -1-antitripsina, cujo alinhamento com as sequências de outras espécies apresentou poucas substituições de aminoácidos entre as sequências (Figura 18A). Apesar de uma ampla região conservada, pode-se observar na árvore filogenética dois ramos, no qual a α -1-antitripsina obtida forma um ramo com o *A. carolinensis* (Figura 18 B). Por outro lado, a sequência de *G. gallus*, considerado um organismo próximo às serpentes, foi agrupada em outro ramo, podendo relacionar a divergência evolutiva entre essas espécies.

Estudos filogenéticos de α -1-antitripsina já foram realizados em diferentes espécies (BARBOUR et al., 2002; CATANESE; KRESS, 1993; GOODWIN, BAUMANN; BERGER, 1996), nos quais foram encontradas diferentes isoformas dessa molécula, mostrando alta diversidade entre as sequências de aminoácidos. Estudos complementares para verificar a função da α -1-antitripsina expressa em *B. jararaca* devem ser realizados para melhor entendimento do papel deste inibidor nas serpentes.

(A) Múltiplo alinhamento da α -1-antitripsina. Regiões conservadas estão marcadas em preto, regiões com resíduos de aminoácidos semelhantes estão marcadas em cinza. (B) Árvore de distância entre as espécies utilizando *Neighbor-joining*. Os valores das porcentagens do *bootstrap* indicados nos nodos são baseados em replicatas de 1000. *H. sapiens* (*Homo sapiens* - Q06033); *C. jacchus* (*Callithrix jacchus* - F7AJD3); *L. africana* (*Loxodonta africana* - G3TSA4); *M. domestica* (*Monodelphis domestica* - F7BA55); *S. harrisii* (*Sarcophilus harrisii* - G3VM17); *G. gallus* (*Gallus gallus* - F1NIE3); *B. jararaca*: α -1-antitripsina obtida do transcriptoma do fígado de *B. jararaca* (BJ-Liver_asb-306); *A. carolinensis* (*Anolis carolinensis* - G1KH79).

O inibidor de protease plasmática C1 (C1) é uma serpina que regula tanto o sistema complemento, o sistema calicreína – cinina, quanto o sistema fibrinolítico e a coagulação sanguínea (DAVIS et al., 2008). O seu principal papel biológico é a regulação da permeabilidade e também supressão da inflamação (COUTINHO; AULAK; DAVIS-III, 1994; DAVIS-III; MEJIA; LU, 2008; DAVIS-III; LU; MEJIA, 2010).

O múltiplo alinhamento da sequência de aminoácidos predita do inibidor C1 pode ser visto na figura 19 A. Os resultados mostram uma maior diferença de aminoácidos desta proteína, formando ramos filogenéticos mais distantes mesmo quando comparado com a sequência de *Anolis carolinensis*, a espécie mais próxima evolutivamente da *B. jararaca*. (Figura 19B).

Análises filogenéticas representam uma poderosa ferramenta na classificação das proteínas dos venenos pela análise funcional ou pela predição de uma nova

sequência (FRY et al., 2009). Wang et al. (2001) construíram árvores filogenéticas de 40 SVSPs da família Viperidae, que foram agrupadas em três *clusters* diferentes, em que cada um deles representava os principais tipos de enzimas encontradas neste grupo de serpentes: coagulantes (CL), cininogenase (KN) e ativador de plasminogênio (PA), mostrando uma evolução independente e paralela das enzimas selecionadas. Não há dados na literatura sobre a evolução dos inibidores de serinoproteases de serpentes, desta forma, este trabalho identifica alguns inibidores de proteases no transcriptoma do fígado de *B. jararaca*, e compara a sequência de aminoácidos com outros inibidores de serinoproteases da mesma família.

B

(A) Regiões conservadas estão marcadas em preto, regiões com resíduos de aminoácidos semelhantes estão marcados em cinza. (B) Árvore de distância entre as espécies utilizando *Neighbor-joining*. Os valores das porcentagens do *bootstrap* indicados nos nodos são baseados em replicatas de 1000. *M. fascicularis* (*Macaca fascicularis* - G7PQ33); *M. mulatta* (*Macaca mulatta* - G7NDA2); *H. sapiens* (*Homo sapiens* - P05155); *O. Garnettii* (*Otolemur garnettii* - H0WQ18); *O cuniculus* (*Oryctolagus cuniculus* - G1SCJ8); *A. carolinensis* (*Anolis carolinensis* - G1SCJ8); *B.jararaca* representa a sequência obtida do transcriptoma do fígado de *B. jararaca* (BJ-Liver_asb-132).

A análise da expressão gênica da α -1-antitripsina demonstrou que este transcrito é cinco vezes mais expresso em indivíduos adultos do que em jovens (Figura 20).

Figura 20- Comparação da expressão gênica de α -1-antitripsina em indivíduos jovens e adultos por PCR em tempo real.

Fêmeas adultas e jovens de *B. jararaca* foram utilizadas. Todos os dados foram normalizados com β -actina, representando a média ($n = 3$) de triplicatas $\pm$ desvio padrão. O teste *t* Student foram utilizados para análise estatística de grupos independentes, * diferenças significativas $p < 0,05$.

A diferença de expressão de α -1-antitripsina entre indivíduos jovens e adultos pode contribuir para a compreensão das características distintas entre o veneno nas duas fases de vida de *B. jararaca*, uma vez que o tipo de presa diverge entre os indivíduos jovens e adultos (ANDRADE; ABE, 1999; ROBINSON, 1994; ZELANIS et al., 2011). Esta diferença pode ocorrer devido à modulação não só da expressão gênica das proteínas tóxicas do veneno, mas também devido à alteração da composição dos inibidores para essas toxinas, uma vez que a análise da expressão gênica desses inibidores mostrou uma diferença na expressão entre os indivíduos adultos e jovens de *B. jararaca*.

A análise da expressão gênica do C1 inibidor entre os indivíduos jovens e adultos de *B. jararaca* mostrou uma expressão aumentada em aproximadamente três vezes na serpente adulta, com $p < 0,05$ (Figura 21).

Figura 21- Comparação da expressão gênica de C1 inibidor em indivíduos jovens e adultos por PCR em tempo real.

Fêmeas adultas e jovens de *B. jararaca* foram utilizadas. Todos os dados foram normalizados com β -actina, representando a média ($n = 3$) de triplicatas $\pm$ desvio padrão. O teste *t* Student foi utilizado para análise estatística de grupos independentes, *diferenças significativas $p < 0,05$.

A inativação ou alterações do inibidor C1 podem levar a ativação do sistema complemento sem geração de cininas (LANDERMAN et al., 1962). Visto que muitos dos sintomas associados ao envenenamento crotalídeo podem ser atribuídos à ativação do sistema calicreína-cinina e do sistema complemento (DAVIS III et al., 2008), é possível que a inativação do inibidor C1 possa estar envolvida neste processo. Os efeitos do veneno bruto de vários crotalídeos, viperídeos e colubrídeos mostraram diferentes graus de inativação do inibidor C1, como também de outras serpinas, como por exemplo α -1-antiquimotripsina, α -1-antiplasmina, antitrombina III e α -1-antitripsina (KRESS; CATANESE; HIRAYAMA, 1983).

A análise da expressão gênica em serpentes é pouco estudada e neste contexto esta metodologia pode contribuir para um melhor entendimento dos processos que ocorrem no fígado de serpente. Uma vez que existem diferenças entre os constituintes do veneno encontrados em jovens e adultos de *B. jararaca* (ZELANIS et al., 2012), talvez essas diferenças de expressão gênica possam ter um papel fisiológico de acordo com a fase de vida da serpente (ANDRADE; ABE 1999; ZELANIS et al., 2010).

5 CONCLUSÃO

Este trabalho gerou uma biblioteca de cDNA do fígado de *B. jararaca*, originando 853 ESTs, as quais foram agrupadas em 260 *contigs*. A maior parte desses *contigs* está representada pelos transcritos relacionados aos inibidores de enzimas, metaloproteinase, serinoproteinase e fosfolipase A₂.

- O inibidor de metaloproteinase Bj46 não apresentou diferenças na expressão gênica entre os indivíduos adultos e jovens de *B. jararaca*;
- houve uma maior expressão de PLIs em serpentes adultas quando comparado com indivíduos jovens, podendo estar relacionado à proteção da serpente contra o seu próprio veneno, mesmo que serpentes adultas apresentem menor expressão de PLA₂, assim outros fatores podem contribuir para a diferença de expressão entre os indivíduos jovens e adultos em relação aos PLIs;
- os inibidores de serinoproteases, α -1-antitripsina e inibidor C1 também foram mais expressos em indivíduos adultos em relação aos juvenis de *B. jararaca*;
- a construção da biblioteca de cDNA permitiu ainda a geração de novas informações que contribuem para um melhor conhecimento sobre o repertório de moléculas produzidas no fígado de serpentes peçonhentas, fornecendo dados que podem ser úteis para o entendimento da biologia destes animais.

REFERÊNCIAS*

- ADAMS, M. D. et al. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. **Science**, v. 252, n. 5013, p. 1651-1656, 1991.
- ALFÖLDI, J. et al. The genome of the green anole lizard and a comparative analysis with bird and mammals. **Nature**, v. 477, n. 7366, p. 587-591, 2011.
- ALAM, J. M., QASIM, R.; ALAM, S. M. Enzymatic activities of some snake venoms from families Elapidae and Viperidae. **Pak J. Pharm. Sci.**, v. 9, n. 1, p. 37-41, 1996.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W. Local alignment statistics. **Methods Enzymol.**, v. 266, p. 460–480, 1996.
- ALTMAN, R. B. A curriculum for bioinformatics: the time is ripe. **Bioinformatics**, v. 14, p. 549-550, 1998.
- ANDRADE, D. V.; ABE, A. Relationship of venom ontogeny and diet in *Bothrops*. **Herpetologica**, v. 55, p. 200-204, 1999.
- ANTUNES, T. C. et al. Comparative analysis of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. **Toxicon**, v.56, p. 1443–1458, 2010.
- ARLINGHAUS, F. T.; EBLE, J. A. C-type lectin-like proteins from snake venoms. **Toxicon**, v. 60, p. 512-519, 2012.
- AROCAS, V. et al. Molecular cloning and expression of bothrojaracin, a potent thrombin inhibitor from snake venom. **Eur. J. Biochem.**, v. 248, p. 550–557, 1997.
- ASHBURNER, M. et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. **Nat. Genet.**, v.25, p.25–29, 2000.
- BARBOUR, K. W. et al. Functional diversification during evolution of the murine $\alpha 1$ -proteinase inhibitor family: role of the hypervariable reactive center loop. **Mol. Biol. Evol.**, v. 19, n. 5, p. 718-727, 2002.
- BARCHAN, D. et al. How the mongoose can fight the snake: the binding site of the mongoose acetylcholine receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 7717–7721, 1992.
- BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D. Families and clans of serine peptidases. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 318, p. 247-250, 1995.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BATEMAN, A. et al. The Pfam protein families database. **Nucleic Acids Res.**, v. 28, p. 263–266, 2000.

BATTY, P.; SMITH, J. G. Haemostasis. **Surgery**, v. 28, n. 11, p. 530-535, 2010.

BERGER, M.; PINTO, A. F. M.; GUIMARÃES, J. A. Purification and functional characterization of bothrojaractivase, a prothrombin- activating metalloproteinase isolate from *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon**, v. 51, p. 488-501, 2008.

BIARDI, J. E. et al. Isolation and identification of a snake venom metalloproteinase inhibitor from California ground squirrel (*Spermophilus beecheyi*) blood sera. **Toxicon**, v. 58, p. 486-493, 2011.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacol. Ther.**, v. 62, p. 325–372, 1994.

BODE, W.; HUBER, R. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. **Eur. J. Biochem.**, v. 204, p. 433-451, 1992.

BOLDRINI-FRANÇA, J. et al. *Crotalus durissus collilineatus* venom gland transcriptome: Analysis of gene expression profile. **Biochimie**, v. 91, n. 5, p. 586-595, 2009.

BORKOW, G.; GUTIÉRREZ, J. M.; OVADIA, M. A potent antihemorrhagin in the serum of the non-poisonous water snake *Natrix tessellata*: isolation, characterization and mechanism of neutralization. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1201, p. 482–490, 1994.

BORKOW, G.; GUTIERREZ, J. M.; OVADIA, M. Inhibition of toxic activities of *Bothrops asper* venom and other crotalid snake venoms by a novel neutralizing mixture. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 147, n.2, p. 442-447, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2. ed. Brasília, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Aspectos epidemiológicos**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31500>. Acesso em: 05 maio 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Acidentes por animais peçonhentos**. Serpentes. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1539> Acesso em: 20 mar. 2012

BUCKLEND, A. G.; WILTON, D. C. Anionic phospholipids, interfacial binding and the regulation of cell functions. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1483, p. 199-216, 2000.

BURDEN, S. J.; HARTZELL, H. C.; YOSHIKAMI, D. Acetylcholine receptors at neuromuscular synapses: phylogenetic differences detected by snake alpha-neurotoxins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 72, p. 3245–3249, 1975.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The venomous reptiles of Latin America**. New York: Cornell University Press, 1989. 425 p.

CARDLE, L.; DUFTON, M. J. Foci of amino acid residue conservation in the 3D structures of the Kunitz BPTI proteinase inhibitors: how do variants from snake venom differ. **Protein Engineering**, v. 10, n. 2, p. 131–136, 1997.

CARDOSO, J. L. C. et al. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in Sao Paulo, Brazil. **Q. J. Med.**, v. 86, p. 315–325, 1993.

CARDOSO, K. C. et al. A transcriptomic analysis of gene expression in the venom gland of the snake *Bothrops alternatus* (urutu). **BMC Genomics**, v. 11, n. 605, 2010.

CASTOE, T. A. et al. A multi-organ transcriptome resource for the Burmese Python (*Python molurus bivittatus*). **BMC Res. Notes**, v. 4, n. 310, 2011.

CATANESE, J. J.; KRESS, L. F. Isolation from opossum serum of a metalloproteinase inhibitor homologous to human alpha 1B-glycoprotein. **Biochemistry**, v. 31, p. 410–418, 1992.

CATANESE, J. J.; KRESS, L. F. Opossum serum α 1-proteinase inhibitor: purification, linear sequence, and resistance to inactivation by rattlesnake venom metalloproteinases. **Biochemistry**, v. 32, p. 509-515, 1993.

CERQUEIRA, R.; LEMOS B. Morphometric differentiation between Neotropical black-eared opossums, *Didelphis marsupialis* and *D. aurita* (Didelphimorphia, Didelphidae). **Mammalia**, v. 64, p. 319–327, 2000.

CHENG, A-C. et al. A novel heparin-dependent inhibitor of activated protein C that potentiates consumptive coagulopathy in Russell's viper envenomation. **J. Biol. Chem.**, v. 287, n. 19, p. 15739-15748, 2012.

CHIJIWA, T. et al. Interisland mutation of a novel phospholipase A2 from *Trimeresurus flavoviridis* venom and evolution of Crotalinae group II phospholipases A2. **J. Mol. Evol.**, v. 57, n. 5, p. 546-554, 2003.

CHIJIWA, T. et al. Amino acid sequence of a basic aspartate-49-phospholipase A2 from *Trimeresurus flavoviridis* venom and phylogenetic analysis of Crotalinae venom phospholipases A2. **Toxicon**, v. 46, n. 2, p. 185-195, 2005.

CHING, A. T. C. et al. Some aspects of the venom proteome of the Colubridae snake *Philodryas olfersii* revealed from a Duvernoy's (venom) gland transcriptome. **FEBS Lett.**, v. 580, p. 4417–4422, 2006.

CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, v. 29, n. 11, p. 1279-1303, 1991.

CHUDZINSKI, A. M. **Isolamento e caracterização de um inibidor de cisteíno-proteinases do plasma de *Bothrops jararaca***. São Paulo: Departamento de Bioquímica, Escola Paulista de Medicina, 1989.

CIDADE, D. A. P. et al. *Bothrops jararaca* venom gland transcriptome: Analyzsis of the gene expression pattern. **Toxicon**, v. 48, p. 437-461, 2006.

CISCOTTO, P. et al. Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an l-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, v. 53, n. 3, p. 330-341, 2009.

CLARK, C. W.; VORIS, K. H. Venom neutralization by rattlesnake serum albumin. **Science**, v. 164, p. 1402–1404, 1969.

CLEMETSON, K. J.; LU, Q.; CLEMETSON, J. M. Snake C-Type Lectin-Like Proteins and Platelet Receptors. **Pathophysiol. Haemost. Thromb.**, v. 34, p.150–155, 2005.

COBRAS BRASILEIRAS. ***Bothropoides Jararaca***. Disponível em: <http://www.cobrasbrasileiras.com.br/bothrops_jararaca.html>. Acesso em: 10 abr. 2012.

CONSECA, A. et al. Blast2GO. A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, v. 21, p. 3674-3676, 2005.

COUTINHO, M.; AULAK, K. S.; DAVIS-III, A. E. Functional analysis of the serpin domain of C1 inhibitor. **J. Immunol.**, v. 153, p. 3648-3654, 1994.

DALTRY, J. C.; WÜSTER, W.; THORPE, R. S. Diet and snake venom evolution. **Nature**, v. 379, p. 537-540, 1996.

DAVIS-III, A. E.; MEJIA, P.; LU, F. Biological activities of C1 inhibitor. **Mol. Immunol.**, v. 45, n. 16, p. 4057-4063, 2008.

DAVIS-III, A. E.; LU, F.; MEJIA, P. C1 inhibitor, a multi-functional serine protease inhibitor. **Thromb. Haemost.**, v. 104, p. 886-893, 2010.

DE-CARVALHO, D. D.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J. C. Primary structure characterization of *Bothrops jararacussu* snake venom lectin. **J. Protein Chem.**, v. 21, p. 43–50, 2002.

DE MORAIS, K. B. et al. *Bothrops jararaca* antithrombin: isolation, characterization and comparison with other animal antithrombins. **Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.**, v. 152, n. 2, p. 171-176, 2009.

DE VIEIRA SANTOS, M. M. et al. Antitumoral effect of na L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v. 102, n. 6, p. 533-542, 2008.

DE WIT, C. A.; WESTRÖM, B. R. Purification and characterization of $\alpha 2$ -, $\alpha 2$ - β and β -macroglobulin inhibitors in the hedgehog, *Erinaceus europaeus*: β -macroglobulin identified as the plasma antihemorrhagic factor. **Toxicon**, v. 25, p. 1209–1219, 1987.

DENNIS, E. A. The growing phospholipase A₂ superfamily of signal transduction enzymes. **TIPS**, v, 22, p.1-2, 1997.

DIAS CORREIA, J. H. R.; DIAS CORREIA, A. A. Alguns aspectos funcionais do epigenoma, genoma e transcriptoma nos animais. **Redvet**, v. 3, n. 10, 2007.

DIZ FILHO, E. B. et al. Enzymatic and structural characterization of new PLA₂ isoform isolated from white venom of *Crotalus durissus ruruima*. **Toxicon**, v. 53, n. 1, p. 104-114, 2009.

DOLEY, R.; KINI, R. M. Protein complexes in snake venom. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 66, p. 2851–2871, 2009.

DOMONT, G. B.; PERALES, J.; MOUSSATCHÉ, H. Natural anti-snake venom proteins. **Toxicon**, v. 29, p.1183–1194, 1991.

DÖRMANN, D. et al. Alboaggregin A activates platelets by a mechanism involving glycoprotein VI as well as glycoprotein Ib. **Blood**, v. 97, p. 929–936, 2001.

DRICKAMER, K. C-type lectin-like domains. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 9, p. 585–590, 1999.

DU, X. Y.; CLEMETSON, K. J. Snake venom L-amino acid oxidase. **Toxicon**, v. 40, p. 659-665, 2002.

DUNN, R. D.; BROADY, K. W. Snake inhibitors of phospholipase A₂ enzymes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1533, p. 29-37, 2001.

EARL, S. T. et al. Identification and characterisation of Kunitz-type plasma Kallikrein inhibitors unique to *Oxyuranus* sp. snake venoms. **Biochimie**, v. 94, n. 2, p. 365-373, 2012.

EWING, B. et al. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Res.**, v. 8, n. 3, p.175-185, 1998.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Res.**, v. 8, n. 3, p. 186-194, 1998.

FAURE, G. Natural inhibitors of toxic phospholipase A₂. **Biochemie**, v.82, p. 833-840, 2000a.

FAURE, G. et al. Interaction of the neurotoxic and non-toxic secretory phospholipases A₂ with the crotoxin inhibitor from *Crotallus* serum. **Eur. J. Biochem.**, v. 267, p. 4799-4808, 2000b.

FERNANDEZ, J. H.; NESHICH, G.; CAMARGO, A. C. Using bradykinin-potentiating peptide structures to develop new drugs. **Genet. Mol. Res.**, v. 3, n. 4, p. 554-563, 2004.

FERREIRA, S. H.; BARTELT, D. C.; GREENE, L. J. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. **Biochemistry**, v. 9, p. 2583–2593. 1970.

FILIPPOVICH, I. et al. A family of textilinin genes, two of which encode proteins with antihemorrhagic properties. **British J. Haematol.**, v. 119, p. 376–384, 2002.

FORTES-DIAS, C. L. Endogenous inhibitors of snake venom phospholipases A₂ in the blood plasma of snakes. **Toxicon**, v. 40, p. 481–484, 2002.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 repolysin family of metalloproteinases, **Toxicon**, v. 45, p. 969–985, 2005.

FOX, J. W. et al. Comparison of indirect and direct approaches using ion-trap and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for exploring viperid venom proteomes. **Toxicon**, v. 47, p. 700–714, 2006.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **FEBS J.**, v. 275, p. 3016–3030, 2008.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Exploring snake venom proteomes: multifaceted analyses for complex toxin mixtures. **Proteomics**, v. 8, p. 909–920, 2008.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research. **J. Proteomics**, v. 72, p. 200–209, 2009.

FRANCO, R. F. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 34, p. 229-237, 2001.

FRANÇA, F. O. S.; MÁLAQUE, C. M. S. Botropic accident. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA O. S. F.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR, V. (Org.). **Venomous animals in Brazil: biology, clinical and therapeutic of accidents**. São Paulo: Sarvier, 2003. p. 72-86.

FRY, B. G. et al. Molecular evolution and phylogeny of elapid snake venom three-finger toxins. **Mol. Evol.**, v. 57, p. 110-129, 2003.

FRY, B. G. From genome to “venome”: Molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. **Genome Res.**, v. 15, p. 403-420, 2005.

FRY, B. G. et al. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. **Nature**, v. 439, p. 584-588, 2006.

FRY, B. G. et al. The toxicogenomic multiverse: Convergent recruitment of proteins into animal venoms. **Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.**, v. 10, p. 483–51, 2009.

FRY, B. G. et al. Novel transcripts in the maxillary venom glands of advanced snakes. **Toxicon**, v. 59, p. 696-708, 2012.

FURIE, B.; FURIE, B. C. The molecular basis of blood coagulation. **Cell**, v. 53, p. 505-518, 1988.

FURTADO, M. F. D.; TRAVAGLIA-CARDOSO, S. R.; ROCHA, M. M. T. Sexual dimorphism in the venom of *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae). **Toxicon**, v. 48, p. 401-410, 2006.

GAVRAS, H. et al. An angiotensin converting enzyme inhibitor to identify and treat vasoconstrictor and volume factors in hypertensive patients. **N. Engl. J. Med.**, v. 291, p. 817–821, 1974.

GIRISH, K. S. et al. Snake venom hyaluronidase: An evidence for isoforms and extracellular matrix degradation. **Mol. Cel. Biochem.**, v. 240, p. 105–110, 2002.

GIRISH, K. S. et al. Isolation and characterization of hyaluronidase a “spreading factor” from Indian cobra (*Naja naja*) venom. **Biochimie**. v. 86, p. 193-202, 2004.

GOODWIN, R. L.; BAUMANN, H.; BERGER, F. G. Patterns of divergence during evolution of α 1-proteinase inhibitors in mammals. **Mol. Biol. Evol.**, v. 13, n. 2, p. 346-358, 1996.

GUO, Y. W. et al. Cloning and functional expression of the mucrosobin protein, a beta-fibrinogenase of *Trimeresurus mucrosquamatus* (Taiwan Habu). **Protein. Expr. Purif.**, v. 23 , n. 3, p. 483-90, 2001.

GUO, Y. et al. dCAS: a desktop application for cDNA sequence annotation. **Bioinformatics**, v. 25, n. 9, p. 1195-1196, 2009.

GUTIÉRREZ J. M.; LOMONTE B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms: a review. **Mem. Inst. Butantan**, v. 51, p. 211-223, 1989.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33, n. 11, p.1405–1424, 1995.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Efectos locales en el envenenamiento ofídico en América Latina. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR, V. (Ed.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, FAPESP, 2003. p. 310-323.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v. 82, p. 841–850, 2000.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon**, v. 45, p. 997–1011, 2005.

GUTIÉRREZ, J. M.; ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v. 54, p. 976–987, 2009.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. **Toxicon**, v. 56, n.7, p. 1223-1235, 2010.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

HACKETT, E.; HANN, C. Slow clotting of reptile bloods. **J. Comp. Pathol.**, v. 77, p. 175-180, 1967.

HAYASHI, M. A. F.; CAMARGO, A. C. M. The Bradykinin-potentiating peptides from venom gland and brain of *Bothrops jararaca* contain highly site specific inhibitors of the somatic angiotensin-converting enzyme. **Toxicon**, v. 45, p. 1163–1170, 2005.

HEINRIKSON, R. L.; KRUEGER, E. T.; KEIM, P. S. Amino acid sequence of phospholipase A₂-α from the venom of *Crotalus adamanteus*. A new classification of phospholipase A₂ based upon structural determinants. **J. Biol. Chem.**, v. 252, p. 4913–4977, 1977.

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: a DNA sequence assembly program. **Gen. Res.**, v. 9, p. 868–877, 1999.

HUBER, R.; CARRELL, R. W. Implications of the three-dimensional structure of α₁-antitrypsin for structure and function of serpins. **Biochemistry**, v. 28, n. 23, p. 8951-8971, 1989.

HUTTON, R. A., WARRELL, D. A. Action of snake venom components on the haemostatic system. **Blood Rev.**, v. 7, p. 176–189, 1993.

- IANZER, D. et al. Identification of five new bradykinin potentiating peptides (BPPs) from *Bothrops jararaca* crude venom by using electrospray ionization tandem mass spectrometry after a two-step liquid chromatography. **Peptides**, v. 25, p. 1085–1092, 2004.
- INOUE, S. et al. Amino acid sequences of the two subunits of phospholipase A₂ inhibitor from the blood plasma of *Trimeresurus flavoviridis*. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 1001–1007, 1991.
- INOUE, S. et al. Specificity of two types of phospholipase A₂ inhibitors from the plasma of venom snakes. **Biochem.Mol. Biol. Int.**, v. 41, p. 529–537, 1997.
- JIANG, Y. et al. Venom gland transcriptomes of two elap snakes (*Bungarus multicinctus* and *Naja atra*) and evolution of toxin genes. **BMC Genomics**, v. 12, n. 1, p.1–13, 2011.
- JOHNSON, D.; TRAVIS, J. structural evidence for methionine at the reactive site of human α -1-proteinase inhibitor. **J. Biol. Chem.**, v. 253, n. 20, p. 7142–7144, 1978.
- JUÁREZ, P. et al. Evolution of snake venom disintegrins by positive darwinian selection. **Mol. Biol. Evol.**, v. 25, n. 11, p. 2391–2407, 2008.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M. et al. Molecular cloning and expression of functional snake venom vascular endothelium growth factor (VEGF) from *Bothrops insularis* pit viper. A new member of the VEGF family of proteins. **J. Biol.Chem.**, v. 276, p. 39836–39842, 2001.
- JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; HO, P. L. A survey of gene expression and diversity in the venom glands of the pit viper snake *Bothrops insularis* through the generation of expressed sequence tags (ESTs). **Gene**, v. 299, p. 279–291, 2002.
- JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO I. M. L. et al. *Lachesis muta* (Viperidae) cDNAs reveal diverging pit viper molecules and scaffolds typical of cobra (Elapidae) venoms: implications for snake toxin repertoire evolution. **Genetics**, v. 173, p. 877–889, 2006.
- JURGILAS, P. B. et al. PO41, a snake venom metalloproteinase inhibitor isolated from *Philander opossum* serum. **Toxicon**, v. 42, p. 621–628, 2003.
- KANG, T. S. et al. Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. **FEBS J.**, v. 278, n. 23, p. 4544–4576, 2011.
- KARDONG, K. V. Snake toxins and venom: an evolutionary perspective. **Herpetologica**, v. 52, p. 36–46, 1996.

KASHIMA, S. et al. Analysis of *Bothrops jararacussu* venomous gland transcriptome focusing on structural and functional aspects: I-gene expression profile of highly expressed phospholipases A₂. **Biochimie**, v. 86, p. 211–219, 2004.

KEMPARAJU, K.; GIRISH, K. S. Snake venom hyaluronidase: a therapeutic target. **Cell Biochem. Function**, v.24, p. 7–12, 2006.

KEMPARAJU, K.; GIRISH, K. S.; NAGARAJU, S. Hylarunonidases, a neglected class of glycosidases from snake venom: beyond a spreading factor. In: MACKESSY, S.P. (Ed.) **Handbook of Venoms and toxins of reptiles**. Florida: CRC Press, Boca Raton, 2010, p. 237-258.

KIHARA, H. Studies on phospholipase A in *Trimeresurus flavoviridis* venom. III. Purification and some properties of phospholipase A inhibitor in Habu serum. **J. Biochem.**, v. 80, p. 341-349, 1976.

KINI, R. M.; EVANS, H. J. Effects of snake venom proteins on blood platelets. **Toxicon**, v. 28, p. 1387–1422, 1990.

KINI, R. M.; CHAN, Y. M. Accelerated evolution and molecular surface of venom phospholipase A₂ enzymes. **J. Mol. Evol.**, v. 48, n. 2, p. 123-132, 1999.

KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. **Toxicon**, v. 42, p. 827–840, 2003.

KINI, R. M. Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake venoms. **Pathophysiol. Haemost. Thromb.**, v. 34, p. 200–204, 2005.

KINI, R. M. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. **Biochem. J.**, v. 397, n. 3, p. 377–387, 2006.

KINI, R. M. Toxins in thrombosis and haemostasis: potential beyond imagination. **J. Thromb. Haemost.**, v. 9, p. 195–208, 2011, (Suppl. 1).

KINKAWA, K. et al. Up-regulation of the expression of phospholipase A₂ inhibitors in the liver of a venomous snake by its own venom phospholipase A₂. **BBRC**, v, 395, p. 377-381, 2010.

KOIDE, T.; PANG, W. L.; BALIGA, N. S. The role of predictive modelling in rationally re-engineering biological systems. **Nature Reviews Microbiol.**, v. 7, p. 297-305, 2009.

KORDIS, D.; GUBENSEK, F. Adaptive evolution of animal toxin multigene families. **Gene**, v. 261, p. 43–52, 2000.

KOSTIZA, T.; MEIER, J. Nerve growth factor from snake venoms: Chemical properties, mode of action and biological significance. **Toxicon**, v. 34, n. 7, p. 787-806, 1996.

- KRESS, L. F.; CATANESE, J.; HIRAYAMA, T. Analysis of the effects of snake venom proteinases on the activity of human plasma Cl esterase inhibitor, alpha 1-antichymotrypsin and alpha 1-antiplasmin. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 745, p. 113-120, 1983.
- KRIEGER, E. M. et al. Potential screening test for detection of overactivity of renin-angiotensin system. **Lancet**, v. 1, p. 269–271, 1971.
- LAMBEAU, G.; LAZDUNSKI, M. Receptors for a growing family of secreted phospholipase A₂. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 20, p. 162-170, 1999.
- LANDEGREN, U.; NILSSON, M.; KWOK, P. Y. Reading bits of genetic information: methods for single-nucleotide polymorphism analysis. **Genome Res.**, v. 8, p. 769-776, 1998.
- LANDERMAN, N. S. et al. Hereditary angioneurotic edema. II. Deficiency of inhibitor for serum globulin permeability factor and/or plasma kallikrein. **J. Allergy**, v. 33, p. 330-341, 1962.
- LASKOWSK JR, M. Protein inhibitors of serine proteinases-mechanism and classification. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 199, p. 1–17, 1986.
- LASKOWSKI JR, M.; KATO, I. Protein inhibitors of proteinases. **Annu. Ver. Biochem.**, v. 49, p. 593-626, 1980.
- LEMAIGRE, F.; ZARET, K. S. Liver development update: new embryo models, cell lineage control, and morphogenesis. **Curr. Opinion Genet. Develop.**, v. 14, p. 582-590, 2004.
- LEÃO, L. I.; HO., P. L.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M. Transcriptomic basis for an antiserum against *Micrurus corallinus* (coral snake) venom. **BMC Genomics**, v. 10, p. 112, 2009.
- LI, Z. Y.; YU, T. F.; LIAN, E. C. Y. Purification and characterization of L-amino acid oxidase from king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom and its effects on human platelet aggregation. **Toxicon**, v. 32, p. 1349–1358, 1994.
- LI, M.; FRY, B. G.; KINI, M. Putting the brakes on snake venom evolution: the unique molecular evolutionary patterns of *Aipysurus eydouxii* (Marbled sea snake) phospholipase A2 toxins. **Mol. Biol. Evol.**, v. 22, n. 4, p. 934-941, 2005.
- LIMA, R. M. et al. Phospholipase A2 inhibitors (βPLIs) are encoded in the venom glands of *Lachesis muta* (Crotalinae, Viperidae) snakes. **Toxicon**, v. 57, n. 1, p. 172-175, 2011.

LISANO, S. et al. Biochemical characterization and pharmacological properties of a phospholipase A2 myotoxin inhibitor from the plasma of the snake *Bothrops asper*. **Biochem. J.**, v. 326, pt. 3, p. 853-859, 1997.

LISANO, S.; DOMONT, G. B.; PERALES, J. Natural phospholipase A (2) myotoxin inhibitor proteins from snakes, mammals and plants. **Toxicon**, v. 42, p. 963-977, 2003.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LIU, C. S.; WU, T. C.; LO, T. B. Complete amino acid sequences of two protease inhibitors in the venom of *Bungarus fasciatus*. **Int. J. Pept. Protein. Res.**, v. 21, n. 2, p. 209-15, 1983.

LIU, S.; SUN, M. Z.; GREENAWAY, F. T. A novel plasminogen activator from *Agkistrodon blomhoffii ussurensis* venom (ABUSV-PA): purification and characterization. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 348, n. 4, p. 1279-1287, 2006.

LOMONTE, B. et al. Neutralization of *Bothrops asper* venom by antibodies, natural products and synthetic drugs: Contributions to understanding snakebite envenomings and their treatment. **Toxicon**, v. 54, p. 1012–1028, 2009.

LU, Q. M. et al. L-amino acid oxidase from *Trimeresurus jerdonii* snake venom: purification, characterization, platelet aggregation-inducing and antibacterial effects. **J. Nat. Toxins.**, v. 11, p. 345–352, 2002.

LU, Q.; CLEMETSON, J. M.; CLEMETSON, K. J. Snake venoms and hemostasis. **Thromb. Haemost.**, v. 3, p. 1791–1799, 2005a.

LU, Q. et al. Snake venom C-type lectins interacting with platelet receptors. Structure–function relationships and effects on haemostasis. **Toxicon**, v. 45, p. 1089–1098, 2005b.

MACKESSY, S. P. Biochemistry and pharmacology of colubrid snake venoms. **J. Toxicol. Toxin. Rev.**, v. 21, n. 1-2, p. 43–83, 2002.

MANDAL, S.; BHATTACHARYYA, D. Two L-amino acid oxidase isoenzymes from Russell's viper (*Daboia russelli russelli*) venom with different mechanisms of inhibition by substrate analogs. **FEBS J.**, v. 275, p. 2078-2095, 2008.

MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD: a database of conserved domain alignments with links to domain three-dimensional structure. **Nucleic Acid Res.**, v.30, p.281–283, 2002.

MARKLAND JR, F. S. Snake venoms. **Drugs**, v. 54 Suppl 3.p. 1-10,1997.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, p. 1749–1800, 1998.

MARKLAND, F. S.; SWENSON, S. **Fibrolase and its evolution to clinical trials: a long and winding road**. In: KINI, R. M.; CLEMETSON, K. J.; MARKLAND, F. S.; MCLANE, M. A.; MORITA, T. (Ed.) **Toxins and hemostasis: from bench to bedside**. Dordrecht: Springer, 2010. p. 409–427.

MARSH, N.; WILLIAMS, V. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. **Toxicon**, v. 45, p. 1171-1181, 2005.

MAST, A. E. et al. Kinetics and physiologic relevance of the inactivation of alpha 1-proteinase inhibitor, alpha 1-antichymotrypsin, and antithrombin III by matrix metalloproteinases-1 (tissue collagenase), -2 (72-kDa gelatinase/type IV collagenase), and -3 (stromelysin). **J. Biol. Chem.**, v. 266, n.24, p. 15810-15816, 1991.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1477, p. 146-156, 2000.

MATTISON, C. **The new encyclopedia of snakes**. Londres/UK: Princeton University Press, 2007.

MEBS, D. et al. Erinacin, an antihemorrhagic factor from the European hedgehog, *Erinaceus europaeus*. **Toxicon**, v. 34, p. 1313–1316, 1996.

MELGAREJO, A. R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEIN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD, V. (Ed.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier-Fapesp, 2003. p. 33-61.

MENEZES, M. C. et al. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. **Toxicon**, v. 47, p. 304-312, 2006.

MONTECUCCO, C.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A₂ myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 65, p. 2897–2912, 2008.

MURAKAMI, M. T.; ARNI, R. K. Thrombomodulin- independent activation of protein C and specificity of hemostatically active snake venom serine proteinases: crystal structures of native and inhibited *Agkistrodon contortrix contortrix* protein C activator. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 39309–39315, 2005.

NAHAS, L. et al. Blood coagulation inhibitor in a snake plasma (*Bothrops jararaca*). **Thromb. Diath. Haemorrh.**, v. 30, p. 106-113, 1973.

NAHAS, L. et al. Blood coagulation mechanism in the snakes *Waglerophis merremii* and *Bothrops jararaca*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 69, p. 739-743. 1981.

NAHAS, L. et al. The inactivating effect of *Bothrops jararaca* and *Waglerophis merremii* snake plasma on the coagulant activity of various snake venoms. **Toxicon**, v. 21, p. 239-246, 1983.

NAKASHIMA, K-I. et al. Accelerated evolution of *Trimeresurus flavoviridis* venom gland phospholipase A2 isozymes. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 90, p. 5964-5968, 1993.

NAKASHIMA, K-I. et al. Accelerated evolution in the protein-coding regions is universal in crotalinae snake venom gland phospholipase A2 isozyme genes. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 92, p. 5605-5609, 1995.

NAUMANN, G. B. et al. Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by an L-amino acid oxidase from *Bothrops leucurus* venom. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1810, p. 683-694, 2011.

NEIVA, M. et al. Transcriptome analysis of the Amazonian viper *Bothrops atrox* venom gland using expressed sequence tags (ESTs). **Toxicon**, v. 53, p. 427–436, 2009.

NG, K. K.; VANE, J. R. Some properties of angiotensin converting enzyme in the lung in vivo. **Nature**, v. 225, p. 1142–1144, 1970.

NEVALAINEN, T. G.; GRAHAM, G. G.; SCOTT, K. F. Antibacterial actions of secreted phospholipases A2. Review. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1781, p.1–9, 2008.

NEVES-FERREIRA, A. G. C. et al. Inhibitory properties of the antithrombotic complex from the South American opossum (*Didelphis marsupialis*) serum. **Toxicon**, v. 35, p. 849–863, 1997.

NEVES-FERREIRA, A. G. C. et al. Isolation and characterization of DM40 and DM43, two snake venom metalloproteinase inhibitors from *Didelphis marsupialis* serum. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1474, p. 309–320, 2000.

NEVES-FERREIRA, A. G. C. et al. Structural and functional analyses of DM43, a snake venom metalloproteinase inhibitor from *Didelphis marsupialis* serum. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 13129–13137, 2002.

NEVES-FERREIRA, A. G. C. et al. Natural inhibitors: Innate Immunity to snake venoms. In: MACKESSEY, S. P. (Ed.). **Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles**. New York: CRC Press, 2009. p. 173 -205 (eBook ISBN: 978-1-4200-0866-1).

NEURATH, H. Evolution of proteolytic enzymes. **Science**, v. 224, p. 350–357, 1984.

NOBUHISA, I. et al. Structural elements of *Trimeresurus flavoviridis* serum inhibitors for recognition of its venom phospholipase A₂ isozymes. **FEBS Lett.**, v. 429, p. 385-389, 1998.

OGAWA, T. et al. Accelerated evolution of snake venom phospholipase A₂ isozymes for acquisition of diverse physiological functions. **Toxicon**, v. 34, p. 1229–1236, 1996.

OGAWA, T. et al. Molecular diversity and accelerated evolution of C-type lectin-like proteins from snake venom. **Toxicon**, v. 45, p. 1-14, 2005.

OHANA, B. et al. Molecular dissection of cholinergic binding sites: how do snakes escape the effect of their own toxins? **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 179, p. 648–654, 1991.

OHKURA, N. et al. Isolation and amino acid sequence of a phospholipase A₂ inhibitor from the blood plasma of *Agkistrodon blomhoffii siniticus*. **J. Biochem.**, v. 113, p. 413-419, 1993.

OHKURA, N. et al. The two subunits of phospholipase A₂ inhibitor from the plasma of Thailand cobra having structural similarity to urokinase-type plasminogen activator receptor and Ly-6 related proteins. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 204, p. 1212-1218, 1994.

OHKURA, N. et al. Purification and characterization of three types of phospholipase A₂ inhibitor from the blood plasma of Chinese mamushi, *Agkistrodon blomhoffii siniticus*. **Biochem. J.**, v. 325, p. 527-531, 1997.

OHKURA, N.; et al. Isolation and amino acid sequence of a phospholipase A₂ inhibitor from the blood plasma of the sea krait, *Laticauda semifasciata*. **J. Biochem.**, v. 125, p. 375-382, 1999.

OKUBO, K. et al. Large scale cDNA sequencing for analysis of quantitative and qualitative aspects of gene expression. **Nat. Genet.**, v. 2, p. 173–179, 1992.

OKUMURA, K. et al. A novel phospholipase A₂ inhibitor with leucine-rich repeats from blood plasma of *Agkistrodon blomhoffii siniticus*. Sequence homologies with human leucine-rich α_2 -glycoprotein. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 19469-19475, 1998.

OKUMURA, K. et al. CDNA cloning of the two subunits of phospholipase A₂ inhibitor PLI α from blood plasma of the Chinese mamushi, *Agkistrodon blomhoffii siniticus*. **IUMB Life**, v. 48, p. 99-104, 1999a.

OKUMURA, K. et al. CDNA cloning and the bacterial expression of phospholipase A₂ inhibitor PLI α from the serum of the Chinese mamushi, *Agkistrodon blomhoffii siniticus*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 1441, p. 51-60, 1999b.

OKUMURA, K. et al. Identification of β -type phospholipase A₂ inhibitor in a nonvenomous snake *Elaphe quadrivirgata*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 408, p. 124-130, 2002.

OLIVEIRA, C.Z. et al. An alpha-type phospholipase A(2) inhibitor from *Bothrops jararacussu* snake plasma: structural and functional characterization. **Biochimie**, v. 90, n. 10, p. 1506-1514, 2008.

OLIVEIRA, C. Z. et al. Structural and functional characterization of a γ -type phospholipase A2 inhibitor from *Bothrops jararacussu* snake plasma. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 11, n. 20, p. 2509-2519, 2011.

OMORI-SATOH, T. et al. Purification and characterization of an anti-hemorrhagic factor in the serum of *Trimeresurus flavoviridis*, a Crotalid. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 285, p. 414-426, 1972.

OMORI-SATOH, T. Antihemorrhagic factor as a proteinase inhibitor isolated from serum of *Trimeresurus flavoviridis*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 495, p. 93-98, 1977.

OMORI-SATOH, T.; YAMAKAWA, Y.; MEBS, D. The antihemorrhagic factor, erinacin, from the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*), a metalloprotease inhibitor of large molecular size possessing ficolin/opsonin P35 lectin domains. **Toxicon**, v. 38, n. 11, p. 1561-1580, 2000.

ONDETTI, M. A.; CUSHMAN, D. W. Angiotensin converting enzyme inhibitors: biochemical properties and biological activities. In: Soffer, R.L. (Ed.), **Biochem. Regulation of Blood Pressure**. Wiley, New York, pp. 165-204. 1981.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Sanke antivenoms**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs337/en/>>. Acesso em: 15/Jun/2012.

OVADIA, M.; KOCHVA, E. Neutralization of Viperidae and Elapidae snake venoms by sera of different animals. **Toxicon**, v. 15, p. 541-547, 1977.

OYAMA, E. et al. Purification and characterization of a new platelet aggregation inhibitor with dissociative effect on ADP-induced platelet aggregation, from the venom of *Protobothrops elegans* (Sakishima-habu). **Toxicon**, v. 53, p. 706-712, 2009.

OWNBY, C.L. Structure, function and biophysical aspects of the myotoxins from snake venoms. **J. Toxicol. Toxin Rev.**, v. 17, p. 213-238, 1998.

OZEKI, Y. et al. C-type galactoside binding lectin from *Bothrops jararaca* venom: comparison of its structure and function with those of botrocetin. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 308, p. 306-310, 1994.

PASSOS, G. A. S., NGUYEN, C., JORDAN, B. Projeto Transcriptoma- Análise da expressão gênica em larga escala usando DNA-arrays. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 12, p. 4-37, 2000.

PATÍÑO, A. C. et al. Isolation and biological characterization of Batx-1, a weak hemorrhagic and fibrinogenolytic PI metalloproteinase from Columbian *Bothrops astrox* venom. **Toxicon**, v. 56, p. 936-943, 2010.

PERALES, J. et al. Natural inhibitors of snake venom hemorrhagic metalloproteinases. **Toxicon**, v. 45, p. 1013–1020, 2005.

PÉREZ, J. C.; SÁNCHEZ, E. E. Natural protease inhibitors to hemorrhagins in snake venoms and their potential use in Medicine. **Toxicon**, v. 37, p. 703-728, 1999.

PERLMUTTER, D. H. et al. Identification of a serpin-enzyme complex receptor on human hepatoma cells and human monocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 87, p. 3753-3757, 1990.

PHILPOT, V. B. et al. Neutralization of crotalid venoms by fractions from snake sera. **Toxicon**, 16, p. 603–610, 1978.

PINHO, F. M. O.; YU, L.; BURDMANN, E. A. Snakebite-induced acute kidney injury in Latin America. **Semin. Nephrol.**, v. 28, n. 4, p. 354-362, 2008.

POTEMPA, J.; KORZUS, E.; TRAVIS, J. The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 23, p. 15957-15960, 1994.

PORAN, N. S.; COSS, R. G.; BENJAMINE, E. Resistance of California ground squirrels (*Spermophilus beecheyi*) to the venom of the northern Pacific rattlesnake (*Crotalus viridis oreganus*): a study of adaptive variation. **Copeia**, v. 25, p. 767–777, 1987.

PRADO, A. **Serpentes do Brasil**. São Paulo: Sítio e fazenda, 1945, p.16-18.

PROSDOCIMI, F. et al. Bioinformática: manual do usuário. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. 29: 12-25, 2002.

PYRON, R. A. et al. The phylogeny of advanced snakes (Colubroidea), with discovery of a new subfamily and comparison of support methods for likelihood trees. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 58, n. 2, p. 329-342, 2011.

QI, Z-Q. et al. Characterization of the antihemorrhagic factors of mongoose (*Herpestes edwardsii*). **Toxicon**, v. 32, p. 1459–1469, 1994.

QI, Z-Q. et al. Isolation of peptides homologous to domains of human alpha 1B-glycoprotein from a mongoose antihemorrhagic factor. **Toxicon**, v. 33, p. 241–245, 1995.

RAMOS, O. H. P.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. Snake venom metalloproteases-structure and function of catalytic and desitegrin domains. **Comp. Biochem. and Physiol. Part C**, v. 142, p. 328-346, 2006.

RAWLINGS, N. D.; TOLLE, D. P.; BARRETT, A. J. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Res.**, v. 40, p. D343–D350, 2012.

RIBEIRO, L. A.; JORGE, M. T. Acidente por serpentes do gênero *Bothrops*: série de 3.139 casos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 6, 475-480, 1997.

ROCHA E SILVA, M., BERALDO, W. T., ROSENFELD, G. Bradykinin, a hypotensive and a smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venom and by trypsin. **Am. J. Physiol.**, v. 156, p. 261–270, 1949.

RICHARDS, D. P.; BARLOW, A.; WÜSTER, W. Venom lethality and diet: Differential responses of natural prey and model organisms to the venom of the saw-scaled vipers (*Echis*). **Toxicon**, v. 59, p. 110-116, 2012.

RITONJA, A.; TURK, V.; GUBENSEK, F. Serine proteinase inhibitors from *Vipera ammodytes* venom. Isolation and kinetic studies. **Eur. J. Biochem.**, v. 133, p. 427–432, 1983.

ROBINSON, S. K. Habitat selection and foraging ecology of raptors in Amazonian Peru. **Biotropica**, v. 26, p. 443-458, 1994.

RODRIGUES, R. S. et al. Combined snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of *Bothropoides pauloensis*. **J. Proteomics**, v. 75, p. 2707-2720, 2012.

ROKITA, D. R. et al. A high-throughput venom-gland transcriptome for the Eastern Diamondback Rattlesnake (*Crotalus adamanteus*) and evidence for pervasive positive selection across toxin classes. **Toxicon**, v. 57, p. 657-671, 2011.

SAMBROOK, J. RUSSEL, D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor, 1989.

SÁNCHEZ, E. E.; RODRÍGUEZ-ACOSTA, A. Inhibitors of snake venoms and development of new therapeutics. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.**, v. 30, n. 4, p. 647-678, 2008.

SANGER, F.; COULSON, A. R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **J. Mol. Biol.**, v. 94, p. 441-448. 1975.

SANO-MARTINS, I. S. et al. Platelet aggregation in patients bitten by the Brazilian snake *Bothrops jararaca*. **Thromb. Res.**, v. 87, p. 183–195, 1997.

SANT'ANA, C. D. et al. Antiviral and antiparasite properties of an L-amino acid oxidase from the snake *Bothrops jararaca*: cloning and identification of a complete cDNA sequence. **Biochem. Pharmacol.**, v. 76, p. 279–288, 2008.

- SANTORO, M. L.; SANO-MARTINS, I. S. Platelet dysfunction during *Bothrops jararaca* snake envenomation in rabbits. **Thromb. Haemost.**, v. 92, p. 369–383, 2004.
- SANTOS-FILHO, N. A. et al. Molecular cloning and biochemical characterization of a myotoxin inhibitor from *Bothrops alternatus* snake plasma. **Biochimie**, v. 93, n. 3, p. 583-592, 2011.
- SASA, M. Diet and snake venom evolution: Can local selection alone explain intraspecific venom variation? **Toxicon**, v.37, p. 249-252, 1999.
- SAZIMA, I. Um estudo comportamental da jararaca, *Bothrops jararaca*, com uso de marcas naturais. **Mem. Inst. Butantan**, v. 50, p. 83-99, 1988.
- SAZIMA, I. Natural History of the jararaca pitvipers, *Bothrops jararaca*. In: CAMPBELL, J. A., BRODIEYR, E. D. (Ed.). **Biology of the pitvipers**. Tyler: Selva, 1992, p. 199-216.
- SCHALOSKE, R. H; DENNIS, E. A. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1761, p. 1246-1259, 2006.
- SCHULTZ, J. et al. SMART: A web based tool for the study of genetically mobile domains. **Nucleic Acids Res.**, v. 28, n. 1, p. 231-240. 2000.
- SCHWARTZ, T. S. et al. A garter snake transcriptome: pyrosequencing, de novo assembly, and sex-specific differences. **BMC Genomics**, v. 7, n. 11:694, 2010.
- SCHWEITZ, H. et al. Calcicludine, a venom peptide of the Kunitz-type protease inhibitor family, is a potent blocker of high-threshold Ca^{2+} channels with a high affinity for L-type channels in cerebellar granule neurons. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 91, p. 878-882, 1994.
- SHAFQAT, J.; ZAIDI, Z. H.; JÖRNVALL, H. Purification and characterization of a chymotrypsin Kunitz inhibitor type of polypeptide from the venom of cobra (*Naja naja naja*). **FEBS Lett.**, v. 275, n. 1-2, p. 6-8, 1990a.
- SHAFQAT, J. et al. Primary structure and functional properties of cobra (*Naja naja naja*) venom Kunitz-type trypsin inhibitor. **Eur. J. Biochem.**, v. 194, n. 2, p. 337-341, 1990b.
- SHIOJIRI, N. Analysis of differentiation of hepatocytes and bile duct cells in developing mouse liver by albumin immunofluorescence. **Dev. Growth. Differ.**, v. 26, p. 555-561, 1984.
- SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, v. 45, p. 1115-1132, 2005.
- SGRIGNOLLI, L. R. et al. Acute kidney injury caused by *Bothrops* snake venom. **Nephron. Clin. Pract.**, v. 119, p. 131–137, 2011.

SI-TAYEB, K.; LEMAIGRE, F. P.; DUNCAN, S. A. Organogenesis and Development of the liver. **Develop. Cell**, v. 18, p. 175-189, 2010.

SOARES, A. M. et al. Structural and functional analysis of BmjMIP, a phospholipase A2 myotoxin inhibitor protein from *Bothrops moojeni* snake plasma. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 302, n. 2, p. 193-200, 2003.

STÁBELI, R. G. et al. Cytotoxic L-amino acid oxidase from *Bothrops moojeni*: biochemical and functional characterization. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 41, 132–140, 2007.

STERKY, F.; LUNDEBERG, J. Sequence analysis of genes and genomes. **J. Biotechnol.**, v. 76, p. 1-31, 2000.

STRAIGHT, R.; GLENN, J. L.; SNYDER, C. C. Antivenom activity of rattlesnake blood plasma. **Nature**, v. 261, p. 259–260, 1976.

SUN, M. Z. et al. Biochemical, functional and structural characterization of Akbu-LAAO: a novel snake venom L-amino acid oxidase from *Agkistrodon blomhoffii ussurensis*. **Biochimie**, v. 92, p. 343–349, 2010.

SUTO, K. et al. Crystal structures of novel vascular endothelial growth factors (VEGF) from snake venoms: insight into selective VEGF binding to kinase insert domain-containing receptor but not to fms-like tyrosine kinase-1. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 3, p. 2126-2131, 2005.

TAKAHASHI, H.; SUZUKI, T.; IWANAGA, S. Isolation of a novel inhibitor of kallikrein, plasmin and trypsin from venom of Russell's viper (*Vipera russelli*). **FEBS Lett.**, v. 27, p. 207, 1972.

TAKAHASHI, H.; IWANAGA, S.; SUZUKI, T. Distribution of proteinase inhibitors in snake venoms. **Toxicon**, v. 12, p. 193-197, 1974.

TAKEDA, S.; TAKEYA, H.; IWANAGA, S. Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1824, p. 164-176, 2012.

TAKEYA, H.; IWANAGA, S. Proteases that induce hemorrhage. In: BAILEY, G.S (Ed.), **Enzymes from Snake Venom**, Colorado, Alaken: 1998, p. 11-38.

TAMURA, K. et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Mol. Biol. Evol.**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

TANIZAKI, M. M. et al. Purification of a proteinase inhibitor from the plasma of *Bothrops jararaca* (jararaca). **Toxicon**, v. 29, p. 673-681, 1991.

TATUSOV, R. L. et al. The COG database: an updated version includes eukaryotes. **BMC Bioinf.**, v.4, n. 41, 2003.

TERRA, R. M. S. et al. Proteomic profiling of snake venom metalloproteinases (SVMPs): Insights into venom induced pathology. **Toxicon**, v. 54, p. 836–844, 2009.

THOENEN, H.; BARDE, Y. A. Physiology of nerve growth factor. **Physiol. Rev.**, v. 60, p. 1284-1235, 1980.

THWIN, M. M.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Snake envenomation and protective natural endogenous proteins: a mini review of the recent developments (1991-1997). **Toxicon**, v. 36, p. 1471–1482, 1998.

THWIN, M. M. et al. Recombinant Antitoxic and antiinflammatory factor from the Nonvenomous snake *Python reticulatus*: Phospholipase A₂ inhibition and venom neutralizing potential. **Biochemistry**, v. 39, p. 9604-9611, 2000.

TOKUNAGA, Y.; YAMAZAKI, Y.; MORITA, T. Specific distribution of VEGF-F in Viperinae snake venoms: Isolation and characterization of a VEGF-F from the venom of *Daboia russelli siamensis*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 439, p. 241–247, 2005.

TOMIHARA, Y. et al. Purification of an antihemorrhagic factor from the serum of the non-venomous snake *Dinodon semicarinatus*. **Toxicon**, v. 26, p. 420–423, 1988.

TRAVIS, J. SALVESON. G. S. Human plasma proteinase inhibitors. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 52, p. 655-709, 1983.

TRIPLETT, D. A. Coagulation and bleeding disorders: review and update. **Clin. Chem.**, v. 46, p. 1260-1269. 2000.

TRUMMAL, K. et al. Molecular diversity of snake venom nerve growth factors. **Toxicon**, v. 58, p. 363–368, 2011.

UETZ, P. (Ed.). **The reptile database**. Disponível em: <<http://www.reptile-database.org>>. Acesso em: 10 Feb 2011.

VALENTE, R. H. et al. Bj46a, snake venom metalloproteinase inhibitor: Isolation, characterization, cloning and insights into its mechanism of action. **Eur. J. Biochem.**, v. 268, p. 3042-3052, 2001.

VALENTE, R. H. et al. *Bothrops insularis* venomomics: A proteomic analysis supported by transcriptomic-generated sequence data. **J. Proteomics**, v. 72, p. 241–255, 2009.

VAN VLIET, A. H. M. Next generation sequencing of microbial transcriptomes: challenges and opportunities. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 302, n. 1, p. 1-7, 2010.

VARANDA, E. A.; GIANNINI, M. J. S. Bioquímica de venenos de serpentes. In: BARRAVIERA, B. **Venenos: aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos**. São Paulo: EPUB, 1999. p. 205–223.

WAGSTAFF, S. C. et al. Molecular characterisation of endogenous snake venom metalloproteinase inhibitors. **Biochem. and Biophys. Res. Commun.**, v. 365, p. 650–656, 2008.

WANG, Y-M.; WANG, S-R.; TSAI, I-H. Serine protease isoforms of *Deinagkistrodon acutus* venom: cloning, sequencing and phylogenetic analysis. **Biochem. J.**, v.354, p. 161–168, 2001.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary too for transcriptomes. **Nat. Ver. Genet.**, v. 10, n.1, p. 57–63, 2009.

WARRELL, D. A. Sanke bite. **Lancet.**, v. 375, p. 77–88, 2010.

WEI, J. F. et al. Purification, characterization and biological activities of the L-amino acid oxidase from *Bungarus fasciatus* snake venom. **Toxicon**, v. 54, p. 262–271, 2009.

WEISSENBERG, S.; OVADIA, M.; KOCHOVA, E. Inhibition of the proteolytic activity of hemorrhagin-e from *Crotalus atrox* venom by antihemorrhagins from homologous serum. **Toxicon**, v. 30, p. 591–597, 1992.

WEIS, W. I.; TAYLOR, M. E.; DRICKAMER, K. The C-type lectin superfamily in the immune system. **Immunol. Rev.**, v. 163, p. 19–34, 1998.

WHITE, J. Snake venoms and coagulopathy. **Toxicon**, v. 45, p. 951–967, 2005.

WISNER, A. S.; BOM, B. C. Snake venom proteinases as tools in hemostasis studies: Structure-function relationship of a plasminogen activator purified from *Trimeresurus stejnegeri* venom. **Haemostasis**, v. 31, p. 133–140, 2001.

YAMADA, D.; SEKIYA, F.; MORITA, T. Prothrombin and factor X activator activities in the venoms of Viperidae snakes. **Toxicon**, v. 35, p. 1581–1589, 1997

YAMAKAWA, Y.; OMORI-SATOH, T. Primary structure of the antihemorrhagic factor in serum of the Japanese Habu: a snake venom metalloproteinase inhibitor with a double headed cystatin domain. **J. Biochem.**, v.112, p. 583–589, 1992.

YAMAMOTO, S. et al. ADAM family proteins in the immune system. **Immunol. Today**, v. 20, p. 278–284, 1999.

YAMASHITA, T. et al. Comprehensive gene expression profile of a normal human liver. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v. 269, p. 110–116, 2000.

YAMAZAKI, Y.; HYODO, F.; MORITA, T. Wide distribution of cysteine-rich secretory proteins in snake venoms: isolation and cloning of novel snake venom cysteine-rich secretory proteins. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 412, p. 133-141, 2003.

YAMAZAKI, Y.; MORITA, T. Structure and function of snake venom cysteine-rich secretory proteins. **Toxicon**, v. 44, p. 227-231, 2004.

YAMAZAKI, Y.; MORITA, T. Molecular and functional diversity of vascular endothelium growth factor. **Mol. Divers.**, v. 10, n. 4, p. 515-527, 2006.

YAMAZAKI, Y. et al. Snake venom vascular endothelial growth factors (VEGF-Fs) exclusively vary their structures and functions among species. **J. Biol. Chem.**, v. 284, p. 9885-9891, 2009.

YU, Y. et al. A comparative analysis of liver transcriptome suggests divergent liver function among human, mouse and rat. **Genomics**, v. 96, p. 281–289, 2010.

ZELANIS, A. et al. Analysis of the ontogenetic variation in the venom proteome/peptidome of *Bothrops jararaca* reveals different strategies to deal with prey. **J. Proteome Res.**, v. 9, p. 2278-2291, 2010.

ZELANIS, A. et al. *Bothrops jararaca* venom proteome rearrangement upon neonate to adult transition. **Proteomics**, v. 11, p. 4218-4228, 2011.

ZELANIS, A. et al. A transcriptomic view of the proteome variability of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. **PloS Negl. Trop. Dis.**, v. 6, n. 3, e1554, 2012.

ZHANG, S. et al. Characterization of a thrombin-like serine protease, Kangshuanmei, isolated from the venom of a Chinese snake, *Agkistrodon halys brevicaudus stejnegeri*. **J. Nat. Toxins.**, v. 10, n. 3, p. 221-38, 2001.

ZHANG, Y. J. et al. Molecular characterization of *Trimeresurus stejnegeri* venom L-amino acid oxidase with potential anti-HIV activity, **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 309, p. 598–604, 2003.

ZHANG, Q. et al. Identification of a novel thrombin-like phospholipase A2 from *Gloydius ussuriensis* snake venom. **Blood. Coagul. Fibrinol.**, v.18, n. 8, p. 723-729, 2007.

ZINGALI, R. B. et al. Bothrojaracin, a new thrombin inhibitor isolated from *Bothrops jararaca* venom: Characterization and mechanism of thrombin inhibition. **Biochemistry**, v. 32, p. 10794–10802, 1993.

ZUG, G. R.; VITT, L. J.; CALDWELL, J. P. **Herpetology**: an introductory biology of amphibians and reptiles. San Diego: Academic Press. 2001.

ZULIANI, J. P. et al. Snake venom L-amino acid oxidase: some consideration about their functional characterization. **Protein Pept. Lett.**, v. 16, p. 908-912, 2009.

ZUPUNSKI, V.; KORDIS, D.; GUBENSEK, F. Adaptive evolution in the snake venom Kunitz/BTTI protein family. **FEBS. Lett.**, v. 547, n. 1-3, p. 131-136, 2003.

APÊNDICE A

**Descrição dos *clusters* identificados na biblioteca de
cDNA do fígado da *B. jararaca***

Quadro A1 - Descrição dos *clusters* identificados na biblioteca de cDNA do fígado da *B. jararaca*.

Cluster	Best match to NR protein database	E- value
BJ-Liver_asb-403	3-hydroxybutyrate dehydrogenase type 2-like	2E-050
BJ-Liver_asb-517	40S ribosomal protein S16-like	1E-044
BJ-Liver_asb-776	40S ribosomal protein S17-like	9E-063
BJ-Liver_asb-777	40S ribosomal protein S17-like	8E-056
BJ-Liver_asb-139	40S ribosomal protein S20-like isoform 2	3E-059
BJ-Liver_asb-84	40S ribosomal protein S8	5E-094
BJ-Liver_asb-588	60S ribosomal protein L10a-like	7E-093
BJ-Liver_asb-696	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase-like	5E-080
BJ-Liver_asb-719	ABC transporter ATP-binding/permease	4.4
BJ-Liver_asb-621	actin	8E-018
BJ-Liver_asb-782	active breakpoint cluster region-related protein-like, partial	0.040
BJ-Liver_asb-279	Adenylosuccinate lyase; Short=ASL; AltName: Full=Adenylosuccinase; Short=ASase	1E-118
BJ-Liver_asb-238	aldolase B fructose-bisphosphate	4E-041
BJ-Liver_asb-370	alpha-2-macroglobulin-like	1E-066
BJ-Liver_asb-52	alpha-2-macroglobulin-like	6E-061
BJ-Liver_asb-486	Alpha-phospholipase A2 inhibitor clone 06/08; Flags: Precursor	1E-004
BJ-Liver_asb-576	angiotensinogen-like	9E-067
BJ-Liver_asb-739	Antihemorrhagic factor cHLP-B; AltName: Full=Chinese mamushi HSF-like protein B;	1E-119
BJ-Liver_asb-66	apolipoprotein B-100-like	6E-049
BJ-Liver_asb-287	ATP synthase lipid-binding protein, mitochondrial	2E-024
BJ-Liver_asb-177	ATP/GTP binding protein	4.1
BJ-Liver_asb-519	ATPase 6	1E-023
BJ-Liver_asb-308	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative, isoform CRA_a	1E-020
BJ-Liver_asb-371	beta-galactosidase a-peptide	2E-009
BJ-Liver_asb-684	beta-galactosidase a-peptide	5E-012
BJ-Liver_asb-508	bifunctional purine biosynthesis protein PURH-like	1E-095
BJ-Liver_asb-544	bifunctional purine biosynthesis protein PURH-like	3E-072
BJ-Liver_asb-443	biogenesis of lysosome-related organelles complex-1 subunit 2-like	2E-034
BJ-Liver_asb-90	bone morphogenetic protein 1-like, partial	2E-018
BJ-Liver_asb-626	c4b-binding protein alpha chain-like	1.4
BJ-Liver_asb-265	candidate odorant receptor (AGAP009392-PA)	6.0
BJ-Liver_asb-794	CHK1 checkpoint-like protein	1E-017
BJ-Liver_asb-173	CHK1 checkpoint-like protein	5E-007

BJ-Liver_asb-214	complement component C9-like	1E-074
BJ-Liver_asb-729	conserved hypothetical protein	4E-007
BJ-Liver_asb-211	conserved hypothetical protein	6.6
BJ-Liver_asb-54	conserved hypothetical protein	0.47
BJ-Liver_asb-587	Contains similarity to CGI-141 protein from Homo sapiens gb AF151899. ESTs	6.6
BJ-Liver_asb-92	CR1-3	3E-010
BJ-Liver_asb-345	cysteine and glycine-rich protein 1-like	4E-041
BJ-Liver_asb-753	cytochrome b	4.9
BJ-Liver_asb-305	Cytochrome C Oxidase subunit 2	3E-034
BJ-Liver_asb-763	cytochrome c oxidase subunit I	2E-010
BJ-Liver_asb-765	cytochrome c oxidase subunit I	1E-078
BJ-Liver_asb-764	cytochrome c oxidase subunit I	1E-107
BJ-Liver_asb-784	cytochrome c oxidase subunit III	1E-118
BJ-Liver_asb-633	cytochrome P450 3A12-like	9E-048
BJ-Liver_asb-766	cytospin-A	5.1
BJ-Liver_asb-578	d-3-phosphoglycerate dehydrogenase-like	7E-031
BJ-Liver_asb-152	eukaryotic translation elongation factor 1	3E-046
BJ-Liver_asb-789	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit K-like	1E-105
BJ-Liver_asb-790	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit K-like	1E-102
BJ-Liver_asb-133	eukaryotic translation initiation factor 4B	3E-024
BJ-Liver_asb-388	exodeoxyribonuclease V, gamma subunit	6.5
BJ-Liver_asb-593	ferritin light chain, oocyte isoform-like	4E-085
BJ-Liver_asb-404	fibrinogen beta chain-like	1E-018
BJ-Liver_asb-387	fibrinogen beta chain-like	5E-064
BJ-Liver_asb-201	fibronectin-like	2E-021
BJ-Liver_asb-595	fructose-1,6-bisphosphatase 1-like	1E-118
BJ-Liver_asb-686	gamma-phospholipase A2 inhibitor	1E-116
BJ-Liver_asb-459	gibberellin 2-oxidase, putative	1.8
BJ-Liver_asb-354	glutathione S-transferase A1-like isoform 1	7E-089
BJ-Liver_asb-439	glutathione S-transferase kappa 1-like	1E-005
BJ-Liver_asb-586	glycine dehydrogenase	3E-008
BJ-Liver_asb-167	hyaluronan-binding protein 2-like	6E-037
BJ-Liver_asb-772	hypothetical 18K protein - goldfish mitochondrion	2E-009
BJ-Liver_asb-771	hypothetical 18K protein - goldfish mitochondrion	8E-010
BJ-Liver_asb-421	hypothetical protein	9E-021
BJ-Liver_asb-108	hypothetical protein	9.1
BJ-Liver_asb-134	hypothetical protein	1.1
BJ-Liver_asb-149	hypothetical protein	4.2
BJ-Liver_asb-151	hypothetical protein	1E-005
BJ-Liver_asb-33	hypothetical protein	0.068
BJ-Liver_asb-484	hypothetical protein	5.9

BJ-Liver_asb-501	hypothetical protein	6.5
BJ-Liver_asb-687	hypothetical protein	0.12
BJ-Liver_asb-718	hypothetical protein	1.7
BJ-Liver_asb-755	hypothetical protein	7E-004
BJ-Liver_asb-591	hypothetical protein	0.45
BJ-Liver_asb-212	hypothetical protein AND_07356	2E-004
BJ-Liver_asb-652	hypothetical protein BBU94A_I15	3.1
BJ-Liver_asb-745	hypothetical protein CBC_0390	0.068
BJ-Liver_asb-748	hypothetical protein CBC_0390	0.018
BJ-Liver_asb-740	hypothetical protein CBC_0390	1.7
BJ-Liver_asb-747	hypothetical protein CBC_0390	0.040
BJ-Liver_asb-783	hypothetical protein CBC_0390	0.015
BJ-Liver_asb-741	hypothetical protein CBC_0390	0.041
BJ-Liver_asb-743	hypothetical protein CBC_0390	0.15
BJ-Liver_asb-742	hypothetical protein CBC_0390	0.16
BJ-Liver_asb-744	hypothetical protein CBC_0390	0.16
BJ-Liver_asb-85	hypothetical protein CBG_14686	8.5
BJ-Liver_asb-683	hypothetical protein CC1G_06355	0.98
BJ-Liver_asb-426	hypothetical protein EAI_02279	0.45
BJ-Liver_asb-75	hypothetical protein GobsU_26581	0.43
BJ-Liver_asb-299	hypothetical protein HMPREF0240_02722	4.7
BJ-Liver_asb-689	hypothetical protein LOAG_06327	5.0
BJ-Liver_asb-477	hypothetical protein LOC100503705	2E-006
BJ-Liver_asb-768	hypothetical protein LOC100507828	2E-025
BJ-Liver_asb-631	hypothetical protein LOC100562920	2E-071
BJ-Liver_asb-510	hypothetical protein LOC100565429	1E-015
BJ-Liver_asb-366	hypothetical protein LVIS_0068	3.8
BJ-Liver_asb-568	hypothetical protein Mlab_1747	4.3
BJ-Liver_asb-307	hypothetical protein Mtub2_12463	2E-005
BJ-Liver_asb-688	hypothetical protein NECHADRAFT_91372	1.3
BJ-Liver_asb-464	hypothetical protein OsJ_01236	0.23
BJ-Liver_asb-664	hypothetical protein SORBIDRAFT_03g026760	2E-009
BJ-Liver_asb-770	hypothetical protein SORBIDRAFT_05g000453	1E-020
BJ-Liver_asb-441	hypothetical protein TATV_DAH68_216	0.003
BJ-Liver_asb-769	hypothetical protein TATV_DAH68_216	4E-013
BJ-Liver_asb-592	hypothetical protein TcasGA2_TC030677	2.9
BJ-Liver_asb-49	hypothetical protein UM01082.1	0.027
BJ-Liver_asb-316	hypothetical protein VHA_002751	4.9
BJ-Liver_asb-28	hypothetical protein XGA_1478	3E-005
BJ-Liver_asb-70	hypothetical protein XGA_1478	2.3
BJ-Liver_asb-775	hypothetical protein, conserved in Plasmodium species	0.47

BJ-Liver_asb-773	hypothetical protein, conserved in Plasmodium species	0.023
BJ-Liver_asb-774	hypothetical protein, conserved in Plasmodium species	1.9
BJ-Liver_asb-159	hypothetical protein, partial	8E-019
BJ-Liver_asb-386	hypothetical protein, partial	5E-019
BJ-Liver_asb-65	hypothetical protein, partial	7E-005
BJ-Liver_asb-655	hypothetical protein, partial	0.040
BJ-Liver_asb-306	inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3-like	1E-105
BJ-Liver_asb-380	inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3-like	3E-058
BJ-Liver_asb-297	isocitrate dehydrogenase	0.15
BJ-Liver_asb-213	L-lactate dehydrogenase B chain; Short=LDH-B gi 5305417 gb AAD41641.1 AF072584_1	2E-033
BJ-Liver_asb-45	lymphatic vessel endothelial hyaluronic acid receptor 1-like	6E-038
BJ-Liver_asb-520	lymphatic vessel endothelial hyaluronic acid receptor 1-like	4E-010
BJ-Liver_asb-119	mCG145257	0.20
BJ-Liver_asb-88	multi-sensor signal transduction histidine kinase	2.9
BJ-Liver_asb-460	NADH dehydrogenase subunit 1	8E-090
BJ-Liver_asb-455	NADH dehydrogenase subunit 4	1.8
BJ-Liver_asb-422	nicotinamide N-methyltransferase-like	6E-080
BJ-Liver_asb-731	ORF2-encoded protein	0.21
BJ-Liver_asb-767	PAS/PAC sensor signal transduction histidine kinase	1.6
BJ-Liver_asb-545	phosphoadenosine phosphosulfate reductase	0.78
BJ-Liver_asb-296	phosphoglucose isomerase	1E-031
BJ-Liver_asb-690	phospholipase A2 inhibitor	3E-098
BJ-Liver_asb-132	plasma protease C1 inhibitor-like	7E-014
BJ-Liver_asb-793	predicted protein	9E-034
BJ-Liver_asb-304	predicted protein	0.58
BJ-Liver_asb-38	predicted protein	2.5
BJ-Liver_asb-746	predicted protein	3.9
BJ-Liver_asb-606	proline rich 12	2.3
BJ-Liver_asb-160	protocadherin gamma-A6-like	6.6
BJ-Liver_asb-164	protodermal factor 1.3	0.002
BJ-Liver_asb-791	pulmonary surfactant-associated protein A	5E-025
BJ-Liver_asb-792	pulmonary surfactant-associated protein A1-like	8E-044
BJ-Liver_asb-239	putative molybdopterin synthase large subunit MOCS2B	2E-009
BJ-Liver_asb-234	putative O-demethylpuromycin O-methyltransferase	4.5
BJ-Liver_asb-499	putative outer membrane protein probably involved in nutrient binding	9.1
BJ-Liver_asb-155	putative ribosomal protein L7a	6E-030
BJ-Liver_asb-94	ribose-phosphate pyrophosphokinase 2	7E-013
BJ-Liver_asb-292	ribosomal protein S3	3.1
BJ-Liver_asb-400	serum albumin	1E-087
BJ-Liver_asb-757	serum albumin	1E-159

BJ-Liver_asb-382	serum albumin	2E-050
BJ-Liver_asb-383	serum albumin	9E-011
BJ-Liver_asb-756	serum albumin	0.26
BJ-Liver_asb-178	serum albumin precursor - monocled cobra gi 469861 emb CAA55333.1 cobra serum	4E-004
BJ-Liver_asb-754	similar to AMP-activated protein kinase gamma	3.8
BJ-Liver_asb-786	similar to conserved hypothetical protein, partial	5E-010
BJ-Liver_asb-157	similar to GG20703	8E-014
BJ-Liver_asb-89	similar to heparin cofactor II, partial	1E-026
BJ-Liver_asb-463	similar to initiation factor 4D	3E-047
BJ-Liver_asb-538	similar to Molybdenum cofactor synthesis protein 2 large subunit (Molybdopterin	5E-022
BJ-Liver_asb-344	similar to PALM	9E-015
BJ-Liver_asb-187	similar to plasminogen	4E-014
BJ-Liver_asb-168	similar to Probable phospholipid-transporting ATPase IF (ATPase class I type	2E-063
BJ-Liver_asb-452	similar to putative cytochrome c oxidase subunit VIIc	3E-004
BJ-Liver_asb-494	similar to Ran binding protein 11	0.054
BJ-Liver_asb-376	similar to Ribosomal protein L34	2E-041
BJ-Liver_asb-509	similar to ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1	2E-044
BJ-Liver_asb-749	Small serum protein 1; Short=SSP-1; Flags: Precursor	7E-042
BJ-Liver_asb-751	small serum protein-1	7E-045
BJ-Liver_asb-750	small serum protein-1	2E-045
BJ-Liver_asb-634	threonine aldolase, low-specificity	1.6
BJ-Liver_asb-179	Tm227 salivary lipocalin	0.60
BJ-Liver_asb-458	TNF receptor-associated factor 5-like	0.007
BJ-Liver_asb-291	transferrin	2E-085
BJ-Liver_asb-575	transferrin	4E-099
BJ-Liver_asb-491	tryptophanyl-tRNA synthetase	1E-010
BJ-Liver_asb-472	UHRF1-binding protein 1-like	0.002
BJ-Liver_asb-250	uncharacterized protein C12orf62-like	0.27
BJ-Liver_asb-632	unclassified ABC-type transport system permease	6.5
BJ-Liver_asb-109	Unknown product	
BJ-Liver_asb-11	Unknown product	
BJ-Liver_asb-13	Unknown product	
BJ-Liver_asb-140	Unknown product	
BJ-Liver_asb-158	Unknown product	
BJ-Liver_asb-180	Unknown product	
BJ-Liver_asb-203	Unknown product	
BJ-Liver_asb-225	Unknown product	
BJ-Liver_asb-226	Unknown product	
BJ-Liver_asb-228	Unknown product	

BJ-Liver_asb-229	Unknown product	
BJ-Liver_asb-230	Unknown product	
BJ-Liver_asb-236	Unknown product	
BJ-Liver_asb-243	Unknown product	
BJ-Liver_asb-244	Unknown product	
BJ-Liver_asb-254	Unknown product	
BJ-Liver_asb-260	Unknown product	
BJ-Liver_asb-266	Unknown product	
BJ-Liver_asb-300	Unknown product	
BJ-Liver_asb-313	Unknown product	
BJ-Liver_asb-333	Unknown product	
BJ-Liver_asb-338	Unknown product	
BJ-Liver_asb-339	Unknown product	
BJ-Liver_asb-340	Unknown product	
BJ-Liver_asb-343	Unknown product	
BJ-Liver_asb-416	Unknown product	
BJ-Liver_asb-428	Unknown product	
BJ-Liver_asb-437	Unknown product	
BJ-Liver_asb-438	Unknown product	
BJ-Liver_asb-444	Unknown product	
BJ-Liver_asb-448	Unknown product	
BJ-Liver_asb-449	Unknown product	
BJ-Liver_asb-451	Unknown product	
BJ-Liver_asb-457	Unknown product	
BJ-Liver_asb-466	Unknown product	
BJ-Liver_asb-476	Unknown product	
BJ-Liver_asb-478	Unknown product	
BJ-Liver_asb-481	Unknown product	
BJ-Liver_asb-482	Unknown product	
BJ-Liver_asb-485	Unknown product	
BJ-Liver_asb-500	Unknown product	
BJ-Liver_asb-507	Unknown product	
BJ-Liver_asb-518	Unknown product	
BJ-Liver_asb-543	Unknown product	
BJ-Liver_asb-546	Unknown product	
BJ-Liver_asb-558	Unknown product	
BJ-Liver_asb-565	Unknown product	
BJ-Liver_asb-566	Unknown product	
BJ-Liver_asb-569	Unknown product	
BJ-Liver_asb-58	Unknown product	
BJ-Liver_asb-580	Unknown product	

BJ-Liver_asb-609	Unknown product	
BJ-Liver_asb-619	Unknown product	
BJ-Liver_asb-639	Unknown product	
BJ-Liver_asb-656	Unknown product	
BJ-Liver_asb-660	Unknown product	
BJ-Liver_asb-694	Unknown product	
BJ-Liver_asb-705	Unknown product	
BJ-Liver_asb-708	Unknown product	
BJ-Liver_asb-74	Unknown product	
BJ-Liver_asb-778	Unknown product	
BJ-Liver_asb-780	Unknown product	
BJ-Liver_asb-81	Unknown product	
BJ-Liver_asb-87	Unknown product	
BJ-Liver_asb-253	Unknown product	
BJ-Liver_asb-585	Unknown product	
BJ-Liver_asb-596	Unknown product	
BJ-Liver_asb-682	Unknown product	
BJ-Liver_asb-779	Unknown product	
BJ-Liver_asb-663	unnamed protein product	2E-027
BJ-Liver_asb-594	unnamed protein product	0.48
BJ-Liver_asb-471	vascular endothelial growth factor receptor 3-like	1E-010
BJ-Liver_asb-579	yrkr	8.6
BJ-Liver_asb-91	zinc finger protein 197-like	2E-023
BJ-Liver_asb-577	zinc finger protein 593-like	0.63
BJ-Liver_asb-325	zinc finger protein 828-like	2E-045