

**POLIANA GARCIA CORRÊA**

**Prospecção gênica e atividade antimicrobiana  
de  $\beta$ -defensina-símiles em viperídeos**

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

**POLIANA GARCIA CORRÊA**

**Prospecção gênica e atividade antimicrobiana  
de  $\beta$ -defensina-símiles em viperídeos**

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. Nancy Oguiura

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se à disposição tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

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

Corrêa, Poliana Garcia.

Prospecção gênica e atividade antimicrobiana de beta-defensina-símiles de viperídeos / Poliana Garcia Corrêa. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Nancy Oguiura.

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: Polimorfismo de genes de toxinas e de defensinas de serpentes.

Versão do título para o inglês: Gene survey and antimicrobial activity of beta-defensin-like in viperid.

1. Evolução molecular 2. Agentes antimicrobianos 3. Imunidade natural 4. Filogenia 5. Polimorfismo 6. Viperidae I. Oguiura, Profa. Dra. Nancy II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0114/2013

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

---

Candidato(a): Poliana Garcia Corrêa.

Título da Dissertação: Prospecção gênica e atividade antimicrobiana de beta-defensina-símiles de viperídeos .

Orientador(a): Profa. Dra. Nancy Oguiura.

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: .....

Aos meus pais Cida e Valmir,  
meus irmãos Léo e Rafa e a  
todos meus familiares.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer a todos que colaboraram de alguma forma para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho. Pelo longo caminho percorrido, com muitos tropeços e quedas, mas finalmente concluído. Mas sem a sua ajuda, dedicação, determinação, e empurrões este trabalho não teria saído, Dra Nancy Oguiura. Obrigada por me mostrar sempre o que é fazer ciência de verdade.

Ao Dr. Álvaro R. B. Prieto-da-Silva do Laboratório de Genética pelo seu modo encantador de fazer ciência, por sua didática, paciência, perseverança e toda colaboração no preparo dos moldes dos peptídeos, e por me fazer enxergar sempre além da tese.

Ao Dr. Pedro Ismael da Silva Jr do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada por ter me recebido sempre de portas abertas em seu laboratório, por sempre me fornecer qualquer material ou reagente de última hora, pela ajuda com a purificação dos peptídeos, pelas cepas cedidas de *Micrococcus luteus* e pelo sua dedicação à pesquisa e incentivo aos seus alunos.

Ao Dr. Otavio Augusto Vuolo Marques e Dra. Selma Almeida-Santos por aceitarem minha transferência da Seção de Envase, por me receberem em seu laboratório e ao Dr. Otavio por me permitir desenvolver o projeto de mestrado no mesmo local de trabalho.

À Dra. Anatércia B. Yano por conceder a minha transferência da Seção de Envase para o laboratório de Ecologia e Evolução.

À Dra Maria José de J. Silva por compartilhar o espaço de seu laboratório com nosso grupo e pela visão crítica desse projeto e pelos momentos agradáveis desfrutados em sua companhia.

À Dra. Kathleen F. Grego do Laboratório de Herpetologia pela colaboração e amostras fornecidas de sangue das *Lachesis*.

À Ms. Taís Machado e ao Dr. Rogério L. Zacariotti pelas amostras fornecidas de tecidos de serpentes.

Ao Sr. Valdir J. Germano e a Daniela P.T. Gennari pelos tecidos fornecidos das serpentes da Coleção Alphonse Richard Hoge.

À Dra Márcia Regina Franzolin do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan pelas cepas cedidas de flora bacteriana de serpentes.

Ao Dr. Paulo Lee Ho do Laboratório de Biotecnologia pela colaboração e acesso ao seu laboratório.

Ao Ms. Leonardo S. Kobashi pela realização de todo o sequenciamento automático de nossas amostras de DNA.

Ao professor Dr. Moacir Wuo pelos conselhos e ajuda na finalização do texto e por me fazer resgatar todo o aprendizado durante as disciplinas de Psicologia e Prática do Ensino do curso Licenciatura de Biologia na Universidade de Mogi das Cruzes.

Ao Dr. Paulo C. Cotrim por me apresentar o fascinante universo da Biologia Molecular de parasitos durante a iniciação científica.

À Dra. Ana Paula Z. S. de Pietri, Ms. Taís Machado, Keila Almeida, Dr. José S. L. Patané e Ms. Hebert Ferrarezzi por toda ajuda e tempo despendidos no preparo das matrizes, das filogenias, utilização dos programas e processamento dos dados gerados.

Aos amigos Aline Kawasaki, Leonardo Sanches e Thayane Ribeiro, parceiros de todas as horas, pelos momentos de aprendizado e descontração compartilhados dentro e fora do laboratório e muitas vezes virtualmente.

À minha grande amiga Giselia Belmira, grande companheira, pelas horas de sufoco em que precisei e pude contar com você. Pelas palavras de conforto, confiança e por acreditar sempre em mim.

À minha grande companheira em todos os momentos: de discussões intelectuais, desabafos, descontrações, discussões e conselhos do coração, Thaís Guedes.

A todos os meus amigos da Seção de Envase e Acondicionamento de Vacinas e Insumos, Formulação de Vacinas, Meios de Cultura, Controle Físico e Químico, Seção de Soros Hiperimunes, Garantia de Qualidade, Herpetologia, Biotecnologia, Genética, Parasitologia, Toxinologia Aplicada e demais que posso ter me esquecido.

Ao colegas de trabalho do Laboratório de Ecologia e Evolução: Kelly, Cris, Adriano, Adriana, Roberto, Maria, Vera, Darina, Regina e Marta, sem vocês minha jornada seria mais difícil.

Aos colegas de laboratório: Lorena, Taís, Elkin, Zé, Karina, Keila e Camilla pela amizade e coleguismo durante tantas horas que passamos no laboratório.

"... foi com muita derrota que nós aprendemos a vencer."

*Autor: Guardiola*

"A ciência, como um todo, não é nada mais do que um refinamento do pensar diário."

*Albert Einstein*

"Considerai tudo com alegria, meus irmãos, ao enfrentardes diversas provações, sabendo que esta qualidade provada da vossa fé produz perseverança. Mas, a perseverança tenha a sua obra completa, para que sejais completos e sãos em todos os sentidos, não vos faltando nada. Portanto, se alguém de vós tiver falta de sabedoria, persista ele em pedi-la a Deus, pois ele dá generosamente a todos, e sem censurar; e ser-lhe-á dada. Mas, persista ele em pedir com fé, em nada duvidando, pois quem duvida é semelhante a uma onda do mar, impelida pelo vento e agitada."

Livro de Tiago 1:2-6

## RESUMO

CORREA, P.G. **Prospecção gênica e atividade antimicrobiana de β-defensina-símiles em viperídeos.** 2013. 95f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

As defensinas são componentes do sistema imune inato de vertebrados; compreendem um grupo diverso de peptídeos catiônicos antimicrobianos, entre eles as β-defensinas, com uma característica estrutura rica em folhas β pregueadas e seis cisteínas conservadas com particular espaçamento e padrão de ligação. São bastante estudadas em mamíferos, mas há pouca informação em serpentes. Utilizando a técnica de PCR em DNA genômico, foram descritos 13 genes β-defensina-símiles em serpentes do gênero *Bothrops* e *Lachesis*. Os genes se organizaram em três exons e dois íntrons com exceção de *B. atrox\_defensinaB\_01* que tem apenas dois exons. Eles têm alta similaridade no exon1, íntrons 1 e 2, mas os exons 2 e 3 estão sob evolução acelerada. O tamanho do primeiro ítron variou bastante (0,4-2,0 kpb), entretanto o segundo era mais conservado (~153 pb). As sequências aminoacídicas deduzidas codificaram uma pré-β-defensina-símile com peptídeo sinal conservado e um peptídeo maduro. A região do peptídeo sinal é rica em Leu e as β-defensina-símiles maduras têm tamanho de cerca de 4,5kDa, carga líquida de +2 a +11 e um motivo conservado de cisteínas. A análise filogenética por máxima parcimônia revelou duas linhagens do gênero *Bothrops*. A conciliação de árvore de espécies com genes indicou oito eventos de duplicações e 24 extinções. Nossos resultados juntamente com dados prévios publicados indicam que o gene ancestral de β-defensina-símile pode ter três exons em vertebrados, pois peixes, lagartos e serpentes a possuem. Sua evolução ocorreu de acordo com o modelo de nascimento-e-morte. Peptídeos β-defensina-símiles sintéticos, reduzidos, obtidos de serpentes do gênero *Bothrops*, *Lachesis*, *Phalotris* e *Thamnodynastes* e β-defensina-humana-2 foram testados por ensaio de inibição de crescimento em meio líquido contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas de flora bacteriana de serpentes e de cepas ATCC. Os peptídeos com carga líquida maior que +6 apresentaram atividade inibitória contra *Escherichia coli* com concentração inibitória mínima (CIM) variando de 8 a 128 µg/ml, e contra *Citrobacter freundii* com CIM variando 8 a 128 µg/ml. Os peptídeos com carga líquida maior que +2 apresentaram atividade inibitória contra *Micrococcus luteus* de 2 a 128 µg/ml. Os peptídeos DefbLm02 e DefbBm02 apresentaram atividade inibitória parcial (50%) contra *Staphylococcus aureus* com CIM de 32 µg/ml e 64 µg/ml, respectivamente. Nenhum peptídeo apresentou atividade inibitória contra as cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Providencia rettgeri* e *Serratia marcescens*. A crotamina nativa foi mais ativa que a forma reduzida. O crotasin linear não apresentou atividade antimicrobiana contra as cepas testadas. Foi observado que os peptídeos mais positivamente carregados apresentaram atividade antimicrobiana contra as cepas testadas. Os resultados indicam que a carga líquida era a característica bioquímica mais importante na atividade antibiótica dos peptídeos β-defensina-símiles.

**Palavras-chave:** β-defensinas. Genes. Antimicrobianos. Serpentes. Crotamina. Evolução acelerada. Filogenia.

## ABSTRACT

CORREA, P.G. **Gene survey and antimicrobial activity of β-defensin-like in viperid.** 2013. 95f. Masters Thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Defensins are components of the vertebrate innate immune system; they comprise a diverse group of cationic antimicrobial peptides. Among them, β-defensins have a characteristic β-sheet-rich fold plus six conserved cysteines with particular spacing and intramolecular bonds. They have been fully studied in mammals, but there is little information about them in snakes. Using a PCR approach, we described 13 β-defensin-like sequences in *Bothrops* and *Lachesis* snakes. The genes are organized in three exons and two introns, with exception of *B. atrox\_defensinB\_01* which has only two exons. They showed high similarities in exon 1, intron 1 and intron 2, but exons 2 and 3 have undergone accelerated evolution. The size of first intron vary greatly (0.4 - 2.0 kb) whereas the second was conserved (~153 bp). The theoretical translated sequences encode a pre-β-defensin-like molecule with a conserved signal peptide (SP) and a mature peptide (MP). The SP are leucine-rich and the mature β-defensin-like molecules have a size around 4.5 kDa, net charge from +2 to +11, and the conserved cysteine motif. Phylogenetic analysis was done using maximum parsimony and the genus *Bothrops* displayed two separate lineages. The reconciliation of gene trees and species tree showed eight duplications and 24 extinctions. Our results together with previously published data indicated that the ancestral β-defensin-like gene may have three exons in vertebrates as fish, lizards and snakes possess. Their evolution occurred according to a birth-and-death model. Synthetic reduced β-defensin-like peptides from *Bothrops*, *Lachesis*, *Phalotris* and *Thamnodynastes* snakes and human-β-defensin-2 were tested against Gram-positive and Gram-negative bacteria from snake bacterial flora and ATCC strains using a modified microbroth dilution assay. The peptides with net charge greater than +6 showed inhibitory activities against *Escherichia coli* with minimal inhibitory concentration (MIC) ranging from 8 to 128 µg/ml, and against *Citrobacter freundii* with MIC ranging from 8 to 128 µg /ml. Peptides with net charge greater than +2 showed MIC against *Micrococcus luteus* from 2 to 128 µg/ml. Only DefLm02 and DefBm02 peptides showed partial inhibitory activity (50%) against *Staphylococcus aureus* with MIC of 32 µg/ml and 64 µg/ml, respectively. None peptide presented satisfactory inhibitory activity against *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Providencia rettgeri* and *Serratia marcescens*. The native form of crotamine was more active than reduced. Linear crotasin showed no antimicrobial activity against the tested species. It has been observed that the most cationic peptides showed antimicrobial activity against the bacterial strains tested. The results indicating that the positive net charge is the most important biochemical characteristic of β-defensin-like peptides to antibiotic activity.

**Keywords:** β-defensins. Genes. Antimicrobials. Snakes. Crotamine. Accelerated evolution. Phylogeny.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Estrutura tridimensional da $\beta$ -defensina humana-1(HBD-1) e da crotamina.....	20
<b>Figura 2</b> - Alinhamento das sequências aminoacídicas de $\alpha$ - e $\beta$ -defensinas humanas.....	21
<b>Quadro 1</b> - Origem dos tecidos cujos DNAs foram purificados para este trabalho... .....	31
<b>Figura 3</b> - Nomes das sequências $\beta$ -defensina-símiles de serpentes brasileiras da família Viperidae descritas neste trabalho.....	41
<b>Figura 4</b> - Modelos de estrutura dos genes $\beta$ -defensinas em aves, mamíferos, peixes, lagarto e serpentes. ....	43
<b>Figura 5</b> - Sítio de clivagem do peptídeo sinal calculado pelo Signal P das sequências aminoacídicas. ....	46
<b>Figura 6</b> - Alinhamento das sequências aminoacídicas das $\beta$ -defensina-símiles de viperídeos brasileiros. ....	47
<b>Figura 7</b> - Análise das taxas de substituição nas regiões codificantes. ....	49
<b>Figura 8</b> - Árvore filogenética com sequências de íntrons.....	50
<b>Figura 9</b> - Árvore filogenética com sequências de éxons (1, 2 e 3). ....	51
<b>Figura 10</b> - Árvore filogenética com sequências completas (éxons e íntrons concatenados) mais sequências de não $\beta$ -defensinas.....	53
<b>Figura 11</b> - Conciliação das árvores filogenéticas de genes e de espécies. ....	55
<b>Quadro 2</b> - Dados bioquímicos dos polipeptídeos $\beta$ -defensina-símiles de viperídeos. ....	56
<b>Figura 12</b> - Modelo de estrutura 3D de alguns dos peptídeos $\beta$ -defensina-símiles de serpentes.....	58

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1** - Tamanho e organização dos genes  $\beta$ -defensina-símiles de serpentes peçonhentas brasileiras ..... 42

**Tabela 2** - Similaridade entre as sequências  $\beta$ -defensina-símiles obtidas com os genes da crotamina (*Crt-p1*) e do crotasin (*Cts-p2*) de *C. d. terrificus* ..... 44

**Tabela 3** - Espectro de atividade antimicrobiana dos peptídeos  $\beta$ -defensina-símiles sintéticos de serpentes e humano.....61

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
ACN	Acetonitrila
AMP	"Antimicrobial peptides" (peptídeos antimicrobianos)
ATCC	"American Type Culture Collection"
BLAST	"Basic Local Alignment Search Tool" (ferramenta de busca local entre sequências)
BSA	Soro albumina bovino
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
CIM	Concentração inibitória mínima
CL	Cardiolipina
DDT	Ditiotreitol
DEFB-VL	"Defensin β venom-like" (β-defensina-símile de veneno de ornitorrinco)
DH5α	Cepa de <i>Escherechia coli</i>
dN/dS	Relação entre substituições nucleotídicas não-sinônimas e sinônimas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Deoxirribonucleotídeos trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetra acético
g	Força relativa de centrifugação
h	Hora
hBd2	β-defensina-humana-2
hBd3	β-defensina-humana-3
IAA	Iodoacetamida
kDa	Kilo Dalton
kpb	Kilo pares de base
L	Litro
LB	Meio de cultura Luria Bertani
LBA	Meio de cultura Luria Bertani com Ampicilina
LPS	Lipopolissacarídeo
m	Minuto
MALDI-TOF-MS	"Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight-Mass Spectrometry"
mg	Miligramma
MGD	"Mouse Genome Database"

MHC	Moléculas do complexo de histocompatibilidade
MIC	"Minimal inhibitory concentration"
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MP	Máxima parcimônia
MS	Ministério da Saúde
mtDNA	DNA mitocondrial
nm	Nanômetro
NMR	ressonância magnética nuclear
PAM	peptídeos antimicrobianos
pb	pares de base
PCR	reação de polimerização em cadeia
PDB	"Protein Data Bank"
PG	" phosphatidylglycerol "
pl	ponto isoelétrico
pmol	Picomol
PS	Fosfatidilserina
VER	"time reversible model"
SLAC	"single likelihood ancestor counting"
t	temperatura
TAE	TRIS, Acetato, EDTA
TFA	Ácido Trifluoro Acético
TNT	"Tree analysis using New Technology"
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TSB	"Trypticase Soy Broth" (caldo digerido de soja-caseína)
UFC	Unidade formadora de colônia
UTR	"Untranslated Region" (região não traduzível)

## LISTA DE SÍMBOLOS

Aminoácidos	3 letras	1 letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Aspartato ou ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamato ou ácido glutâmico	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	19
<b>1.1 Peptídeos antimicrobianos.....</b>	19
<b>1.2 β-defensinas .....</b>	20
<b>1.3 Mecanismo de ação dos antimicrobianos.....</b>	23
<b>1.4 Genes de defensinas.....</b>	25
<b>1.5 Filogenia e evolução das defensinas .....</b>	26
<b>1.6 Serpentes .....</b>	28
<b>1.7 Objetivos e justificativa .....</b>	30
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	31
<b>2.1 Purificação de DNA .....</b>	31
<b>2.2 Reação de PCR .....</b>	32
<b>2.3 Eletroforese em gel de agarose .....</b>	33
<b>2.4 Purificação e ligação de DNA .....</b>	33
<b>2.5 Transformação bacteriana (SAMBROOK et al., 1989).....</b>	33
<b>2.6 Verificação rápida de plasmídeo (ERIK et al., 1998).....</b>	34
<b>2.7 Purificação de plasmídeos .....</b>	34
<b>2.8 Digestão de DNA plasmidial .....</b>	34
<b>2.9 Reação de sequenciamento .....</b>	34
<b>2.10 Montagem e alinhamento das sequências .....</b>	35
<b>2.11 Análise filogenética.....</b>	35
<b>2.12 Análise da taxa evolutiva das sequências .....</b>	36
<b>2.13 Dados bioquímicos e modelagem tridimensional .....</b>	36
<b>2.14 Ensaios antimicrobianos .....</b>	37
<b>2.14.1 Peptídeos sintéticos: redução e alquilação.....</b>	38
<b>2.14.2 Micro-organismos .....</b>	38
<b>2.14.3 Ensaios de inibição de crescimento microbiano em meio líquido .....</b>	39
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	41
<b>3.1 Sequências β-defensina-símiles .....</b>	41
<b>3.2 Análise das sequências aminoacídicas .....</b>	45
<b>3.3 Taxas de substituição das regiões codificantes .....</b>	48

<b>3.4 Filogenia dos genes β-defensina-símiles.....</b>	<b>49</b>
<b>3.5 Conciliação da árvore gênica com a árvore de espécie .....</b>	<b>53</b>
<b>3.6 Dados bioquímicos .....</b>	<b>56</b>
<b>3.7 Modelagem tridimensional .....</b>	<b>57</b>
<b>3.8 Ensaios antimicrobianos .....</b>	<b>60</b>
<b>4 CONCLUSÕES .....</b>	<b>64</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>66</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>70</b>
<b>ANEXO A - Mapa de restrição do vetor de clonagem pTZ57R/T da Fermentas™.</b>	
.....	70
<b>ANEXO B - Alinhamento das sequências β-defensina-símiles de serpentes peçonhentas brasileiras .....</b>	<b>70</b>
<b>ANEXO C - Artigo de periódico .....</b>	<b>70</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Peptídeos antimicrobianos

O sistema imune protege os animais contra organismos invasores e podem ser de dois tipos: o inato e o adaptativo. O sistema imune inato (imunidade natural ou nativa) é a primeira linha de defesa, age rápida e inespecificamente respondendo da mesma maneira às infecções repetitivas. É composta por moléculas constitutivamente presentes e prontas para serem utilizadas antes mesmo de uma infecção: são as células fagocitárias (neutrófilos e macrófagos), células dendríticas, células assassinas naturais ("natural killers"), proteínas do sangue (incluindo sistema complemento e mediadores de inflamação) e barreiras físicas, como os epitélios, e químicas como os peptídeos antimicrobianos. Por outro lado, o sistema imune adaptativo ou adquirido, presente apenas nos vertebrados, tem como característica a resposta imunológica estimulada pela exposição a agentes infecciosos cuja magnitude e capacidade de defesa aumentam a cada exposição sucessiva a determinado micro-organismo. Age em uma segunda etapa, pois requer algum tempo para agir, é específico protegendo o animal contra reexposições ao mesmo patógeno, pois possui memória imunológica. Esse sistema é constituído pelos linfócitos, e seus produtos secretados como os anticorpos (ABBAS et al., 2011; GANZ, 2003; TORTORA et al., 2002; ZASLOFF, 2002).

Os peptídeos antimicrobianos, conhecidos também como PAMs, são moléculas pequenas, de 12 a 100 resíduos de aminoácidos, catiônicas e anfipáticas. Possuem importante atividade antimicrobiana além de outras funções na imunidade, tais como a sinalização celular (JENSSSEN et al., 2006). Amplamente distribuídos em plantas e animais, variam em tamanho, estrutura e composição aminoacídica bem como no modo de ação, matando bactérias, fungos e vírus envelopados, em geral, através da ruptura de suas membranas citoplasmáticas negativamente carregadas (WU et al., 2003).

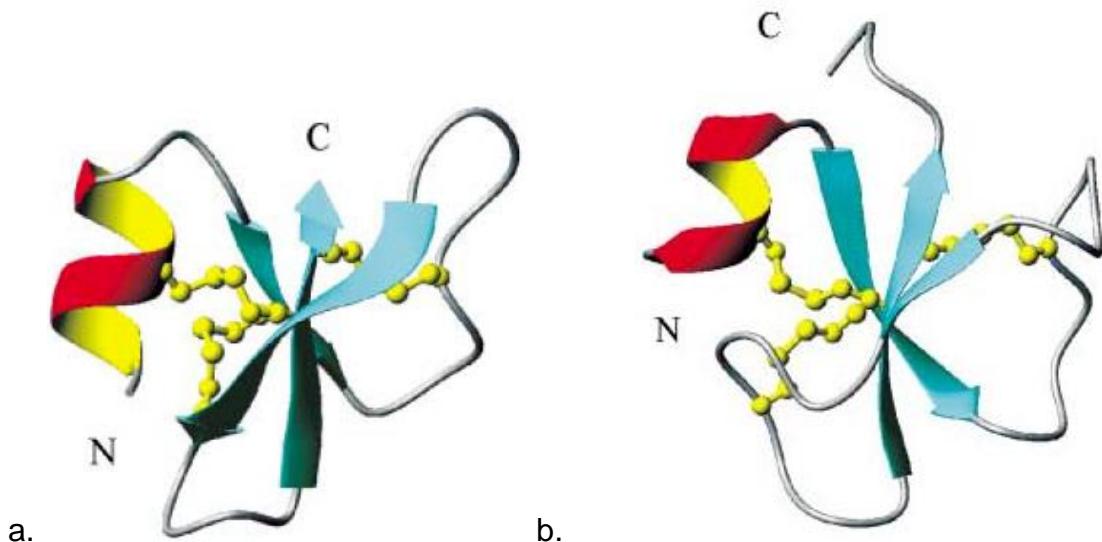
Apesar das sequências aminoacídicas variadas, os PAMs podem ser agrupados pela similaridade estrutural em peptídeos lineares e cíclicos. Os PAMs lineares consistem de peptídeos com uma estrutura  $\alpha$ -hélice anfipática ou estrutura flexível, enquanto que os peptídeos cíclicos contêm uma ou mais pontes dissulfeto

com um laço ou estrutura em folha- $\beta$  (ZASLOFF, 2002). Os PAMs cíclicos, conhecidos como defensinas, constituem uma das famílias de antimicrobianos mais estudadas.

As defensinas são peptídeos catiônicos, ricos em folha beta pregueada, estruturados por três pontes dissulfeto. Nos vertebrados existem três distintas famílias de defensinas: alpha- ( $\alpha$ -), beta- ( $\beta$ -) e teta- ( $\theta$ -) defensinas, cujo espectro de atividade antimicrobiana é bastante amplo (GANZ, 2003; LEHRER; GANZ, 2002). As  $\alpha$ -defensinas foram isoladas de humanos, macacos e roedores; as  $\theta$ -defensinas são moléculas circulares restritas aos macacos do Velho Mundo e as  $\beta$ -defensinas representam a maior família de defensinas de vertebrados (GANZ, 2003).

## 1.2 $\beta$ -defensinas

As  $\beta$ -defensinas são moléculas pequenas, catiônicas, de 35 a 50 resíduos de aminoácidos, estruturadas por três folhas  $\beta$  antiparalelas estabilizadas por três pontes dissulfeto (GANZ, 2003; NICASTRO et al., 2003), figura 1.

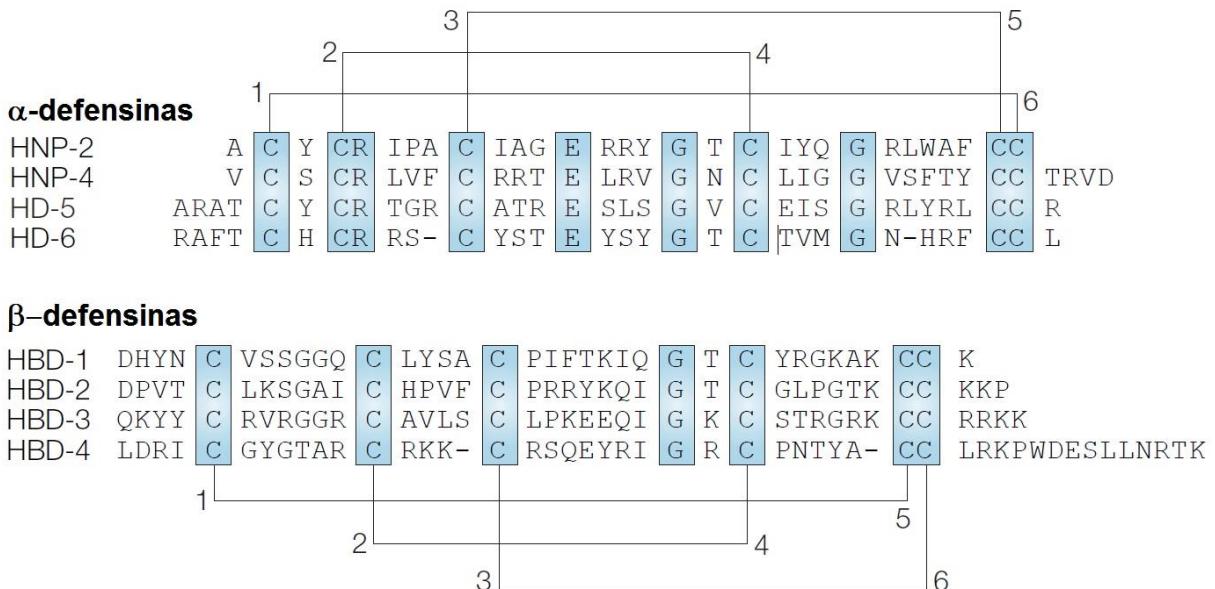


**Figura 1 - Estrutura tridimensional da  $\beta$ -defensina humana-1(HBD-1) e da crotamina.**

a. Defensina humana, número de acesso PDB 1IJU. b. Crotamina, defensina-símile, número de acesso PDB P01475. As pontes dissulfeto são mostradas nas linhas amarelas, folhas  $\beta$  antiparalelas em azul,  $\alpha$ -hélice em vermelho-amarelo.  
Fonte: Modificado de Nicastro et al., 2003.

O que diferencia uma  $\alpha$ - de uma  $\beta$ -defensina é o padrão de pareamento entre as cisteínas, nas  $\alpha$ -defensinas as pontes são formadas por ligações no padrão Cys<sup>1</sup>-

Cys<sup>6</sup>, Cys<sup>2</sup>-Cys<sup>4</sup> e Cys<sup>3</sup>-Cy<sup>5</sup>, ao passo que nas β-defensinas as cisteínas estão ligadas no padrão Cys<sup>1</sup>-Cys<sup>5</sup>, Cys<sup>2</sup>-Cys<sup>4</sup> e Cys<sup>3</sup>-Cys<sup>6</sup> (XIAO et al, 2004), Figura 2.



**Figura 2 - Alinhamento das sequências aminoacídicas de α- e β-defensinas humanas.**

Os aminoácidos conservados são realçados em azul. As pontes dissulfeto entre as cisteínas 1-6, 2-4 e 3-5 nas α-defensinas são mostradas acima do alinhamento e entre as cisteínas 1-5, 2-4 e 3-6 nas β-defensinas abaixo.

Fonte: Modificado de Lehrer, 2004.

Exceto pelas seis cisteínas, outros poucos aminoácidos são conservados na região do peptídeo maduro. Esta região, devido à seleção positiva, mostra alta taxa de substituições de aminoácidos (HUGHES, 1999; MAXWELL et al., 2003).

As β-defensinas são expressas numa grande variedade de tecidos e órgãos envolvidos na defesa do hospedeiro contra micro-organismos invasores. Tecidos mucosos e epiteliais como pele, córnea, língua, gengiva, glândulas salivares, esôfago, intestino, rim, trato urogenital e epitélio respiratório, são fontes notáveis de β-defensinas (DIAMOND et al., 2000; SCHUTTE; MCCRAY, 2002; ZHAO et al., 2006).

A estrutura da pré-β-defensina consiste em uma sequência sinal, um curto ou ausente pré-peptídeo e a defensina madura (GANZ, 2003). As β-defensinas são sintetizadas em muitos tipos de células (incluindo linfócitos, monócitos, macrófagos, neutrófilos, células epiteliais e queratinócitos) como pré-pro-peptídeos e armazenadas em grânulos na região citoplasmática, permitindo rápida liberação dos

peptídeos ativos quando da infecção microbiana. Algumas defensinas são constitutivamente expressas enquanto outras podem ser induzidas (ZOU et al., 2007). O mecanismo de processamento das defensinas ainda não está completamente esclarecido, mas sabe-se que proteases, como a tripsina, estão envolvidas na clivagem das pró-defensinas (ZOU et al., 2007).

Algumas defensinas funcionam como imunoduladores eficazes na imunidade adaptativa por quimioatração seletiva de linfócitos T, monócitos e células dendríticas imaturas, portanto, a função imune de defensinas não está limitada à imunidade inata, mas também na imunidade adaptativa. Pesquisas recentes indicaram que as defensinas humanas também podem atuar como biomarcadores de câncer e moléculas antitumorais (DROIN et al., 2009).

As  $\beta$ -defensinas contêm uma matriz de cisteínas altamente conservada que proporciona uma rigidez estrutural (YOUNT et al., 2009). Vários trabalhos paralelos sugerem semelhanças estrutural, funcional e evolutiva entre  $\beta$ -defensinas e outras moléculas, tais como as toxinas. Assim como os peptídeos antimicrobianos, muitas toxinas são pequenas, catiônicas, estabilizadas por cisteínas (YEMAN; YOUNT, 2003), e compartilham certo grau de conservação com peptídeos de defesa do hospedeiro (YOUNT et al, 2009). Foram descritos peptídeos com estrutura  $\beta$ -defensina-símile em lagarto *Anolis carolinensis* (DALLA VALLE et al., 2012) e no veneno de anêmona do mar (TORRES; KUCHEL, 2004), ornitorrinco (WHITTINGTON et al., 2008), lagarto *Pogona* (FRY et al., 2005) e serpentes (RÁDIS-BAPTISTA et al., 2003; RÁDIS-BAPTISTA et al., 2004).

Um grupo de toxinas com homologia às  $\beta$ -defensinas é a família das pequenas miotoxinas básicas de cascavéis, entre elas a crotamina, um dos principais componentes do veneno das cascavéis sul-americanas *Crotalus durissus terrificus* (GONÇALVES; ARANTES, 1956; GONÇALVES; VIEIRA, 1950). Essas toxinas induzem a paralisia espástica nos membros posteriores de camundongos rapidamente e, tardivamente, mionecrose no músculo esquelético (OGUIURA; BONIMITAKE; RÁDIS-BAPTISTA, 2005).

A estrutura global da crotamina e seu padrão de pareamento entre as cisteínas são similares aos das  $\beta$ -defensinas, embora os peptídeos tenham baixa similaridade em suas sequências e apresentem diferentes atividades biológicas (FADEL et al., 2005).

A crotamina é um polipeptídeo catiônico com 42 resíduos de aminoácidos, carga líquida +8 em pH 7, tamanho de 4,9 kDa e pl 9,5 (LAURE, 1975). Na natureza, as serpentes *C. d. terrificus* podem ou não apresentar na peçonha a fração crotamínica, sendo os venenos classificados como crotamina positiva (+) ou negativa (-) (GONÇALVES; ARANTES, 1956).

A crotamina tem atividade antibiótica contra *E. coli* e *Bacillus subtilis*, bem como antifúngica contra *Candida*, *Trichosporon* spp. e *Cryptococcus neoformans* (OGUIURA et al., 2011; YAMANE et al., 2013; YOUNT et al., 2009). O ornitorrinco também expressa peptídeos defensina-símiles com estrutura global e padrão de emparelhamento das cisteínas similar às β-defensinas, porém sem atividade antimicrobiana (TORRES et al., 1999).

Outras toxinas de veneno de serpentes com diferentes estruturas também apresentam atividades antimicrobianas moderadas. A fosfolipase do tipo A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) e a L-aminoácido oxidase (LAOO) de *Daboia russelli russelli*, *Crotalus adamanteus*, *Naja sumatrana* entre outras, inibiram o crescimento das bactérias *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (SAMY et al., 2006). A LAOO de veneno de *B. mattogrossensis* apresentou atividade antibiótica contra diferentes bactérias Gram positiva e Gram negativa sem atividade citotóxica contra macrófagos ou eritrócitos (OKUBO et al., 2012). Pequenos peptídeos sintéticos da serpente *Naja atra* contra *E. coli* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* apresentaram atividade antimicrobiana significante (DE LATOUR et al., 2010). A primeira catelicidina encontrada no veneno da serpente *Bungarus fasciatus*, catelicidina BF, possui potente atividade antimicrobiana contra bactérias Gram negativas e moderada contra bactérias Gram positivas (*Bacillus* e *Salmonella typhi*) e fungos (*Candida albicans* e *Pichia pastoris*) (WANG et al., 2008).

### **1.3 Mecanismo de ação dos antimicrobianos**

O principal modo de ação dos PAMs é através do aumento da permeabilidade da membrana plasmática (STRAUS; HANCOCK, 2006). A primeira etapa seria a interação eletrostática entre o peptídeo positivamente carregado e os componentes negativamente carregados da membrana do micro-organismo e/ou parasita. E em uma etapa posterior, as interações entre a porção apolar da membrana das células e

os resíduos hidrofóbicos dos peptídeos antimicrobianos culminariam na permeabilização das membranas (ANDREU; RIVAS, 1998).

Os parâmetros moleculares interdependentes e determinantes que influenciam os mecanismos de ação dos antimicrobianos são sua conformação, carga líquida, hidrofobicidade, anfipaticidade e ângulo polar. Uma característica marcante é a conservação global da sua estrutura. A anfipaticidade e carga líquida são características comprehensivelmente conservadas entre muitos peptídeos antimicrobianos e a afinidade por carga é um importante meio de seleção para estes (YEMAN; YOUNT, 2003).

A característica catiônica dos PAMs, associados com sua tendência a adotar uma anfipaticidade, facilita sua interação e inserção na parede celular aniónica e nas membranas fosfolipídicas de micro-organismos. Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar seu modo de ação como a desestabilização da membrana, mecanismo de formação de carpete e formação de poro do tipo barril (IZADPANAH ; GALLO, 2005).

No mecanismo de formação de poro do tipo barril, a face hidrofóbica dos peptídeos, em forma de  $\alpha$ -hélice e/ou de fita- $\beta$ , fica em contato com as caudas da bicamada lipídica, enquanto a face hidrofílica forma o poro transmembrana. Desta forma, ocorre o extravasamento do conteúdo citoplasmático, causando a destruição do micro-organismo (BULET et al., 2004).

Já na formação dos poros toroidais, os resíduos hidrofóbicos dos peptídeos deslocam as cabeças polares dos fosfolipídios induzindo a formação de uma curvatura na membrana, que desestabiliza a sua superfície e permite uma maior interação com estes peptídeos, há a formação do poro transmembrana no qual os lipídios permanecem intercalados com as moléculas dos peptídeos. Este mecanismo permite a formação de poros com um tamanho pequeno e seletivo quanto à passagem de íons (YANG et al, 2001).

De acordo com o modelo de carpete os PAMs se ligam à membrana do micro-organismo por atração eletrostática, e só começam a agir ao atingirem uma concentração crítica na superfície da mesma. Desta forma, os peptídeos deslocam de maneira difusa os fosfolipídios componentes da membrana plasmática das bactérias, alterando a sua fluidez, o que propicia a desestruturação da mesma. Neste mecanismo não há a formação de poros, pois a membrana se desintegra em

forma de micelas, como pela ação detergente (LADOKHIN; WHITE, 2001; SHAI, 1999).

#### 1.4 Genes de defensinas

Genes de defensina-símiles em vertebrados têm sido descritos em muitas espécies como peixes (CASADEI ET AL., 2009; ZOU et al., 2007), répteis (DALLA VALLE et al., 2012; RÁDIS-BAPTISTA et al., 2003; RÁDIS-BAPTISTA et al., 2004,), aves (XIAO et al., 2004) e mamíferos (GANZ, 2003, LUENSER et al., 2005; PATIL et al., 2005; SCHUTTE; MCCRAY, 2002; WHITTINGTON et al., 2008).

A maioria dos genes de  $\beta$ -defensinas em mamíferos é composta de dois éxons separados por um íntron de comprimento variável que codificam um polipeptídeo precursor constituído por: uma sequência sinal hidrofóbica rica em leucina, uma pró-sequência e uma defensina madura com um motivo de seis cisteínas conservado (GANZ, 2003). Alguns genes podem ter um ou dois éxons adicionais que codificam uma pró-sequência interna, parte da região carboxi-terminal ou regiões não traduzíveis (PATIL et al., 2005).

Um gene de  $\beta$ -defensina-símile de veneno de ornitorrinco, *DEFB-VL*, apresenta a mesma estrutura de mamíferos com o primeiro éxon codificando o peptídeo sinal e o segundo éxon codificando a defensina madura com as seis cisteínas (WHITTINGTON et al., 2008).

Treze genes de  $\beta$ -defensinas de galinha (genes *Gal*) foram identificados, e diferentemente dos mamíferos, estes genes são formados por quatro éxons curtos separados por três íntrons de tamanhos variáveis (de 117 a 3322 pb). O gene *Gal 12* é uma exceção com os dois últimos éxons fundidos. O éxon 1 dos genes *Gal* codifica a região 5' não traduzível (UTR); os éxons 2 e 3, semelhantes aos genes  $\beta$ -defensinas de mamíferos, codificam o peptídeo sinal, pró-sequência e defensina madura com 6 resíduos de cisteínas e o último éxon codifica a região 3'UTR e alguns aminoácidos C-terminais (XIAO et al., 2004).

Em serpentes, os genes  $\beta$ -defensina-símiles têm três éxons e dois íntrons (RÁDIS-BAPTISTA et al., 2003; RÁDIS-BAPTISTA et al., 2004), assim como em lagartos (DALLA VALLE et al., 2012) e peixes (ZOU et al., 2007). Em *C. d. terrificus* foram descritos dois genes que codificam  $\beta$ -defensinas símiles, os da crotamina e do crotasin. O gene da crotamina (*Crt-p1*) possui cerca de 1,8 kpb cujos éxons são

separados por dois íntrons um longo (900 pb) e um curto (140 pb). O éxon 1 inclui a região 5' não traduzida e codifica para os primeiros 19 aminoácidos do peptídeo sinal. O éxon 2 codifica 42 aminoácidos, três pertencentes ao peptídeo sinal e 39 à crotamina madura. O éxon 3 codifica para os últimos três aminoácidos da toxina madura, incluindo a lisina terminal, que é retirada após a tradução, e a região 3'- não traduzida (RÁDIS-BAPTISTA et al., 2003).

O crotasin, gene parólogo ao da crotamina, apresenta a mesma estrutura gênica e alta similaridade nas sequências não-traduzidas 3' e 5', do peptídeo sinal e dos íntrons, porém o íntron 1 é de comprimento maior (2,5kpb) do que o íntron 1 da crotamina (RÁDIS-BAPTISTA et al., 2004). Uma comparação da sequência nucleotídica do gene da crotamina (*Crt-p1*) com o gene do crotasin (*Cts-p2*), revelou alta similaridade nas regiões de íntrons (92,3%), peptídeo sinal (96,9%), 5'-UTR (93,4%) e 3'UTR (100%), mas baixa na região codificante do peptídeo maduro (59,5%) (RÁDIS-BAPTISTA et al., 2004).

O crotasin (*Cts-p2*) foi isolado de espécimes crotamina negativos, porém ele está presente em ambas as variedades (crotamina + e crotamina -). A transcrição reversa acoplada à PCR mostrou que *Cts-p2* é abundantemente expresso em diversos tecidos da serpente, principalmente pâncreas e fígado, mas raramente expresso na glândula de veneno (RÁDIS-BAPTISTA et al., 2004). Possui 41 resíduos de aminoácidos, carga líquida -1 em pH 7, tamanho de 4,7 kDa e pl 5,3. As estruturas gênicas, as mesmas fases de ambos os íntrons, as sequências nucleotídicas e o motivo conservado das seis cisteínas sugerem que a crotamina e o crotasin evoluíram por duplicação de um gene ancestral comum. A função fisiológica do crotasin ainda não é conhecida (RÁDIS-BAPTISTA et al., 2004).

## **1.5 Filogenia e evolução das defensinas**

Os genes de  $\beta$ -defensinas constituem uma família multigênica, ou seja, um grupo de genes que descendem de um gene ancestral comum e, portanto têm funções e sequências de DNA similares. Várias famílias multigênicas, incluindo imunoglobulinas e moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC), evoluem de acordo com um mecanismo definido como evolução por nascimento-e-morte. Neste modelo novos genes são criados por duplicações gênicas e alguns genes

duplicados são mantidos no genoma por um longo tempo enquanto outros perdem a atividade e podem ser deletados (NEI; ROONEY, 2005).

A relação evolutiva entre defensinas de vertebrados e de outras espécies ainda não está clara, embora análises filogenéticas tenham revelado que um gene primordial de  $\beta$ -defensina seja o ancestral comum para todos os vertebrados (XIAO et al., 2004).

Apesar da maioria das  $\beta$ -defensinas serem evolutivamente conservadas entre espécies a análise filogenética de Patil et al. (2005) mostrou que há subgrupos de linhagens gênicas espécie-específicas implicando em algumas  $\beta$ -defensinas terem se originado após a divergência desses mamíferos enquanto que a maioria surgiu antes do último ancestral comum de mamíferos.

Luenser et al. (2005) estudaram a evolução molecular e a variabilidade gênica de  $\beta$ -defensinas de caprinos, e utilizando apenas as sequências de íntrons, revelaram que esses genes descritos são de origem monofilética e surgiram por numerosos eventos de duplicação independentes, assim, genes recentes de defensinas de caprinos são distribuídos de modo espécie-específico.

A análise filogenética por "neighbor-joining" com genes de vertebrados mostra que as defensinas de galinha se agrupam com diferentes grupos de  $\beta$ -defensinas de mamíferos e que esse agrupamento surgiu antes do último ancestral comum de aves e mamíferos, há estimados 310 milhões de anos (XIAO et al., 2005).

Zou et al. (2007) descreveram pela primeira vez genes de  $\beta$ -defensinas em peixes, expressos em vários tecidos (gônadas, rim, pâncreas etc.). Estes peptídeos se assemelham às  $\beta$ -defensinas de mamíferos e aves e se dividem em dois subgrupos com base na comparação de homologia e análise filogenética.

As análises filogenéticas de defensina-símiles de ornitorrinco (*Ornithorhynchus* venom defensin-like peptide - OvDLPs), de lagarto,  $\beta$ -defensinas 1, 2, e 11 de galinha,  $\beta$ -defensina 51 de camundongo e crotamina do veneno de serpente mostram que esses genes parecem ter evoluído independentemente a partir de um mesmo gene ancestral (WHITTINGTON et al., 2008).

## 1.6 Serpentes

As serpentes distribuem-se por uma grande variedade de habitats, desde ambientes áridos até florestas e ambientes alagadiços, exceto nas calotas polares (CAMPBELL; LAMAR, 2004). Pertencem à ordem Squamata, que inclui as serpentes, lagartos e anfisbenas e é a principal ordem da classe Reptilia com o maior número de répteis descritos. Das 3378 espécies de serpentes conhecidas, 375 são brasileiras (UETZ, 2011).

São descritas seis superfamílias de serpentes: Acrochordoidea, Uropeltoidae, Pythonoidea, Booidea, Colubroidea e Typhloidea. A superfamília Colubroidea inclui a maioria das espécies de serpentes, inclusive as peçonhentas, e é uma das radiações mais evidentes e bem conhecidas de vertebrados terrestres (PYRON et al., 2011). Nesta superfamília, encontra-se a família Viperidae com 308 espécies e a subfamília Crotalinae ("pitvipers") que inclui as espécies peçonhentas brasileiras dos gêneros *Bothrops* (jararacas), *Crotalus* (cascavel) e *Lachesis* (surucucu).

Os viperídeos são caracterizados por apresentarem dentição do tipo solenóglifa ("soleno"= canal, "gliphé"= sulco) constituída de um par de dentes ou presas anteriores, bem desenvolvidos, com canal central e maxilar móvel; e presença de fosseta loreal (sistema termo-receptor bem desenvolvido que possibilita a percepção de animais de sangue quente) (CAMPBELL; LAMAR, 2004).

No Brasil, foram registrados 30836 acidentes por serpentes em 2011, sendo maior o número de casos nas regiões Norte (9309) e Nordeste (8081) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012). Os acidentes botrópicos representam a maioria dos casos, 88%, enquanto que os acidentes crotálicos representam 9%, laquéticos 2,5% e elapídicos 0,5% (gênero *Micrurus*, nome popular coral verdadeira) do total das notificações (MS, 2011).

O gênero *Lachesis* Linnaeus, 1766, cujo nome se deve a uma das três Moiras na mitologia grega (Láquesis), tem uma única espécie - *Lachesis muta*, difundida na América do Sul, principalmente, na região Nordeste do Brasil. São as maiores serpentes venenosas do Novo Mundo e os maiores viperídeos do mundo. O nome da espécie *muta* vem do latim = mudo pelo fato das surucucus, como as cascavéis, vibrarem a cauda quando alarmadas, porém, como não têm chocalho não há som (CAMPBELL; LAMAR, 2004). Seu veneno tem ação: hemorrágica, coagulante, com

inflamação local e neurotóxica vagal (vômito, diarréia, hipotensão, choque) (MS, 2011).

O gênero *Crotalus* Linnaeus, 1758, é representado no Brasil por uma única espécie, *Crotalus durissus*, que tem uma ampla distribuição geográfica. A presença de um guizo ao final da cauda torna os espécimes desse grupo inconfundíveis (do espanhol "cascabeles" e do latim = chocalho) (CAMPBELL; LAMAR, 2004). São responsáveis pelo maior índice de mortalidade sendo seu veneno o mais letal com ações: neurotóxica, miotóxica sistêmica, sem dor local, visão turva e insuficiência renal (MS, 2011).

O grupo *Bothrops* Wagler, 1824, é formado por 37 espécies. O nome do gênero é derivado do grego "bothros" = fosseta e "ops" = olho/face, obviamente em alusão às distintivas fossetas loreais sensíveis ao calor localizadas na face entre as narinas e os olhos (CAMPBELL; LAMAR; 2004). Possuem cabeça em forma de lança na maioria das espécies. O gênero é distribuído pela América do Sul, com duas espécies alcançando a América Central. Seu veneno de ação local causa: dor imediata, inchaço, hemorragia, bolhas e insuficiência renal (MS, 2011).

As espécies do gênero *Bothrops* haviam sido alocadas em cinco gêneros segundo Fenwick et al. (2009): *Bothrocophias*, *Rhinocerophis*, *Bothropoides*, *Bothrops* e *Bothriopsis* voltando, atualmente, a ser reagrupadas em um único gênero (*Bothrops*) segundo Carrasco et al. (2012). Neste estudo, Carrasco et al. (2012) exploraram as questões da informação filogenética de diferentes tipos de caracteres morfológicos; o grau de congruência entre as diferentes fontes de evidência (morfológica, molecular e ecológico) o monofiletismo e as relações dentro do grupo Bothropoide. Finalmente, depois de avaliar as propostas taxonômicas anteriores, sugerem um rearranjo que retifica a parafilia de *Bothrops* enquanto observam a estabilidade taxonômica, mantendo diferentes espécies em um mesmo gênero (*Bothrops*) em que aparecem como grupo monofilético nas árvores filogenéticas.

As análises filogenéticas destas serpentes, assim como o estudo de toxinas do veneno, podem contribuir para o entendimento da variabilidade em viperídeos (CARRASCO et al., 2012; WÜSTER et al., 2008).

## 1.7 Objetivos e justificativa

Mais de 300 defensinas foram identificadas até 2006 (SEEBAH et al., 2007), com poucas sequências descritas para répteis. Novas buscas ainda podem ser feitas por homologia através de técnicas como: amplificação por PCR, hibridização de ácidos nucléicos e similaridade de sequências de cDNA e DNA genômico em banco de dados (SCHUTTE; MCCRAY, 2002). Devido a seu pequeno tamanho, os genes de  $\beta$ -defensina são excelentes alvos para amplificação por PCR. Diamond et al. (1991) foram os primeiros a usar a técnica de PCR para clonar um gene de  $\beta$ -defensina. Na revisão de Schutte e Mccray (2002) é descrito que em 10 de 12 amplificações de genes de defensinas em vertebrados foram usados "primers" desenhados com base em cDNA de uma diferente espécie. Portanto, para atingir o objetivo principal deste trabalho: investigar genes  $\beta$ -defensina-símiles em serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Lachesis* optamos pela amplificação dessas sequências por PCR utilizando "primers" heterólogos de cascavéis, devido às suas relações de parentesco.

Outro objetivo foi determinar se os peptídeos codificados por essas sequências possuem atividade antibiótica. Para tanto, polipeptídeos sintéticos lineares foram testados para atividade antimicrobiana pelo microensaio em meio líquido para determinar a concentração mínima inibitória.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Purificação de DNA

Os DNAs genômicos foram extraídos de tecidos fornecidos pelo Banco de Tecidos da Coleção Alphonse Richard Hoge do Instituto Butantan, de animais mantidos no Laboratório de Herpetologia e Laboratório Especial de Ecologia e Evolução do Instituto Butantan e de tecidos fornecidos pelo Banco de Tecidos do Instituto de Biociências da USP (IB) (quadro 1). Para a purificação do DNA de fígado, foi utilizado o método descrito por Ausubel et al. (2002) modificado e a purificação a partir de sangue foi feita com o kit de purificação ZR Genomic DNA™ Tissue da ZymoResearch®.

As amostras de DNA genômico foram dosadas no espectrofotômetro Nano Drop ND-2000c acoplado ao programa ND-2000 v. 3.3.0, no comprimento de onda de 260 nm.

Espécies	Tecido	Tombo	Localidade
<i>Bothrops alternatus</i>	Fígado	IBSP: 77.198	Estiva - MG
<i>Bothrops atrox</i>	Sangue	IBSP: 79.765	Rio Branco - AC
<i>Bothrops diporus</i>	Fígado	IBSP: 60.323	Blumenal - SC
<i>Bothrops erythromelas</i>	Sangue	IBSP: 79.766	Ibitina - BA
<i>Bothrops insularis*</i>	Sangue	s/ número	Ilha da Queimada Grande - SP
<i>Bothrops jararaca</i>	Sangue	s/ número	Embu Guaçu - SP
<i>Bothrops jararacussu</i>	Fígado	s/ número	Ubatuba - SP
<i>Bothrops leucurus</i>	Sangue	IBSP: 79.100	Porto Seguro - BA
<i>Bothrops mattogrossensis</i>	Fígado	IB: 77.705	N. Sra do Livramento - MT
<i>Bothrops neuwiedi</i>	Fígado	IBSP: 74.566	Baependi - MG
<i>Crotalus durissus terrificus</i>	Sangue	s/ número	s/ procedência
<i>Lachesis muta*</i>	Sangue	s/ número	NE - Bahia/Pernambuco

**Quadro 1** - Origem dos tecidos cujos DNAs foram purificados para este trabalho.

Os nomes das espécies são apresentadas segundo Carrasco et al. 2012; o tipo de tecido de onde foi purificado o DNA; número de tombo quando o tecido foi cedido pelo Banco de Tecidos da Coleção Herpetológica Alphonse Richard-Hoge do Instituto Butantan (IBSP) ou pelo Banco de Tecidos do Instituto de Biociências da USP (IB) e localidade de captura (cidade) quando informada. \*A *B. insularis* e a *L. muta* são mantidas em cativeiro no Laboratório Especial de Ecologia e Evolução e no Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, respectivamente.

## 2.2 Reação de PCR

Para a reação de PCR, foram utilizados os "primers" de regiões conservadas do gene da crotamina (número de acesso ao GenBank: AF 223947) sintetizados pela Invitrogen™ do Brasil:

**H010:** 5'-AAG CAG TCT CAG CAT GAA GAT-3' com Tm (50mM Na<sup>+</sup>) = 59 °C; e

**3'UTRas:** 5'-GGC ACT CTC AGG TCC TTG GCC AT-3' com Tm (50mM Na<sup>+</sup>) = 70 °C.

Em 50 µl de reação, utilizaram-se as seguintes quantidades de DNA:

- 100 ng de DNA para a espécie *L. muta*;
- 300 ng de DNA para a espécie *B. diporus*, *B. erythromelas*,
- 500 ng de DNA para as espécies *B. pauloensis*, *B. jararaca* e *B. neuwiedi*; *B. atrox*, *B. leucurus*.
- 800 ng de DNA para as espécies *B. jararacussu* e *B. matogrossensis*.
- 300 ng de DNA para as espécies *B. alternatus* e *B. insularis*.
- 100 ng de DNA de cascavel *C. durissus* (controle positivo).

Demais reagentes:

- 0,1 µM de cada "primer" por reação,
- 1,25 U de Taq DNA Polimerase Platinum® (Invitrogen™)(destituída de atividade 3'→5' exonuclease),
- tampão sem magnésio [1X] com adição de 1,5 mM de cloreto de magnésio e
- 0,2 mM de dNTPs.

A reação foi feita no termociclador Mastercycler® Ep Gradient da Eppendorf™ nas seguintes condições:

- desnaturação inicial de 4 min a 94 °C;
- seguido de 30 ciclos de: 45 s a 94 °C,
- 45 s a 52,5 °C, 55 °C ou 58 °C e
- 45 s a 72 °C.

A temperatura de hibridização dos "primers" foi otimizada em 52,5 °C para as espécies *B. neuwiedi* e *B. alternatus*; 55 °C para as espécies *B. insularis*, *B. jararacussu*, *B. diporus* e *B. matogrossensis*; e 58 °C para as espécies *B. jararaca*, *B. pauloensis*, *B. atrox*, *B. leucurus*, e *L. muta*.

### **2.3 Eletroforese em gel de agarose**

Os amplificados foram analisados por eletroforese em gel agarose 1 % com Tampão TAE 1X pH 8,5 (4 mM de Tris base, 0,14 % de ácido acético glacial e 1 mM de EDTA) e Gel Red 0,01X. Após a corrida, o DNA foi visualizado no transiluminador Alpha Innotech™ no comprimento de onda de 302 nm e a imagem digitalizada no programa Alpha Digidoc™ RT 2 da Alpha Innotech™.

### **2.4 Purificação e ligação de DNA**

Os amplificados de interesse, de 0,8 a 2,0 kpb de comprimento, foram cortados do gel e purificados em coluna com o kit Zymoclean™ DNA Recovery Kit da ZymoResearch®. Depois, foram dosados em espectrofotômetro Nano Drop ND-2000c e ligados no vetor pTZ57R/T do Instaclone™ PCR Cloning Kit (Fermentas™) (anexo A).

Para as reações de ligação, foram utilizadas as proporções de extremidades molares de inserto por vetor de 3:1, e a enzima T4 DNA ligase USB™ no tampão de reação do mesmo fabricante, por 2 horas à temperatura ambiente.

### **2.5 Transformação bacteriana (SAMBROOK et al., 1989)**

As bactérias competentes *E. coli* cepa DH5α foram preparadas a partir de pré inóculo, crescidas até DO<sub>(600)</sub> de 0,6 e tratadas por choque térmico e resuspensas em solução de CaCl<sub>2</sub> 0,1M. As reações de ligação, os tubos e as bactérias competentes foram mantidos em gelo por 15 minutos. Foram adicionados 7,5 µl de cada ligação para 50 µl de bactéria competente e mantidos em gelo. Após 20 min, foi feito choque térmico a 42 °C por 90s e mantidos em gelo novamente. Adicionou-se 950 µl de meio de cultura Luria Bertani (LB), acrescido de glicose 20mM e cloreto de magnésio 10mM, e a cultura foi mantida por uma hora à 37 °C sob agitação. Depois, 200 µl de bactérias transformadas foram plaqueadas em LBA (meio LB sólido contendo Ampicilina 100 µg/ml). Como controle positivo da transformação foi utilizado plasmídeo pTZ57R, sem inserto, plaqueado em LBA e como controle

negativo foi utilizada a bactéria DH5 $\alpha$ , sem plasmídeo, plaqueada nos meios sólidos, LB e LBA. As placas foram mantidas em estufa à 37 °C durante a noite.

## 2.6 Verificação rápida de plasmídeo (ERIK et al., 1998)

Seis colônias isoladas de cada transformação, mais uma colônia de plasmídeo sem inserto, foram cultivadas em tubos com meio LBA líquido, à 37 °C, sob agitação, durante a noite. Centrifugou-se 150  $\mu$ l de cada cultura e, sobre o resíduo, adicionou-se 14  $\mu$ l de “stop mix” (azul de bromofenol 0,017%, EDTA 16 mM, sacarose 8%, uréia 7%) e 40  $\mu$ l de fenol/clorofórmio (1:1). A mistura foi agitada no vórtex e novamente centrifugada. Aplicou-se 10  $\mu$ l da fase aquosa de cada amostra em cada poço do gel agarose 1%. O plasmídeo íntegro sem inserto (pTZ57R) foi utilizado como padrão de peso molecular.

## 2.7 Purificação de plasmídeos

Os plasmídeos maiores do que o pTZ57R foram purificados, a partir de 1,2 mL de cultura bacteriana, em coluna com Zippy™ Plasmid Miniprep Kit da ZymoResearch® e eluídos em 25  $\mu$ l de tampão do kit e a sua concentração estimada em espectrofotômetro Nano Drop ND-2000c.

## 2.8 Digestão de DNA plasmidial

Os clones purificados foram digeridos com enzimas de restrição para checar a presença e o tamanho dos inserts.

Para cada 15 $\mu$ l de reação, utilizou-se 5U de enzima *Pst*I, 5U de enzima *Eco*RI, Tampão NEB3 1X, BSA 1X, 5  $\mu$ l de cada clone e água ultra pura, quantidade suficiente para o volume final (15  $\mu$ l). A reação ocorreu em banho-maria à 37 °C, por 2 horas.

## 2.9 Reação de sequenciamento

Para a reação de sequenciamento, foram utilizados numa primeira reação os "primers" do vetor pTZ57R/T:

**T7:** 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3' e  
**M13/pUC (-20nt):** 5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3';  
e posteriormente, após análise das primeiras sequências, foram desenhados "primers" internos, para completar as sequências do ítron 1 usando o site IDT ([http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/"primer"quest/](http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/'primer'quest/)):  
**ítron-def-REV:** 5'-GACTTCCGATTCCCTGTTGC-3'  
**ítron-def-FWD:** 5'-GATTATTCCTCCCTACG-3' da Invitrogen™.

Para cada reação de sequenciamento, utilizou-se de 100 a 150 ng de DNA e 1,6 pmol de cada "primer". As amostras foram sequenciadas (pelo método de Sanger) no Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan, utilizando os kits BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing; e fracionadas no aparelho ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer da Applied Biosystems™.

## 2.10 Montagem e alinhamento das sequências

A análise preliminar das sequências foi feita no programa CodonCode Aligner v3.7.1 utilizando o algoritmo Muscle (EDGAR, 2004) mais correções manuais para obter a sobreposição das sequências de cada inserto. Para os insertos grandes, de mais de 1000pb, o alinhamento foi feito em separado, senso e reverso, com o algoritmo ClustalW no programa on-line ClustalW2 (GOUJON et al., 2010; LARKIN et al., 2007).

## 2.11 Análise filogenética

As sequências gênicas foram alinhadas no programa online MAFFT v6 (KATOH, 2010) na opção E-INS-i (recomendada para menos de 200 sequências com domínios múltiplos conservados e longos GAPS).

As sequências aminoacídicas foram alinhadas pelo algoritmo Muscle no programa Jalview v2 (WATHERHOUSE et al., 2009). A sequência consenso de maioria foi obtida no Programa BioEdit version 7.1.3 (HALL, 2011).

Para as análises filogenéticas foram utilizadas sequências concatenadas (de exons e ítrons) ou fracionadas por regiões (só exons 1, 2 e 3, e só ítron 1) e foram realizadas pelo método de máxima parcimônia (MP) utilizando os programas T.N.T. 1.1 ("Tree analysis using New Technology" desenvolvido por GOLOBOFF et al.,

2003) e MEGA v5 (TAMURA et al, 2011). As árvores filogenéticas geradas foram editadas no programa FigTree v1.3.1 (RAMBAUT, 2009). A árvore mais parcimoniosa foi obtida por busca exaustiva, onde todas as árvores possíveis são analisadas.

A conciliação da árvore filogenética das sequências gênicas com a árvore filogenética de espécies (árvore consenso das descritas por WÜSTER et al., 2002, CASTOE; FENWICK et al., 2009 e PARKINSON, 2006) foram implementadas no programa Mesquite v2.75 (MADDISON; MADDISON, 2011).

Para as análises filogenéticas com sequências aminoacídicas foi utilizado o método de “neighbor joining” (SAITOU; NEI, 1987) no programa Jalview v2.

## **2.12 Análise da taxa evolutiva das sequências**

A taxa  $dN/dS$  (relação entre substituições nucleotíidas não-sinônimas e sinônimas) foi utilizada para analisar as sequências codificantes sob seleção positiva ou negativa, utilizando o pacote HYPHY no servidor Datamonkey (POND; FROST, 2005). O método utiliza a verossimilhança e para a análise dos dados foram escolhidos os seguintes parâmetros: códon como tipo de dados, código genético universal, método SLAC ("single likelihood ancestor counting"), rápido e mais conservador e que pode ser usado para grande conjunto de dados e para obter mapas de substituição em cada local permitindo a visualização do processo evolutivo e modelo REV ("time reversible model"), modelo de substituição reversível que considera a troca de uma base nitrogenada por qualquer outra.

## **2.13 Dados bioquímicos e modelagem tridimensional**

As sequências gênicas nucleotíidas codificantes foram traduzidas, em aminoácidos utilizando os programas Mega ou BioEdit. A sequência precursora foi analisada no servidor online Signal P 4.0 (PETERSEN et al., 2011) de modo a verificar a presença e localização do sítio de clivagem do peptídeo sinal. O cálculo foi feito pela combinação de diversas redes neurais artificiais do programa.

Foram calculados para as sequências dos peptídeos lineares maduros: a carga líquida em pH 7, o potencial de hidrofobicidade (seguindo a escala de Winley- White,

1996), o ponto isoelétrico (pl) e a massa no programa PepDraw (<http://www.tulane.edu/~biochem/WW/PepDraw/index.html>).

Foi feita uma busca de sequências proteicas e informações funcionais de defensinas,  $\beta$ -defensinas, miotoxinas ou  $\beta$ -defensina-símiles no banco Uniprot ("Universal Protein Resource") (2012). Para seleção destas sequências obtidas foram considerados: estado da sequência, se revisada ou não pelos responsáveis do próprio banco; tipo de organismo, restrito aos vertebrados; e maior valor às proteínas purificadas, com informações biológicas e com modelo de estrutura tridimensional publicado.

A reconstrução filogenética com sequências aminoacídicas auxiliou na busca por um modelo tridimensional evolutivamente mais próximo para servir como molde para os peptídeos em estudo. O modelo tridimensional da proteína escolhida foi obtido no portal de estruturas biológicas macromoleculares PDB ("Protein Data Bank") pelo seu número de identificação da proteína, nome da molécula ou autor que a descreveu e o arquivo com a molécula foi baixado em formato pdb utilizado por este portal. Foi criado um projeto no programa Pdbviewer (GUEX; PETISCH, 1997) com a sequência madura de cada peptídeo mais a proteína molde escolhida para criar a estrutura por método comparativo automático no SwissModel (ARNOLD et al., 2006) disponível em <http://swissmodel.expasy.org>.

Os modelos foram obtidos por método comparativo automático no SwissModel (ARNOLD et al., 2006) disponível em <http://swissmodel.expasy.org/>. Foi obtido um relatório com uma estimativa global da qualidade "QMEAN" (BENKERT et al., 2011) do modelo obtido com base no molde escolhido, sendo considerados: energia de interação entre os carbonos beta, energia de pareamento entre todos os átomos, energia de solvatação e energia de ângulo de torção.

As moléculas geradas foram editadas no programa Pdbviewer, destacando as pontes dissulfeto entre as cisteínas, colorindo as folhas beta e  $\alpha$ -hélice e cada aminoácido por suas características como hidrofobicidade e polaridade, calculando seu potencial eletrostático e distribuição de cargas, renderização em 3D entre outras.

## 2.14 Ensaios antimicrobianos

### **2.14.1 Peptídeos sintéticos: redução e alquilação**

Foram sintetizados automaticamente pela Biomatik (Wilmington, USA) os seguintes peptídeos  $\beta$ -defensina-símiles de serpentes: DefbBd03, DefbBj01, DefbBju01, DefbBm02, DefbBm03, DefbBn02, DefbLm01, DefbLm02, Crotasin, DefbPm (de *Phalotris mertensi*), DefbTs (de *Thamnodynastis strigatus*) e  $\beta$ -defensina-humana-2 (hBd02).

Os peptídeos (8-10mg) desnaturados com 8 M de uréia e 400 mM de bicarbonato de amônio foram reduzidos pelo método modificado de Stone e Willians (1996) por incubação com 45 mM de ditiotreitol (DTT) por 15 min à 50 °C, seguidos de alquilação por incubação com 100 mM de iodoacetamida (IAA) por 15 min, protegido da luz, à temperatura ambiente e diluídos em água para concentração final de 1 M de uréia para seguir com a purificação, por gravidade, em coluna Sep-Pak® C18 (Vac 20cc, 5g, Waters Associations™). A coluna C18 foi ativada com metanol absoluto e em seguida equilibrada em água ultrapura acidificada com 0,1% de ácido trifluoro acético (TFA). As amostras foram diluídas em TFA para concentração final de 0,05% e aplicadas na coluna. Todo o volume de solução foi recolhido e separado dos peptídeos purificados/eluídos em 80% de solvente acetonitrila (ACN) em água ultrapura acidificada. Todas as amostras foram liofilizadas, após congelamento das soluções em gelo seco, e reconstituídas em 0,01% de ácido acético até a concentração de cerca de 1 mg/ml, estimada no mesmo espectrofotômetro.

Uma alíquota dos peptídeos foi checada por espectrometria de massa por MALDI-TOF-MS ("Matrix Assisted Laser Desorption Ionization") para verificar se todas as moléculas ou parte delas estavam realmente reduzidas e alquiladas de acordo com a alteração da massa dos aminoácidos ionicamente carregados.

### **2.14.2 Micro-organismos**

Foram utilizadas espécies de bactérias Gram positivas e Gram negativas para os ensaios de inibição de crescimento em meio líquido para determinar a concentração inibitória mínima de crescimento bacteriano (CIM) com os peptídeos  $\beta$ -defensina-símiles sintéticos. O teste foi feito com espécies bacterianas Gram negativas: *Klebsiella pneumonia*, *Serratia marcescens*, *Morganella morganii*,

*Providencia rettgeri* e *Citrobacter freundii* obtidas da flora bacteriana de serpentes, cedidas pela Dra Márcia Regina Franzolin do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan e *Escherechia coli* (ATCC 25922); e Gram positivas: *Micrococcus luteus* (A270) da coleção do Instituto Pasteur (Paris, França) e *Staphylococcus aureus* de flora bucal de serpente.

#### **2.14.3 Ensaios de inibição de crescimento microbiano em meio líquido**

Foi utilizado o método de Xiao et al. (2006) modificado para avaliar a atividade antibacteriana. A maioria das bactérias foi mantida em placa de petri com LB ágar 1,5%, e as espécies fermentadoras de lactose *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumonia* e *C. freundii* foram mantidas em placas de ágar BBL<sup>TM</sup> MacConkey 1,5% sendo cultivadas para repique semanal em meio LB líquido, por 18 h, 37 °C, a 120 RPM em estufa.

Após cultivo inicial de três colônias independentes em meio BBL<sup>TM</sup> TSB ("Trypticase Soy Broth", caldo digerido de soja-caseína) à 37 °C por uma noite, em estufa com agitação de 120RPM, foi feito subcultivo com 100µl de cada cultura em 8mL de TSB e após 1h30 min - 3 h as culturas foram dosadas em cubeta por absorbância à 600 nm no espectrofotômetro Nanodrop 2000c. Cada espécie bacteriana cresceu até sua densidade óptica ótima, correspondente ao crescimento exponencial (fase logarítmica) determinada anteriormente pela curva de crescimento de cada espécie.

As bactérias foram lavadas uma vez por 10 min de centrifugação a 7820 g com 10 mM de tampão fosfato de sódio, pH 7,4, e ressuspensas a  $4 \times 10^5$  UFC/ml em tampão fosfato contendo 10% de TSB. Apenas as espécies *M. morganii* e *P. rettgeri* precisaram de meio mais concentrado sendo cultivadas em tampão fosfato a 50% de TSB, para atingir a mesma concentração de células que as demais no cultivo. Foram adicionadas 90µl de cultura na microplaca de 96 poços contendo 10 µl de cada peptídeo distribuídos em triplicata, diluídos em série a partir de 0,64 µg/µl até 0,01 µg/µl e então incubadas à 37 °C por cerca de 18 horas. A crotamina nativa e a crotamina desnaturada foram utilizadas para a padronização dos ensaios sendo a primeira diluída a partir de 1,24 µg/µl até 0,01 µg/µl e a segunda diluída a partir de 0,64 µg/µl até 0,01 µg/µl. Foram realizados três experimentos com células

independentes em triplicatas. Para o controle de crescimento bacteriano foi utilizado como positivo 90 µl de cultura com 10 µl de ácido acético 0,01% e como controle negativo 90 µl de tampão fosfato contendo (com 10% ou 50% de TSB) mais 10 µl de ácido acético 0,01%. A turbidez das culturas foi lida à 600 nm em leitor de microplacas Epoch™ da Bioteck®. A CIM de cada peptídeo foi determinada pela menor concentração de peptídeo capaz de inibir 90% do crescimento bacteriano.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Sequências β-defensina-símiles

Foram obtidas 13 sequências β-defensina-símiles de serpentes, de 10 espécies de viperídeos. A nomenclatura dos genes seguiu o padrão que se têm utilizado para ratos e camundongos, segundo o banco de dados *Mouse Genome Database* (MGD) (Eppig et al., 2012), por exemplo, *Def* da família das defensinas mais a letra *B* da subfamília β, e as iniciais da espécie de serpente *Ba* de *B.atrox* seguido do número da sequência. Entretanto, para facilitar a visualização da nomenclatura gênica nas imagens das árvores filogenéticas optamos por utilizar os nomes das espécies completos mais a sigla da família das β-defensinas seguida do número da sequência. Sequências não β-defensinas receberam o prefixo Seq. Na figura 3, apresentamos os nomes dos genes assim como o número de acesso ao GenBank de cada sequência.

Serpente	*	#	GenBank
grupo 'atrox'	<i>B.atrox_defensinaB_01</i>	<i>DefbBa01</i>	KC117158
	<i>B.leucurus_defensinaB_01</i>	<i>DefbBl01</i>	KC117166
grupo 'alternatus'	<i>B.alternatus_sequência_01</i>	<i>SeqBal01</i>	KC117159
grupo 'jararaca'	<i>B.jararaca_defensinaB_01</i>	<i>DefbBj01</i>	KC117163
	<i>B.jararaca_defensinaB_02</i>	<i>DefbBj02</i>	KC117164
	<i>B.insularis_sequência_02</i>	<i>SeqBi02</i>	KC117162
grupo 'jararacussu'	<i>B.jararacussu_defensinaB_01</i>	<i>DefbBju01</i>	KC117165
grupo 'neuwiedi'	<i>B.diporus_defensinaB_01</i>	<i>DefbBd01</i>	KC117160
	<i>B.erythromelas_defensinaB_01</i>	<i>DefbBe01</i>	KC117161
	<i>B.mattogrossensis_defensinaB_02</i>	<i>DefbBm02</i>	KC117167
	<i>B.mattogrossensis_defensinaB_03</i>	<i>DefbBm03</i>	KC117168
	<i>B.neuwiedi_defensinaB_02</i>	<i>DefbBn02</i>	KC117169
	<i>B.pauloensis_defensinaB_01</i>	<i>DefbBp01</i>	KC117170
gênero <i>Lachesis</i>	<i>L.muta_defensinaB_01</i>	<i>DefbLm01</i>	KC117171
	<i>L.muta_defensinaB_02</i>	<i>DefbLm02</i>	KC117172

**Figura 3** - Nomes das sequências β-defensina-símiles de serpentes brasileiras da família Viperidae descritas neste trabalho.

Grupo das serpentes botrópicas, \*nome das sequências gênicas utilizadas nas análises filogenéticas e #nome dos genes e número de acesso ao GenBank.  
Fonte: Correa e Oguiura, 2013.

O alinhamento dessas sequências com os genes da crotamina e do crotasin, que pode ser vista no material suplementar 2, permitiu determinar as regiões intrônicas e exônicas. Os genes  $\beta$ -defensina-símiles dos viperídeos estudados apresentaram tamanhos totais variando de 852pb a 2397pb (tabela 1). Essa variação no tamanho total dos genes também é vista em aves, variando de 900pb a 4608pb (XIAO et al., 2004); em lagartos (*Anolis carolinenses*) de 689pb a 12825pb (DALLA VALLE et al., 2012) e em peixes de 398pb a 4544pb (ZOU et al., 2007).

A maioria das sequências amplificadas apresentou três éxons, separados por dois íntrons, um longo de fase 1 e um curto de fase 2. Esta organização gênica é a mesma dos genes da crotamina e crotasin em *C. d. terrificus*, da maioria dos genes  $\beta$ -defensina do lagarto verde *Anolis carolinensis* (DALLA VALLE et al., 2012) e de peixes como a truta (ZOU et al., 2007), mas diferente dos mamíferos (PATIL et al., 2005), cujos genes  $\beta$ -defensina são compostos de dois éxons separados por um íntron de comprimento variável; e as aves, com quatro éxons curtos separados por três íntrons de tamanhos variáveis, mas com exceções (XIAO et al., 2004).

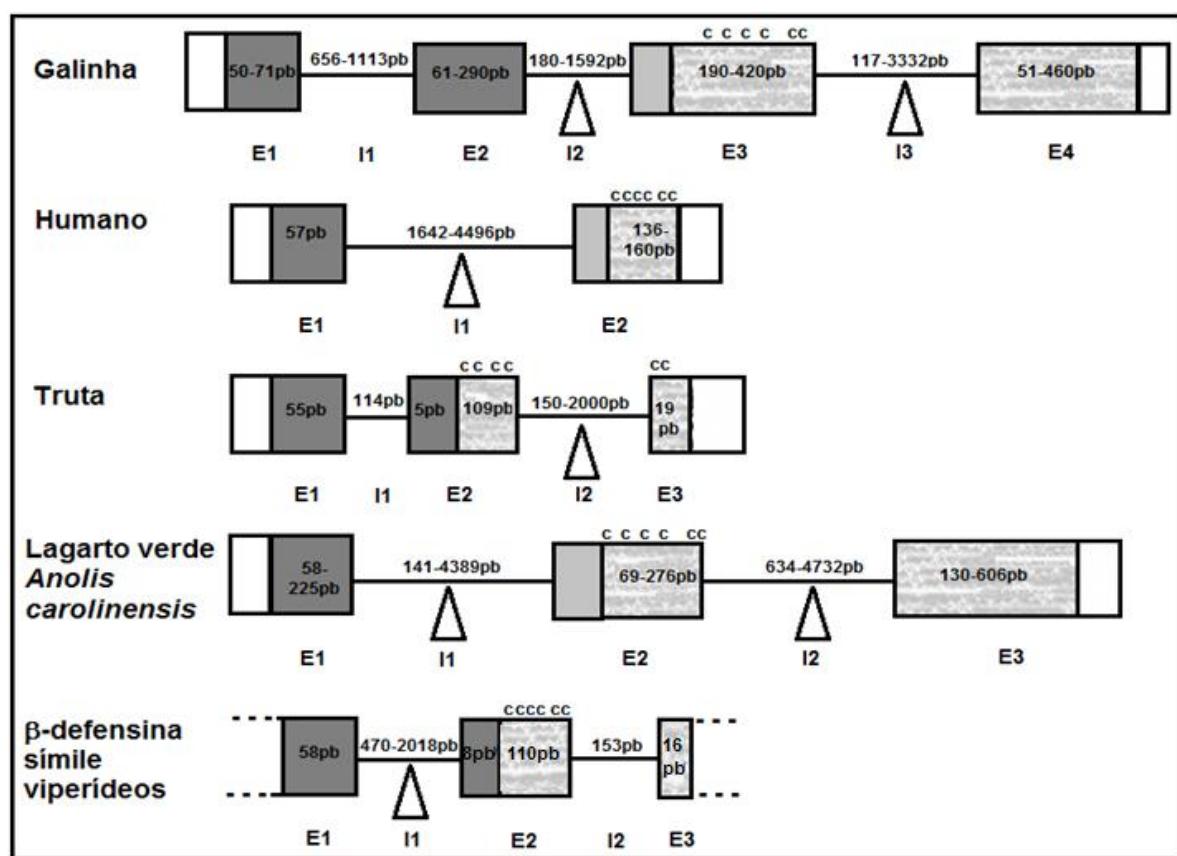
Genes	Espécies	Total	éxon I	ítron I	éxon II	ítron II	éxon III
<i>DefbBa01</i>	<i>B. atrox</i>	2166	58	1784	121*+203 <sup>&amp;</sup>	-	-
<i>SeqBal01</i>	<i>B. alternatus</i>	1658	58	1308	83*+209 <sup>&amp;</sup>	-	-
<i>DefbBd03</i>	<i>B. diporus</i>	2134	58	1758	112	153	16*+37 <sup>&amp;</sup>
<i>DefbBe01</i>	<i>B. erythromelas</i>	852	58	470	118	153	16*+37 <sup>&amp;</sup>
<i>SeqBi02</i>	<i>B. insularis</i>	1630	58	1281	68*+207 <sup>&amp;</sup>	-	-
<i>DefbBj01</i>	<i>B. jararaca</i>	861	58	479	118	153	16*+37 <sup>&amp;</sup>
<i>DefbBj02</i>	<i>B. jararaca</i>	2145	58	1762	118	154	16*+37 <sup>&amp;</sup>
<i>DefbBju01</i>	<i>B. jararacussu</i>	1966	58	1619	118	149	16*+37 <sup>&amp;</sup>
<i>DefbBl01</i>	<i>B. leucurus</i>	2397	58	2018	118	153	13*+37 <sup>&amp;</sup>
<i>DefbBm02</i>	<i>B. mattogrossensis</i>	2001	58	1619	118	153	16*+37 <sup>&amp;</sup>
<i>DefbBm03</i>	<i>B. mattogrossensis</i>	2001	58	1619	118	153	16*+37 <sup>&amp;</sup>
<i>DefbBn02</i>	<i>B. neuwiedi</i>	2083	58	1701	118	153	16*+37 <sup>&amp;</sup>
<i>DefbBp01</i>	<i>B. pauloensis</i>	1271	58	898	112	150	16*+37 <sup>&amp;</sup>
<i>DefbLm01</i>	<i>L. muta</i>	1271	58	898	115	153	10*+37 <sup>&amp;</sup>
<i>DefbLm02</i>	<i>L. muta</i>	1909	58	1511	118	153	10*+59 <sup>&amp;</sup>
<i>Crt-p1</i>	<i>C. d. terrificus</i>	1319	58	898	124	145	16*+37 <sup>&amp;</sup>
<i>Cts-p2</i>	<i>C. d. terrificus</i>	2147	58	1762	118	152	16*+37 <sup>&amp;</sup>

**Tabela 1** - Tamanho e organização dos genes  $\beta$ -defensina-símiles de serpentes peçonhentas brasileiras.

O comprimento dos éxons e íntrons é apresentado em pares de bases. A sequência *Crt-p1* e *Cts-p2* correspondem aos genes da crotamina e crotasin, respectivamente, de *C. d. terrificus*. \* Indica o tamanho das sequências codificantes e <sup>&</sup> indica a região 3'UTR do último éxon.

Fonte: Correa e Oguiura, 2013.

A variação no tamanho total dos genes  $\beta$ -defensina-símiles em serpentes se deve ao tamanho do ítron 1, que variou de 470pb a 2018pb, assim como ocorre em mamíferos e outros animais (CASADEI et al., 2009; LUENSER et al., 2005; XIAO et al., 2004). Os modelos de estrutura dos genes  $\beta$ -defensina símiles nos animais são ilustrados na figura 4. A variação no tamanho dos ítrons parece ser uma constante nos genes das  $\beta$ -defensinas dos vertebrados de uma mesma espécie animal, assim como uma variação na quantidade dos ítrons entre os grandes grupos indicando uma evolução dinâmica nessa região gênica.



**Figura 4** - Modelos de estrutura dos genes  $\beta$ -defensinas em aves, mamíferos, peixes, lagarto e serpentes.

Os quadrados e retângulos representam os exons. Preenchidos em branco, representam as regiões não traduzíveis 5'UTR (à esquerda) e 3'UTR (à direita); em cinza escuro, o peptídeo sinal; em cinza claro, a pró-região presente em aves e mamíferos; e em cinza hachurado, o peptídeo maduro. A linha preta indica o ítron sem escala. O triângulo destaca a grande variação de tamanho das regiões intrônicas. E1 a E4 = exon1 a 4; I1 a I3 = ítron 1 a 3.

Fonte: Modificado de Casadei et al., 2009; Dalla Valle et al., 2012; Patil et al., 2005; Xiao et al., 2004.

O éxon 1 codificou o peptídeo sinal, o éxon 2, os três aminoácidos finais do peptídeo sinal e o peptídeo maduro; e o éxon 3, os três aminoácidos finais do peptídeo maduro e uma lisina C-terminal. O tamanho dos exons era bastante conservado: o éxon 1 tinha 58 nucleotídeos, conservados em todas as sequências, o éxon 2 tinha de 112 a 122 nucleotídeos e o éxon 3 tinha de 10 a 16 nucleotídeos.

O motivo de seis cisteínas conservado encontra-se codificado no éxon 2 nas serpentes, assim como ocorre em aves, lagartos e mamíferos. Apenas em peixes as seis cisteínas são codificadas em dois exons, estando quatro cisteínas codificadas no éxon 2 e duas no éxon 3 (ZOU et al., 2007).

A similaridade das sequências foi analisada comparando-as com as sequências dos genes da crotamina e do crotasin e os resultados obtidos são apresentados na tabela 2. Podemos observar que as regiões do éxon 1, íntrons 1 e 2 têm alta similaridade das sequências tanto com *Crt-p1* quanto *Cts-p2*. A conservação da sequência do éxon 1 nos vários genes se deve ao fato dela codificar a região do peptídeo sinal cuja função é direcionar a pró-proteína para o local em que será processada e depois exportada.

Genes	Éxon 1		Íntron 1		Éxon 2		Íntron 2		Éxon 3	
	<i>Crt-p1</i>	<i>Cts-p2</i>								
<i>DefbBa01</i>	96,6	93,1	92,8	93,6	63,6	66,9	96,6	97,4	75,0	68,8
<i>DefbBd03</i>	96,6	93,1	92,8	94,2	62,5	66,9	95,9	96,7	68,8	62,5
<i>DefbBe01</i>	96,6	93,1	92,6	90,4	63,6	67,8	97,2	98,0	68,8	62,5
<i>DefbBj01</i>	96,6	93,1	93,9	92,0	63,6	67,8	97,2	98,0	68,8	62,5
<i>DefbBj02</i>	96,6	93,1	89,1	91,1	67,8	72,0	95,9	96,7	75,0	75,0
<i>DefbBju01</i>	96,6	93,1	92,1	92,7	70,3	69,5	97,2	97,9	81,3	81,3
<i>DefbBl01</i>	94,8	98,3	91,9	91,2	68,1	71,6	95,9	96,7	75,0	75,0
<i>DefbBm02</i>	96,6	93,1	91,9	92,3	64,4	66,9	96,6	97,4	81,3	81,3
<i>DefbBm03</i>	96,6	93,1	91,9	92,2	63,6	67,8	96,6	97,4	75,0	75,0
<i>DefbBn02</i>	96,6	93,1	89,5	91,1	67,8	71,2	95,9	96,7	75,0	75,0
<i>DefbBp01</i>	94,8	91,4	92,7	93,6	62,5	71,4	96,5	97,3	68,8	62,5
<i>DefbLm01</i>	96,6	93,1	92,6	94,5	63,5	69,6	95,9	96,7	90,0	70,0
<i>DefbLm02</i>	96,6	93,1	92,7	93,4	69,5	57,6	96,6	97,4	80,0	60,0

**Tabela 2** - Similaridade entre as sequências β-defensina-símiles obtidas com os genes da crotamina (*Crt-p1*) e do crotasin (*Cts-p2*) de *C. d. terrificus*.

A similaridade por identidade foi calculada no programa MEGA e está expresso em porcentagem. Legenda: Ba de *Bothrops atrox*; Bd, *B. diporus*; Be, *B. erythromelas*; Bj, *B. jararaca*; Bju, *B. jararacussu*; Bl, *B. leucurus*; Bm, *B. mattogrossensis*; Bn, *B. neuwiedi*; Bp, *B. pauloensis*; Lm, *Lachesis muta*.

Fonte: Correa e Oguiura, 2013.

Os íntrons também são bastante similares embora haja diferença de comprimentos de uma sequência para outra, isso poderia ser consequência da ocorrência de vários eventos de inserção, deleção ou mesmo duplicação.

A região mais variável é a do éxon 2, cuja similaridade gira em torno de 65% a 70%. Mas, de modo geral todas as sequências são mais similares ao gene *Cts-p2* do que ao gene *Crt-p1* nesta região.

A taxa de similaridade do éxon 3 varia de 60 a 90%, mas pela variação em seu comprimento do que pela alteração na sequência.

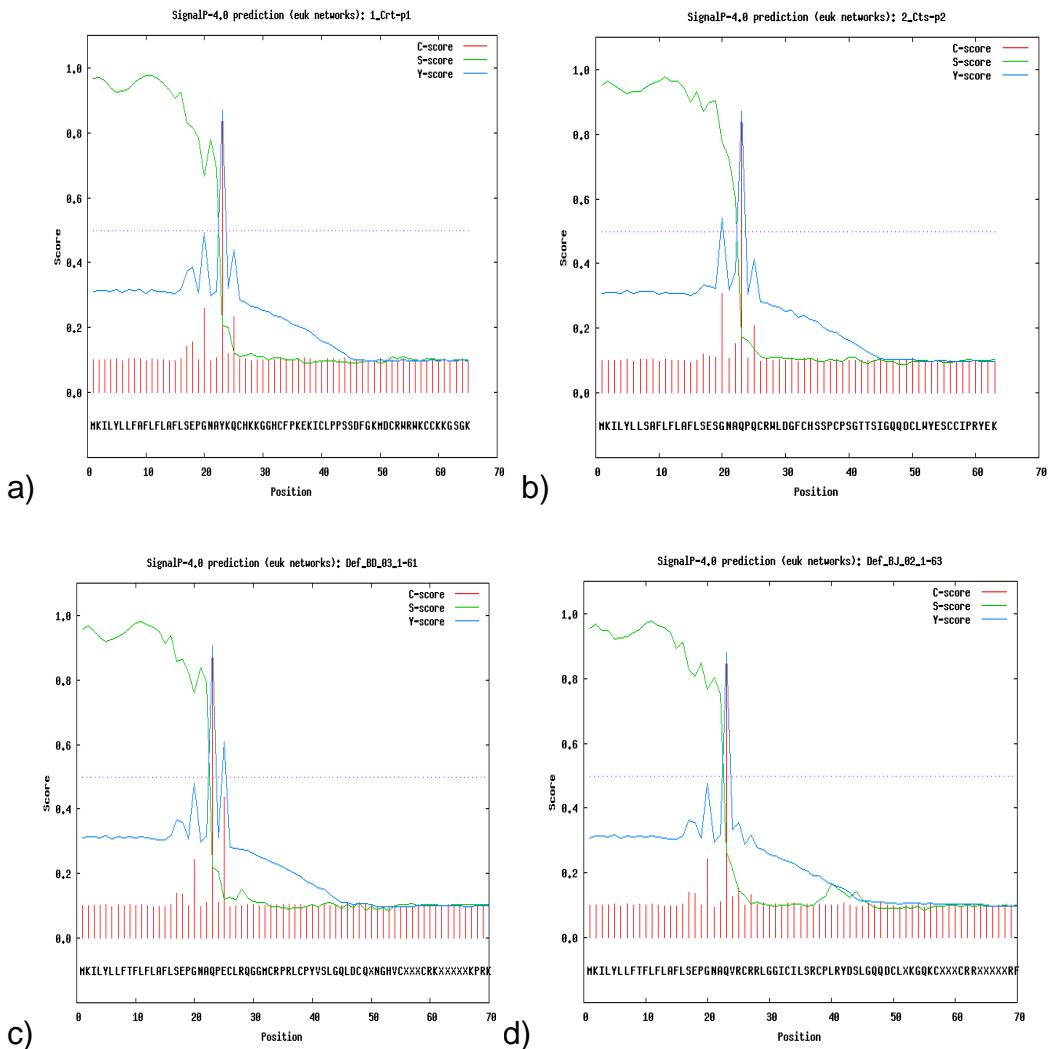
Apesar da similaridade de sequências nucleotídicas, há mutações em *B.alternatus\_sequência\_01* e *B.insularis\_sequência\_02* que altera o quadro de leitura ocasioando a perda das três últimas cisteínas e resultando na perda da estrutura de β-defensina.

A sequência *B.atrox\_defensinaB\_01* tem códon de parada prematuro que interrompe a sequência após o término do éxon 2, não interrompendo a sequência de seis cisteínas que estão conservadas nesta região, portanto não comprometendo o esqueleto de β-defensina. É provável que sua função antimicrobiana seja mantida apresentando desta forma uma região carboxi terminal mais curta em relação aos demais peptídeos.

A sequência *B.neuwiedi\_defensinaB\_02* tem uma cisteína a mais, logo após a primeira, mas que não altera o quadro de leitura.

### **3.2 Análise das sequências aminoacídicas**

Em todas as sequências o sítio de clivagem do peptídeo sinal ocorreu na posição 22/23 dos aminoácidos após análise no programa Signal P. Foi obtido um gráfico para cada sequência peptídica e após o cálculo dessa estimativa foi observado o pico do sítio de clivagem na região entre o peptídeo sinal e o peptídeo maduro (figura 5 a-d). Essa análise mostrou que as sequências β-defensinas descritas neste trabalho codificam um pró-peptídeo constituído de peptídeo sinal e a β-defensina-símile madura. Assim como em trutas e lagartos, as β-defensinas dos viperídeos estudados não apresentam pré-pró-peptídeos, como é comum em aves e mamíferos.



**Figura 5** - Sítio de clivagem do peptídeo sinal calculado pelo Signal P das sequências aminoacídicas.

Em a) crotamina; b) crotasin; c) DefbBd03; d) DefbBj02. No eixo y temos: "C-score" que é o valor do sítio de clivagem deduzido representado em vermelho corresponde a cada aminoácido; "S-score" em verde é o valor do peptídeo sinal deduzido; e "Y-score" é a combinação de "C-" e "S-scores". Valores altos de "Y-score" mostram onde é provável que a clivagem ocorra.

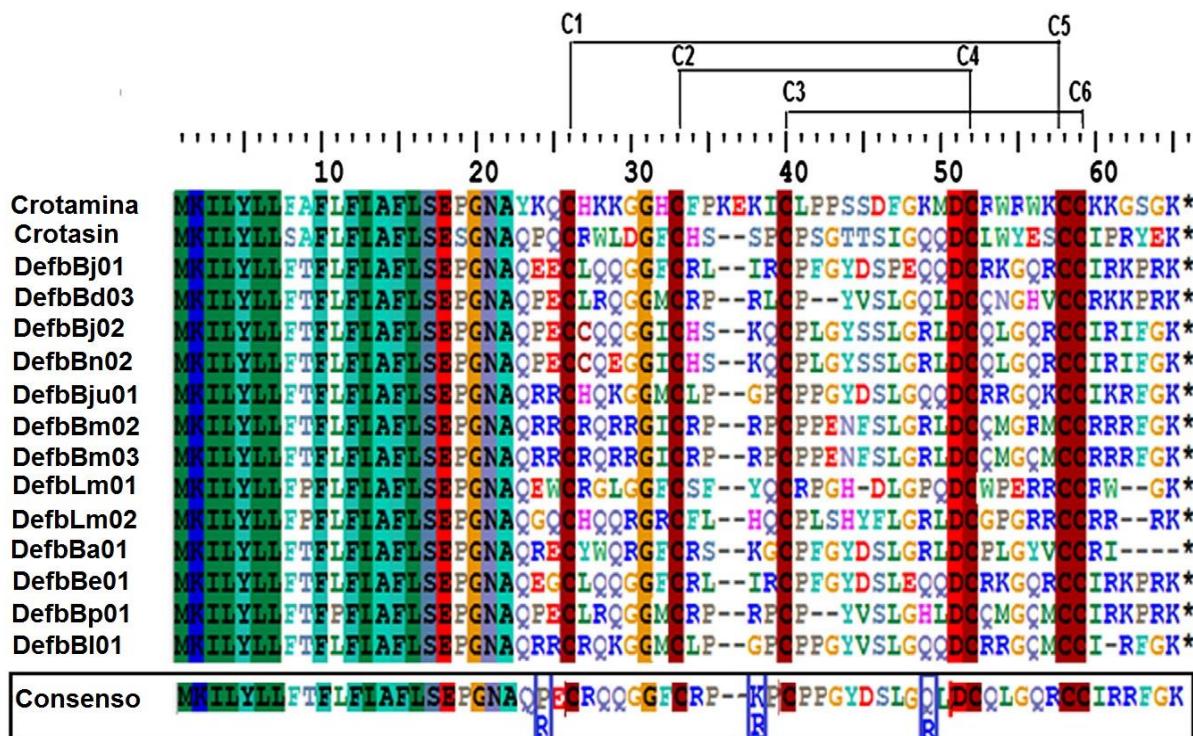
O peptídeo sinal é bastante hidrofóbico e rico em leucina (cinco leucinas e duas isoleucinas dentre os 22 aminoácidos), uma característica comum ao peptídeo sinal de outras  $\beta$ -defensinas de mamíferos (LUENSER et al., 2005; PATIL et al., 2005).

Apesar da sequência aminoacídica da  $\beta$ -defensina madura ser altamente variável, elas possuem as seis cisteínas nas mesmas posições conservadas da família das  $\beta$ -defensinas, carga líquida positiva (de +2 a +11), um glutamato na região amino terminal, uma glicina conservada na nona posição, um aspartato na 29<sup>a</sup> posição do peptídeo maduro e uma lisina carboxi terminal (Figura 6). As

moléculas  $\beta$ -defensina-símiles descritas neste trabalho, assim como o crotasin, tem em comum uma glutamina como primeiro aminoácido na região amino terminal do peptídeo maduro, diferente da crotamina que tem uma tirosina.

A crotamina possui 42 resíduos de aminoácidos, sendo dois aminoácidos a mais que a maioria dos demais peptídeos de  $\beta$ -defensina-símiles (tirosina e glutamato na posição 36) e o crotasin com 40 resíduos de aminoácidos. As exceções são as sequências DefbBd03, DefbBp01, DefbLm01 e DefbLm02 com 38 resíduos de aminoácidos; DefbBa01 com 37 resíduos e a sequência DefbBl01 com 39 resíduos de aminoácidos na região do peptídeo maduro.

Essas sequências aminoacídicas foram alinhadas, sendo possível inferir uma sequência consenso de maioria dos peptídeos  $\beta$ -defensina-símiles de viperídeos brasileiros que é apresentada na mesma figura 6.



**Figura 6** - Alinhamento das sequências aminoacídicas das  $\beta$ -defensina-símiles de viperídeos brasileiros.

As sequências peptídicas foram alinhadas usando o algoritmo Muscle no programa BioEdit v7.1.3. As colunas em verde indicam os aminoácidos mais conservados; em azul os básicos; em vermelho os ácidos; em vermelho mais escuro as cisteínas. Na última linha, destacado no quadro preto, a sequência consenso de maioria, e destacado em quadro azul na sequência consenso os dois possíveis aminoácidos na mesma posição. Acima da figura, as linhas mostram as pontes dissulfeto entre as respectivas cisteínas.

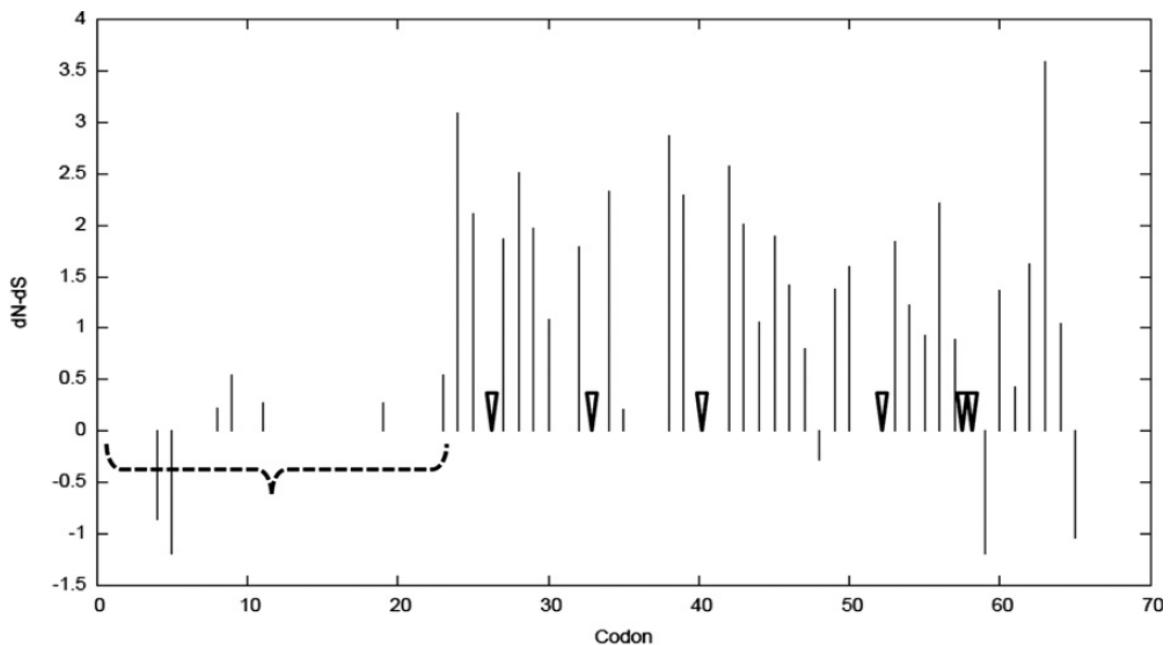
Fonte: Correa e Oguiura, 2013.

A sequência consenso padrão de  $\beta$ -defensinas madura em serpentes pode ser representada como: X<sub>3</sub>-C-X<sub>6</sub>-C-X<sub>4-6</sub>-C-X<sub>9-11</sub>-C-X<sub>5</sub>-CC-X<sub>4-6</sub> com uma grande proporção de aminoácidos básicos na região carboxi-terminal.

### **3.3 Taxas de substituição das regiões codificantes**

O cálculo das taxas de substituição das sequências exônicas de  $\beta$ -defensina-símiles na região do peptídeo sinal indicou que é uma sequência bastante conservada e sob seleção negativa (em geral  $\omega \leq 0$ ). Os exons 2 e 3, por sua vez indicaram altas taxas de substituição (em geral  $\omega > 1$ ) indicando que estão sob pressão seletiva positiva (figura 7), exceto no códon das cisteínas que são conservados ( $\omega=0$ ). Este processo, conhecido como evolução acelerada, também ocorre nos exons de várias famílias de toxinas (FRY et al., 2005; NAKASHIMA et al., 1993; GIBBS; ROSSITER, 2007) como também na família das  $\beta$ -defensinas (HUGHES, 1999).

Morrison et al. (2003) também observaram altas taxas de variação nas sequências do peptídeo maduro nas  $\beta$ -defensinas de roedores. Eles sugerem que essas substituições sem perda da função antimicrobiana seria vantajosa para aumentar o espectro contra diferentes patógenos. Assim como para as toxinas que aumentariam o espectro de ação em relação à evolução do sistema de defesa das presas.



**Figura 7** - Análise das taxas de substituição nas regiões codificantes.

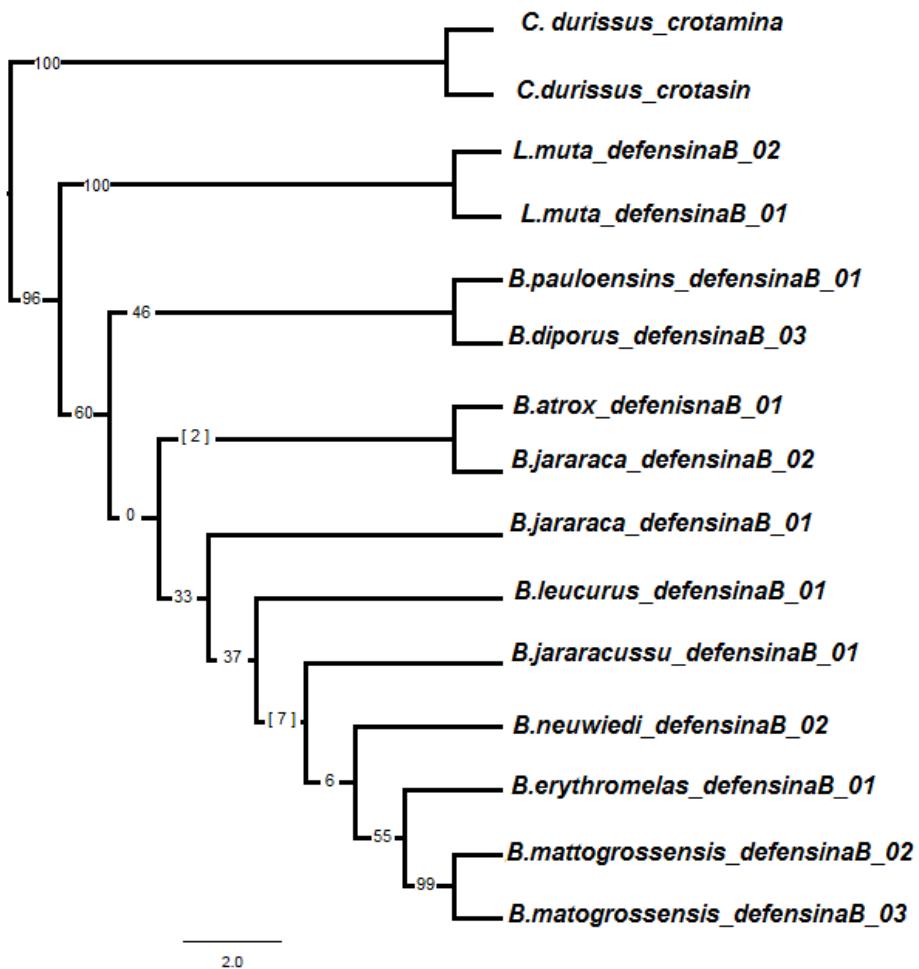
No eixo Y, são apresentados os valores de  $\omega$  ( $dN/dS$ ) e no eixo X, as sequências codificantes dos exons 1, 2 e 3. Nas linhas pontilhadas indicamos os aminoácidos que codificam o peptídeo sinal. Os triângulos indicam a posição conservada das cisteínas.  
Fonte: Correa e Oguiura, 2013.

### 3.4 Filogenia dos genes $\beta$ -defensina-símiles

O alinhamento foi feito no programa Mafft, opção E-INS-i utilizando cinco partições de dados: só exons (1, 2 e 3), só ítron 1, só ítron 2, ítrons 1 e 2, e exons e ítrons concatenados.

As árvores filogenéticas apresentadas neste capítulo foram obtidas utilizando as partições: exons, ítrons, e exons mais ítrons concatenados.

A árvore filogenética de ítrons (1 e 2), apresentada na figura 8, é a árvore mais parcimoniosa gerada, dicotômica cuja análise é bastante resolvida, apesar do baixo suporte na maioria dos ramos.



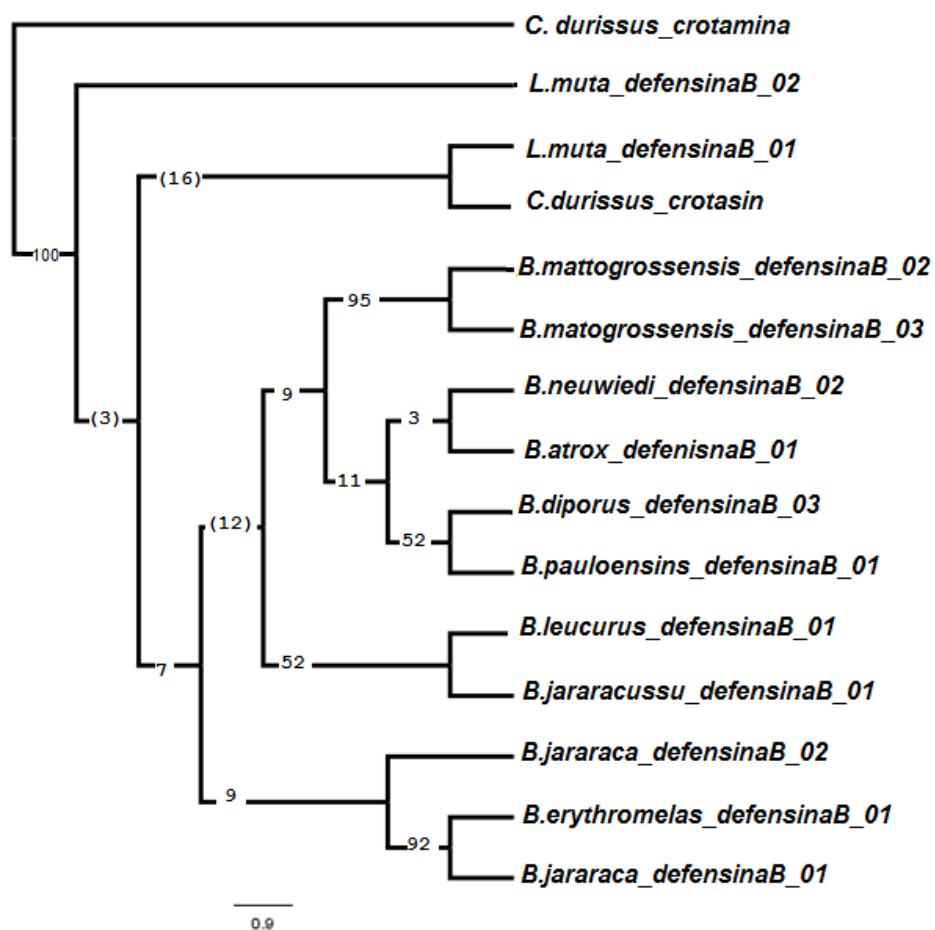
**Figura 8 - Árvore filogenética com sequências de ítrons.**

Árvore filogenética obtida por máxima parcimônia (MP) no programa TNT v1.1 com sequências intrônicas, com valores de suporte por bootstrap (1000 réplicas).  
Fonte: Correa e Oguiura, 2013.

Os gêneros *Crotalus*, *Lachesis* e *Bothrops* encontram-se separados em ramos diferentes, com uma topologia geral similar ao mostrado por Carrasco et al. (2012) indicando que há sinal filogenético nas sequências intrônicas. Portanto, mesmo com a grande variação de tamanho do ítron 1, sua composição mantém o sinal filogenético necessário para a reconstrução das relações entre as sequências. As sequências intrônicas do grupo 'neuwiedi' são recuperadas em vários ramos diferentes. As sequências da jararaca podem ser parálogas, por serem recuperadas em ramos diferentes, o que não é surpreendente pela possibilidade de existirem várias cópias gênicas. As sequências de *B. matogrossensis* podem ser alelos, pois as cópias são quase idênticas.

O sinal filogenético também foi observado por Luenser et al. (2005) que analisaram as sequências intrônicas de  $\beta$ -defensinas de caprinos e ovinos, onde as espécies de uma mesma tribo foram recuperadas juntas. Os autores discutem que as sequências intrônicas, por estarem sujeitas à evolução neutra, são úteis nas investigações evolutivas.

A análise filogenética de exons (1, 2 e 3) é apresentada na figura 9, mostrando a árvore consenso de três árvores geradas no programa TNT.



**Figura 9** - Árvore filogenética com sequências de exons (1, 2 e 3).

Árvore filogenética por método de máxima parcimônia (MP) no programa TNT v1.1 com sequências exônicas. Valor de suporte por bootstrap (1000 réplicas).  
Fonte: Correa e Oguiura, 2013.

A sequência da toxina *C.durissus\_crotamina* aparece separada das demais defensina-símiles, provavelmente enfatizando a diferença na função. O sinal filogenético é perdido, pois as sequências *C.durissus\_crotasin* com *L.muta\_defensinaB\_01* são recuperadas como grupos irmãos.

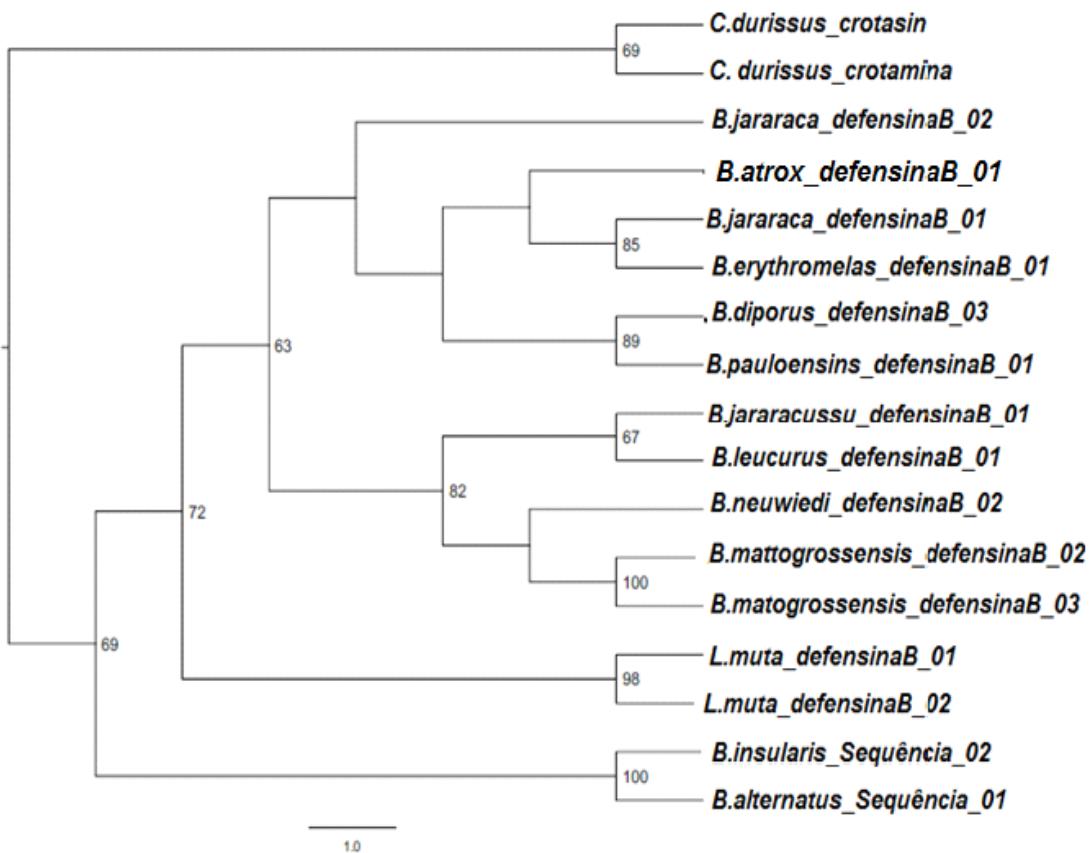
As únicas relações no gênero *Bothrops* que foram mantidas na árvore de exons, quando comparadas às obtidas na árvore filogenética de íntrons, foram *B.mattogrossensis\_defensinaB\_02* e *03*, como também a *B.diporus\_defensinaB\_03* e *B.pauloensis\_defensinaB\_01*.

Provavelmente, a perda do sinal filogenético se deve ao fato dessa região gênica estar sob evolução acelerada, o que gera alta variabilidade nas sequências.

Para a filogenia das sequências concatenadas foram utilizadas as sequências dos íntrons e exons, mais as sequências não β-defensinas: *B.insularis\_Sequência\_02* e *B.alternatus\_Sequência\_01*. A falta de sinal de "splicing" dificultou determinar as partições gênicas para as análises anteriores, portanto elas foram incluídas somente nessa filogenia.

Na árvore de genes concatenados o sinal filogenético foi recuperado e as relações entre as sequências apresentaram um melhor suporte. Encontram-se agrupadas as sequências não β-defensinas, β-defensina-símiles de *Crotalus*, das *Lachesis*, e duas linhagens das *Bothrops* (figura 10). Nessa árvore, os genes β-defensinas símiles, não mantém as relações entre as espécies encontradas por Carrasco et al. (2012) para o gênero *Bothrops*.

Nesta árvore o sinal filogenético é recuperado e ela apresenta-se dicotômica, bem resolvida e similar àquela obtida da partição de íntrons, com elevados valores de suporte dos ramos. Portanto, optamos por esta árvore para traçarmos a história evolutiva de genes β-defensina-símiles em viperídeos. Não houve diferença na topologia da árvore ou nos valores de suporte quando adicionamos ou removemos as sequências não β-defensinas, portanto optamos por adicioná-las para aumentar a amostragem e enriquecer o número de sequências.



**Figura 10** - Árvore filogenética com sequências completas (éxons e íntrons concatenados) mais sequências de não  $\beta$ -defensinas.

Alinhamento no MAFFT, árvore filogenética por método de máxima parcimônia (MP), no programa TNT v1.1 e valores de suporte por bootstrap (1000 réplicas).  
Fonte: Correa e Oguiura, 2013.

Os genes *B.jararaca\_defensina\_01* e *02* podem ser parálagos que teriam se duplicado antes da especiação dos grupos '*neuwiedi*', '*jararaca*' e '*jararacussu*'.

Os baixos suportes observados em alguns ramos nas árvores podem ser devido à falha amostral, seja pela falta de amostragem de genes de outras espécies ou grupos de serpentes ou pela falta de amostragem de cópias gênicas de uma determinada espécie. Portanto, um aumento do número de sequências pode melhorar tanto o suporte das filogenias como as relações entre elas.

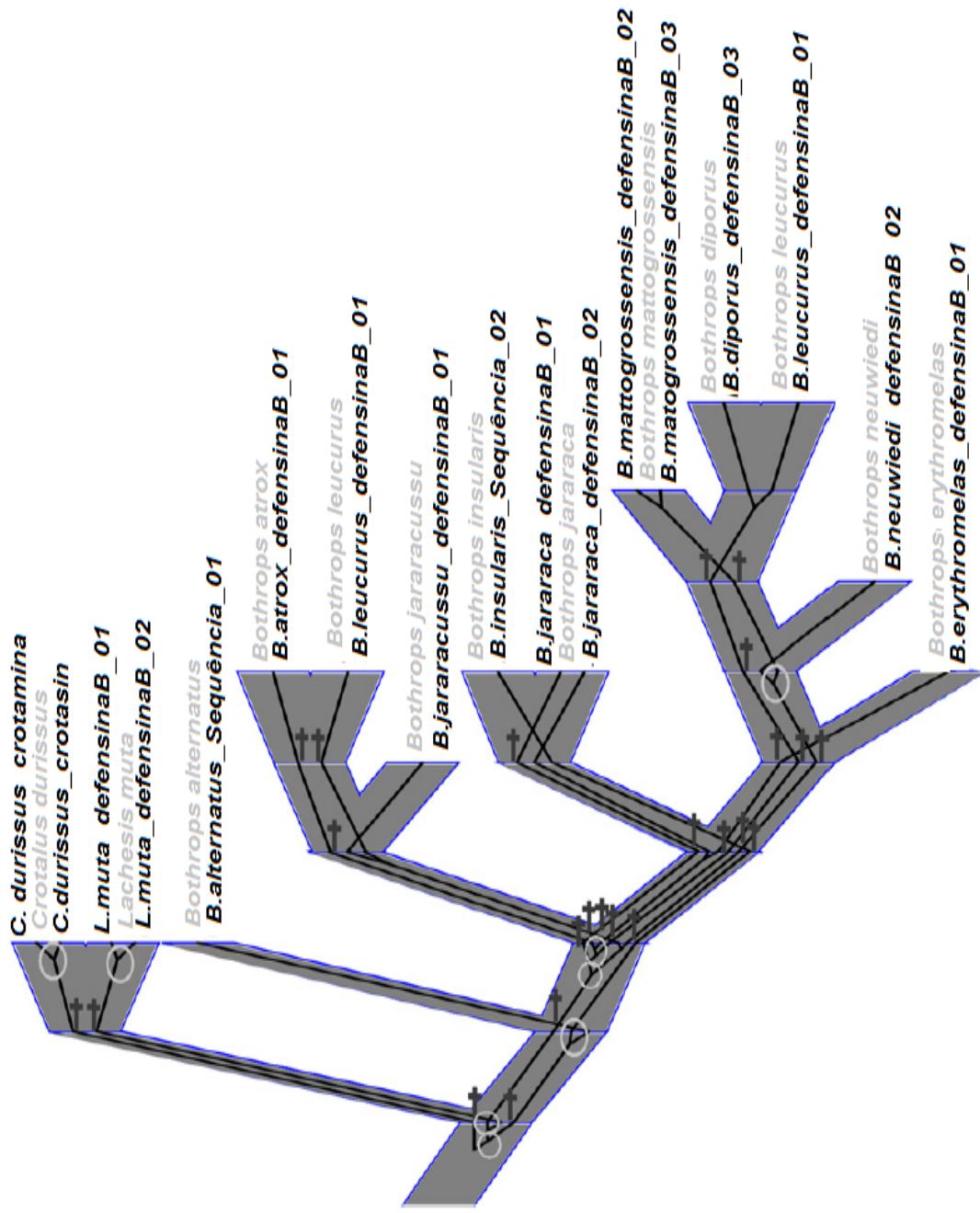
### 3.5 Conciliação da árvore gênica com a árvore de espécie

A árvore obtida a partir dos éxons e íntrons concatenados foi utilizada como árvore gênica ("Gene Tree") para a conciliação com a árvore de espécies ("Species Tree") para reconstruir a história evolutiva dos genes  $\beta$ -defensina-símiles em

serpentes peçonhentas brasileiras da família Viperidae. A árvore de espécie é um consenso baseado nas árvores de espécies obtidas a partir de sequências de DNA mitocondrial de Wüster et al (2002), Castoe e Parkinson (2006) e Fenwick (2009). A conciliação das duas árvores foi feita no programa Mesquite v2.75 (MADDISON & MADDISON, 2011). A árvore resultante da conciliação é vista na figura 11, onde se observam oito eventos de duplicações gênicas e 24 eventos de extinções gênicas.

O número elevado de extinções gênicas pode ser consequência de uma falha amostral, pois não foram exploradas todas as possíveis cópias que poderiam estar presentes em cada espécime animal, e nem todas as espécies e/ou grupos de serpentes da família Viperidae.

A conciliação das árvores ilustra que as atuais sequências  $\beta$ -defensina-símiles, que formam uma família multigênica, tenham evoluído a partir de um ancestral comum segundo o modelo de nascimento-e-morte (NEI; ROONEY, 2005) assim como sugerido para os genes da crotamina e do crotasin (OGUIURA et al., 2009) e outros genes de  $\beta$ -defensinas. O modelo postula que, em algumas famílias, os novos genes são criados por repetidas duplicações, podendo alguns destes permanecer por longos períodos de tempo no genoma. Outros genes, entretanto, podem ser inativados por mutações deletérias e, ou divergem criando novas funções, como foi o caso da crotamina que adquiriu uma nova função tóxica.



**Figura 11 - Conciliação das árvores filogenéticas de genes e de espécies.**

A conciliação das árvores filogenéticas foi implementada no programa Mesquite v2.75. Como restrição é utilizada a árvore consenso de espécies baseada em sequências de mtDNA (WÜSTER et al 2002; CASTOE; PARKINSON, 2006; FENWICK 2009). A árvore gênica está representada em linhas pretas enquanto a árvore gênica nos ramos largos e cinzas. Os eventos de duplicações gênicas estão ilustrados nos círculos cinza claro enquanto os eventos de extinção estão ilustrados como cruzes cinza médio. Os nomes das espécies de serpentes estão escritos em cinza claro e em preto, o nome das sequências gênicas.

Fonte: Correa e Oguiura, 2013.

### 3.6 Dados bioquímicos

Foram calculados para as sequências dos peptídeos lineares: a carga líquida em pH 7, o potencial de hidrofobicidade (segundo a escala de Wimley e White, 1996), o ponto isoeletérico (pI) e a massa no programa PepDraw (<http://www.tulane.edu/~biochem/WW/PepDraw/index.html>); os resultados são apresentados no quadro 2.

Sequências aminoacídicas	Espécies	pI	Carga líquida	Hidrofobicidade Kcal/mol	Massa molecular
<b>DefbBa01</b>	<i>B. atrox</i>	8,77	+5	+33,40	4,7kDa
<b>DefbBd03</b>	<i>B. diporus</i>	9,14	+6	+37,08	4,4kDa
<b>DefbBe01</b>	<i>B. erythromelas</i>	8,80	+5	+42,57	4,8kDa
<b>DefbBj01</b>	<i>B. jararaca</i>	8,52	+4	+45,05	4,8kDa
<b>DefbBj02</b>	<i>B. jararaca</i>	10,44	+9	+36,46	4,7kDa
<b>DefbBju01</b>	<i>B. jaracussu</i>	9,54	+7	+43,85	4,5kDa
<b>DefbBl01</b>	<i>B. leucurus</i>	9,63	+7	+32,96	4,5kDa
<b>DefbBm02</b>	<i>B. matogrossensis</i>	12,01	+11	+39,97	4,9kDa
<b>DefbBm03</b>	<i>B. matogrossensis</i>	11,85	+10	+38,93	4,9kDa
<b>DefbBn02</b>	<i>B. neuwiedi</i>	7,89	+2	+33,65	4,5kDa
<b>DefbBp01</b>	<i>B. pauloensis</i>	8,81	+5	+32,82	4,5kDa
<b>DefbLm01</b>	<i>L. muta</i>	7,98	+2	+33,69	4,5kDa
<b>DefbLm02</b>	<i>L. muta</i>	10,35	+8	+36,9	4,6kDa
<b>Crotasin</b>	<i>C. d.terribilis</i>	5,34	-1	+28,91	4,7kDa
<b>Crotamina</b>	<i>C. d.terribilis</i>	9,55	+7	+45,09	4,8kDa

**Quadro 2 - Dados bioquímicos dos polipeptídeos β-defensina-símiles de viperídeos.**

O quadro mostra o potencial de hidrofobicidade (na escala Wimley e White), a carga líquida em pH neutro, o ponto isoeletérico (pI) e a massa molecular das sequências aminoacídicas das β-defensina-símiles das serpentes. Dados estimados no programa PepDraw.

Fonte: Correa e Oguiura, 2013.

O pI dos peptídeos β-defensina-símiles lineares variou de 5,34 a 12,01 e corresponde ao valor de pH em que a molécula se encontre eletricamente neutra (GARCIA, 2007). A carga líquida dos peptídeos variou de +2 a +11 em pH neutro. Esta carga líquida positiva, uma característica das β-defensinas, é determinante na função e solubilidade destas moléculas (JENSSSEN et al., 2006), e determinante em sua função de interagir com a carga oposta, negativa, de membranas bacterianas.

A hidrofobicidade geral dos peptídeos, calculada na escala de Wimley e White (1996), é a contribuição de energia livre de todos os resíduos de aminoácidos que ocorrem naturalmente na transferência de um peptídeo de uma interface bicamada

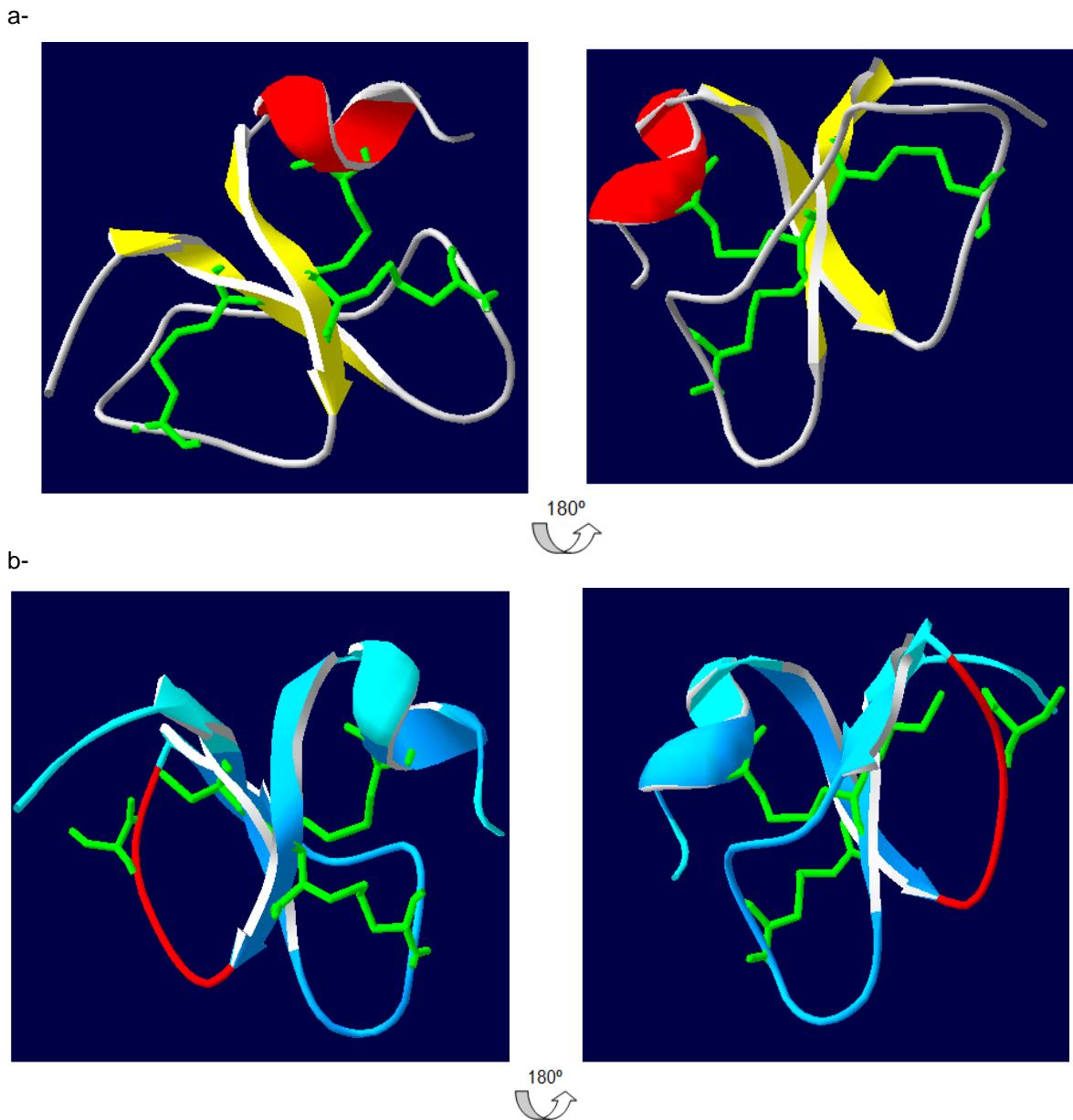
para a água. Quanto mais positivo for o valor ( $\Delta G$  kcal/mol), mais hidrofóbico são os aminoácidos localizados nos peptídeos (WIMLEY; WHITE, 1996), portanto capazes de interagir com a membrana formando poros ou micelas desestruturando a mesma. Assim os mais hidrofóbicos são crotamina e DefbBj01 (*B. jararaca*).

As substituições não-sinônimas, que alteram os aminoácidos, mesmo quando alteram as cargas mantém sua carga líquida e os peptídeos continuam sendo catiônicos, como foi também observado em roedores (MORISSON et al., 2003).

### 3.7 Modelagem tridimensional

A crotamina P01475 foi escolhida como modelo para estruturar tridimensionalmente os polipeptídeos  $\beta$ -defensinas, após análise filogenética com sequências proteicas (dados não mostrados por ser a molécula evolutivamente mais relacionada dentre aquelas cujas estruturas tridimensionais eram conhecidas. As estruturas moldes números 1H5O (Nicastro et al., 2003) e 1Z99 (Fadel et al., 2005), obtidos do banco de proteínas PDB, tiveram a estrutura tridimensional da crotamina purificada do veneno resolvida por ressonância magnética nuclear (NMR).

Os modelos tridimensionais gerados foram facilmente obtidos e apresentaram QMEAN em torno de 0,33, indicando que a estrutura é bastante confiável. Os peptídeos DefbBj01 e DefbBn02 apresentaram QMEAN relativamente mais baixo que a média (0,01 e 0,08 respectivamente), porém foi possível criar seus moldes assim como os demais, nas figuras 12a-b são apresentados alguns dos modelos de peptídeos tridimensionais obtidos.



**Figura 12** - Modelo de estrutura 3D de alguns dos peptídeos  $\beta$ -defensina-símiles de serpentes.

Imagen frontal e dorsal dos peptídeos. Em a) DefbBm02, em amarelo as duas folhas  $\beta$ , antiparalelas; em vermelho a estrutura em  $\alpha$ -hélice na região amino terminal; pontes dissulfeto em verde; em prata "looping" da sequência; em b) DefbBd03, as três folhas  $\beta$ , antiparalelas em azul com a estrutura em  $\alpha$ -hélice na região amino terminal, pontes dissulfeto em verde. Em vermelho região dos peptídeos correspondente à segunda cisteína cuja estrutura teve mal ajuste, o molde é maior e a ponte dissulfeto não é formada.

Na maioria dos modelos de  $\beta$ -defensina-símiles de serpentes são observadas as três folhas  $\beta$ -antiparalelas similares a de répteis (figura 1) e mamíferos (RÁDIS-BAPTISTA et al., 2003 e 2004; PATIL et al., 2004) e uma  $\alpha$ -hélice na região amino terminal. Para alguns peptídeos como DefbLm01 e DebBd03 não foi possível

observar todas as pontes dissulfeto formadas devido ao encurtamento destas sequências em relação aos demais e à crotamina, na região entre Cys<sup>3</sup> e Cys<sup>4</sup>, impossibilitando a formação do ângulo necessário para unir as duas cisteínas, Cys<sup>3</sup>-Cys<sup>6</sup>, ficando uma ponte aberta. Como se trata de uma estruturação artificial, hipotética, com base em um modelo selecionado, não é possível afirmar como esses peptídeos se comportam na natureza, como são estruturados realmente. Pode ser que estas pontes se formem naturalmente e pode ser que, utilizando outro modelo ainda não publicado como molde a estrutura desses peptídeos poderia ter maior similaridade estrutural. O peptídeo DefbBn02 tem uma cisteína a mais, logo após a primeira cisteína, mas que não alterou sua estrutura tridimensional na modelagem, o pareamento ocorreu normalmente entre as cisteínas 1-5, 2-4, 3-6, ficando apenas a cisteína excedente sem ligação à outro aminoácido .

Podemos comparar dois peptídeos de estrutura similar, a crotamina e a  $\beta$ -defensina humana-2 (hBD2). Ainda que tenham uma mesma arquitetura tridimensional esses peptídeos individualmente apresentam uma grande diversidade funcional. A hBD2 não tem atividade miotóxica em mamíferos mas a crotamina é uma potente miotoxina. A hBD2 tem largo espectro antibacteriano enquanto a crotamina tem uma atividade antimicrobiana mais restrita porém antiparasitária contra *Leishmania amazonensis* (PASSERO et al., 2007); hBD2 se liga preferencialmente à células procarióticas enquanto dados indicam que crotamina é seletiva para células eucarióticas (OGUIURA et al., 2011; PEREIRA et al., 2011; YAMANE et al., 2013; YOUNT et al., 2009).

Essas diferenças nas atividades biológicas resultam de variações físico-químicas da superfície e da composição de aminoácidos desses peptídeos básicos a despeito de sua similaridade estrutural. Além disso, a inspeção do potencial eletrostático da superfície molecular indica que a distribuição de cargas varia muito entre toxinas e peptídeos antimicrobianos com esqueleto molecular similar. A hidrofobicidade da superfície dessas moléculas também é bastante diferente quando comparadas entre si. Essa variação de carga e hidropaticidade pode então explicar as diferenças encontradas nas especificidades e funções biológicas vistas nesses peptídeos similares.

Nos modelos não foi possível observar a estimada distribuição de cargas uma vez que o cálculo é feito pela equação de Poisson–Boltzmann\*distância<sup>1</sup>(FOGOLARI; BRIGO; MOLINARI, 2002), isso quer dizer que duas cargas diferentes

quando se aproximam estas acabam se anulando, aparecendo em branco, como neutra. Mesmas cargas quando distantes podem aparecer em menor intensidade de cor na molécula, portanto a modelagem permite ter uma ideia global da distribuição de suas cargas, mas não se pode inferir se cada peptídeo terá atividade antimicrobiana, apenas estimar se é possível sua interação com a membrana microbiana.

### 3.8 Ensaios antimicrobianos

Os resultados dos ensaios antimicrobianos com os peptídeos cujas sequências foram descritas nesse trabalho são apresentados na tabela 3. Também foram incluídas a crotamina e a hBd02.

A espécie bacteriana mais sensível para a maioria dos peptídeos foi *Micrococcus luteus* A270 cujo crescimento não foi inibido apenas na cultura com os peptídeos DefbBn02 e crotasin. A CIM para esta espécie variou de 2 a 128 µg/ml. A *E. coli* ATCC 25922 foi a segunda espécie bacteriana mais sensível aos peptídeos testados, seis deles com CIM variando de 8 a 128 µg/ml. Estas cepas são bastante utilizada em bioensaios pela sua sensibilidade aos antimicrobianos (YAMANE et al., 2013). A espécie *C. freundii* também se mostrou sensível e seu crescimento foi inibido por cinco peptídeos, com CIM variando de 8 a 128 µg/ml. *S. aureus* foi sensível apenas para dois peptídeos com CIM de 32 e 64 µg/ml e *K. pneumonia* apresentou sensibilidade apenas contra o peptídeo de maior carga positiva, DefbBm02 (+11,0). Apesar das cepas terem sido obtidas da flora bucal de serpentes, os peptídeos analisados não apresentaram atividade antibiótica contra a maioria delas. Talvez por serem sequências que seriam expressas em outros órgãos diferentes do gastrointestinal ou pele, ou mesmo por utilizarmos peptídeos lineares que poderiam estar sujeitos a agregação ou degradação. A *S. aureus* ATCC é bastante utilizada para bioensaios para antimicrobianos pela sua importância médica pois é uma bactéria simbionte do homem cujas toxinas podem causar doenças graves. Ela não é muito sensível às defensinas, para muitas moléculas seu CIM é acima de 100 µg/ml (HOOVER et al., 2003; YAMANE et al., 2013)

Concentração inibitória mínima (CIM)									
	Bactérias								
	Gram -	Gram +	Gram -	Gram -	Gram -	Gram -	Gram -	Gram -	Gram +
<b>Peptídeos (carga líquida)</b>	<i>E. coli</i>	<i>M. luteus</i>	<i>P. rettgeri</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>M. morganii</i>	<i>C. freundii</i>	<i>K. pneumonia</i>	<i>S. aureus</i>	
<b>Crotamina nativa (+7,0)</b>	64 µg/ml	8 µg/ml	n.a.	n.a.	n.a.	32 µg/ml	n.a.	n.a.	
<b>Crotamina linear (+7,0)</b>	128 µg/ml	8 µg/ml	n.a.	n.a.	n.a.	128 µg/ml	i.p.	n.a.	
<b>DefbBm02 (+11,0)</b>	16 µg/ml	4 µg/ml	n.a.	n.a.	n.a.	8 µg/ml	i.p.	64 µg/ml	
<b>DefbBm03 (+10,0)</b>	8 µg/ml	8 µg/ml	n.a.	n.a.	n.a.	16 µg/ml	n.a.	n.a.	
<b>DefbBd03 (+6,0)</b>	n.a	4 µg/ml	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
<b>DefbBj01 (+4,0)</b>	n.a	16 µg/ml	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
<b>DefbBju01 (+7,0)</b>	n.a	2 µg/ml	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
<b>DefbBn02 (+2,0)</b>	n.a	n.a	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
<b>DefbLm01 (+2,0)</b>	n.a	128 µg/ml	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
<b>DefbLm02 (+8,0)</b>	16 µg/ml	4 µg/ml	n.a.	n.a.	n.a.	16 µg/ml	n.a.	32 µg/ml	
<b>hBd02 (+6,0)</b>	64 µg/ml	8 µg/ml	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
<b>DefbPm (+6,0)</b>	n.a	32 µg/ml	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
<b>DefbTs (+3,2)</b>	n.a	64 µg/ml	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
<b>Crotasin (-1,0)</b>	n.a	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	

**Tabela 3** - Espectro de atividade antimicrobiana dos peptídeos β-defensina-símiles sintéticos de serpentes e humano.

São apresentados os resultados de concentração inibitória mínima (CIM) para as espécies bacterianas: *E. coli* = *Escherichia coli* ATCC 25922; *M. luteus* = *Micrococcus luteus* A270; *P. rettgeri* = *Providencia rettgeri*; *S. marcescens* = *Serratia marcescens*; *M. morganii* = *Morganella morganii*; *C. freundii* = *Citrobacter freundii*; *K. pneumonia* = *Klebsiella pneumonia*; *S. aureus* = *Staphylococcus aureus*. N.A. =não ativo para o intervalo de concentração testado. I.P. = inibição parcial, peptídeo inibiu menos que 90% do crescimento bacteriano.

Em geral, o crescimento das bactérias foi inibido apenas pelos peptídeos mais positivamente carregados. Sabe-se que a cationicidade é essencial para a atração eletrostática inicial do antimicrobiano com as membranas de bactérias e outros micro-organismos, cujos fosfolipídeos são carregados negativamente. O fato das membranas bacterianas serem ricas em ácidos fosfolipídicos PG (fosfatidilglicerol), PS (fosfatidilserina), e CL (cardiolipina) confere a sua carga global negativa. Além

disso, LPS (lipopolisacarídeos) e ácidos teicóicos ou teicurônicos de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, transmitem adicional carga negativa às superfícies destes respectivos organismos (YEMAN; YOUNT, 2003; 2007). Assim, era esperado que peptídeos mais carregados positivamente e mais hidrofólicos fossem mais ativos contra uma maior variedade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Os peptídeos de maior carga positiva, DefbBm02 e DefbBm03, são bastante ativos mas se comportaram de forma diferente sendo o primeiro mais ativo, com CIM variando de 4 a 64 µg/ml contra quatro espécies de micro-organismos enquanto o segundo peptídeo é ativo contra apenas três espécies. Essa diferença pode ser devido a desigual distribuição das cargas dos peptídeos e seu modo de interação com as membranas bacterianas, além disso o DefBm03 não foi totalmente reduzido e alquilado como verificado por MALDI-TOF-MS, o que pode ter dificultado a sua interação com a membrana bacteriana uma vez que as moléculas não estão totalmente linearizadas podendo haver várias estruturas diferentes além da possibilidade de formação de agregados.

Uma defensina bastante conhecida e estudada em modelos de ensaios antimicrobianos é a β-defensina-humana-2 (hBd02), cujo espectro é amplo, pois inibe diferentes cepas bacterianas Gram-negativas e espécies de *Candida* (HARDER et al., 1997). A hBd02 inibiu o crescimento apenas da *E. coli* e da *M. luteus* por ter sido testado na forma linear. Routsias et al. (2010) mostraram que as pontes dissulfeto são essenciais para a atividade antibacteriana da hBd02. Ao contrário de outra defensina humana (hBd03), cujas pontes dissulfeto não são fundamentais para os ensaios de inibição de crescimento bacteriano (HOOVER et al., 2003). Estas defensinas quando comparadas não apresentam similaridade em sua composição aminoacídica apenas a posição das seis cisteínas é conservada.

Os peptídeos DefbBd03 (+5,0) e DefbLm01 (+2,0), cujo modelo de estrutura tridimensional não nos permitiu ligar todas as pontes dissulfeto entre as cisteínas, inibiram o crescimento da *M. luteus*, mesmo com carga líquida positiva não muito alta e na forma linear. Portanto, esses peptídeos poderiam manter a atividade antimicrobiana mesmo sem a formação da ponte Cys<sup>3</sup>-Cys<sup>6</sup>.

A crotamina nativa se apresentou mais ativa contra a *E. coli* e a *C. freundii* que a crotamina desnaturada, ao contrário do descrito por Oguiura et al. (2011) onde a crotamina reduzida é mais ativa que a nativa contra cepas da bactéria *E. coli*. A diminuição da atividade pode ter ocorrido devido a formação de agregados da forma

linear que dificultaria a interação dos peptídeos com a membrana ou diminuiria a concentração efetiva da toxina.

DefbBju01 apesar da mesma carga positiva que a crotamina (+7,0) e alto potencial de hidrofobicidade (+45,05), só foi ativo contra a cepa *M. luteus* com CIM de 2 µg/ml, o que pode ocorrer é que sua composição aminoacídica e a distribuição das cargas tenha diferente padrão de exposição destas cargas ao longo da molécula em relação à crotamina e outros peptídeos, o que dificulta sua interação com a membrana microbiana, também pode ter ocorrido formação de agregados.

Os peptídeos: DefbBn02 e o crotasin não apresentaram atividade inibitória, contra as cepas testadas. Em comum, ambos apresentam baixa carga líquida e baixo potencial de hidrofobicidade. Ainda não é conhecida a atividade do crotasin, apenas sabe-se que se trata de um peptídeo bastante expresso em vários tecidos como fígado e pâncreas e escasso na glândula de veneno das cascavéis sul-americanas (RÁDIS-BAPTISTA et al., 2004) e que seu gene é parálogo à crotamina. Só podemos sugerir que não se trata de um antimicrobiano.

Ao contrário dos antibióticos convencionais, como a penicilina, a qual os micro-organismos podem facilmente contornar, a aquisição de resistência por uma cepa sensível contra peptídeos antimicrobianos é pouco provável (ZASLOFF et al., 2002). Como observado na tabela 3, três espécies bacterianas não apresentaram sensibilidade contra nenhum dos peptídeos testados: *P. rettgeri*, *S. marcescens* e *M. morganii*, mas duas destas espécies são conhecidas na literatura por apresentar um mecanismo de resistência à ação dos PAMs: *Morganella* e *Serratia* expressam uma membrana externa que não tem uma densidade apropriada de lipídeos ácidos para promover sítios de interação com os peptídeos antimicrobianos. Para a maioria dos micro-organismos redesenhar a estrutura de suas membranas pode ter um custo energético alto, portanto esta estratégia não é muito utilizada (ZASLOFF et al., 2002).

## 4 CONCLUSÕES

A estrutura gênica, a similaridade e as mesmas fases de inserção dos íntrons indicam uma origem comum entre as sequências  $\beta$ -defensina-símiles encontradas e os genes *Crt-p1* e *Cts-p2* de *C. d. terrificus*.

As sequências obtidas de serpentes são de peptídeos  $\beta$ -defensina-símiles pelas suas características gênicas, aminoacídicas, físico-químicas, moleculares e pelo sinal filogenético com demais sequências gênicas e peptídicas.

A estrutura dos genes  $\beta$ -defensina-símiles em serpentes é diferente da encontrada em aves e mamíferos. Constituídos de três exons e dois íntrons, de diferentes fases e comprimentos, é similar ao grupo dos répteis como o gene da crotamina e gene do crotasin de *Crotalus*, e outras espécies, como  $\beta$ -defensina de lagarto verde *Anolis carolinensis*, podendo esta ser considerada uma característica dos lagartos e serpentes da ordem Squamata.

Os genes  $\beta$ -defensina-símiles de serpentes têm o mesmo modelo de evolução dos genes de  $\beta$ -defensinas, crotamina, crotasin e outras famílias multigênicas em vertebrados, conhecido por modelo de nascimento e morte.

As pontes dissulfeto não são essenciais na atividade antimicrobiana, apesar da possibilidade de diminuir a sua ação, pois muitos peptídeos inibiram o crescimento bacteriano quando na forma reduzida e alquilada.

Os peptídeos mais positivamente carregados DefbBm02, DefbBm03 e DefbLm02 foram os mais ativos contra as bactérias.

A crotamina foi mais ativa na sua forma nativa que a forma desnaturada nos ensaios antimicrobianos.

O crotasin na sua forma linear não apresentou atividade antimicrobiana contra nenhuma das espécies testadas (*E. coli*, *M. luteus*, *P. rettgeri*, *S. marcescens*, *M. morganii*, *C. freundii*, *K. pneumonia* e *S. aureus*).

As cepas bacterianas mais sensíveis aos peptídeos  $\beta$ -defensina-símiles de serpentes foram: *M. luteus* A270 (CIM variando de 2 a 128  $\mu\text{g/ml}$ ), *E.coli* ATCC 25922 (CIM variando de 8 a 128  $\mu\text{g/ml}$ ), *C. freundii* (CIM variando de 8 a 128  $\mu\text{g/ml}$ ) e *S. aureus* (CIM variando de 32 a 64  $\mu\text{g/ml}$ ).

## REFERÊNCIAS\*

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H., PILLAI, S. Propriedades gerais das respostas imunológicas. In: ABBAS, A.K. (ed.) **Imunologia celular e molecular**. 7<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011. p. 1-20.
- ANDREU, D., RIVAS, L. Animal antimicrobial peptides: an overview. **Biopolymers**, v. 47, n. 6, p. 415-433, 1998.
- ARNOLD K. et al. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. **Bioinformatics**, v. 22, p.195-201, 2006.
- AUSUBEL, F.M. et al. **Current Protocols in Molecular Biology**. New York: John Wiley; 2002. v.1.
- BENKERT, P.; BIASINI, M., SCHWEDE, T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. **Bioinformatics**, v. 27, n. 3, p. 343-350, 2011.
- BULET, P.; STÖCKLIN, R.; MENIN, L. Antimicrobial peptides: from invertebrates to vertebrates. **Immunol. Rev.**, v. 198, p.169-184, 2004.
- CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. (Eds) In: **The venomous reptiles of the western hemisphere**. Ithaca, New York: Cornell University Press; 2004. v 2, p.687-689.
- CARRASCO, P. A. et al. Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae). **Zool. Scr.**, v. 41, n.2, p. 109–124, 2012.
- CORRÊA, P. G.; OGUIURA, N. Phylogenetic analysis of  $\beta$ -defensin-like genes of *Bothrops*, *Crotalus* and *Lachesis* snakes. **Toxicon**, v. 69, 65-74, 2013.
- CASADEI, E. et al. Characterization of three novel  $\beta$ -defensin antimicrobial peptides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Mol. Immunol.**, v. 46, p. 3358–3366, 2009.
- CASTOE, T. A.; PARKINSON, C. L. Bayesian mixed models and the phylogeny of pitvipers (Viperidae: Serpentes). **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 39, p. 91-110, 2006.
- CARRASCO, P. A. et al. Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae). **Zool. Scr.**, v. 41, n.2, p. 109–124, 2012.
- CORRÊA, P. G.; OGUIURA, N. Phylogenetic analysis of  $\beta$ -defensin-like genes of *Bothrops*, *Crotalus* and *Lachesis* snakes. **Toxicon**, v. 69, 65-74, 2013.
- DALLA VALLE, L. et al. Bioinformatic and molecular characterization of  $\beta$ -defensins-like peptides isolated from the green lizard *Anolis carolinensis*. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 36, n.1, p. 222-229, 2012.

\*De acordo com:

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

- DE LATOUR, F. A. et al. Antimicrobial activity of the *Naja atra* cathelicidin and related small peptides. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 396, p. 825–830, 2010.
- DIAMOND G. et al. Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA. **PNAS**, v.88, p. 3952–3956, 1991.
- DIAMOND, G. et al. Transcriptional regulation of  $\beta$ -defensin gene expression in tracheal epithelial cells. **Infect. Immun.**, v. 68, n.1, p. 113-119, 2000.
- DROIN, N. et al. Human defensins as cancer biomarkers and antitumour molecules. **J. Proteomics**, v. 72, p. 918-927, 2009
- EDGAR, R. C. Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Res.**, v. 32, n. 5, p. 1792-1799, 2004.
- EPPIG, J. T. et al. The Mouse Genome Database (MGD): comprehensive resource for genetics and genomics of the laboratory mouse. **Nucleic Acids Res.**, v.40, n. D1, p. D881-D886, 2012.
- ERIK, B.; CORNELIS, V.; CATHREIN, A. B. One-step procedure for screening recombinant plasmids by size. **Bio. Techniques**, v. 24, n. 5, p. 748-750, 1998.
- FADEL, V. et al. Automated NMR structure determination and disulfide bond identification of the myotoxin crotamine from *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, v. 46, p. 759–767, 2005.
- FENWICK, A. M. et al. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Sepentes: Viperidae). **Zool. J. Linn. Soc.**, v.156, p. 617-640, 2009.
- FOGOLARI, F.; BRIGO, A.; MOLINARI, H. The Poisson–Boltzmann equation for biomolecular electrostatics: a tool for structural biology. **J. Mol. Recognit.**, v. 15, n. 6, p. 377-392, 2002.
- FRY, B. G. et al. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. **Nature**, v. 439, p. 584–588, 2005.
- GANZ, T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 3, n. 9, p. 710-720, 2003.
- GARCIA, M. **Uma filogenia mitocondrial de metazoários**. 2007. 224 f. [Dissertação (Mestrado em Modelagem Computacional)]. Petrópolis, Rio de Janeiro, 2007.
- GIBBS, H. L.; ROSSITER, W. Rapid evolution by positive selection and gene gain and loss: PLA2 venom genes in closely related *Sistrurus* rattlesnakes with divergent dets. **J. Mol. Evol.**, v. 66, n. 2, p.151-166, 2007.

GOLOBOFF, P. A.; FARRIS, J. S.; NIXON, K. TNT: Tree analysis using new technology. version 1.0. program and documentation available at <http://www.zmuc.dk/public/phylogeny/TNT/>, 2003.

GONÇALVES, J.M., VIEIRA, L.G. Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras I. Análise eletroforética. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v. 2, p. 141–150, 1950.

GONÇALVES, J.M., ARANTES, E.G. Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras III—Determinação quantitativa de crotamina no veneno de cascavel Brasileira. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v. 28, p. 369–371, 1956.

GOUJON, M. A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. **Nucleic Acids Res.**, v. 38, p. W695-699, 2010.

GUEX, N.; PEITSCH, M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**, v. 18, p. 2714-2723, 1997.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symp. Ser.**, v. 41, p.95-98, 1999.

HARDER, J. et al. A peptide antibiotic from human skin. **Nature**. v.387, p.861, 1997.

HOOVER, D. M. et al. antimicrobial characterization of human  $\beta$ -defensin-3 derivatives. **Antimicrob. agents chemother.**, v. 47, n. 9, p. 2804–2809, 2006.

HUGHES, A. L. Evolutionary diversification of the mammalian defensins. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 56, p. 94–103, 1999.

IZADPANAH, A.; GALLO, R.L. Antimicrobial peptides. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 52, n. 3, p. 381-390, 2005.

JENSSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R. E. W. peptide antimicrobial agents. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 19, n. 3, p. 491–511, 2006.

KATOH, T. Parallelization of the MAFFT multiple sequence alignment program. **Bioinformatics**, v. 26, p. 1899-1900, 2010.

LADOKHIN, A. S.; WHITE, S. H. ‘Detergent-like’ permeabilization of anionic lipid vesicles by melittin. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1514, p. 253–260, 2001.

LARKIN, M.A. et al. ClustalW and ClustalX version 2. **Bioinformatics**, v. 23, n.21, p. 2947-2948, 2007.

LAURE, C. J. et al. Die primärstruktur des crotaminins Hoppe-Seyler's. **Hoppe-Seyler's. z. physiol. chem.**, v. 356, p. 213–215, 1975.

LEHRER, R. I. Primate defensins. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 727-738, 2004.

LEHRER, R. I.; GANZ, T. Defensins of vertebrate animals. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 14, n. 1 ,p. 96-102, 2002.

LUENSER, K.; FICKEL, J.; LUDWIG, A. Evolution of caprine and ovine  $\beta$ -defensin genes. **Immunogenetics**, v. 57, p. 487-498, 2005.

MADDISON, W. P.; MADDISON, D.R. Mesquite: A modular system for evolutionary analysis. Version 2.75. Disponível em: <<http://mesquiteproject.org>> 2011.

MAXWELL, A. I.; MORRISON, G. M.; DORIN, J. R. Rapid sequence divergence in mammalian  $\beta$ -defensins by adaptive evolution. **Molec. Immunol.**, v. 40, p. 413-421, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Aspectos Epidemiológicos. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/profissional/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=31500](http://portal.saude.gov.br/portal/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31500). Acesso em 04/06/2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Acidentes por Animais Peçonhentos - Serpentes. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/profissional/area.cfm?id\\_area=1539](http://portal.saude.gov.br/portal/profissional/area.cfm?id_area=1539). Acesso em: 04/06/2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Acidentes por Serpentes. Situação Epidemiológica. Disponível em: [http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/tab\\_cas\\_serpentes\\_br\\_gd\\_reg\\_2000\\_2011.pdf](http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/tab_cas_serpentes_br_gd_reg_2000_2011.pdf) Acesso em: 31/08/2012.

MORRISON, G. M. et al. Signal sequence conservation and mature peptide divergence within subgroups of the murine  $\beta$ -defensin gene family. **Mol. Bio. Evol.**, v. 20, n. 3, p. 460-470, 2003.

NAKASHIMA, K. et al. Accelerated Evolution of *Trimeresurus Flavoviridis* Venom Gland Phospholipase A2 Isozymes. **PNAS**, 90:5964-5968, 1993.

NEI, M., ROONEY, A.P. Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. **Annu. Rev. Genet.**, v. 39, p. 121-152, 2005.

NICASTRO G. et al. Solution structure of crotamine, a  $\text{Na}^+$  channel affecting toxin from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Eur. J. Biochem.**, v. 270, p.1969–1979, 2003.

OGUIURA, N.; BONI-MITAKE, M.; RÁDIS-BAPTISTA, G. New view on crotamine, a small basic polypeptide myotoxin from South American rattlesnake venom. **Toxicon**, v. 46, p. 363–370, 2005.

OGUIURA, N. et al. Intraspecific variation of the crotamine and crotasin genes in *Crotalus durissus* rattlesnakes. **Gene**. v. 446, p. 35–40, 2009.

OGUIURA, N. et al. In vitro antibacterial and hemolytic activities of crotamine, a small basic myotoxin from rattlesnake *Crotalus durissus*. **J. Antibiot.**, v. 64, p. 327–331, 2011.

- OKUBO, B. M. et al. evaluation of an antimicrobial I-amino acid oxidase and peptide derivatives from *Bothropoides mattogrossensis* pitviper venom. **PLoS ONE**. v. 7, n. 3, p. 1-10, 2012.
- PASSERO, L.F.D. et al. Comparative studies of the anti-leishmanial activity of three *Crotalus durissus* ssp. venoms. **Parasitol. Res.**, v. 101, p.1365–1371, 2007.
- PATIL, A. et al. Cross-species analysis of the mammalian beta-defensin gene family: Presence of syntenic gene clusters and preferential expression in the male reproductive tract. **Physiol. Genomics**, v. 23, p. 5–17, 2005.
- PEREIRA, A. et al. Crotamine toxicity and efficacy in mouse models of melanoma. **Expert Opin. Investig. Drugs**, v. 20, n.9, p.1189-1200, 2011.
- PETERSEN, T. N. Signal P 4.0: discriminating signal peptides from transmenbrane regions. **Nat. Methods**, v. 8, p. 785-786, 2011.
- POND, S. L.; FROST, S.D. Datammonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. **Bioinformatics**, v. 21, n. 10, p. 2531–2533, 2005.
- 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. Phylogen. Evol.**, v. 58, n. 2, p. 329-342, 2011.
- RÁDIS-BAPTISTA, G. et al. Structure and chromosomal localization of the gene for crotamine, a toxin from the South American rattlesnake, *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, v. 42, p.747-752, 2003.
- RÁDIS-BAPTISTA, G. et al. Identification of crotasin, a crotamine-related gene of *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, v. 43, n.7, p. 751-759, 2004.
- RAMBAUT, A. FigTree v1.3.1: (2009) Tree Figure Drawing Tool. Available from <http://treebioedacuk/software/figtree/>. Acesso em abril, 2012.
- ROUTSIAS, J. G. et al. In vitro bactericidal activity of human -defensin 2 against nosocomial strains. **Peptides**. v. 31, p. 1654–1660, 2010.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.**, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. (Eds) **Molecular cloning: a laboratory manual**, 2nd edn, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. 1989.
- SAMY, R. P. et al. Antibacterial activity of snake, scorpion and bee venoms: a comparison with purified venom phospholipase A2 enzymes. **J. Appl. Microbiol.**, v.102, p. 650–659, 2006.

SCHUTTE, B.C.; MCCRAY, P. B. Jr.  $\beta$ -defensins in lung host defense. **Annu. Rev. Physiol.**, v.64, p.709-48, 2002.

SEEBAH, S. et al. Defensins knowledgebase: a manually curated database and information source focused on the defensins family of antimicrobial peptides. **Nucleic Acids Res.**, v. 35, 265–268, 2007.

SHAI, Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alphahelical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.1462, p. 55–70, 1999.

STONE,K.L.; WILLIAMS, K. R. Enzymatic digestion of proteins in solutions and in SDS polyacrylamide gel. In: Walker, J.M. (ed.) **The Protein protocol handbook**. Totowa, NJ: Human Press Inc., 1996, p. 415-421.

STRAUS, S. K.; HANCOCK, R. E. W. Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin: Comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.1758, p.1215–1223, 2006.

TAMURA, K.; et al. **MEGA5**: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. molecular biology and evolution. Disponível em: < <http://www.megasoftware.net/>> 2011.

TORRES, A. M.; KUCHEL, P. W. The  $\beta$ -defensin-fold family of polypeptides. **Toxicon**, v. 44, p.581-588, 2004.

TORTORA, G. J.; FUNKE, R. S.; CASE, C. L. (Eds). **Microbiology**, 6th ed., London/UK: Artmed, 2002. Chapter 1 and 7.

UETZ, P. et al. (eds) **The Reptile Database**. Disponível em < <http://www.reptile-database.org/db-info/taxa.html#Ser>>. Acesso em 04/06/2012.

UNIPROT CONSORTIUM, THE. Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt). **Nucleic Acids Res.**, v. 40, p. D71-D75, 2012.

WANG, Y. et al. snake cathelicidin from *Bungarus fasciatus* is a potent peptide antibiotics. **PLoS ONE**. v. 3, n. 9, p. 01-09, 2008.

WATERHOUSE, A. M. et al. Jalview version 2: a multiple sequence alignment and analysis workbench. **Bioinformatics**, v.25, n. 9, p. 1189-1191, 2009.

WHITTINGTON, C.M. et al. Defensins and the convergent evolution of platypus and reptile venom genes. **Genome Res.**, v. 18, n. 6, p. 986-994, 2008.

WHIMLEY, W. C.; WHITE, S. H. Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces . **Nat. Struct. Biol.**, v. 3, n. 10, p. 842-848, 1996.

WU, Z. et al. Engineering disulfide bridges to dissect antimicrobial and chemotactic activities of human  $\beta$ -defensin 3. **PNAS**, v. 100, n.15, p. 8880-8885, 2003.

- WÜSTER, W. et al. Butantan-British *Bothrops* systematics project, 2002. Origin and evolution of the South American pitviper fauna: evidence from mitochondrial DNA sequence data. In: Schuett, G.W., Höggren, M., Douglas, M.E., Greene, H.W. (Eds.), **Biology of the Vipers**. Salt Lake City,: Eagle Mountain Publishing, 2002. p.111-128.
- WÜSTER , W. et al. A nesting of vipers: phylogeny and historical biogeography of the Viperidae (Squamata: Serpentes). **Mol. Phylogen. Evol.**, v. 49, p. 445-459, 2008.
- XIAO, Y. et al. A genome-wide screen identifies a single  $\beta$ -defensin gene cluster in the chicken: implications for the origin and evolution of mammalian defensins. **BMC Genomics**, v.5, n.56, p.1-11, 2004.
- XIAO, Y. et al. Identification and functional characterization of three chicken cathelicidins with potent antimicrobial activity. **J. Biol. Chem.** v. 281, p. 2858–2867, 2006.
- YAMANE, E. S. et al Unraveling the antifungal activity of a South American rattlesnake toxin crotamine. **Biochimie**, v. 95, p. 231-240, 2013.
- YANG, L. et al. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. **Biophys. J.**, v.81, p. 1475-1485, 2001.
- YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. **Pharmacol. Rev.**, v. 55, p.27-55, 2003.
- YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Unifying themes in host defence effector polypeptides. **Nat. rev. microbiol.**, v. 5, p. 727-740, 2007.
- YOUNT, N. Y. et al. Selective reciprocity in antimicrobial activity versus cytotoxicity of hBD-2 and crotamine. **PNAS**, v.106, n. 35, p.14972-14977, 2009.
- ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, v. 415, p.389-395, 2002.
- ZHAO, H. et al. Interaction of the antimicrobial peptide pheromone Plantaricin A with model membranes: Implications for a novel mechanism of action. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1758, p.1461–1474, 2006.
- ZOU, J. et al. Discovery of multiple  $\beta$ -defensin like homologues in teleost fish. **Mol. Immunol.**, v. 44, p. 638–647, 2007.

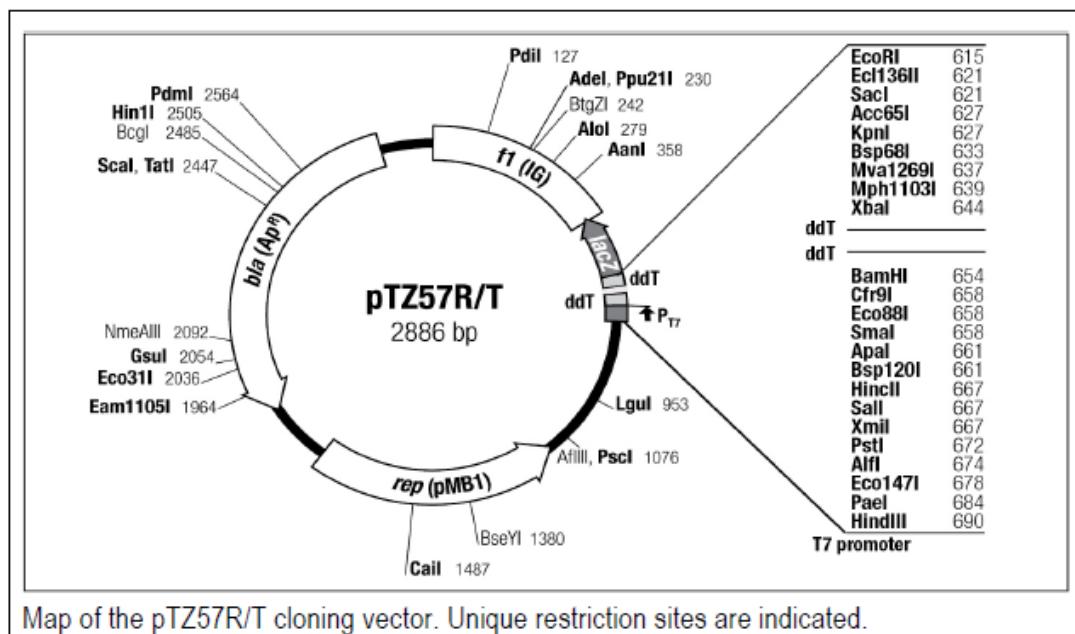
## **APÊNDICES**

**ANEXO A** - Mapa de restrição do vetor de clonagem pTZ57R/T da Fermentas™.

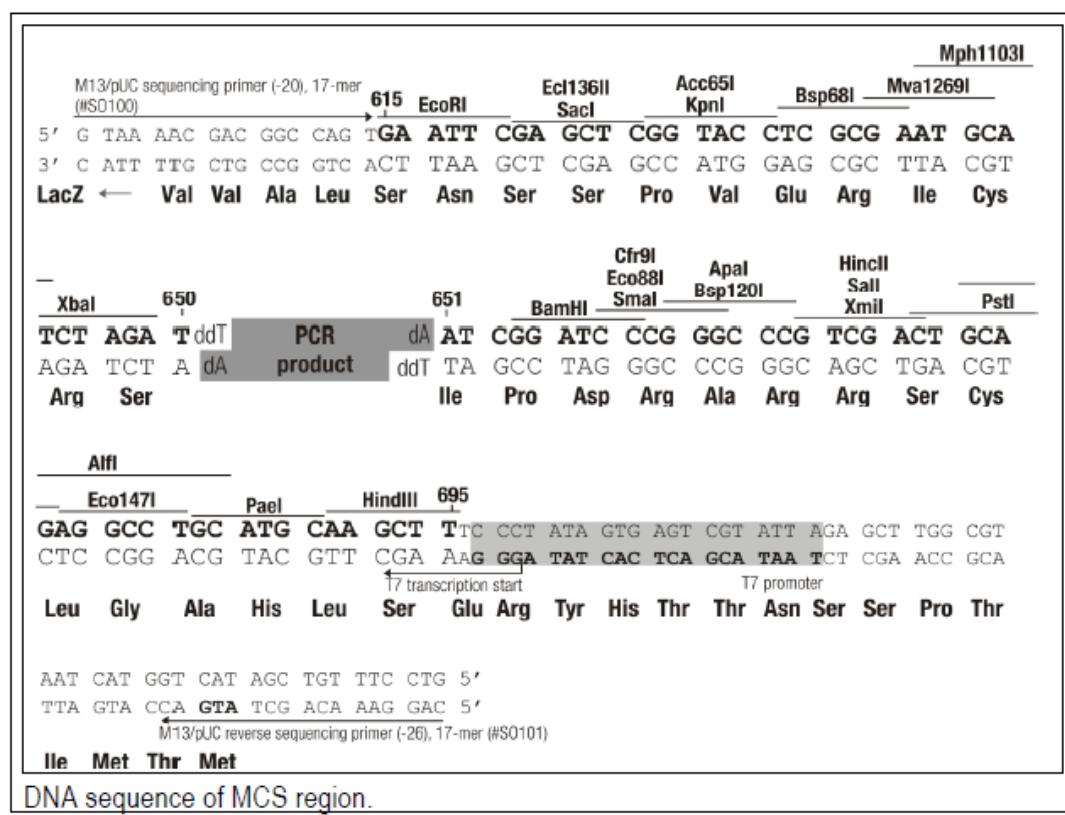
**ANEXO B** - Alinhamento das sequências  $\beta$ -defensina-símiles de serpentes peçonhentas brasileiras.

**ANEXO C** - Artigo de periódico.

**ANEXO A - Mapa de restrição do vetor de clonagem pTZ57R/T da Fermentas™.**



Map of the pTZ57R/T cloning vector. Unique restriction sites are indicated.



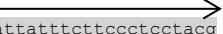
Fonte: Fermentas™.

## **ANEXO B - Alinhamento das sequências β-defensina-símiles de serpentes peçonhentas brasileiras**

<i>B.jararaca_defensinaB_01</i>	cattgattttctttgattcacaattcttcaaagaatttattgggggtttgtattg	297
<i>B.erythromelas_defensinaB_01</i>	cattgattttctttgattcacaattcttcaaagaatttattgggggtttgtattg	288
<i>B.jararaca_defensinaB_02</i>	cattgattttctttgattcacaattcttcaaagaatttattgggggtttgtattg	297
<i>B.diporus_defensinab_03</i>	cattgattttctttgattcacaattcttcaaagaatttattgggggtttgtattg	297
<i>B.pauloensis_defensinab_01</i>	cattgattttactttgattcacaattcttcaaagaatttattgggggtttgtattg	297
<i>B.atrox_defensinab_01</i>	cattgattttactttgattcacaattcttcaaagaatttattgggggtttgtattg	297
<i>B.jararacussu_defensinab_01</i>	cattgattttactttgattcacaattcttcaaagaatttattgggggtttgtattg	297
<i>B.mattogrossensis_defensinab_02</i>	cattgattttactttgattcacaattcttcaaagaatttattgggggtttgtattg	297
<i>B.mattogrossensis_defensinab_03</i>	cattgattttactttgattcacaattcttcaaagaatttattgggggtttgtattg	297
<i>B.leucurus_defensinaB_01</i>	cattgattttctttgattcacaattcttcaaagaatttattgggggtttgtattg	297
<i>B.neuwiedi_defensinaB_02</i>	cattgattttctttgattcacaattcttcaaagaatttattgggggtttgtattg	282
<i>L.muta_defensinaB_01</i>	cattgattttctttgattcacaattcttcaaagaatttattgggggtttgtattg	297
<i>L.muta_defensinaB_02</i>	cattgattttctttgattcacaattcttcaaagaatttattgggggtttgtattg	297
<i>B.insularis_Sequência_02</i>	tattgtttttctttgattcacaattcttcaaagaacttattgggggtttgtattg	297
<i>B.alternatus_Sequência_01</i>	tattgtttttctttgattcacaattcttcaaagaacttattgggggtttgtattg	295
<i>C.durissus_crotamina</i>	tagcttat-tt-----t-----	309
<i>C.durissus_crotasin</i>	tagcttat-tt-----ttgttat-----	317
<i>B.jararaca_defensinaB_01</i>	tagcttat-tt-----ttgttat-----	315
<i>B.erythromelas_defensinaB_01</i>	tagcttat-tt-----ttgttat-----	306
<i>B.jararaca_defensinaB_02</i>	tagcttat-tt-----ttgttat-----	315
<i>B.diporus_defensinab_03</i>	tagcttgttt-----ttgttat-----	316
<i>B.pauloensis_defensinab_01</i>	tagcttat-tt-----ttgttat-----	307
<i>B.atrox_defensinab_01</i>	tagcttat-tt-----ttgttat-----	315
<i>B.jararacussu_defensinab_01</i>	tagcttat-tt-----ttgttat-----	315
<i>B.mattogrossensis_defensinab_02</i>	tagcttat-tt-----ttgttat-----	315
<i>B.mattogrossensis_defensinab_03</i>	tagcttat-tt-----ttgttat-----	315
<i>B.leucurus_defensinaB_01</i>	tagcttat-tt-----ttgttat-----	315
<i>B.neuwiedi_defensinaB_02</i>	tagcttat-tt-----ttgttat-----	341
<i>L.muta_defensinaB_01</i>	tagcttat-tt-----ttgttat-----	300
<i>L.muta_defensinaB_02</i>	tagcttat-tt-----ttgttat-----	315
<i>B.insularis_Sequência_02</i>	-----tt-----ttgttat-----	230
<i>B.alternatus_Sequência_01</i>	tagtttat-tt-----ttgttat-----	315
	tagtttat-ttgtttattgttat-----	328
	**	
 	-----	
<i>C.durissus_crotamina</i>	-----	
<i>C.durissus_crotasin</i>	-----	
<i>B.jararaca_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.erythromelas_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.jararaca_defensinaB_02</i>	-----	
<i>B.diporus_defensinab_03</i>	-----	
<i>B.pauloensis_defensinab_01</i>	-----	
<i>B.atrox_defensinab_01</i>	-----	
<i>B.jararacussu_defensinab_01</i>	-----	
<i>B.mattogrossensis_defensinab_02</i>	-----	
<i>B.mattogrossensis_defensinab_03</i>	-----	
<i>B.leucurus_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.neuwiedi_defensinaB_02</i>	gggacctccgggtcatcgagtccaacccctgctcgaggcaggattccaaaccattc	401
<i>L.muta_defensinaB_01</i>	-----	
<i>L.muta_defensinaB_02</i>	-----	
<i>B.insularis_Sequência_02</i>	-----	
<i>B.alternatus_Sequência_01</i>	-----	
 	-----	
<i>C.durissus_crotamina</i>	-----	
<i>C.durissus_crotasin</i>	-----	
<i>B.jararaca_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.erythromelas_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.jararaca_defensinaB_02</i>	-----	
<i>B.diporus_defensinab_03</i>	-----	
<i>B.pauloensis_defensinab_01</i>	-----	
<i>B.atrox_defensinab_01</i>	-----	
<i>B.jararacussu_defensinab_01</i>	-----	
<i>B.mattogrossensis_defensinab_02</i>	-----	
<i>B.mattogrossensis_defensinab_03</i>	-----	
<i>B.leucurus_defensinaB_01</i>	cagacagatggccgtccagtcctgcttgaagacctccatcgaaaggagctaccacct	461
<i>B.neuwiedi_defensinaB_02</i>	-----	
<i>L.muta_defensinaB_01</i>	-----	
<i>L.muta_defensinaB_02</i>	-----	
<i>B.insularis_Sequência_02</i>	-----	
<i>B.alternatus_Sequência_01</i>	-----	
 	-----	
<i>C.durissus_crotamina</i>	-----ttgcttcac-----	326
<i>C.durissus_crotasin</i>	-----ttgcttcac-----	324
<i>B.jararaca_defensinaB_01</i>	-----ttgcttcac-----	315
<i>B.erythromelas_defensinaB_01</i>	-----ttgcttcac-----	324
<i>B.jararaca_defensinaB_02</i>	-----ttgcttcac-----	325
<i>B.diporus_defensinab_03</i>	-----ttgcttcac-----	325
<i>B.pauloensis_defensinab_01</i>	-----ttgcttcac-----	324
<i>B.atrox_defensinab_01</i>	-----ttgcttcac-----	324
<i>B.jararacussu_defensinab_01</i>	-----ttgcttcac-----	324
<i>B.mattogrossensis_defensinab_02</i>	-----ttgcttcac-----	324
<i>B.mattogrossensis_defensinab_03</i>	-----ttgcttcac-----	324
<i>B.leucurus_defensinaB_01</i>	cctgtggcaacctgttccactggtcgatcacccctcaccgttagaaatttttctaacat	521
<i>B.neuwiedi_defensinaB_02</i>	-----ttgcttcac-----	309
<i>L.muta_defensinaB_01</i>	-----	
<i>L.muta_defensinaB_02</i>	-----ttgcttcac-----	239
<i>B.insularis_Sequência_02</i>	-----ttgcttcac-----	324
<i>B.alternatus_Sequência_01</i>	-----ttgcttcac-----	337

<i>C.durissus_crotamina</i>	-----	
<i>C.durissus_crotasin</i>	-----	
<i>B.jararaca_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.erythromelas_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.jararaca_defensinaB_02</i>	-----	
<i>B.diporus_defensinab_03</i>	-----	
<i>B.pauloensis_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.atrox_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.jararacussu_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.mattogrossensis_defensinaB_02</i>	-----	
<i>B.mattogrossensis_defensinaB_03</i>	-----	
<i>B.leucurus_defensinaB_01</i>	ctaatctgaatctttccctgcagttcatccattgttctagtccctgggcaa	581
<i>B.neuwiedi_defensinaB_02</i>	-----	
<i>L.muta_defensinaB_01</i>	-----	
<i>L.muta_defensinaB_02</i>	-----	
<i>B.insularis_Sequência_02</i>	-----	
<i>B.alternatus_Sequência_01</i>	-----	
 	-----	
<i>C.durissus_crotamina</i>	-----	
<i>C.durissus_crotasin</i>	-----	
<i>B.jararaca_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.erythromelas_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.jararaca_defensinaB_02</i>	-----	
<i>B.diporus_defensinab_03</i>	-----	
<i>B.pauloensis_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.atrox_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.jararacussu_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.mattogrossensis_defensinaB_02</i>	-----	
<i>B.mattogrossensis_defensinaB_03</i>	-----	
<i>B.leucurus_defensinaB_01</i>	gtgagaacaggcgtggccctctgcactgtgcacagccctcaggtagtttagacagcta	641
<i>B.neuwiedi_defensinaB_02</i>	-----	
<i>L.muta_defensinaB_01</i>	-----	
<i>L.muta_defensinaB_02</i>	-----	
<i>B.insularis_Sequência_02</i>	-----	
<i>B.alternatus_Sequência_01</i>	-----	
 	-----	
<i>C.durissus_crotamina</i>	-----	
<i>C.durissus_crotasin</i>	-----	
<i>B.jararaca_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.erythromelas_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.jararaca_defensinaB_02</i>	-----	
<i>B.diporus_defensinab_03</i>	-----	
<i>B.pauloensis_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.atrox_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.jararacussu_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.mattogrossensis_defensinaB_02</i>	-----	
<i>B.mattogrossensis_defensinaB_03</i>	-----	
<i>B.leucurus_defensinaB_01</i>	tcatgtctctctcagttttttctgttagactaaacattccataattcccttaaccgtt	701
<i>B.neuwiedi_defensinaB_02</i>	-----	
<i>L.muta_defensinaB_01</i>	-----	
<i>L.muta_defensinaB_02</i>	-----	
<i>B.insularis_Sequência_02</i>	-----	
<i>B.alternatus_Sequência_01</i>	-----	
 	-----	
<i>C.durissus_crotamina</i>	-----	
<i>C.durissus_crotasin</i>	-----	
<i>B.jararaca_defensinaB_01</i>	-----	353
<i>B.erythromelas_defensinaB_01</i>	-----	351
<i>B.jararaca_defensinaB_02</i>	-----	342
<i>B.diporus_defensinab_03</i>	-----	351
<i>B.pauloensis_defensinaB_01</i>	-----	352
<i>B.atrox_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.jararacussu_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.mattogrossensis_defensinaB_02</i>	-----	
<i>B.mattogrossensis_defensinaB_03</i>	-----	
<i>B.leucurus_defensinaB_01</i>	-----	351
<i>B.neuwiedi_defensinaB_02</i>	-----	351
<i>L.muta_defensinaB_01</i>	-----	
<i>L.muta_defensinaB_02</i>	-----	
<i>B.insularis_Sequência_02</i>	-----	
<i>B.alternatus_Sequência_01</i>	-----	
 	-----	
<i>C.durissus_crotamina</i>	-----	
<i>C.durissus_crotasin</i>	-----	
<i>B.jararaca_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.erythromelas_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.jararaca_defensinaB_02</i>	-----	
<i>B.diporus_defensinab_03</i>	-----	
<i>B.pauloensis_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.atrox_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.jararacussu_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.mattogrossensis_defensinaB_02</i>	-----	
<i>B.mattogrossensis_defensinaB_03</i>	-----	
<i>B.leucurus_defensinaB_01</i>	cctcataggacatgggtttagaccgttcacatcttggtag	743
<i>B.neuwiedi_defensinaB_02</i>	-----	336
<i>L.muta_defensinaB_01</i>	-----	
<i>L.muta_defensinaB_02</i>	-----	
<i>B.insularis_Sequência_02</i>	-----	
<i>B.alternatus_Sequência_01</i>	-----	
 	-----	
<i>C.durissus_crotamina</i>	-----	
<i>C.durissus_crotasin</i>	-----	
<i>B.jararaca_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.erythromelas_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.jararaca_defensinaB_02</i>	-----	
<i>B.diporus_defensinab_03</i>	-----	
<i>B.pauloensis_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.atrox_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.jararacussu_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.mattogrossensis_defensinaB_02</i>	-----	
<i>B.mattogrossensis_defensinaB_03</i>	-----	
<i>B.leucurus_defensinaB_01</i>	-----	266
<i>B.neuwiedi_defensinaB_02</i>	-----	369
<i>L.muta_defensinaB_01</i>	-----	
<i>L.muta_defensinaB_02</i>	-----	
<i>B.insularis_Sequência_02</i>	-----	
<i>B.alternatus_Sequência_01</i>	-----	382



<i>L.muta_defensinaB_01</i>	-----catggcaataactggagagaatatacacaaggcc---	366
<i>L.muta_defensinaB_02</i>	-----catggcaataactggagagaatatacacaaggtt---	628
<i>B.insularis_Sequência_02</i>	-----catggcaataactggagagaatatacacaaggtt---	653
<i>B.alternatus_Sequência_01</i>	-----catggcaataactggagagaatatacacaaggtt---	
primer Intron_Def_FWD  gattatttcttccttctacg		
<i>C.durissus_crotamina</i>	-----attctattcatatgaaatagaattttttccctccatataatagatgttaggctac	515
<i>C.durissus_crotasin</i>	-tgtccttcatatgaaccag-attattttttccctccatcgtaatagatgttaggcttat	509
<i>B.jararaca_defensinaB_01</i>	-tgtccttcatatgaaccag-attattttttccctccatcgtaatagatgttaggcttat	500
<i>B.erythromelas_defensinaB_01</i>	-tgtccttcatatgaaccag-attattttttccctccatcgtaatagatgttaggcttat	509
<i>B.jararaca_defensinaB_02</i>	-tgtccttcatatgaaccag-attattttttccctccatcgtaatagatgttaggcttat	510
<i>B.diporus_defensinaB_03</i>	-tgtccttcatatgaaccag-attattttttccctccatcgtaatagatgttaggcttat	
<i>B.pauloensis_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.atrox_defensinaB_01</i>	-tgtccttcatatgaaccag-attattttttccctccatcgtaatagatgttaggcttat	509
<i>B.jararacussu_defensinaB_01</i>	-tgcccttcacatgaaccag-attattttttccctccatcgtaatagatgttaggcttat	509
<i>B.mattogrossensis_defensinaB_02</i>	-tgcccttcacatgaaccag-attattttttccctccatcgtaatagatgttaggcttat	509
<i>B.mattogrossensis_defensinaB_03</i>	-tgcccttcacatgaaccag-attattttttccctccatcgtaatagatgttaggcttat	509
<i>B.leucurus_defensinaB_01</i>	-tgtccttcatatgaaccag-attattttttccctccatcgtaatagatgttaggcttat	897
<i>B.neuwiedi_defensinaB_02</i>	-tgtccttcacatgaaccag-attattttttccctccatcgtaatagatgttaggcttat	579
<i>L.muta_defensinaB_01</i>	-----	
<i>L.muta_defensinaB_02</i>	-tgcccttcacatgaaccag-attattttttccctccatcgtaatagatgttaggcttat	424
<i>B.insularis_Sequência_02</i>	-tatccttcatgtgaaccag-attattttttccctccatcgtaatagatgttaggcttat	679
<i>B.alternatus_Sequência_01</i>	-tatccttcatgtgaaccag-attattttttccctccatcgtaatagatgttaggcttat	704
<i>C.durissus_crotamina</i>	-----cagctattttttttgagtcaacttcaaacctgggtaatggctgatttttagct	575
<i>C.durissus_crotasin</i>	cagctaattca-----	520
<i>B.jararaca_defensinaB_01</i>	cagctaattca-----	511
<i>B.erythromelas_defensinaB_01</i>	cagctaattcatttttgagtcaacttcaaacctgggtaatggctgatttttagct	569
<i>B.jararaca_defensinaB_02</i>	cagctaattcatttttgagtcaacttcaaacctgggtaatggctgatttttagct	570
<i>B.diporus_defensinaB_03</i>	cagctaattcatttttgagtcaacttcaaacctgggtaatggctgatttttagct	
<i>B.pauloensis_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.atrox_defensinaB_01</i>	cagctaattcatttttgagtcaacttcaaacctgggtaatggctgatttttagct	569
<i>B.jararacussu_defensinaB_01</i>	cagctaattcatttttgagtcaacttcaaacctgggtaatggctgatttttagct	569
<i>B.mattogrossensis_defensinaB_02</i>	cagctaattcatttttgagtcaacttcaaacctgggtaatggctgatttttagct	569
<i>B.mattogrossensis_defensinaB_03</i>	cagctaattcatttttgagtcaacttcaaacctgggtaatggctgatttttagct	569
<i>B.leucurus_defensinaB_01</i>	cagctaattcatttttgagtcaacttcaaacctgggtaatggctgatttttagct	957
<i>B.neuwiedi_defensinaB_02</i>	cagctaattcatttttgagtcaacttcaaacctgggtaatggctgatttttagct	639
<i>L.muta_defensinaB_01</i>	-----	
<i>L.muta_defensinaB_02</i>	cagctaattcatttttgagtcaacttcaaacctgggtaatggctgatttttagct	484
<i>B.insularis_Sequência_02</i>	---ttaattcatctctgagtcaacttcaaacctgggtaatggctgatttttagct	735
<i>B.alternatus_Sequência_01</i>	---ttaattcatctctgagtcaacttcaaacctgggtaatggctgatttttagct	761
<i>C.durissus_crotamina</i>	-----gctgcaggagatcagcagagat-ggatctgtgtggtcagagaaaactgtgtgtccta	634
<i>C.durissus_crotasin</i>	-----	
<i>B.jararaca_defensinaB_01</i>	-----gctgcaggagatcagcagagat-ggatctgtgtggtcagagaaaactgtgtgtccta	628
<i>B.erythromelas_defensinaB_01</i>	-----gctgcaggagatcagcagagat-ggatctgtgtggtcagataaaaactgtgtgtccta	630
<i>B.jararaca_defensinaB_02</i>	-----	
<i>B.diporus_defensinaB_03</i>	-----gctgcaggagatcagcagagat-ggatctgtgtggtcagagaaaactgtgtgtccta	628
<i>B.pauloensis_defensinaB_01</i>	-----gctgcaggagatcagcagagat-ggatctgtgtggtcagagaaaactgtgtgtccta	585
<i>B.atrox_defensinaB_01</i>	-----gctgcaggagatcagcagagat-ggatctgtgtggtcagagaaaactgtgtgtccta	585
<i>B.jararacussu_defensinaB_01</i>	-----gctgcaggagatcagcagagat-ggatctgtgtggtcagagaaaactgtgtgtccta	585
<i>B.mattogrossensis_defensinaB_02</i>	-----gctgcaggagatcagcagagat-ggatctgtgtggtcagagaaaactgtgtgtccta	585
<i>B.mattogrossensis_defensinaB_03</i>	-----gctgcaggagatcagcagagat-ggatctgtgtggtcagagaaaactgtgtgtccta	585
<i>B.leucurus_defensinaB_01</i>	-----gctgcaggagatcagcagagat-ggatctgtgtggtcagagaaaactgtgtgtccta	973
<i>B.neuwiedi_defensinaB_02</i>	-----gctgcaggagatcagcagagat-ggatctgtgtggtcagagaaaactgtgtgtccta	655
<i>L.muta_defensinaB_01</i>	-----	
<i>L.muta_defensinaB_02</i>	-----gctgcaggagatcagcagagat-ggatctgtgtggtcagagaaaactgtgtgtccta	500
<i>B.insularis_Sequência_02</i>	-----gctgcaggagatcagcagagat-ggatctgtgtggtcagagaaaactgtgtgtccta	794
<i>B.alternatus_Sequência_01</i>	-----gctgcaggagatcagcagagat-ggatctgtgtggtcagagaaaactgtgtgtccta	820
<i>C.durissus_crotamina</i>	-----ggaatccctgcagtttttggaggatgtttccatccccatcttggatgaatggttacaaaa	694
<i>C.durissus_crotasin</i>	-----	
<i>B.jararaca_defensinaB_01</i>	-----ggaatccctgcagtttttggaggatgtttccatccccatcttggatgaacggttacaaaa	688
<i>B.erythromelas_defensinaB_01</i>	-----ggaatccctgcagtttttggaggatgtttccatccccatcttggatgaacggttacaaaa	690
<i>B.jararaca_defensinaB_02</i>	-----	
<i>B.diporus_defensinaB_03</i>	-----ggaatccctgcagtttttggaggatgtttccatccccatcttggatgaatggttacaaaa	688
<i>B.pauloensis_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.atrox_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.jararacussu_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.mattogrossensis_defensinaB_02</i>	-----	
<i>B.mattogrossensis_defensinaB_03</i>	-----	
<i>B.leucurus_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.neuwiedi_defensinaB_02</i>	-----	
<i>L.muta_defensinaB_01</i>	-----	
<i>L.muta_defensinaB_02</i>	-----	
<i>B.insularis_Sequência_02</i>	-----ggaatccctgcacttttggaggatgtttccatccccaccccttggctgaatggttacaaaa	854
<i>B.alternatus_Sequência_01</i>	-----ggaatccctgcacttttggaggatgtttccatccccaccccttggctgaatggttacaaaa	880
<i>C.durissus_crotamina</i>	-----gctgtggaggtagcagagatggctaaactgacagttttgataaaaagaaaatataaa-	753
<i>C.durissus_crotasin</i>	-----	
<i>B.jararaca_defensinaB_01</i>	-----gctgtggaggtagcagagatggctaaactgacagttttgataaaaagaaaatataaa-	747
<i>B.erythromelas_defensinaB_01</i>	-----gctgtggaggtagcagagatggctaaactgacagttttgataaaaagaaaatataaa-	749
<i>B.jararaca_defensinaB_02</i>	-----	
<i>B.diporus_defensinaB_03</i>	-----gctgtggaggtagcagagatggctaaactgacagttttgataaaaagaaaatataaa-	748
<i>B.pauloensis_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.atrox_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.jararacussu_defensinaB_01</i>	-----	

<i>mattogrossensis_defensinaB_02</i>	-----	
<i>B.mattogrossensis_defensinaB_03</i>	-----	
<i>B.leucurus_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.neuwiedi_defensinaB_02</i>	-----	
<i>L.muta_defensinaB_01</i>	-----	
<i>L.muta_defensinaB_02</i>	-----	
<i>B.insularis_Sequência_02</i>	-----	
<i>B.alternatus_Sequência_01</i>	-----	
<i>C.durissus_crotamina</i>	-----	
<i>C.durissus_crotasin</i>	-----	
<i>B.jararaca_defensinaB_01</i>	-----gtactttgtttgacttggatactgcttggac-----tttg	792
<i>B.erythromelas_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.jararaca_defensinaB_02</i>	-----gtactttgtttgacttggatactgcttggac-----tttg	786
<i>B.diporus_defensinab_03</i>	-----gtactttgtttgacttggatactgcttggac-----tttg	788
<i>B.pauloensis_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.atrox_defensinaB_01</i>	-----tactttgtttgacttggatactgcttggac-----tttg	798
<i>B.jararacussu_defensinaB_01</i>	-----ttctggactttgtgtctataaa-----tttg	609
<i>B.mattogrossensis_defensinaB_02</i>	-----ttctggactttgtgtctataaa-----tttg	609
<i>B.mattogrossensis_defensinaB_03</i>	-----ttctggactttgtgtctataaa-----tttg	609
<i>B.leucurus_defensinaB_01</i>	-----ttctggactttgtgtctataaaatttgtctataggtt	1007
<i>B.neuwiedi_defensinaB_02</i>	-----ttctggactttgtgtctataaa-----tttg	679
<i>L.muta_defensinaB_01</i>	-----	
<i>L.muta_defensinaB_02</i>	-----ttctggactttgtgtctataaa-----tttg	524
<i>B.insularis_Sequência_02</i>	-----	
<i>B.alternatus_Sequência_01</i>	-----	
<i>C.durissus_crotamina</i>	-----	
<i>C.durissus_crotasin</i>	-----	
<i>B.jararaca_defensinaB_01</i>	tgttataatttgctataatttgctataatttcacagagtctcattctcc-----	852
<i>B.erythromelas_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.jararaca_defensinaB_02</i>	-----tgctataatttgctataatttgctataattctataattcacacagtgctcattctcc-----	846
<i>B.diporus_defensinab_03</i>	-----tgctataatttgctataatttgctataattctataattcacacagtgctcattctcc-----	848
<i>B.pauloensis_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.atrox_defensinaB_01</i>	-----tgctataatttgctataatttgctataattctataattcacacagtgctcattctcc-----	858
<i>B.jararacussu_defensinaB_01</i>	-----tgctataatttgctataatttgctataattctataattcacacagtgctcattctcc-----	669
<i>B.mattogrossensis_defensinaB_02</i>	-----tgctataatttgctataatttgctataattctataattcacacagtgctcattctcc-----	669
<i>B.mattogrossensis_defensinaB_03</i>	-----tgctataatttgctataatttgctataattctataattcacacagtgctcattctcc-----	669
<i>B.leucurus_defensinaB_01</i>	-----tgctataatttgctataatttgctataattctataattcacacagtgctcattctcc-----	1067
<i>B.neuwiedi_defensinaB_02</i>	-----tgctataatttgctataatttgctataattctataattcacacagtgctcattctcc-----	739
<i>L.muta_defensinaB_01</i>	-----	
<i>L.muta_defensinaB_02</i>	-----ggctataatttgctatgatttgctataatttcacacagtgctcattctcc-----	584
<i>B.insularis_Sequência_02</i>	-----	
<i>B.alternatus_Sequência_01</i>	-----	
<i>C.durissus_crotamina</i>	-----	
<i>C.durissus_crotasin</i>	-----	
<i>B.jararaca_defensinaB_01</i>	ctttgggttatatttatttatttgc---tagtgattacttgcactgtatgtcttcagctaat-----	910
<i>B.erythromelas_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.jararaca_defensinaB_02</i>	ctttcggttatatttatttatttgc---tagtgattacttgcactgtatgtcttcagctaat-----	904
<i>B.diporus_defensinab_03</i>	ctttcggttatatttatttatttgc---tagcgattacttgcactgtatgtcttcagctaat-----	906
<i>B.pauloensis_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.atrox_defensinaB_01</i>	ctttcggttatatttatttatttgc---tagtgattacttgcactgtatgtcttcagctaat-----	916
<i>B.jararacussu_defensinaB_01</i>	ctttcggttatatttatttatttgc---tagtgattacttgcactgtatgtcttcagctaat-----	729
<i>B.mattogrossensis_defensinaB_02</i>	ctttcggttatatttatttatttgc---tagtgattacttgcactgtatgtcttcagctaat-----	729
<i>B.mattogrossensis_defensinaB_03</i>	ctttcggttatatttatttatttgc---tagtgattacttgcactgtatgtcttcagctaat-----	729
<i>B.leucurus_defensinaB_01</i>	ctttcggttatatttatttatttgc---tagtgattacttgcactgtatgtcttcagctaat-----	1127
<i>B.neuwiedi_defensinaB_02</i>	ctttcgattttatatttatttgc---tagtgattacttgcactgtatgtcttcagctaat-----	799
<i>L.muta_defensinaB_01</i>	ctttcggttatatttatttatttgc---tagtgattacttgcactgtatgtcttcagctaat-----	644
<i>L.muta_defensinaB_02</i>	-----	
<i>B.insularis_Sequência_02</i>	-----	
<i>B.alternatus_Sequência_01</i>	-----	
<i>C.durissus_crotamina</i>	-----	
<i>C.durissus_crotasin</i>	-----	
<i>B.jararaca_defensinaB_01</i>	gtatgtctggcagaaaatagttaaaaatcagatccaatggatcttcaactaagatcttgg-----	970
<i>B.erythromelas_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.jararaca_defensinaB_02</i>	gtatgtcatggcagaaaatagaataaaaatcagatccaatggatcttcaactaagatcttgg-----	964
<i>B.diporus_defensinab_03</i>	gtatgtcatggcagaaaatagaataaaaatcagatccaatggatcttcaactaagatcttgg-----	966
<i>B.pauloensis_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.atrox_defensinaB_01</i>	gtatgtcatggcagaaaatagaataaaaatcagatccaatggatcttcaactaagatcttgg-----	976
<i>B.jararacussu_defensinaB_01</i>	gtatgtcatggcagaaaatagaataaaaatcagatccaatggatcttcaactaagatcttgg-----	789
<i>B.mattogrossensis_defensinaB_02</i>	gtatgtcatggcagaaaatagaataaaaatcagatccaatggatcttcaactaagatcttgg-----	789
<i>B.mattogrossensis_defensinaB_03</i>	gtatgtcatggcagaaaatagaataaaaatcagatccaatggatcttcaactaagatcttgg-----	789
<i>B.leucurus_defensinaB_01</i>	gtatgtcatggcagaaaatagaataaaaatcagatccaatggatcttcaactaagatcttgg-----	1187
<i>B.neuwiedi_defensinaB_02</i>	gtatgtcatggcagaaaatagaataaaaatcagatccaatggatcttcaactaagatcttgg-----	859
<i>L.muta_defensinaB_01</i>	gtatgtcatggcagaaaatagaataaaaatcagatccaatggatcttcaactaagatcttgg-----	704
<i>L.muta_defensinaB_02</i>	gtatgtcatggcagaaaatagaataaaaatcagatccaatggatcttcaactaagatcttgg-----	704
<i>B.insularis_Sequência_02</i>	-----	
<i>B.alternatus_Sequência_01</i>	-----	
<i>C.durissus_crotamina</i>	-----	
<i>C.durissus_crotasin</i>	-----	
<i>B.jararaca_defensinaB_01</i>	aagaagcagaaaaaaattcttaagat-tttttctcaagctaaataccat-tttgaat-----	1029
<i>B.erythromelas_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.jararaca_defensinaB_02</i>	aagaagcag-aaaaaaattcttaagat-tttttctcaagctaaataccat-tttgaat-----	1022
<i>B.diporus_defensinab_03</i>	aagaagcagaaaaaaattcttaagat-tttttctcaagctaaataccat-tttgaat-----	1025
<i>B.pauloensis_defensinaB_01</i>	-----	

<i>B.atrox_defensinaB_01</i>	aagaagcagaaaaaaaaattcttaagatta-tttttctcaagttaaataccgtttgaat	1035
<i>B.jararacussu_defensinaB_01</i>	aagaagcagaaaaaaaaattcttaagattatttttctcaagttaaataccgtttgaat	849
<i>B.mattogrossensis_defensinaB_02</i>	aagaagcagaaaaaaaaattcttaagatta-tttttctcaagttaaataccgtttgaat	848
<i>B.mattogrossensis_defensinaB_03</i>	aagaagcagaaaaaaaaattcttaagatta-tttttctcaagttaaataccgtttgaat	848
<i>B.leucurus_defensinaB_01</i>	aagaagcagaaaaaaaaattcttaagatta-tttttctcaagttaaataccgtttgaat	1246
<i>B.neuwiedi_defensinaB_02</i>	aagaagcagaaaaaaaaattcttaagatta-tttttctcaagttaaataccgtttgaat	918
<i>L.muta_defensinaB_01</i>	-----	
<i>L.muta_defensinaB_02</i>	aagaagcagaaaaaaaaattcttaagatta-tttttctcaagttaaataccatattgaat	763
<i>B.insularis_Sequência_02</i>	-----	
<i>B.alternatus_Sequência_01</i>	-----	
<i>C.durissus_crotamina</i>	-----	
<i>C.durissus_crotasin</i>	accattnaaat-ccactttagaataagaatgacttgcgtgacttaatcagcacag	1088
<i>B.jararaca_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.erythromelas_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.jararaca_defensinaB_02</i>	accattnaaatacacaacttagaataagaatgacttgcgtgacttaatcagcacag	1082
<i>B.diporus_defensinab_03</i>	accattnaaatacacaacttagaataagaatgacttgcgtgacttaatcagcacag	1085
<i>B.pauloensis_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.atrox_defensinaB_01</i>	accattnaaatacacaacttagaataagaatgacttgcgtgacttaatcagcacag	1095
<i>B.jararacussu_defensinaB_01</i>	accattnaaatacacaacttagaataagaatgacttgcgtgacttaatcagcacag	909
<i>B.mattogrossensis_defensinaB_02</i>	accattnaaatacacaacttagaataagaatgacttgcgtgacttaatcagcacag	908
<i>B.mattogrossensis_defensinaB_03</i>	accattnaaatacacaacttagaataagaatgacttgcgtgacttaatcagcacag	908
<i>B.leucurus_defensinaB_01</i>	accattnaaatacacaacttagaataagaatgacttgcgtgacttaatcagcacag	1306
<i>B.neuwiedi_defensinaB_02</i>	accattnaaatacacaacttagaataagaatgacttgcgtgacttaatcagcacag	978
<i>L.muta_defensinaB_01</i>	-----	
<i>L.muta_defensinaB_02</i>	accattnaaagtacaacttagaataagaatgacttgcgtatgacttaatcagcacag	823
<i>B.insularis_Sequência_02</i>	-----	
<i>B.alternatus_Sequência_01</i>	-----	
<i>C.durissus_crotamina</i>	-----	
<i>C.durissus_crotasin</i>	-ctggatcttgcataaggataaatatgcattgacttttttgcattcacaattcttgc	1147
<i>B.jararaca_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.erythromelas_defensinaB_01</i>	cctggatcttgcataaaagataaatatgcattgatttttttcgcattcacaattcttgc	1142
<i>B.jararaca_defensinaB_02</i>	cctggatcttgcataaaagataaatatgcattgatttttttcgcattcacaattcttgc	1145
<i>B.diporus_defensinab_03</i>	-----	
<i>B.pauloensis_defensinaB_01</i>	cctggatcttgcataaaagataaatatgcattgatttttttcgcattcacaattcttgc	1155
<i>B.atrox_defensinaB_01</i>	cctggatcttgcataaaagataaatatgcattgatttttttcgcattcacaattcttgc	969
<i>B.jararacussu_defensinaB_01</i>	cctggatcttgcataaaagataaatatgcattgatttttttcgcattcacaattcttgc	968
<i>B.mattogrossensis_defensinaB_02</i>	cctggatcttgcataaaagataaatatgcattgatttttttcgcattcacaattcttgc	968
<i>B.mattogrossensis_defensinaB_03</i>	tctggatctaataaaagataaatatgcattgatttttttcgcattcacaattcttgc	1366
<i>B.leucurus_defensinaB_01</i>	cctggatcttgcataaaagataaatatgcattgatttttttcgcattcacaattcttgc	1038
<i>B.neuwiedi_defensinaB_02</i>	-----	
<i>L.muta_defensinaB_01</i>	cctggatcttgcataaaagataaatatgcattgatttttttcgcattcacaattcttgc	883
<i>L.muta_defensinaB_02</i>	-----	
<i>B.insularis_Sequência_02</i>	-----	
<i>B.alternatus_Sequência_01</i>	-----	
<i>C.durissus_crotamina</i>	-----	
<i>C.durissus_crotasin</i>	ataactttattgggg-gttttgtt-tttagcttattt---tttttgcattcactt	328
<i>B.jararaca_defensinaB_01</i>	ataactttattgggg-gttttgtt-tttagcttattt---tttttgcattcactt	1202
<i>B.erythromelas_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.jararaca_defensinaB_02</i>	agaactttattgggg-tttttgttatttgcatttatttgggggggtatgcattcactt	1200
<i>B.diporus_defensinab_03</i>	ataactttattgggg-gttttgttatttgcatttatttgggggggtatgcattcactt	1204
<i>B.pauloensis_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.atrox_defensinaB_01</i>	tggggggggggtatgcattcactt	330
<i>B.jararacussu_defensinaB_01</i>	agaactttattgggg-gttttgttatttgcatttatttgggggggtatgcattcactt	1214
<i>B.mattogrossensis_defensinaB_02</i>	ataactttattgggg-tttttgttatttgcatttatttgggggggtatgcattcactt	1028
<i>B.mattogrossensis_defensinaB_03</i>	ataactttattggggtttttgcatttatttgcatttatttgggggggtatgcattcactt	1027
<i>B.leucurus_defensinaB_01</i>	ataactttattggggtttttgcatttatttgcatttatttgggggggtatgcattcactt	1027
<i>B.neuwiedi_defensinaB_02</i>	ataactttattgggg-gttttgttatttgcatttatttgggggggtatgcattcactt	1425
<i>L.muta_defensinaB_01</i>	agaactttattgggg-gttttgttatttgcatttatttgggggggtatgcattcactt	1095
<i>L.muta_defensinaB_02</i>	-----	
<i>B.insularis_Sequência_02</i>	ttcattcactt	326
<i>B.alternatus_Sequência_01</i>	ataactttattgggg-gttttgtttagtgcatttatttgcatttatttgggggggtatgcattcactt	938
<i>C.durissus_crotamina</i>	tagtattggtttaccaaattctcagccaaatatgtttgtctgaataaggaggcacaata	388
<i>C.durissus_crotasin</i>	tagtattgtttaccaaattctcagccaaatatgtttgtctgaataaggaggcacaatg	1262
<i>B.jararaca_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.erythromelas_defensinaB_01</i>	tagtattggtttaccaaattctcagccaaatatgtttgtctgaataaggaggcacaatg	1260
<i>B.jararaca_defensinaB_02</i>	tagtattggtttaccaaattctcagccaaatatgtttgtctgaataaggaggcacaatg	1264
<i>B.diporus_defensinab_03</i>	tagtattggtttaccaaattctcagccaaatatgtttgtctgaataaggaggcacaatg	390
<i>B.pauloensis_defensinaB_01</i>	tagtattggtttaccaaattctcagccaaatatgtttgtctgaataaggaggcacaatg	1274
<i>B.atrox_defensinaB_01</i>	tagtattggtttaccaaattctcagccaaatatgtttgtctgaataaggaggcacaatg	1088
<i>B.jararacussu_defensinaB_01</i>	tagtattggtttaccaaattctcagccaaatatgtttgtctgaataaggaggcacaatg	1087
<i>B.mattogrossensis_defensinaB_02</i>	tagtattggtttaccaaattctcagccaaatatgtttgtctgaataaggaggcacaatg	1087
<i>B.mattogrossensis_defensinaB_03</i>	tagtattggtttaccaaattctcagccaaatatgtttgtctgaataaggaggcacaatg	1087
<i>B.leucurus_defensinaB_01</i>	tagtattggtttaccaaattctcagccaaatatgtttgtctgaataaggaggcacaatg	1485
<i>B.neuwiedi_defensinaB_02</i>	tagtattggtttaccaaattctcagccaaatatgtttgtctgaataaggaggcacaatg	1155
<i>L.muta_defensinaB_01</i>	taacattggtttaccaaattctcagccaaatatgtttgtctgaataaggaggcacaatg	386
<i>L.muta_defensinaB_02</i>	taacattggtttaccaaattctcagccaaatatgtttgtctgaataaggaggcacaatg	998
<i>B.insularis_Sequência_02</i>	-----	
<i>B.alternatus_Sequência_01</i>	-----	
<i>C.durissus_crotamina</i>	gag-aaacagtttgcatagtgatttagagccaaaactcgcaactctgggtactgagttc	447
<i>C.durissus_crotasin</i>	gag-aaacacttttgtct-agtgatttagagccaaaacacgacaactctgggtactgagttc	1320
<i>B.jararaca_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.erythromelas_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B.jararaca_defensinaB_02</i>	gagaaaacagtttgcatagtgatttagagccaaaacactacaactctggataactgagttc	1319

<i>B.diporus_defensinab_03</i>	gag-aaacagtttggctc-agtgattagagcaaaacactacaactctggatactgaggc	1322
<i>B.pauloensis_defensinab_01</i>	gag-aaacagtttggctc-agtgattagagcaaaacactacaactctggatactgaggc	448
<i>B.atrox_defensinab_01</i>	gag-aaacagtttggctc-agtgattagagcaaaacactacaactctggatactgaggc	1332
<i>B.jararacussu_defensinab_01</i>	gag-aaacagtttggctc-agtgattagagcaaaacactacaactctggatactgaggc	1146
<i>B.mattogrossensis_defensinab_02</i>	gag-aaacagtttggctc-agtgattagagcaaaacactacaactctggatactgaggc	1145
<i>B.mattogrossensis_defensinab_03</i>	gag-aaacagtttggctc-agtgattagagcaaaacactacaactctggatactgaggc	1145
<i>B.leucurus_defensinab_01</i>	gag-aaacagtttggctc-agtgattagagcaaaacactacaactctggatactgaggc	1543
<i>B.neuwiedi_defensinab_02</i>	gag-aaacagtttggctc-agtgattagagcaaaacactacaactctggatactgaggc	1213
<i>L.muta_defensinab_01</i>	gag-aaacagtttggctc-agtgattagagcaaaacactacaactctggatactgaggc	444
<i>L.muta_defensinab_02</i>	gag-aaacagtttggctc-agtgattagagcaaaacactacaactctggatactgaggc	1056
<i>B.insularis_Sequência_02</i>	-----	
<i>B.alternatus_Sequência_01</i>	-----	
<i>C.durissus_crotamina</i>	cagtcccaccccttgggcctgaaagctgactgagtgaatttggctaaactgacaggtttga	507
<i>C.durissus_crotasin</i>	taatcccaccccttgggcctgaaagctgactgagtgaatttggctaaactgacag-ttttg-	1378
<i>B.jararaca_defensinab_01</i>	-----	
<i>B.erythromelas_defensinab_01</i>	tagtcccaccccttgggcctgaa-----agtgaatttggctaaactgacgg-ttttg-	1368
<i>B.jararaca_defensinab_02</i>	tagtcccaccccttgggcctgaaagctgta-----ctaaactgacgg-ttttg-	1366
<i>B.diporus_defensinab_03</i>	tagtcccaccccttgggcctgaaagctgactgagtgaatttggctaaactgacag--ttttg	506
<i>B.pauloensis_defensinab_01</i>	tagtcccaccccttgggcctgaaagctgactgagtgaatttggctaaactgacgg--ttttg	1390
<i>B.atrox_defensinab_01</i>	tagtcccaccccttgggcctgaaagctgactgagtgaatttggctaaactgacgg--ttttg	1190
<i>B.jararacussu_defensinab_01</i>	tagtcccaccccttgggcctgaaagctgactgagtgaatttggctaaactgacgg--ttttg	1189
<i>B.mattogrossensis_defensinab_02</i>	tagtcccaccccttgggcctgaaagctgactgagtgaatttggctaaactgacgg--ttttg	1189
<i>B.mattogrossensis_defensinab_03</i>	tagtcccaccccttgggcctgaaagctgactgagtgaatttggctaaactgacgg--ttttg	1587
<i>B.leucurus_defensinab_01</i>	tagtcccaccccttggactgaaagctgactgagtgaatttggctaaactgacgg--ttttg	1271
<i>B.neuwiedi_defensinab_02</i>	tagtcccaccccttgggcctgaaagctgactgagtgaatttggctaaactgacgg--tttcg	502
<i>L.muta_defensinab_01</i>	tagtcccaccccttgggcctgaaagctgactgagtgaatttggctaaactgacag--ttttg	1114
<i>L.muta_defensinab_02</i>	-----agcagaggtggctaaactgacta--ttttg	894
<i>B.insularis_Sequência_02</i>	-----agcagaggtggctaaactgacta--ttttg	920
<i>B.alternatus_Sequência_01</i>	-----	
<i>C.durissus_crotamina</i>	taaaaagaaaagaatataagttactattgttctacttgaaaactgcttctggccttgc	567
<i>C.durissus_crotasin</i>	ataaaaagaaaagaataaaag-cattatgttctacttgaaaactg-----ctttgt	1429
<i>B.jararaca_defensinab_01</i>	-----	
<i>B.erythromelas_defensinab_01</i>	ataaaaagaaaagaatataag-tactattgttctacttgaaaactgcttctggccttgc	1427
<i>B.jararaca_defensinab_02</i>	ataaaaagaaaagaatataag-tactattgttctacttgaaaactgcttctggccttgc	1425
<i>B.diporus_defensinab_03</i>	ataaaaagaaaagaatataag-tactattgttctacttgaaaactgcttctggccttgc	565
<i>B.pauloensis_defensinab_01</i>	ataaaaagaaaagaatataag-tactattgttctacttgaaaactgcttctggccttgc	1449
<i>B.atrox_defensinab_01</i>	ataaaaagaaaagaatataag-tactattgttctacttgaaaactgcttctggccttgc	1249
<i>B.jararacussu_defensinab_01</i>	ataaaaagaaaagaatataag-tactattgttctacttgaaaactgcttctggccttgc	1248
<i>B.mattogrossensis_defensinab_02</i>	ataaaaagaaaagaatataag-tactattgttctacttgaaaactgcttctggccttgc	1248
<i>B.mattogrossensis_defensinab_03</i>	ataaaaagaaaagaatataag-tactattgttctacttgaaaactgcttctggccttgc	1646
<i>B.leucurus_defensinab_01</i>	ataaaaagaaaagaatataag-tactattgttctacttgaaaactgcttctggccttgc	1330
<i>B.neuwiedi_defensinab_02</i>	ataaaaagaaaagaatataag-tactattgttctacttgaaaactgcttctggccttgc	561
<i>L.muta_defensinab_01</i>	ataaaaagaaaagaatataag-tactattgttctacttgaaaactgcttctggacttgt	1173
<i>L.muta_defensinab_02</i>	ataaaaagaaaagaatataag-tacttttttttctacttgaaaactgcttctggacttgt	953
<i>B.insularis_Sequência_02</i>	ataaaaagaaaagaatataag-tacttttttttctacttgaaaactgcttctggacttgt	979
<i>B.alternatus_Sequência_01</i>	-----	
<i>C.durissus_crotamina</i>	gcttggag-gtggaaagaatgataactatgaattttgggttactgattaaaacggat-	625
<i>C.durissus_crotasin</i>	gcttggagggtgg-aaaagaatgataactatgatttt-ggggttactgattagactgatt	1486
<i>B.jararaca_defensinab_01</i>	-----	
<i>B.erythromelas_defensinab_01</i>	gcttggagggtggaaaaaaaaacgataactatgactttt-ggggttactgattagactgatt	1485
<i>B.jararaca_defensinab_02</i>	gcttggagggtggaaaaaaaaatgataactatgactttt-ggggttactgattagactgatgt	1483
<i>B.diporus_defensinab_03</i>	gcttggagggtggaaaaaaaaatgataactatgactttt-ggggttactgattagactgatgt	623
<i>B.pauloensis_defensinab_01</i>	gcttggagggtggaaaaaaaaatgataactatgactttt-ggggttactgattagattaatgt	1507
<i>B.atrox_defensinab_01</i>	gctcgagggtggaaaaaaaaatgataactatgactttt-ggggttactgattagactgatt	1307
<i>B.jararacussu_defensinab_01</i>	gcttggagggtggaaaaaaaaatgataactatgactttt-ggggttactgattagactgatt	1305
<i>B.mattogrossensis_defensinab_02</i>	gcttggagggtgg-aaaaaaaaatgataactatgactttt-ggggttactgattagactgatgt	1306
<i>B.mattogrossensis_defensinab_03</i>	gcttggagggtggaaaaaaaaatgataactatgactttt-ggggttactgattagactgatgt	1704
<i>B.leucurus_defensinab_01</i>	gctcgagggtggaaaaaaaaatgataactatgactttt-ggggttactgattagactgatgt	1388
<i>B.neuwiedi_defensinab_02</i>	gcttggagggtgg-aaaaaaaaatgatactgattttt-ggggttactgattagactgatgt	618
<i>L.muta_defensinab_01</i>	gcttggagggtggaaaaaaaaatgatactgattttt-ggggttactgattagactgatgt	1231
<i>L.muta_defensinab_02</i>	gcttggagggtgg----aaaaaatgataactatgattttt-ggggttactgattagactgatgt	1007
<i>B.insularis_Sequência_02</i>	gcttggagggtgg----aaaaaatgataactatgattttt-ggggttactgattagactgatgt	1034
<i>B.alternatus_Sequência_01</i>	-----	
<i>C.durissus_crotamina</i>	-ttgtttaaaaatggcttattccacttaatacagaaaaatgccaaaatttggaaaaatc	684
<i>C.durissus_crotasin</i>	gttgatagagaaaatggcttagtcatac-taatacag-aaaatgcaaaaatgtt--gagattt	1542
<i>B.jararaca_defensinab_01</i>	-----	
<i>B.erythromelas_defensinab_01</i>	gttgatagagaaaatggctggctcac-taatacag-aaaatgcaaaaatgtt--gagattc	1541
<i>B.jararaca_defensinab_02</i>	gttgatagagaaaatggctggctcac-taatacag-aaaatgcaaaaatgtt--gagattc	1539
<i>B.diporus_defensinab_03</i>	gttgatagagaaaatggctggctcac-taatacag-aaaatgcaaaaatgtt--gagattc	679
<i>B.pauloensis_defensinab_01</i>	gttgatagagaaaatggctggctcac-taatacag-aaaatgcaaaaatgtt--gagattc	1563
<i>B.atrox_defensinab_01</i>	gttgatagagaaaatggctggctcac-taatacag-aaaatgcaaaaatgtt--gagattc	1363
<i>B.jararacussu_defensinab_01</i>	gttgatagagaaaatggctggctcac-taatacag-aaaatgcaaaaatgtt--gagattc	1361
<i>B.mattogrossensis_defensinab_02</i>	gttgatagagaaaatggctggctcac-taatacag-aaaatgcaaaaatgtt--gagattc	1362
<i>B.mattogrossensis_defensinab_03</i>	gttgatagagaaaatggctggctcac-taatacag-aaaatgcaaaaatgtt--gagattc	1760
<i>B.leucurus_defensinab_01</i>	gttgatagagaaaatggctggctcac-taatacag-aaaatgcaaaaatgtt--gagattc	1444
<i>B.neuwiedi_defensinab_02</i>	gttgatagagaaaatggctggctcac-taatacag-aaaatgcaaaaatgtt--gagattc	674
<i>L.muta_defensinab_01</i>	gttgatagagaaaatggctggctcac-taatacag-aaaatgcaaaaatgtt--gagattc	1287
<i>L.muta_defensinab_02</i>	gttgatagagaaaatggctggctcac-taatacag-aaaatgcaaaaatgtt--gagattc	1063
<i>B.insularis_Sequência_02</i>	gttgatagagaaaatggctggctcac-taatacag-aaaatgcaaaaatgtt--gagattc	1090
<i>B.alternatus_Sequência_01</i>	-----	
<i>C.durissus_crotamina</i>	caatttcatgcc-catt-----t	697
<i>C.durissus_crotasin</i>	gattttcatgcctgatt-----t	1560
<i>B.jararaca_defensinab_01</i>	-----	

<i>B. erythromelas_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B. jararaca_defensinaB_02</i>	gatttaatgccttatt-----c	1559
<i>B. diporus_defensinaB_03</i>	gatttaatgccttatt-----c	1557
<i>B. pauloensis_defensinaB_01</i>	gatttaacgccttatt-----c	697
<i>B. atrox_defensinaB_01</i>	gatttaacgccttatt-----c	1581
<i>B. jararacussu_defensinaB_01</i>	gattttatttatttatttattaattaaatttgtatccgc(ccctctcccaagact-c	1422
<i>B. mattogrossensis_defensinaB_02</i>	gattttatttatttatttattaattaaatttgtatccgc(ccctctcccaagact-c	1420
<i>B. mattogrossensis_defensinaB_03</i>	gattttatttatttatttattaattaaatttgtatccgc(ccctctcccaagactcc	1422
<i>B. leucurus_defensinaB_01</i>	gattttatttatttatttattaattaaatttgtatccgc(ccctctcccaagact-c	1819
<i>B. neuwiedi_defensinaB_02</i>	gattttatttatttatttattaattaaatttgtatccgc(ccctctcccaagact-c	1503
<i>L. muta_defensinaB_01</i>	gatttaatgccttatt-----t	692
<i>L. muta_defensinaB_02</i>	aatttaatgccttatt-----t	1305
<i>B. insularis_Sequência_02</i>	aatttaatgccttatt-----t	1081
<i>B. alternatus_Sequência_01</i>	aatttaatgccttatt-----t	1108
← primer Intron_Def_REV gcaacagg gaatcgaaagtc		
<i>C. durissus_crotamina</i>	tactgcaacagg-gaatcgaaagtcaacgcctttgttctcccc-cccac--tttccac	753
<i>C. durissus_crotasin</i>	tattgcaacagg-gaatcgaaagtcaacgcctttgttctccc-cccac--tttccac	1616
<i>B. jararaca_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B. erythromelas_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B. jararaca_defensinaB_02</i>	tactgcaacagg-gaatcgaaagtcaacgcctttgttctcccccccccccccccccac	1618
<i>B. diporus_defensinaB_03</i>	tactgcaacagg-gaatcagaagtcaacgcctttgttctcccccccccccccccccac	1614
<i>B. pauloensis_defensinaB_01</i>	tactgcaacagg-gaatcagaagtcaacgcctttgttctcccccccccccccccccac	754
<i>B. atrox_defensinaB_01</i>	tactgcaacagg-gaatcgaaagtcaacgcctttgttctcccccccccccccccccac	1640
<i>B. jararacussu_defensinaB_01</i>	tactgcaacagg-gaatcagaagt---cgctttgttctcccc-ccc---tttacac	1473
<i>B. mattogrossensis_defensinaB_02</i>	tactgcaacagg-gaatcgaaagt---cgctttgttctcccc-ccccccgttacac	1475
<i>B. mattogrossensis_defensinaB_03</i>	tactgcaacagg-gaatcgaaagt---cgctttgttctcccc-cccccc-gttacac	1475
<i>B. leucurus_defensinaB_01</i>	tactgcaacagg-gaatcagaagtcaacgcctttgttctcccc-ccc---tttacac	1873
<i>B. neuwiedi_defensinaB_02</i>	tactgcaacagg-gaatcgaaagt---cgctttgttctccccccccccc-tttacac	1557
<i>L. muta_defensinaB_01</i>	tactgcaacagg-gaatcgaaagtcaacgcctttgttccccccc-tttacac	748
<i>L. muta_defensinaB_02</i>	tactgcaacagg-gaatcgaaagtcaacgcctttgttccccccc-tttccac	1361
<i>B. insularis_Sequência_02</i>	tacagcaacagatgaatggaaagtcaacgcctttgttccccccc-tttccac	1139
<i>B. alternatus_Sequência_01</i>	tacagcaacagatgaatggaaagtcaacgcctttgttccccccc-tttccac	1166
<i>C. durissus_crotamina</i>	atttcccc----cttccctataatgttgccttaactatgtgttttatgtat	805
<i>C. durissus_crotasin</i>	atttccccctttctctttccatgttgccttaactatgtgttttatgtat	1676
<i>B. jararaca_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B. erythromelas_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B. jararaca_defensinaB_02</i>	atttccccctttccctttccatgttgccttaactatgtgttttatgtat	1678
<i>B. diporus_defensinaB_03</i>	gtttccccctttctctttccatgttgccttaactatgtgttttatgtat	1674
<i>B. pauloensis_defensinaB_01</i>	gtttccccctttctctttccatgttgccttaactatgtgttttatgtat	814
<i>B. atrox_defensinaB_01</i>	atttccccctgttctctttccatgttgccttaactatgtgttttatgtat	1700
<i>B. jararacussu_defensinaB_01</i>	atttccccctttccactttccatgttgccttaactatgtgttttatgtat	1533
<i>B. mattogrossensis_defensinaB_02</i>	atttccctcccttctctttccatgttgccttaactatgtgttttatgtat	1535
<i>B. mattogrossensis_defensinaB_03</i>	atttccctcccttctctttccatgttgccttaactatgtgttttatgtat	1535
<i>B. leucurus_defensinaB_01</i>	atttccccctttccactttccatgttgccttaactatgtgttttatgtat	1933
<i>B. neuwiedi_defensinaB_02</i>	atttccccctttcccttccatgttgccttaactatgtgttttatgtat	1617
<i>L. muta_defensinaB_01</i>	atttccccctttcccttccatgttgccttaactatgtgttttatgtat	808
<i>L. muta_defensinaB_02</i>	atttccccctttcccttccatgttgccttaactatgtgttttatgtat	1421
<i>B. insularis_Sequência_02</i>	atttccccctttccctttccatgttgccttaactatgtgttttat-----	1192
<i>B. alternatus_Sequência_01</i>	atttccccctttccctttccatgttgccttaactatgtgttttat-----	1219
<i>C. durissus_crotamina</i>	ttttatgttctaaatgaataagaatataattgataaaggaaatctgcagttctgttagaa	865
<i>C. durissus_crotasin</i>	ttttatgttctaaatgaataagaatataattgataaaggaaatctgcataatctgttagaa	1736
<i>B. jararaca_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B. erythromelas_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B. jararaca_defensinaB_02</i>	gtttatgttataatgaa----tataattgtataaaggaaatctgcataatctgttagaa	1732
<i>B. diporus_defensinaB_03</i>	gtttatgttataatgaa----taaaattgtataaaggaaatctgcataatctgttagaa	1728
<i>B. pauloensis_defensinaB_01</i>	gtttatgttataatgaa----taaaattgtataaaggaaatctgcataatctgttagaa	868
<i>B. atrox_defensinaB_01</i>	gtttatgttataatgaa----taaaattgtataaaggaaatctgcataatctgttagaa	1754
<i>B. jararacussu_defensinaB_01</i>	gtttatgttataatgaa----taaaattgtataaaggaaatctgcataatctgttagaa	1587
<i>B. mattogrossensis_defensinaB_02</i>	gtttatgttataatgaa----tataattgtataaaggaaatctgcataatctgttagaa	1589
<i>B. mattogrossensis_defensinaB_03</i>	gtttatgttataatgaa----tataattgtataaaggaaatctgcataatctgttagaa	1589
<i>B. leucurus_defensinaB_01</i>	gtttatgttataatgaa----tataattgtataaaggaaatctgcataatctgttagaa	1987
<i>B. neuwiedi_defensinaB_02</i>	gtttatgttataatgaa----tataattgtataaaggaaatctgcataatctgttagaa	1671
<i>L. muta_defensinaB_01</i>	ttttatgttataatgaaaaaaatataattgtataaaggaaatctgcataatctgttagaa	868
<i>L. muta_defensinaB_02</i>	ttttatgttataatgaaaaaaatataattgtataaaggaaatctgcagttctgttagaa	1481
<i>B. insularis_Sequência_02</i>	-tttatgttataatgaaataattataattgtataaaggaaatctgcataatctgtaaaa	1251
<i>B. alternatus_Sequência_01</i>	-tttatgttataatgaaataattataattgtataaaggaaatctgcataatctgtaaaa	1278
<i>C. durissus_crotamina</i>	gaagg-tagtgtcttggaaaggaaaaatatttaatattaaggaaatcttactcatcg	924
<i>C. durissus_crotasin</i>	gaagg-tagtgtcttggaaaggaaaaatatttaatattaaggaaatcttactcatcg	1795
<i>B. jararaca_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B. erythromelas_defensinaB_01</i>	-----	
<i>B. jararaca_defensinaB_02</i>	gaagg-tagggcttggaaaggaaaaatatttaatattaaggaaatcttgcacatcg	1791
<i>B. diporus_defensinaB_03</i>	ggagg-tagggcttggaaaggaaaaatatttaatattaaggaaatcttgcacatcg	1787
<i>B. pauloensis_defensinaB_01</i>	ggagg-tagggcttggaaaggaaaaatatttaatattaaggaaatcttgcacatcg	927
<i>B. atrox_defensinaB_01</i>	ggagg-tagggcttggaaaggaaaaatatttaatattaaggaaatcttgcacatcg	1813
<i>B. jararacussu_defensinaB_01</i>	ggaggtagggcttggaaaggaaaaatatttaatattaaggaaatcttgcacatcg	1647
<i>B. mattogrossensis_defensinaB_02</i>	ggagg-tagggcttggaaaggaaaaatatttaatattaaggaaatcttgcacatcg	1648
<i>B. mattogrossensis_defensinaB_03</i>	ggagg-tagggcttggaaaggaaaaatatttaatattaaggaaatcttgcacatcg	1648
<i>B. leucurus_defensinaB_01</i>	ggaggtagggcttggaaaggaaaaatatttaatattaaggaaatcttgcacatcg	2047
<i>B. neuwiedi_defensinaB_02</i>	ggaggtagggcttggaaaggaaaaatatttaatattaaggaaatcttgcacatcg	1730
<i>L. muta_defensinaB_01</i>	ggaggtagggcttggaaaggaaaaatatttaatattaaggaaatcttgcacatcg	927
<i>L. muta_defensinaB_02</i>	gaagg-tagtgtcttggaaaggaaaaatatttaatattaaggaaatcttactcttc	1540
<i>B. insularis_Sequência_02</i>	gaagg-taatgtcttggaaaggaaaaatatttaatattaaggaaatcttactcatcg	1310



<i>B.atrox_defensinaB_01</i>	tgcaaaggaaaagaatttactttaaactcactttgatcaacttatta-ttttttctcatt	2106
<i>B.jararacussu_defensinaB_01</i>	tgcaaaggaaaagaatttactttaaactcactttgatcaac--atta-ttttttctcatt	1936
<i>B.mattogrossensis_defensinaB_02</i>	tgcaaaggaaaagaatttactttaaactcactttgatcaacttatta-ttttttctcatt	1941
<i>B.mattogrossensis_defensinaB_03</i>	tgcaaaggaaaagaatttactttaaactcactttgatcaacttatta-ttttttctcatt	1941
<i>B.leucurus_defensinaB_01</i>	tgcaaaggaaaagaatttactttaaactcactttgatcaacttatta-ttttttctcatt	2340
<i>B.neuwiedi_defensinaB_02</i>	tgcaaaggaaaagaatttactttaaactcactttgatcaacttatta-ttttttctcatt	2023
<i>L.muta_defensinaB_01</i>	tgcaaaggaaaagaatttactttaaactcactttgatcaacttatta-ttttttctcatt	1217
<i>L.muta_defensinaB_02</i>	tgcaaaggaaaagaatttactttaaactcactttgatcaacttatta-ttttttctcatt	1833
<i>B.insularis_Sequência_02</i>	tgcaaaggaaaagaatttactttaaactaacttggatcaacttatta-ttttttctcact	1570
<i>B.alternatus_Sequência_01</i>	tgcaaaggaaaagaatttactttaaacttggatcaacttatta-ttttttctcact	1598
***.*****	***.*****	***.*****

### Éxon 3

STOP

<i>C.durissus_crotamina</i>	tgtatagGG-----GAAGTGGAAAATAAtgcacatctccatcttaggacca	1259
<i>C.durissus_crotasin</i>	tgtatagGA-----GATATGAGAAAATAAtgcacatctccatcttaggacca	2131
<i>B.jararaca_defensinaB_01</i>	tgtatagGA-----AACCTAGAAAATAAtgcgtctccatctccgacca	845
<i>B.erythromelas_defensinaB_01</i>	tgtatagGA-----AACCTAGAAAATAAtgcgtctccatctacgacca	836
<i>B.jararaca_defensinaB_02</i>	tgtatagGA-----GATTGGAAAATAAtgcgtctccatctacaacca	2129
<i>B.diporus_defensinaB_03</i>	tgtatagGA-----AACCTAGAAAATAAtgcgtctccatctacgacca	2118
<i>B.pauloensis_defensinaB_01</i>	tgtatagGA-----AACCTAGAAAATAAtgcgtctccatctacgacca	1255
<i>B.atrox_defensinaB_01</i>	tgtatagga-----aacctggaaaataatgcacatctccatctacgacca	2150
<i>B.jararacussu_defensinaB_01</i>	tgtatagGA-----GATTGGAAAATAAtgcacatctccatctacgacca	1980
<i>B.mattogrossensis_defensinaB_02</i>	tgtatagGA-----GATTGGAAAATAAtgcacatctccatctacaacca	1985
<i>B.mattogrossensis_defensinaB_03</i>	tgtatagGA-----GATTGGAAAAGTAAtgcacatctccatctacgacca	1985
<i>B.leucurus_defensinaB_01</i>	tgtatag-----ATTGGAAAATAAtgcgtctccatctacgatca	2381
<i>B.neuwiedi_defensinaB_02</i>	tgtatagGA-----TATTGGAAAATAAtgcacatctccatctacgacca	2067
<i>L.muta_defensinaB_01</i>	tgtatag-----GGAAAATAAtgcgtctccatctacgacca	1255
<i>L.muta_defensinaB_02</i>	tgtatagGAGAAAATAAtggaaaatggagatggaaaataatgcgtctccatctacgacca	1893
<i>B.insularis_Sequência_02</i>	tgtatagca-----gaaaggaaaataaaggccatctccatctacgacca	1614
<i>B.alternatus_Sequência_01</i>	tgtatagca-----gaaaggaaaataatgcacatctccatctacgacca	1642
*****	...*.***	...*.*****

primer 3'UTRas atggccaaggacctgagagtgcc

<i>C.durissus_crotamina</i>	tggatatcttcagatatggcaaggacctgagagtgcc	1342
<i>C.durissus_crotasin</i>	tggatatcttcagatatggcaaggacctgagagtgcc	2170
<i>B.jararaca_defensinaB_01</i>	tggatatcttcagatatggcaaggacctgagagtgcc	861
<i>B.erythromelas_defensinaB_01</i>	tggatatcttcagatatggcaaggacctgagagtgcc	884
<i>B.jararaca_defensinaB_02</i>	tggatatcttcagatatggcaaggacctgagagtgcc	2168
<i>B.diporus_defensinaB_03</i>	tggatatcttcagatatggcaaggacctgagagtgcc	2157
<i>B.pauloensis_defensinaB_01</i>	tggatatcttcagatatggcaaggacctgagagtgcc	1271
<i>B.atrox_defensinaB_01</i>	tggatatcttcagatatggcaaggacctgagagtgcc	2166
<i>B.jararacussu_defensinaB_01</i>	tggatatcttcagatatggcaaggacctgagagtgcc	1996
<i>B.mattogrossensis_defensinaB_02</i>	tggatatcttcagatatggcaaggacctgagagtgcc	2001
<i>B.mattogrossensis_defensinaB_03</i>	tggatatcttcagatatggcaaggacctgagagtgcc	2001
<i>B.leucurus_defensinaB_01</i>	tggatatcttcagatatggcaaggacctgagagtgcc	2397
<i>B.neuwiedi_defensinaB_02</i>	tggatatcttcagatatggcaaggacctgagagtgcc	2083
<i>L.muta_defensinaB_01</i>	tggatatcttcagatatggcaaggacctgagagtgcc	1271
<i>L.muta_defensinaB_02</i>	tggatatcttcagatatggcaaggacctgagagtgcc	1909
<i>B.insularis_Sequência_02</i>	tggataccttcagatatggcaaggacctgagagtgcc	1630
<i>B.alternatus_Sequência_01</i>	tggataccttcagatatggcaaggacctgagagtgcc	1658
***.***	*****	

Em cinza escuro destaque para as cisteínas e sequências dos "primers". "STOP" = códon de parada.

**ANEXO C - Artigo de periódico**

CORRÊA, P.G. E OGUIURA, N. (2013) Phylogenetic analysis of  $\beta$ -defensin-like genes of *Bothrops*, *Crotalus* and *Lachesis* snakes. **Toxicon**, v.69, 65-74.



ELSEVIER

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/toxicon](http://www.elsevier.com/locate/toxicon)

## Phylogenetic analysis of $\beta$ -defensin-like genes of *Bothrops*, *Crotalus* and *Lachesis* snakes



Poliana G. Correa, Nancy Oguiura\*

Ecology and Evolution Laboratory – Butantan Institute, Av. Dr. Vital Brasil 1500, CEP 05503-900 – São Paulo, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 4 November 2012

Received in revised form 11 February 2013

Accepted 19 February 2013

Available online 14 March 2013

## Keywords:

Beta-defensin

Innate immunity

Brazilian pitvipers

Snakes

Gene tree

Birth-and-death evolution

## ABSTRACT

Defensins are components of the vertebrate innate immune system; they comprise a diverse group of small cationic antimicrobial peptides. Among them,  $\beta$ -defensins have a characteristic  $\beta$ -sheet-rich fold plus six conserved cysteines with particular spacing and intramolecular bonds. They have been fully studied in mammals, but there is little information about them in snakes. Using a PCR approach, we described 13  $\beta$ -defensin-like sequences in *Bothrops* and *Lachesis* snakes. The genes are organized in three exons and two introns, with exception of *B.atrix\_defensinB\_01* which has only two exons. They show high similarities in exon 1, intron 1 and intron 2, but exons 2 and 3 have undergone accelerated evolution. The theoretical translated sequences encode a pre- $\beta$ -defensin-like molecule with a conserved signal peptide and a mature peptide. The signal peptides are leucine-rich and the mature  $\beta$ -defensin-like molecules have a size around 4.5 kDa, a net charge from +2 to +11, and the conserved cysteine motif. Phylogenetic analysis was done using maximum parsimony, maximum likelihood and Bayesian analyses, and all resulted in similar topologies with slight differences. The genus *Bothrops* displayed two separate lineages. The reconciliation of gene trees and species tree indicated eight to nine duplications and 23 to 29 extinctions depending on the gene tree used. Our results together with previously published data indicate that the ancestral  $\beta$ -defensin-like gene may have three exons in vertebrates and that their evolution occurred according to a birth-and-death model.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

A wide variety of organisms have an innate immune system that provides the first line of defense against external pathogens. Vertebrates have, among the components of this innate immune system, defensins comprising a diverse group of small cationic antimicrobial peptides. These molecules have both antimicrobial and cell signaling functions (Lai and Gallo, 2009). They are grouped into three families: alpha ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), and theta ( $\theta$ ), according to the

pattern of disulfide bonds between cysteine residues (Cys).  $\beta$ -Defensins are a subgroup of defensins that have a characteristic  $\beta$ -sheet-rich fold plus six conserved Cys with particular spacing and intramolecular bonds. The structure of pre- $\beta$ -defensin consists of a signal sequence, a short or absent propiece, and the mature defensin (Ganz, 2003).  $\beta$ -Defensin-like peptides are found in the venom of diverse organisms, including sea anemones, snakes and platypus (Torres and Kuchel, 2004) as well lizards (Fry et al., 2005). Interestingly crotamine (one of four major components of the venom of the South American rattlesnake) has been shown to have a global fold and a Cys-pairing pattern similar to that of the  $\beta$ -defensin scaffold, although the peptides show low sequence similarity and display different biological activities (Fadel et al., 2005). Crotamine

\* Corresponding author. Tel.: +55 (11) 2627 9812; fax: +55 (11) 2627 9811.

E-mail addresses: pgcorrea@ig.com.br (P.G. Correa), nancyoguiura@butantan.gov.br, naniogui@hotmail.com (N. Oguiura).

has an antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, as well against *Candida* spp., *Trichosporon* spp. and *Cryptococcus neoformans* (Oguiura et al., 2011; Yamane et al., 2012; Yount et al., 2009). Defensin-like peptides from the platypus also show a similar overall fold and Cys-pairing pattern as  $\beta$ -defensin-2, although no antimicrobial activity (Torres et al., 1999).

In vertebrates,  $\beta$ -defensin-like genes have been described in birds (Xiao et al., 2004), fishes (Zou et al., 2007), lizards (Dalla Valle et al., 2012), mammals and primates (Del Pero et al., 2002; Luenser and Ludwig, 2005; Luenser et al., 2005; Patil et al., 2005), platypus (Whittington et al., 2008) and rattlesnakes (Rádis-Baptista et al., 2003, 2004). The  $\beta$ -defensin genes are organized in a different manner in each animal group. The most common structure found in mammals is two exons and one intron (Patil et al., 2005), which also includes the platypus (Whittington et al., 2008), while there are four exons and three introns in chickens (Xiao et al., 2004). In snakes,  $\beta$ -defensin-like genes have three exons and two introns (Rádis-Baptista et al., 2003; 2004), as well as lizards (Dalla Valle et al., 2012) and fishes (Zou et al., 2007).

The  $\beta$ -defensin genes constitute a multigene family. Previous studies have shown that many multigene families, including proteins of the immune system, evolved according to a mechanism defined as the birth-and-death process (Nei and Rooney, 2005). This process was reported for mammalian  $\beta$ -defensin genes (Morrison et al., 2003), bovine defensin genes (Liu et al., 2009) and  $\alpha$ -defensin genes (Das et al., 2010), and may explain the degree of diversity amongst the sequences in *Anolis carolinensis* (Dalla Valle et al., 2012). The unusually high degree of sequence variation in the mature peptide produced by the paralogous and in some cases orthologous genes implies extensive specialization and species-specific adaptation (Semple et al., 2006).

Comparative studies are important in determining patterns of evolution and function of the innate immune system. In this work, we describe new  $\beta$ -defensin-like genes in Brazilian pitvipers of the *Bothrops* and *Lachesis* genera, where we analyzed them phylogenetically and reconciled the species tree with gene tree to infer duplication/speciation nodes of these  $\beta$ -defensin-like genes.

## 2. Material and methods

### 2.1. Tissues

The snakes studied in this work were *Bothrops alternatus* (Estiva - MG, IBSP 77.198), *B. atrox* (Rio Branco - AC, IBSP 79.765), *B. diporus* (Blumenal - SC, IBSP 60.323), *B. insularis* (Queimada Grande Island - SP), *B. erythromelas* (Ibitira - BA, IBSP 79.766), *B. jararaca* (Embu Guaçu - SP), *B. jararacussu* (Ubatuba - SP), *B. leucurus* (Porto Seguro - BA, IBSP 79.100), *B. mattogrossensis* (N. Sra do Livramento - MT, IBSP 77.705), *B. neuwiedi* (Baependi - MG, IBSP 74.566), *B. pauloensis* (Frutal - MG, IBSP 71.111), *Crotalus durissus*, *Lachesis muta* (Northeast Brazil).

We used livers and scales from snakes deposited in the Tissue Collection of Alphonse Hoge Herpetological Collection at the Butantan Institute and the blood from *B. insularis*

snakes, kept alive in the Ecology and Evolution Laboratory, and from *L. muta*, kept in the Herpetology Laboratory, both at the Butantan Institute.

### 2.2. DNA purification

The DNA was purified from liver tissues (Ausubel et al., 2000), scales (Fetzner, 1999) or blood (ZR Genomic DNA Tissue kit, ZymoResearch), which was then quantified at 260 nm using the NanoDrop ND-2000c spectrophotometer.

### 2.3. PCR

#### 2.3.1. Primers

The forward and reverse primers H010 (5'-AAG CAGTCTCACCATGAAGAT-3') and 3'UTRas (5'-GGCACTCTC AGGTCTTGCCAT-3') were designed on the basis of crotamine (Rádis-Baptista et al., 2003) and crotasin (Rádis-Baptista et al., 2004) gene sequences to amplify  $\beta$ -defensin-like sequences.

#### 2.3.2. Reaction

A 50  $\mu$ l reaction mix contained 100–1000 ng DNA sample, 0.1  $\mu$ M each primer, 1.25 U Taq DNA Polymerase Platinum (Invitrogen), buffer with the addition of 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 0.2 mM dNTPs mix. The amplification process used an initial denaturation step of 4 min at 94 °C, followed by 30 cycles of 45 s at 94 °C, 45 s at 52.5, 55 or 58 °C and 45 s at 72 °C, and finally 1 min at 72 °C.

### 2.4. Cloning

The amplified DNA was purified, after electrophoresis on a 1% agarose gel, using the Zymoclean Gel DNA Recovery kit (ZymoResearch). The purified DNA was cloned into the

**Table 1**

$\beta$ -Defensin-like sequence of snakes from different groups of *Bothrops* and *Lachesis* genera.

Snake	Sequence	GenBank
group 'atrox'	<i>B. atrox_defensinB_01</i>	<i>DefbBa01</i> KC117158
	<i>B.leucurus_defensinB_01</i>	<i>DefbBl01</i> KC117166
group 'alternatus'	<i>B.alternatus_sequence_01</i>	<i>SqBal01</i> KC117159
group 'jararaca'	<i>B.jararaca_defensinB_01</i>	<i>DefbBj01</i> KC117163
	<i>B.jararaca_defensinB_02</i>	<i>DefbBj02</i> KC117164
	<i>B.insularis_sequence_02</i>	<i>SqBi02</i> KC117162
group 'jararacussu'	<i>B.jararacussu_defensinB_01</i>	<i>DefbBju01</i> KC117165
group 'neuwiedi'	<i>B.diporus_defensinB_03</i>	<i>DefbBd03</i> KC117160
	<i>B.erythromelas_defensinB_01</i>	<i>DefbBe01</i> KC117161
	<i>B.mattogrossensis_defensinB_02</i>	<i>DefbBm02</i> KC117167
	<i>B.mattogrossensis_defensinB_03</i>	<i>DefbBm03</i> KC117168
	<i>B.neuwiedi_defensinB_02</i>	<i>DefbBn02</i> KC117169
	<i>B.pauloensis_defensinB_01</i>	<i>DefbBp01</i> KC117170
genus <i>Lachesis</i>	<i>L.muta_defensinB_01</i>	<i>DefbLm01</i> KC117171
	<i>L.muta_defensinB_02</i>	<i>DefbLm02</i> KC117172

The names of sequences and respective GenBank accession numbers are presented as well as the sequences are organized in the *Bothrops* groups as described in Carrasco et al. (2012).

**Table 2**

Sizes and organization of  $\beta$ -defensin-like gene of some Brazilian pitvipers.

Gene	Total length	Exon 1	Intron 1	Exon 2	Intron 2	Exon 3
<i>DefbBa01</i>	2166	58	1784	122* + 202&	–	–
<i>DefbBal01</i>	1658	58	1308	83* + 209&	–	–
<i>DefbBd03</i>	2134	58	1758	112	153	16* + 37&
<i>DefbBe01</i>	852	58	470	118	153	16* + 37&
<i>DefbBi02</i>	1630	58	1281	68* + 207&	–	–
<i>DefbBj01</i>	861	58	479	118	153	16* + 37&
<i>DefbBj02</i>	2145	58	1762	118	154	16* + 37&
<i>DefbBju01</i>	1996	58	1619	118	149	16* + 37&
<i>DefbBl01</i>	2397	58	2018	118	153	13* + 37&
<i>DefbBm02</i>	2001	58	1619	118	153	16* + 37&
<i>DefbBm03</i>	2001	58	1619	118	153	16* + 37&
<i>DefbBn02</i>	2083	58	1701	118	153	16* + 37&
<i>DefbBp01</i>	1271	58	898	112	150	16* + 37&
<i>DefbLm01</i>	1271	58	898	115	153	10* + 37&
<i>DefbLm02</i>	1909	58	1511	118	153	10* + 59&

Total lengths (bp) correspond to sequences between PCR primers H010 and 3'UTRas. The boundaries of exons-introns were estimated according to *Crt-p1* (*Cdurissus\_crotamine*, GenBank: AF223646)) and Cts-p2 (*Cdurissus\_crotasin*, GenBank: AF250212) sequences after the alignment. \* Indicates the size of codifying sequence and & the 3'UTR in the last exon.

PTZ57 R/T vector according to the manufacturer's instructions (Fermentas). Ten microliters of ligation mixture were used to transform the *E. coli* DH5 $\alpha$  (Ausubel et al., 2000). Six clones were cultured, and the plasmids were then purified using Zippy Plasmid Miniprep (ZymoResearch).

### 2.5. Sequencing

Clones were sequenced using the Big Dye Terminator V3.1 Cycle Sequence kit and fractionated on an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). The sequencing was performed at the Biotechnology Center in the Butantan Institute, using the primers M13 (5'-GTAAACGACGGCC AGT-3') and T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG -3') to sequence the insert's boundaries, and intron-def-FWD (5'-GATTATTCTTCCCTCTACG-3') and intron-def-REV (5'-GACTTCCGATTCCCTGTTGC-3') to sequence intron 1.

### 2.6. Sequence analysis

The sequences were analyzed for selective pressure using the Hyphy package in the Datammonkey server at [www.datammonkey.org](http://www.datammonkey.org) (Pond et al., 2005). Datammonkey implements likelihood-based approaches for detecting

sites under selection (Pond and Frost, 2005). Our data were analyzed using the following options: codon, universal code, SLAC (single likelihood ancestor counting) and REV model (time reversible model nucleotide substitution model to estimate the branch lengths and nucleotide substitution biases).

Sequences were aligned in MAFFT v7.017b (Katoh and Toh, 2010), strategy E-INS-i to less than 200 sequences, with multiple conserved domains and long gaps. Gene phylogenies were constructed by maximum parsimony using TNT1.1 (Goloboff et al., 2008), by maximum likelihood using TreeFinder 1.4 (Jobb et al., 2004), and by Bayesian analysis using MrBayes 3.2 (Ronquist et al., 2011). We used five partitions for the probabilistic analyses (three exons and two introns), assuming the best substitution model according to AICc using TreeFinder. The reconciliation of gene tree with species tree was done in Mesquite v2.75 (Maddison and Maddison, 2011).

## 3. Results and discussion

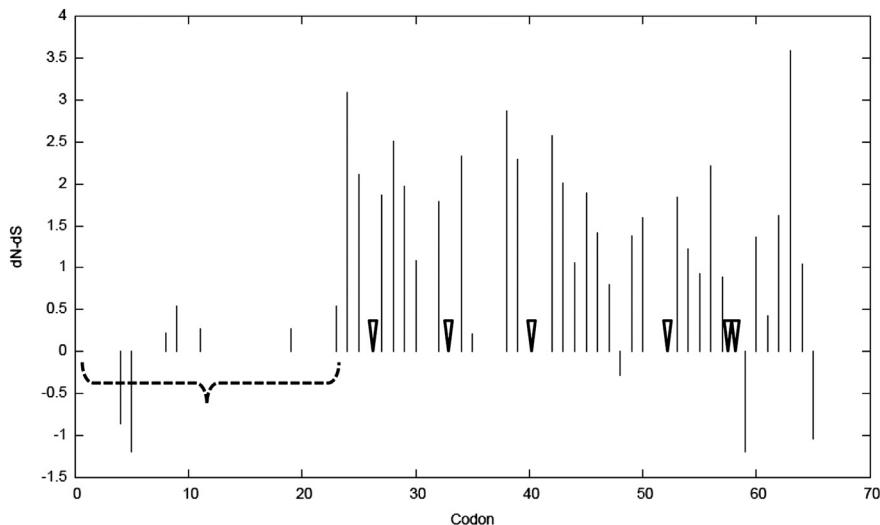
We detected 13  $\beta$ -defensin-like sequences from 12 species of Brazilian Crotalinae snakes, which are listed along with GenBank accession number in Table 1, and aligned

**Table 3**

Similarity of  $\beta$ -defensin-like sequences of Brazilian pitvipers with crotamine (*Crt-p1*) and crotasin (*Cts-p2*) genes.

Genes	Exon 1		Intron 2		Exon 2		Intron 2		Exon 3	
	<i>Crt-p1</i>	<i>Cts-p2</i>								
<i>DefbBa01</i>	96.6	93.1	92.8	93.6	63.6	66.9	96.6	97.4	75.0	68.8
<i>DefbBd03</i>	96.6	93.1	92.8	94.2	62.5	66.9	95.9	96.7	68.8	62.5
<i>DefbBe01</i>	96.6	93.1	92.6	90.4	63.6	67.8	97.2	98.0	68.8	62.5
<i>DefbBj01</i>	96.6	93.1	93.9	92.0	63.6	67.8	97.2	98.0	68.8	62.5
<i>DefbBj02</i>	96.6	93.1	89.1	91.1	67.8	72.0	95.9	96.7	75.0	75.0
<i>DefbBju01</i>	96.6	93.1	92.1	92.7	70.3	69.5	97.2	97.9	81.3	81.3
<i>DefbBl01</i>	94.8	98.3	91.9	91.2	68.1	71.6	95.9	96.7	75.0	75.0
<i>DefbBm02</i>	96.6	93.1	91.9	92.3	64.4	66.9	96.6	97.4	81.3	81.3
<i>DefbBm03</i>	96.6	93.1	91.9	92.2	63.6	67.8	96.6	97.4	75.0	75.0
<i>DefbBn02</i>	96.6	93.1	89.5	91.1	67.8	71.2	95.9	96.7	75.0	75.0
<i>DefbBp01</i>	94.8	91.4	92.7	93.6	62.5	71.4	96.5	97.3	68.8	62.5
<i>DefbLm01</i>	96.6	93.1	92.6	94.5	63.5	69.6	95.9	96.7	90.0	70.0
<i>DefbLm02</i>	96.6	93.1	92.7	93.4	69.5	57.6	96.6	97.4	80.0	60.0

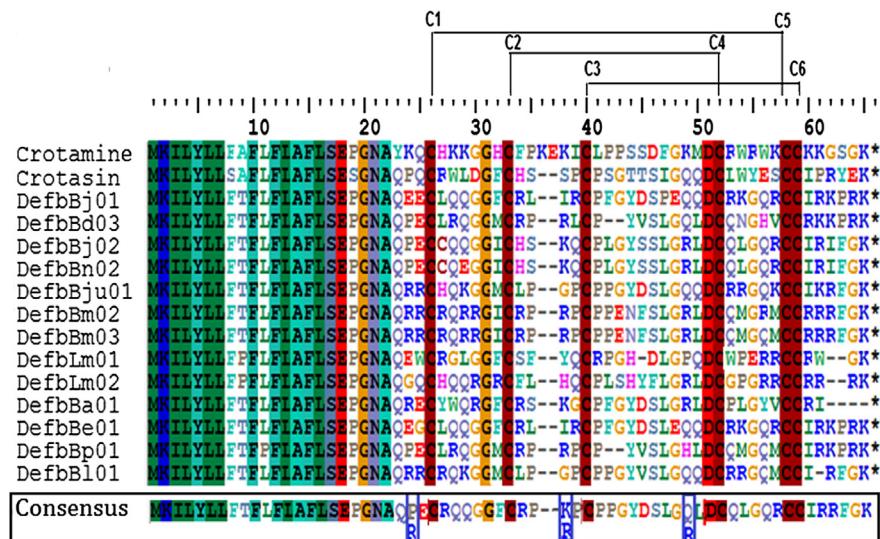
The values presented here are percentage of nucleotide identity. Contiguous deletions or insertions were counted as one event.



**Fig. 1.** Analysis of selective pressure of  $\beta$ -defensin-like sequences in Brazilian pitvipers. The  $\omega$  values (dN-dS) are shown on Y-axis, and the codons of exon 1, 2 and 3 sequences on X-axis. The dashed brace indicates the peptide signal region. Triangles indicate the positions of cysteines.

sequences are shown in *Supplementary Material 1*. Despite the similarity of the nucleotide sequences, mutations in *B.alternatus\_sequence\_01* and *B.insularis\_sequence\_02* caused the loss of Cys which resulted in the loss of  $\beta$ -defensin structure and a change or loss of function. Although the sequence *B.atrox\_defensinB\_01* showed a premature stop codon, this occurred after the sixth Cys, which did not compromise the  $\beta$ -defensin scaffold. *B.atrox\_defensinB\_01* may maintain its antimicrobial function with a short C-terminal. The gene sizes varied from 852 to 2397 bp, and they were organized in three exons and two introns (Table 2), except the *DefbBa01* sequence which had only two exons. Interestingly, Oguiura et al. (2009) also described two

sequences of crotamine genes without intron 2 in two rattlesnakes, indicating the possible occurrence of a minor gene structure with two exons and one intron. Intron 1 was long and in phase 1, dividing the codon between the first and second nucleotides, and intron 2 was short and in phase 2, dividing the codon between the second and third nucleotides as well as crotamine and crotasin genes (Rádis-Baptista et al., 2003, 2004). The variation in gene size was mainly due to the size variation of intron I, a region where insertions or deletions as well duplication were detected. The similarity of new sequences was analyzed in relation to the previous published rattlesnake  $\beta$ -defensin-like sequences, crotamine (*Crt-p1*) and crotasin (*Cts-p2*) (in Table 3, we did not compare



**Fig. 2.** Alignment of  $\beta$ -defensin-like amino acid sequences in Brazilian pitvipers. The deduced amino acid sequences were aligned using Muscle in the BioEdit v7.1.3 program. Green indicates hydrophobic amino acids, red the negatively charged amino acids, blue the positively charged amino acids and brown the other amino acids including cysteines, glycines and prolines. Above the figure, black lines indicate the pattern of cysteine bridges. Below the figure is the consensus sequence where the most frequent residues is annotated. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

**Table 4**

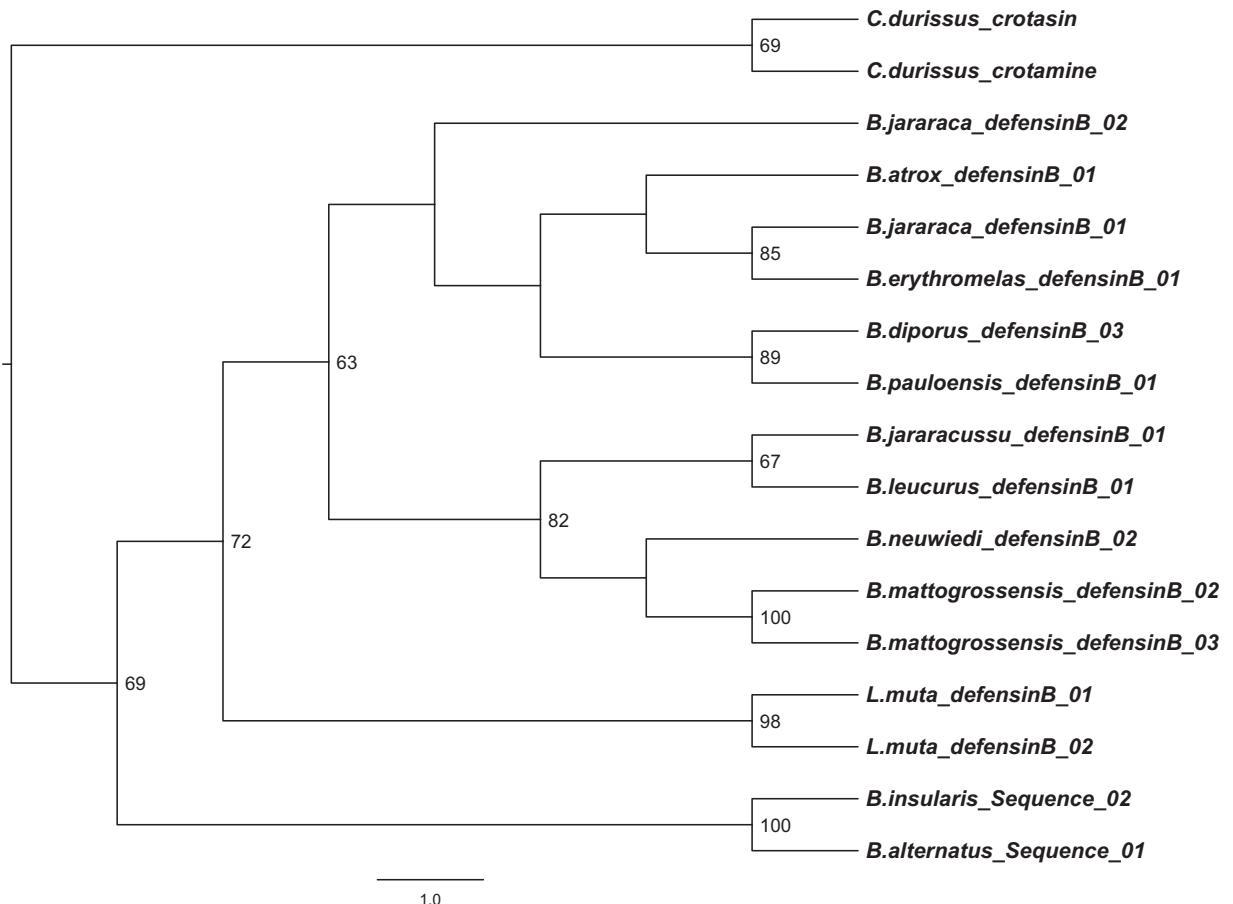
Theoretical characteristics of deduced amino acid sequences of  $\beta$ -defensin-like of Brazilian pitvipers.

$\beta$ -Defensin-like molecules	Snakes	pI	Net charge	Hidrofobicity (kcal mol <sup>-1</sup> )	MW (kDa)
DefbBa01	<i>B. atrox</i>	8.3	+3	+26.1	4.3
DefbBd03	<i>B. diporus</i>	9.1	+6	+37.1	4.5
DefbBe01	<i>B. erythromelas</i>	8.8	+5	+42.6	4.8
DefbBj01	<i>B. jararaca</i>	8.5	+4	+45.1	4.9
DefbBj02	<i>B. jararaca</i>	10.4	+9	+36.5	4.5
DefbBju01	<i>B. jararacussu</i>	9.5	+7	+43.9	4.6
DefbBl01	<i>B. leucurus</i>	9.6	+7	+33	4.5
DefbBm02	<i>B. mattogrossensis</i>	12.0	+11	+40	5
DefbBm03	<i>B. mattogrossensis</i>	11.9	+10	+39	5
DefbBn02	<i>B. neuwiedi</i>	7.9	+2	+33.7	4.5
DefbBp01	<i>B. pauloensis</i>	8.8	+5	+32.8	4.5
DefbLm01	<i>L. muta</i>	8	+2	+33.7	4.5
DefbLm02	<i>L. muta</i>	10.4	+8	+36.9	4.7
Crotasin	<i>C. d. terrificus</i>	5.3	-1	+28.9	4.7
Crotamine	<i>C. d. terrificus</i>	9.6	+7	+45.1	4.8

Isoelectric point (pI), net charge at neutral pH, hydrophobicity (Wimley–White scale) and molecular weight (MW) were calculated on PepDraw software at <http://www.tulane.edu/~biochem/WW/PepDraw/index.html>.

the non- $\beta$ -defensin-like sequences). Exon 1 and introns 1 and 2 displayed more than 90% identity, and curiously, intron 1 had high similarity despite the wide variation in its size. Also high similarity in exon 1 was expected because it

codes for the signal peptide, which needs to be preserved to correctly address the protein in the cell. Fig. 1 shows the selective pressure analysis of exonic sequences of snake  $\beta$ -defensin-like genes: the proportion of dN-dS in signal



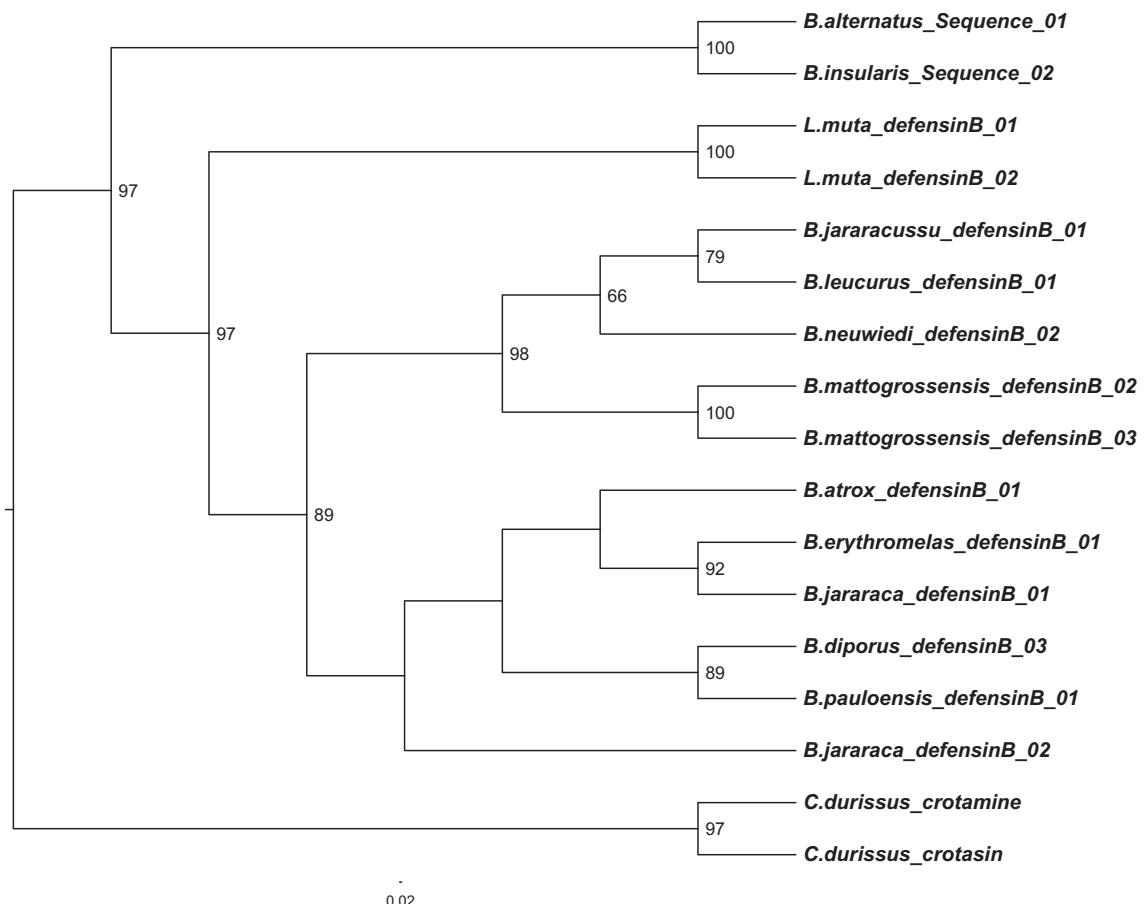
**Fig. 3.** Maximum parsimony cladogram of  $\beta$ -defensin-like sequences of Brazilian pitvipers. Cladogram of the most parsimonious trees using TNT1.1. Of 2955 nt, 1869 were conserved, 515 variable and 264 parsimony informative. Only bootstrap values greater than 50 are shown. The cladogram was rooted in *Crotalus* sequences. Scale bar below the tree measures evolutionary distances in substitutions per site.

peptide indicated a conserved sequence ( $\omega < 1$ , 0 or negative in general). On the other hand,  $\omega$  value for exons 2 and 3 were higher (more than 1 in general) indicating positive selection, except in the Cys codons, which were conserved ( $\omega = 0$ ). Introns were not analyzed, because we considered that these non-coding sequences were only subject to neutral evolution. Exons 2 and 3, which encode the mature protein, underwent an accelerate evolution as other snake toxins and defensins. Accelerated amino acid substitutions have been reported to occur not only in toxins but also in such proteins as antigen recognition sites of the MHC molecules and other antimicrobial peptides.

The analysis of deduced amino acid sequences by Signal P 4.0 (Petersen et al., 2011) indicated the  $\beta$ -defensin-like precursors consisted of signal peptide (SP) and mature peptide (MP), and lacked the anionic propiece between the SP and MP, which is common in mammalian  $\alpha$ -defensins and can be shorter or absent in  $\beta$ -defensins (Ganz, 2003). The signal peptides were hydrophobic and Leu-rich (five Leu and two Ile in 22 aa) as in other immature  $\beta$ -defensins (Luenser et al., 2005; Patil et al., 2005). Despite the accelerated evolution, the deduced amino acid sequences (Fig. 2)

exhibited the consensus pattern of mature  $\beta$ -defensins. The consensus sequence of mature peptide is X<sub>3</sub>-C-X<sub>6</sub>-C-X<sub>4-6</sub>-C-X<sub>9-11</sub>-C-X<sub>5</sub>-CC-X<sub>4-6</sub> with a high proportion of basic amino acids in carboxy-terminal region. Between the second and third Cys, crotamine has six amino acid residues instead of four in crotasin and other snake  $\beta$ -defensin-like sequences. Also, the first amino acid of the N-terminus of mature peptide of crotamine is Tyr instead of Gln in crotasin, and the newly described  $\beta$ -defensin-like molecules. Like crotamine and crotasin, the  $\beta$ -defensin-like sequences of *Bothrops* and *Lachesis* snakes have Gly at position 9 and Asp at position 29 of mature peptide. Also, all sequences have a terminal Lys, but we do not know if they are removed after post-translational processing as occurs in crotamine. All sequences described exhibited the characteristics of the  $\beta$ -defensin family, namely the six conserved Cys motif, small size (about 5 kDa), positive net charge, and high hydrophobicity (Table 4).

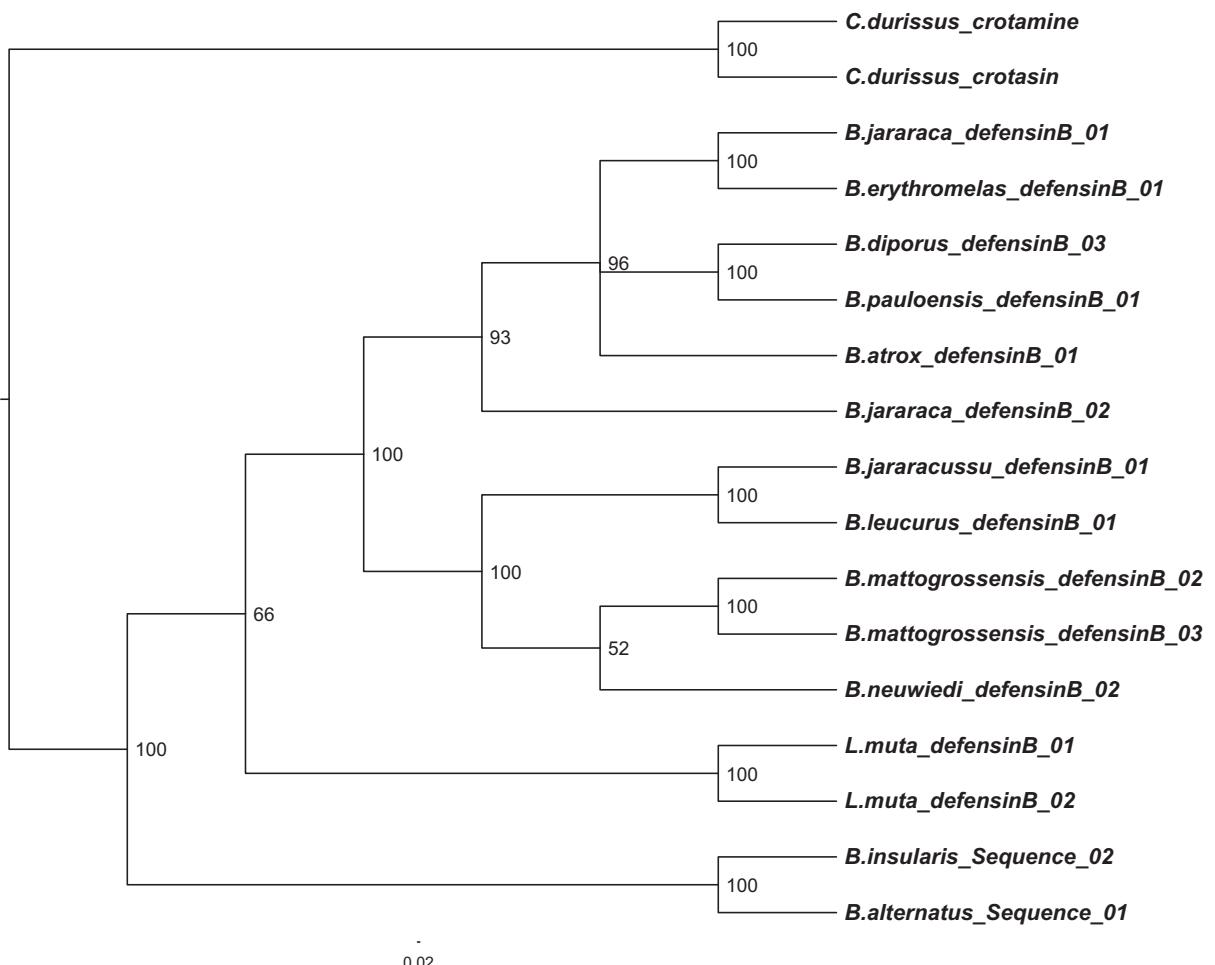
We analyzed three data sets by maximum parsimony: intronic sequences only, exonic sequences only, and the whole genes. In the case of snake  $\beta$ -defensin-like sequences, the best phylogenetic signal was obtained using the



**Fig. 4.** Maximum likelihood cladogram of  $\beta$ -defensin-like sequences of Brazilian pitvipers. Sequences were analyzed using TreeFinder based on the HKY model to partitions exons 1, 2, 3 and intron 2, and TVM model for intron 1. *Crotalus* sequences were used as outgroup. The bootstrap values are shown at each node. Scale bar below the tree measures evolutionary distances in substitutions per site.

concatenated exonic and intronic sequences. In contrast, Luenser et al. (2005) analyzed caprine and ovine  $\beta$ -defensin-like sequences and found a phylogenetic signal only when intronic sequences were used to construct the phylogenetic tree. Phylogenetic analyses were done using parsimony and probabilistic approaches obtaining three topologies (Figs. 3–5). The best substitution model obtained using TreeFinder resulted in two models, TVM for intron 1 and HKY for the other partitions (intron 2, exons 1, 2 and 3) and they were used for both maximum likelihood and Bayesian analyses. All topologies showed three branches including non- $\beta$ -defensins and  $\beta$ -defensin-like sequences of *Crotalus* and *Lachesis* and two lineages of *Bothrops*. The lineages were jararaca (*B.jararaca\_defensinB\_01* and *\_02*, *B.atrox\_defensinB\_01*, *B.erythromelas\_defensinB\_01*, *B.pauloensis\_defensinB\_01*, *B.diporus\_defensinB\_03*) and jarara cussu (*B.jararacussu\_defensinB\_01*, *B.leucurus\_defensinB\_01*, *B.neuwiedi\_defensinB\_02*, *B.mattogrossensis\_defensinB\_02* and *03*), and the  $\beta$ -defensin-like genes of 'neuwiedi' (*B.erythromelas*, *B.pauloensis*, *B.diporus*, *B.neuwiedi* and *B.mattogrossensis*) and 'atrox' (*B.atrox* and *B.leucurus*) groups.

were recovered in both branches. Maximum parsimony and Bayesian analyses recovered *B.neuwiedi\_defensinB\_02* together with *B.matogrossensis\_defensinB\_01* and *02*, both of the '*neuwiedi*' group, though without support. The lineage *jararaca* which showed polytomy in Bayesian analysis, had low support in other analyses. The two paralogous  $\beta$ -defensin-like genes *jararaca\_01* and *jararaca\_02* may have duplicated before the speciation of the '*neuwiedi*', '*jaracussu*' and '*jararaca*' groups. The sequences *B.mattogrossensis\_defensinB\_02* and *\_03* seem to be polymorphic sequences and not duplicated genes. In all trees, the low support of branches was probably due to lack of sequence sampling from other snake species groups as well in the same species and due to gene duplications. Thus, an increase in the number of sequences of the same species, and also a larger sampling in  $\beta$ -defensin-like sequences from other snake species, may improve the tree topology and branch support in future studies. The great number of gaps and only one sequence in that gap did not seem to affect the parsimony or Bayesian analyses but it seemed to be spurious in likelihood analysis.

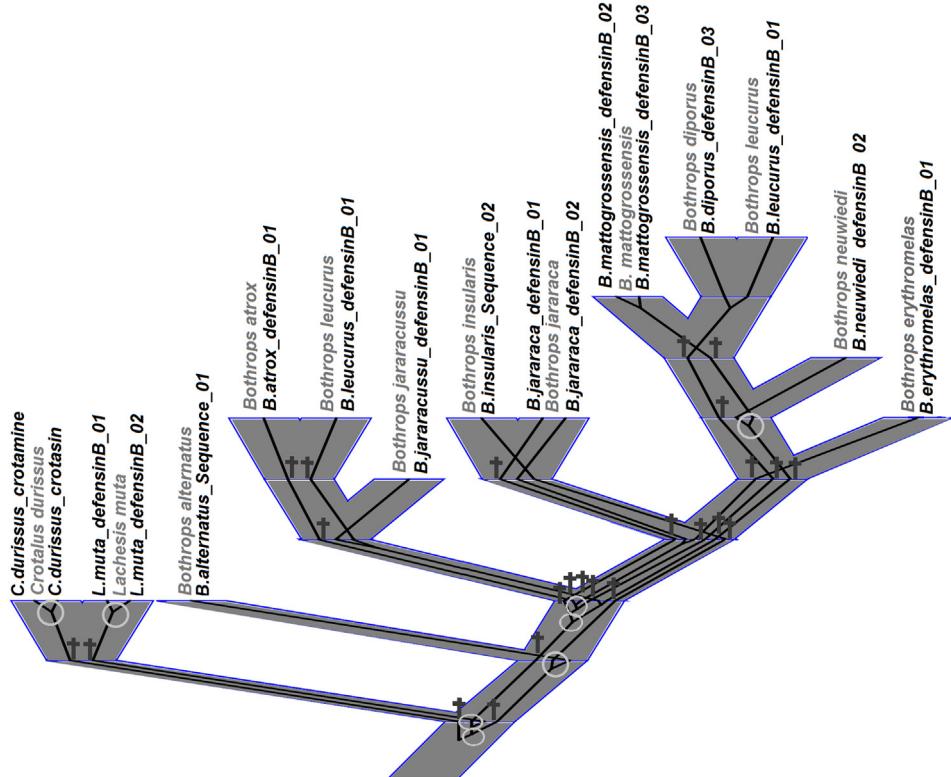


**Fig. 5.** Bayesian cladogram of  $\beta$ -defensin-like sequences of Brazilian pitvipers. Bayesian Markov Chain Monte Carlo consensus cladogram derived from an analysis based on the HKY model to partitions exons 1, 2, 3 and introns 2, and TVM model for intron 1. The posterior probabilities are shown at each node. Scale bar below the tree measures evolutionary distances in substitutions per site.

To construct the evolutionary history of the  $\beta$ -defensin genes in the snakes studied, all topologies were used to reconcile the gene tree with species tree. The reconciliation with the maximum parsimony gene tree resulted in eight duplications and 24 extinctions (Fig. 6), while the Bayesian gene tree showed eight duplications and 23 extinctions and maximum likelihood gene tree nine duplications and 29 extinctions. These events of duplication and differentiation of the genes occurred over a period of about 22 million years, the timeframe for the evolution of viperid snakes in the New World (Wüster et al., 2008). The high number of extinctions may be due to the lack of other  $\beta$ -defensin-like genes from the same species as well as from other *Bothrops* snakes. The evolution of these genes occurred according to the birth-and-death model, as for  $\beta$ -defensin genes and other multigene families in vertebrates (Nei and Rooney, 2005) and as suggested for the crotamine and crotasin genes (Oguiura et al., 2009).

We amplified  $\beta$ -defensin-like sequences of several snakes and we noticed that their genes have the same organization as the crotamine and crotasin genes as well other  $\beta$ -defensin-like genes of lizards and fishes. The evolution of genes is dynamic, where not only do substitutions occur but also intron gains and losses (Babenko et al., 2004). Coulombe-Huntington and Majewski (2007) observed a trend toward intron losses in mammals; furthermore, they observed that intron losses occurred

more frequently in those smaller than 150 bp. We proposed that the structure of three exons and two introns is a squamate characteristic, because it is found in snakes and lizards, whereas the feature of two exons is characteristic for mammals (Patil et al., 2005) and four exons for birds (Xiao et al., 2004). All  $\beta$ -defensin-like sequences that have been described show a common main gene organization in a particular group of animals, but also one or more sequences with a different structure: our *DefBa01* has only two exons, some in lizards have four exons (Dalla Valle et al., 2012), and mammals also have genes with more than two exons (Patil et al., 2005). In summary, all animals possess two or more gene structures, but with the predominance of one. As the  $\beta$ -defensin-like genes of zebrafish are organized in three exons and two introns (the first in phase 1 and the second in phase 2; Zou et al., 2007), and the ray finned fishes are the basis of the species tree (Shen et al., 2011), we speculate that the ancestral gene had this gene structure. After the speciation of mammals, the copies with two exons duplicated, and sometime after the speciation of the squamates and birds/turtles/crocodilians group, intron insertions occurred in the  $\beta$ -defensin-like genes, and this different arrangement duplicated more than that with three exons. Only studies of  $\beta$ -defensin-like genes in other animals including turtles and crocodilians and also amphibians and other fishes can further elucidate gene evolution in vertebrates.



**Fig. 6.** Gene and species reconciliation tree of  $\beta$ -defensin-like sequences and snake species trees using maximum parsimony topology. Mesquite v.2.7.5 software was used to reconcile the gene (shown in Fig. 3) and the species trees. The species tree, in gray, is based on the topologies described in Castoe and Parkinson (2006), Fenwick et al. (2009) and Wüster et al. (2002). The black line represents the gene tree, the light gray circles the gene duplications, and the black crosses the gene extinctions.

## Ethical statement

I declare that this work was conducted in accordance with the rules governing the scientific procedures, ethical conduct and protection to flora and fauna of Brazil.

## Conflict of interest statement

I declare that there is no conflict of interest related to this publication.

## Acknowledgments

We thank the following: Taís Machado, José S.L. Patané, and Hebert Ferrarezzi of the Ecology and Evolution Laboratory (Butantan Institute) for their assistance and support with the phylogenetic analysis; Valdir J. Germano, Daniela P.T. Gennari, and Kathleen F. Grego of the Herpetology Laboratory (Butantan Institute); Taís Machado and Rogério L. Zacariotti of the Ecology and Evolution Laboratory (Butantan Institute) for their assistance in obtaining the snake tissues or blood; and also Paulo L. Ho and Leonardo S. Kobashi of the Biotechnology Laboratory (Butantan Institute) for sequencing of the DNA samples. This work was supported by FAPESP 2010/08580-8 and INCTTOX.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.02.013>.

## References

- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J., Struhl, K. (Eds.), 2000. Current Protocols in Molecular Biology [CD-ROM]. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Babenko, V.N., Rogozin, I.B., Mekhedov, S.L., Koonin, E.V., 2004. Prevalence of intron gain over intron loss in the evolution of paralogous gene families. *Nucleic Acids Res.* 32, 3724–3733.
- Carrasco, P.A., Mattoni, C.I., Leynaud, G.C., Scrocchi, G.J., 2012. Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes: Viperidae). *Zool. Scr.* 41, 109–124.
- Castoe, T.A., Parkinson, C.L., 2006. Bayesian mixed models and the phylogeny of pitvipers (Viperidae: Serpentes). *Mol. Phylogenet. Evol.* 39, 91–110.
- Coulombe-Huntington, J., Majewski, J., 2007. Characterization of intron loss events in mammals. *Genome Res.* 17, 23–32.
- Dalla Valle, L., Benato, F., Maistro, S., Quinzani, S., Alibardi, L., 2012. Bioinformatic and molecular characterization of beta-defensins-like peptides isolated from the green lizard *Anolis carolinensis*. *Dev. Comp. Immunol.* 36, 222–229.
- Das, S., Nikolaidis, N., Goto, H., McCallister, C., Li, J., Hirano, M., Cooper, M.D., 2010. Comparative genomics and evolution of the alpha-defensin multigene family in primates. *Mol. Biol. Evol.* 27, 2333–2343.
- Del Pero, M., Boniotti, M., Zuccon, D., Cervella, P., Spando, A., Amoroso, A., Crovella, S., 2002. β-Defensin 1 gene variability among non-human primates. *Immunogenetics* 53, 907–913.
- Fadel, V., Bettendorff, P., Herrmann, T., de Azevedo Jr., W.F., Oliveira, E.B., Yamane, T., Wüthrich, K., 2005. Automated NMR structure determination and disulfide bond identification of the myotoxin crotamine from *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon* 46, 759–767.
- Fenwick, A.M., Gutberlet Jr., R.L., Evans, J.A., Parkinson, C.L., 2009. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). *Zool. J. Linn. Soc.* 156, 617–640.
- Fetzner, J.R., 1999. Extracting high-quality DNA from shed reptile skins: a simplified method. *BioTechniques* 26, 1052–1054.
- Fry, B.G., Vidal, N., Norman, J.A., Vonk, F.J., Scheib, H., Ramjan, S.F.R., Kuruppu, S., Fung, K., Hedges, S.B., Richardson, M.K., Hodgson, W.C., Ignjatovic, V., Summerhayes, R., Kochva, E., 2005. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. *Nature* 439, 584–588.
- Ganz, T., 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat. Rev./Immunol.* 3, 710–720.
- Goloboff, P., Farris, J., Nixon, K., 2008. TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics* 24, 774–786.
- Jobb, G., von Haeseler, A., Strimmer, K., 2004. TREEFINDER: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. *BMC Evol. Biol.* 4, 18. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2148-4-18>.
- Katoh, K., Toh, H., 2010. Parallelization of the MAFFT multiple sequence alignment program. *Bioinformatics* 26, 1899–1900.
- Lai, Y., Gallo, R.L., 2009. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol.* 30, 131–141.
- Liu, G.E., Ventura, M., Cellamare, A., Chen, L., Cheng, Z., Zhu, B., Li, C., Song, J., Eichler, E.E., 2009. Analysis of recent segmental duplications in the bovine genome. *BMC Genomics* 10, 571. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-10-571>.
- Luenser, K., Ludwig, A., 2005. Variability and evolution of bovine β-defensin genes. *Genes Immun.* 6, 115–122.
- Luenser, K., Fickel, J., Ludwig, A., 2005. Evolution of caprine and ovine β-defensin genes. *Immunogenetics* 57, 487–498.
- Maddison, W.P., Maddison, D.R., 2011. Mesquite: A Modular System for Evolutionary Analysis. Version 2.75. <http://mesquiteproject.org>.
- Morrison, G.M., Semple, C.A.M., Kilanowski, F.M., Hill, R.E., Dorin, J.R., 2003. Signal sequence conservation and mature peptide divergence within subgroups of the murine β-defensin gene family. *Mol. Biol. Evol.* 20, 460–470.
- Nei, M., Rooney, A.P., 2005. Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annu. Rev. Genet.* 39, 121–152.
- Oguiura, N., Collares, M.A., Furtado, M.F.D., Ferrarezzi, H., Suzuki, H., 2009. Intraspecific variation of the crotamine and crotasin genes in *Crotalus durissus* rattlesnakes. *Gene* 446, 35–40.
- Oguiura, N., Boni-Mitake, M., Affonso, R., Zhang, G., 2011. In vitro anti-bacterial and hemolytic activities of crotamine, a small basic myotoxin from rattlesnake *Crotalus durissus*. *J. Antibiot.* 64, 327–331.
- Patil, A.A., Cai, Y., Sang, Y., Blecha, F., Zhang, G., 2005. Cross-species analysis of the mammalian β-defensin gene family: presence of syntenic gene clusters and preferential expression in the male reproductive tract. *Physiol. Genomics* 23, 5–17.
- Petersen, T.N., Brunak, S., Von Heijne, G., Nielsen, H., 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods* 8, 785–786.
- Pond, S.L.K., Frost, S.D.W., 2005. Datamonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. *Bioinformatics* 21, 2531–2533.
- Pond, S.L.K., Frost, S.D.W., Muse, S.V., 2005. HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. *Bioinformatics* 21, 676–679.
- Rádis-Baptista, G., Kubo, T., Oguiura, N., Svartman, M., Almeida, T.M.B., Batistic, R.F., Oliveira, E.B., Vianna-Morgante, A.M., Yamane, T., 2003. Structure and chromosomal localization of the gene for crotamine, a toxin from the South American rattlesnake, *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon* 42, 747–752.
- Rádis-Baptista, G., Kubo, T., Oguiura, N., da Silva, A.R.B.P., Hayashi, M.A.F., Oliveira, E.B., Yamane, T., 2004. Identification of crotasin, a crotamine-related gene of *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon* 43, 751–759.
- Ronquist et al., 2011. Online manual at [mrbayes.sourceforge.net/manual.php](http://mrbayes.sourceforge.net/manual.php).
- Semple, C.A., Gautier, P., Taylor, K., Dori, J.R., 2006. The changing of the guard: molecular diversity and rapid evolution of β-defensins. *Mol. Divers.* 10, 557–584.
- Shen, X.-X., Liang, D., Wen, J.-Z., Zhang, P., 2011. Multiple genome alignments facilitate development of NPCL markers: a case study of tetrapod phylogeny focusing on the position of turtles. *Mol. Biol. Evol.* 28, 3237–3252.
- Torres, A.M., Kuchel, P.W., 2004. The β-defensin-fold family of poly-peptides. *Toxicon* 46, 581–588.
- Torres, A.M., Wang, X., Fletcher, J.I., Alewood, D., Alewood, P.F., Smith, R., Simpson, R.J., Nicholson, G.M., Sutherland, S.K., Gallagher, C.H., King, G.F., Kuchel, P.W., 1999. Solution structure of a defensin-like peptide from platypus venom. *Bioch. J.* 341, 785–794.
- Whittington, C.M., Papenfuss, A.T., Bansal, P., Torres, A.M., Wong, E.S.W., Deakin, J.E., Graves, T., Alsop, A., Schatzkamer, K., Kremitzki, C., Ponting, C.P., Temple-Smith, P., Warren, W.C., Kuchel, P.W., Belov, K., 2008. Defensins and the convergent evolution of platypus and reptile venom genes. *Genome Res.* 6, 986–994.
- Wüster, W., Salomão, M.G., Quijada-Mascreñas, J.A., Thorpe, R.S., et al., 2002. Origins and evolution of the South American pit viper fauna: evidence from mitochondrial DNA sequence analysis. In: Schuett, G.W., Höggren, M., Douglas, M.E., Greene, H.W. (Eds.), *Biology of the Vipers*. Eagle Mountain Publishing, Utah, pp. 111–128.

- Wüster, W., Peppin, L., Pook, C.E., Walker, D.E., 2008. A nesting of vipers: phylogeny and historical biogeography of the Viperidae (Squamata: Serpentes). *Mol. Phylogenet. Evol.* 49, 445–459.
- Xiao, Y., Hughes, A.L., Ando, J., Matsuda, Y., Cheng, J.-F., Skinner-Noble, D., Zhang, G., 2004. A genome-wide screen identifies a single  $\beta$ -defensin gene cluster in the chicken: implications for the origin and evolution of mammalian. *BMC Genomics* 5, 56. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-5-56>.
- Yamane, E.S., Bizerra, F.C., Oliveira, E.B., Rajabi, M., Nunes, G.L.C., De Souza, A.O., da Silva, I.D.C.G., Yamane, T., Karpel, R.L., Silva Jr., P.I., Hayashi, M.A.F., 2012. Unraveling the antifungal activity of a South American rattlesnake toxin crotamine. *Biochimie*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2012.09.019>.
- Yount, N.Y., Kupferwasser, D., Spisni, A., Dutz, S.M., Ramjan, Z.H., Sharma, S., Waring, A.J., Yeaman, M.R., 2009. Selective reciprocity in antimicrobial activity versus cytotoxicity of hBD-2 and crotamine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 14972–14977.
- Zou, J., Mercier, C., Koussounadis, A., Secombes, C., 2007. Discovery of multiple beta-defensin like homologues in teleost fish. *Mol. Immunol.* 44, 638–647.