The background of the cover is a photograph of a Bothrops atrox snake. The snake is coiled, with its head raised and facing towards the right. It has a pattern of dark brown and black bands over a lighter, yellowish-brown base color. The texture of its scales is visible. The background is slightly blurred, showing some greenery and a fence in the distance.

Márcia Neiva

Transcriptoma da glândula de veneno de
Bothrops atrox

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

São Paulo
2011

MÁRCIA NEIVA

TRANSCRIPTOMA DA GLÂNDULA DE VENENO
DE *Bothrops atrox*

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

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Spartaco Astolfi-Filho

Versão Original

São Paulo
2011

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

© reprodução total

Neiva, Márcia.

Transcriptoma da glandula de veneno de *Bothrops atrox* / Márcia Neiva. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Spartaco Astolfi Filho.

Tese (Doutorado) – 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: Biotecnologia.

Versão do título para o inglês: Transcriptome of *Bothrops atrox* venom gland

Descritores: 1. Venenos de origem animal 2. Serpentes 3. Toxinas em animal 4. Biologia Molecular-Métodos técnicas 5. Transcriptoma 6. Ofidismo I. Astolfi Filho, Spartaco II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB035/2011

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

Candidato(a): Márcia Neiva.

Título da Tese: Transcriptoma da glandula de veneno de Bothrops atrox .

Orientador(a): Spartaco Astolfi Filho.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a 14 / ABRIL / 2011, considerou

☒ **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Dedicatória

Aos meus pais, Orlando e Antonieta, pelo amor e incentivo, em toda minha vida acadêmica e por sempre me apoiarem em todos os meus projetos, mesmo os mais malucos, buscando sempre a minha felicidade e bem estar, todo meu amor e agradecimento.

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, agradeço a Deus por minha vida e por todas as pessoas e oportunidades que colocou nela.

À minha irmã Angela, sempre disposta a ajudar, "quebrar meus galhos", apesar de todas as diferenças que temos e aos meus sobrinhos, Thomás e Marina, pelas horas de alegria e descontração, agradeço com todo amor e carinho.

À minha família que não é de sangue, mas que me adotou e eu adotei de coração, Ana Maria, Renata, Angela e toda "turma de Jaguariúna" obrigada pelo incentivo e por me acolherem com carinho.

Ao meu orientador Prof^o Spartaco, meu pai científico que nesses dez anos de convivência me ensinou a ter amor e empolgação pela pesquisa e não desanimar diante de resultados negativos, me incentivando e proporcionando oportunidades. E muito além do laboratório, sempre um amigo, meio "paizão" me ajudando e às vezes dando "puxões de orelha", mas sempre mostrando como ser uma profissional, ética, honesta, responsável, sempre em busca de ser melhor na profissão, sem perder a simplicidade e humildade.

Durante os quatro anos dessa "aventura" chamada doutorado, conheci tantas pessoas que de alguma forma me ajudaram, e ao se juntarem com outras que já conhecia, fica difícil agradecer a todas nominalmente aqui, mas algumas eu não posso deixar de citar.

Ao Álvaro Prieto, que me acolheu no IPEN no início do doutorado, e que abraçou meu projeto com empolgação, sem a menor obrigação de fazê-lo, e acabou se tornando meu co orientador na prática e ganhou minha admiração irrestrita. Não tenho palavras pra agradecer pela ajuda, os ensinamentos, a atenção em passar horas sentado comigo explicando, discutindo, fazendo esquemas, mostrando ferramentas no computador, me dando sugestões, corrigindo meus erros, hoje sei um pouco de toxilogia graças a sua ajuda. Agradeço também pela amizade, a companhia nos almoços e por todo o incentivo ao meu trabalho.

Ao Prof. Testuo Yamane, uma das pessoas mais agradáveis, honestas e íntegras que tive a honra de conhecer, que me recebeu com entusiasmo no CBA na época em que fui sua bolsista, e que posteriormente me apresentou ao Álvaro e me deu suporte de laboratório no IPEN e Butantan. Obrigada pela amizade, pelas conversas filosóficas sempre fascinantes e pelos ensinamentos de vida.

Ao Gandhi Rádís Baptista pela ajuda na bancada em todo o processo de construção da biblioteca, pelas idéias, conversas e por sempre estar disposto a ajudar na medida em que a distância permitiu.

Ao Profº Luiz Lozano, do Instituto de Medicina Tropical do Amazonas, por ceder a serpente para a realização desse trabalho.

Aos colegas de laboratório, Camila e Larissa que me deram uma grande ajuda no IPEN.

Aos colegas de laboratório da UFAM, em especial ao Jonso e Rogério, pela ajuda nos extrações e sequenciamento, e ao Edson pela ajuda na parte de expressão em levedura.

Aos que não me ajudaram diretamente na bancada, mas que sempre me proporcionaram uma convivência divertida e agradável, Doriane, Daniele, André, Ana Paula, Marcos, Carolzinha, Isabelle, Lívio, Gustavo e Edmar.

Aos meus colegas que já passaram pela UFAM, e continuaram amigos, dando força e torcendo por mim, Alessandra Kariza, Andrezza, Daniel Dutra e Gisele.

Às minhas constantes companhias dentro e fora do laboratório nos últimos dois anos, Andrea e Aldi, obrigada pela amizade, por dividirem comigo as alegrias e angústias dessa vida às vezes maluca da pós-graduação.

Ao Leandro, pela companhia, carinho, atenção, incentivo, paciência, por me fazer sorrir e sempre dizer que tudo vai dar certo.

Às "Meninas da Química", em especial Cristina, Alcinei e Karime pelos conselhos, amizade e carinho em todos os momentos, estando longe ou perto, amo vocês!

Ao Moisés pela amizade, carinho, apoio e incentivo.

Aos professores do programa, pela oportunidade de aprender muito sobre diversos assuntos.

Ao pessoal da secretaria, Fábria, Eliane e Marcos, pela boa vontade, atenção e carinho com que me trataram.

Aos técnicos e estagiários do laboratório de Tecnologias de DNA e pessoal do administrativo do CAM - UFAM.

À dona Regina por cuidar de mim e fazer aquele cafezinho sempre fresquinho.

A todos os amigos que não citei, mas que de alguma forma me incentivaram, ajudaram e torceram por mim, sou muito feliz por ter os amigos que tenho.

À FAPEAM, CNPq e Suframa, pela bolsa concedida e suporte financeiro.

**“Talvez eu não tenha ido para onde pretendia, mas
acho que acabei onde pretendia estar”**

Douglas Adams

RESUMO

NEIVA, M. **Transcriptoma da glândula de veneno de *Bothrops atrox***. 2011. 100 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A espécie *Bothrops atrox* é responsável por grande parte dos acidentes no estado do Amazonas. No entanto, ainda são poucos os estudos sobre as toxinas que compõem o veneno dessa serpente, os mecanismos envolvidos na sintomatologia dos acidentes, bem como de formas de inibição. Os soros antiveneno utilizados atualmente com o objetivo de neutralizar as atividades sistêmicas e locais dos venenos mostraram reatividade cruzada entre componentes dos venenos de serpentes do gênero *Bothrops* (MOURA DA SILVA et al., 1990). No entanto alguns componentes do veneno não apresentaram essa reatividade (SILES-VILARROEL et al., 1974), mostrando a existência de toxinas espécie específicas. Os venenos de serpentes estão sujeitos a grandes variações induzidas por diversos aspectos ontogenéticos e influencia do habitat. Assim, essas variações podem gerar toxinas espécie específicas cujos mecanismos de ação ainda são desconhecidos e que os anticorpos presentes nos antivenenos disponíveis não sejam capazes de reconhecer e neutralizar eficientemente. O gênero *Bothrops* possui espécies extremamente variáveis, algumas de difícil classificação taxonômica, e novas espécies têm sido descobertas recentemente. Como contribuição para o acúmulo de informações a respeito das diferentes composições do veneno do gênero *Bothrops*, e para o conhecimento de toxinas já isoladas e as ainda não isoladas na espécie tipo *Bothrops atrox*, foi construída uma biblioteca de cDNA da glândula de veneno. Os dados obtidos são importantes para a elaboração de um painel da expressão gênica dessa espécie e permitirá a identificação de toxinas que podem ser comuns ou não ao veneno de outras espécies do gênero. Aliado a isso, esses dados permitirão a correlação com o estudo proteômico, e possivelmente fornecerão subsídios para a melhoria da terapêutica empregada no tratamento dos casos envenenamento na região.

Palavras - chave: *Bothrops*. Serpentes. Venenos. Toxinas. Transcriptoma.

ABSTRACT

NEIVA, M. **Transcriptome of *Bothrops atrox* venom gland**. 2011. 100 p. Ph. D. thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

The species *Bothrops atrox* is responsible for most accidents in state of Amazonas. However, there are few studies on toxins that make up the venom of this snake, mechanisms involved in symptomatology of accidents, as well as inhibition forms. Sera antivenom currently used in order to neutralize the systemic and local activities of the venoms showed cross-reactivity between components of the venom of *Bothrops* (MOURA DA SILVA et al., 1990). However some components of the venom showed no reactivity (SILES-VILARROEL et al., 1974), indicating the existence of species-specific toxins. Snake venoms are subject to large variations induced by several aspects and influences of ontogenetic habitat. Thus, these variations can produce toxins whose mechanisms of species-specific action are still unknown and antibodies present in available antivenoms maybe not are capable to recognize and neutralize some toxins efficiently. *Bothrops* species have highly variable, some of difficult taxonomic classification and new species have been discovered recently. As a contribution to gain of information about of different compositions of *Bothrops* venom and to knowledge of toxins not yet isolated and the isolated in *Bothrops atrox* type species we constructed a venom gland cDNA library. The data obtained are important for the development of gene expression panel of this species and enable the identification of toxins common or not in the venom of other species. These data will allow correlation with the proteomic study, and possibly provide input for improving the therapeutic used in the treatment of accidents cases in the region.

Keywords: *Bothrops*. Snakes. Venoms. Toxins. Transcriptoma.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Serpentes e venenos	13
1.2 A família Viperidae	13
1.3 O gênero <i>Bothrops</i>	15
1.4 O complexo <i>Bothrops atrox</i> e a jararaca da Amazônia	16
1.5 O envenenamento botrópico	17
1.6 Principais toxinas do veneno botrópico	19
1.6.1 <i>Metaloproteinases</i>	19
1.6.1.1 <i>Classe PI</i>	21
1.6.1.2 <i>Classe PII</i>	22
1.6.1.3 <i>Classe PIII</i>	22
1.6.2 <i>Serinoproteinases</i>	24
1.6.3 <i>Fosfolipases A₂</i>	26
1.6.4 <i>Lectinas tipo C</i>	29
1.6.5 <i>L-aminoácido oxidases (LAAO)</i>	31
1.6.6 <i>Peptídeos potenciadores da bradicinina</i>	32
1.6.7 <i>Proteínas ricas em cisteína (CRISPs)</i>	33
1.7 Variabilidade na composição do veneno	35
1.8 Transcriptômica e análise de toxinas de venenos de serpentes	37
2 OBJETIVOS	40
3 MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 Construção da biblioteca de cDNA	41
3.1.1 <i>Linhagens bacterianas</i>	41
3.1.2 <i>Coleta do material biológico</i>	42
3.1.3 <i>Extração do RNA total</i>	42
3.1.4 <i>Síntese dos cDNAs</i>	42
3.1.5 <i>Digestão enzimática</i>	43
3.1.6 <i>Fracionamento</i>	44
3.1.7 <i>Ligação ao vetor</i>	44
3.1.8 <i>Transformação bacteriana</i>	44
3.1.9 <i>Extração plasmidial</i>	44

3.2 Sequenciamento	45
3.3 Montagem e Identificação das sequências	45
4 RESULTADOS	47
4.1 Extração do RNA total	47
4.2 Síntese dos cDNAs	47
4.3 Análise dos tamanhos de fragmentos	48
4.4 Agrupamentos das sequências	48
4.5 Análise dos grupos e predição de função	52
4.5.1 <i>Grupos das proteínas relacionadas a processos celulares</i>	52
4.5.2 <i>Grupo das toxinas</i>	55
4.5.2.1 <i>Toxinas minoritárias – CRISP, LAAO, VEGF e BPPs</i>	56
4.5.2.2 <i>Lectinas tipo C</i>	57
4.5.2.3 <i>Serinoproteinases</i>	59
4.5.2.4 <i>Metaloproteinases</i>	60
4.5.2.5 <i>Fosfolipases A2</i>	64
5 DISCUSSÃO	65
6 CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS	70

1 INTRODUÇÃO

1.1 Serpentes e venenos

As serpentes que produzem e são capazes de inocular veneno são denominadas peçonhentas e pertencem a 4 grandes famílias, Elapidae, Colubridae, Atractaspididae e Viperidae (MACKESSY, 2009). Os venenos de serpentes são produzidos em glândulas especializadas capazes de sintetizar e secretar uma grande quantidade de substâncias biologicamente ativas, compostas principalmente de proteínas e polipeptídeos, que representam aproximadamente de 95% do seu peso seco total. Várias destas substâncias já analisadas demonstraram efeitos biológicos diversificados.

As principais funções atribuídas ao veneno são imobilizar a presa para alimentar-se e se defender de predadores. Assim parte de seus constituintes estão relacionados à atividade digestiva, apresentando atividade enzimática hidrolítica que é importante para a dispersão dos componentes tóxicos do veneno pelo tecido da presa.

Devido ao dano local e sistêmico, como hemorragia, necrose e dor, causado por algumas dessas enzimas, as mesmas são denominadas toxinas, no entanto, cabe salientar que nem todas as toxinas possuem atividade enzimática, bem como nem todas as proteínas presentes no veneno possuem atividade tóxica e dessa forma não são consideradas toxinas.

Cada veneno possui uma ação que é característica da espécie de serpente, e sua ação é decorrente da sua composição, ou seja, dos tipos de toxinas que estão presentes. As toxinas por sua vez, são caracterizadas por possuírem atividades rápidas, altamente seletivas e específicas. Dessa forma, são capazes de interferir eficientemente em diversos mecanismos fisiológicos da presa.

1.2 A família Viperidae

Essa família compreende cerca 270 espécies de serpentes (MALLOW et al., 2003; WÜSTER et al., 2008) cujo tamanho pode atingir mais de dois metros de comprimento e que são consideradas as de maior importância médica, pois são responsáveis pela maioria dos acidentes e mortalidade nas regiões onde ocorrem

(WARRELL, 1995a, b, 2004). Todas as serpentes dessa família são peçonhentas, possuem dentição do tipo solenóglifa (Figura 1), que consiste em dois dentes inoculadores, que possuem canais internos por onde veneno é inoculado, localizados na porção frontal da maxila superior. As serpentes dessa família possuem o aparato de inoculação de veneno mais sofisticado, devido aos dentes serem retráteis e posicionados em uma maxila móvel. Esse aparato permitiu a essas serpentes desenvolverem dentes inoculadores particularmente longos e isso está associado ao seu modo de vida sedentário, preferencialmente emboscando presas relativamente grandes (GREENE, 1992).

Figura 1 – Aparato inoculador de veneno da família Viperidae
Fonte: Mackessy (2009)

Dentro da família estão incluídas duas subfamílias reconhecidas, a saber:

1. Viperinae: Possui 12 gêneros e 66 espécies reconhecidas distribuídas por regiões tropicais e subtropicais. Essa subfamília compreende as denominadas víboras do Velho Mundo e inclui os gêneros *Bitis* ("Puff Adders"), *Vipera* e *Echis* ("Saw-scaled vipers") como representantes com o maior número de espécies.
2. Crotalinae: Família com 28 gêneros e 195 espécies também chamadas serpentes do "Novo Mundo", pois habitam predominantemente no continente americano, embora algumas espécies ocorram na Ásia. Têm como característica principal a presença da fosseta loreal ("pit") que é um órgão em forma de orifício sensor de radiação infravermelha, localizado na porção supralabial, entre os olhos e narinas.

Nessa subfamília se encontram os gêneros *Crotalus*, *Sistrurus* (cascavéis), *Bothrops* (jararacas) e *Trimeresurus*.

1.3 O gênero *Bothrops*

O gênero *Bothrops* compreende mais de 30 espécies e subespécies que habitam as diversas regiões desde a América Central até a América do Sul (CIDADE et al., 2007). No Brasil, a distribuição geográfica abrange todas as regiões, sendo que entre as principais espécies estão *Bothrops jararaca*, *B. jararacussu*, *B. alternatus*, *Bothrops insularis* (espécie ilhoa), *Bothrops moojeni* e *Bothrops atrox* (Figura 2).

Figura 2 - Algumas espécies do gênero *Bothrops*

As serpentes desse gênero são denominadas jararacas e possuem como características morfológicas cabeça ligeiramente triangular em forma de lança, destacada do restante do corpo. As escamas no topo da cabeça têm arranjo e número variável, assim como as escamas supra e sublabiais. No corpo possuem escamas dorsais pequenas e carenadas e ventrais grandes e lisas (GOMES, 1993).

Apresentam grande variação de tamanho, indo de 70 cm até 2 m, nos padrões de coloração, e habitats, que variam desde regiões desérticas a florestas de várzea, o que faz com que existam espécies arbóreas e terrestres (CAMPBELL; LAMAR, 1989).

Devido a essas variações e semelhanças morfológicas, o gênero é taxonomicamente mal resolvido e suas espécies classificadas dentro de grupos ou complexos. WÜSTER et al. (1999) após análises baseadas em DNA mitocondrial e sistemática molecular chegaram entre outras conclusões de que apesar de terem conseguido resolver vários grupos, entre eles *Bothrops (sensu lato)*, *B. jararaca*, *B. jararacussu* e *B. atrox*, ainda são necessárias análises com espécies raras para se chegar a um consenso sobre a filogenia desse gênero.

No Brasil as serpentes do gênero *Bothrops* são consideradas um grave problema de saúde pública correspondendo a 90% dos acidentes notificados quando identificado o gênero (BRASIL, 2001).

1.4 O complexo *Bothrops atrox* e a jararaca da Amazônia

O complexo *B. atrox* compreende um grande número de populações de serpentes que ocorrem desde a América Central até a região Norte da América do Sul. Nele há grandes variações de tamanho, padrão de coloração, arranjo de escamas, entre outros (WÜSTER et al., 1999). Dentro desse complexo incluem-se espécies como *B. leucurus* (WANGLER, 1824), *B. marajoensis*, *B. moojeni* (HOGE, 1965), *B. lanceolatus aidaie* (SANDNER-MONTILLA, 1979).

A espécie tipo desse complexo é *B. atrox*, popularmente conhecida como jararaca da Amazônia (Figura 03), tem distribuição em toda a Amazônia brasileira (Figura 04), habitando florestas predominantemente, mas ocasionalmente pode ser encontrada em áreas de agricultura e atividades humanas (CAMPBELL; LAMAR, 1989). Estudo com espécies representantes da Amazônia Central observadas na região de Manaus mostrou que possuem hábitos predominantemente noturnos, sendo mais ativas nos períodos de maior umidade e chuvas. Seu ciclo reprodutivo foi observado nos meses entre fevereiro e maio, e observou-se também uma troca de micro habitat ontogenética onde indivíduos juvenis tem preferência pela vegetação enquanto os adultos são encontrados no solo (OLIVEIRA, 2001).

Figura 3 – *Bothrops atrox* espécie tipo da região de Manaus
 Fonte: Bernarde (2009)

Figura 4 – Distribuição geográfica de *B. atrox* no Brasil

Na Amazônia brasileira, essas serpentes são de extrema importância médica, uma vez é predominante na região e é responsável por mais de 90% dos acidentes. Estudo na região de Manaus (LOPEZ-LOZANO, 2002) demonstrou mais de 90% dos pacientes atendidos no Instituto de Medicina Tropical (IMT) foram vítimas de picadas dessa serpente. No entanto, devido às grandes distâncias e dificuldades de deslocamento da região amazônica, as estatísticas para o estado podem estar subestimadas uma vez que muitos pacientes atendidos pelos serviços de saúde.

1.5 O envenenamento botrópico

A grande maioria das serpentes da família Crotalinae possui toxinas que tem como alvo principal componentes do sistema hemostático. Os mecanismos de ação dessas toxinas são os mais diversos e incluem atividade anticoagulante, pro coagulante, coagulante e inibidora da agregação plaquetária. Há também a presença de toxinas com efeitos citotóxicos que contribuem em grande parte para o estabelecimento dos danos locais característicos. Do veneno de botrópico foram isoladas e caracterizadas metaloproteínases, serinoproteínases, fosfolípases A2, desintegrinas, lectinas tipo C, fatores de crescimento de endotélio e nervos, proteínas ricas em cisteínas, L aminoácido oxidases e peptídeos potenciadores da bradicina.

A principal característica deste tipo de envenenamento é a atividade sobre a cascata de coagulação sanguínea e apresenta efeitos locais e sistêmicos. O veneno possui três importantes ações biológicas: coagulante, hemorrágica e proteolítica (ROSENFELD, 1971; LOMONTE, 1994; BRASIL, 1998). A sintomatologia local inclui dor sangramento no local da picada, formação de edema, formação de bolhas, choque periférico e mionecrose. Como efeitos sistêmicos observam-se hemorragia, hipotensão arterial e em casos mais graves choque e insuficiência renal aguda que pode levar ao óbito.

Essas ações são mediadas por um conjunto de toxinas predominantemente proteolíticas. As metaloproteinases e desintegrinas agem diretamente na membrana basal se ligando às integrinas e também a proteínas da superfície de endotélios, causando sua ruptura e degradação. A disrupção dessa matriz provoca um alargamento das junções intercelulares, e em conjunto com a degradação das células endoteliais provocam o extravasamento de sangue dando início ao processo hemorrágico (GUTIERREZ; LOMONTE, 1989; KAMIGUTI et al., 1996). As metaloproteinases são as mais frequentemente encontradas nos venenos dos viperídeos em geral, e no gênero *Bothrops*, e são as principais indutoras dos efeitos hemorrágicos característicos do veneno desse gênero. Entre as principais atividades biológicas estão a ativação de fatores de coagulação e da trombina, levando a coagulopatias, degradação da matriz extracelular (MEC) com ação sobre lamininas e colágeno tipo IV, alterações nas células endoteliais. Além desses efeitos, elas também estão relacionadas a outras alterações fisiológicas como coagulopatias, mionecrose, ativação/inibição de plaquetas e atividade inflamatória (GUTIERREZ e RUCAVADO, 2005; TEIXEIRA et al., 2005). Essas atividades estão ligadas as diversas estruturas terciárias e quaternárias e têm como alvo as células endoteliais e a matriz extra celular (MEC).

A ação coagulante é devida principalmente às serinoproteinases que têm principalmente ação tipo trombina e ativam a cascata de coagulação convertendo fibrinogênio em fibrina ou ativando o fator X e a protrombina. No primeiro caso, podem se ligar ao fibrinogênio clivando a cadeia A, a cadeia b ou ambas, liberando os fibrinopeptídeos. A ativação do fator X leva ao consumo dos fatores V, VII e plaquetas e em consequência coagulação intravascular disseminada (CIVD). Ao mesmo tempo sua ação sobre endotélios, destrói os vasos capilares provocando o extravasamento de líquidos intersticiais iniciando o processo edematoso.

As lectinas tipo C do veneno também interferem na cascata de coagulação inibindo a agregação plaquetária e assim contribuindo com o efeito hemorrágico. Algumas L-aminoácido oxidases também estão envolvidas no processo edematoso.

O efeito hipotensivo do veneno se dá pela ação de peptídeos que potencializam a ação de proteínas vasodilatadoras como a bradicinina. Esses peptídeos conhecidos como potenciadores da bradicinina (BPPs) foram isolados pela primeira vez do veneno de *B. jararaca* (FERREIRA, 1970). Outras toxinas encontradas no veneno botrópico em menor quantidade como L aminoácido oxidases, proteínas ricas em cisteínas e relacionadas também aos processos coagulantes/anticoagulantes

Os efeitos locais são resultado em um primeiro momento pela ação proteolítica das metaloproteinases e a mionecrose pela ação das fosfolipases A2 (PLA₂). As PLA₂ agem na membrana celular provocando sua disrupção, algumas por sua hidrólise enzimática dos fosfolipídios, e outras sem atividade catalítica por mecanismos ainda pouco estudados, onde existe a interação de moléculas presentes na membrana celular que interagem com sítios não catalíticos da enzima.

O quadro clínico de um paciente pode ser de maior ou menor gravidade dependendo de variáveis como a quantidade de veneno inoculada, local de picada e idade do paciente. Em casos graves favorece o estabelecimento de infecções secundárias causadas por bactérias presentes na boca da serpente e na pele, e o desenvolvimento da Síndrome Compartimental. Essa síndrome é provocada pelo edema formado que dificulta a perfusão sanguínea nos músculos, aumentando a pressão do líquido intersticial, resultando em isquemia. As manifestações mais importantes são a dor intensa, parestesia e déficit motor (KOUYOUMDJIAN; POLIZELLI, 1989; FRANÇA; FAN, 1992; BRASIL, 1998).

1.6 Principais toxinas do veneno de botrópico

1.6.1 Metaloproteinases

As metaloproteinases constituem uma grande família de enzimas proteolíticas dependentes de Zn⁺² e estão presentes nos mais diversos organismos. Os venenos de viperídeos e colubrídeos são grandes fontes dessas proteínas reunidas na família das reprotinas ou M12, que contém as SVMPs (Snake Venom Metalloproteinases) e ADAMs (A Desintegrin And Metalloproteinase) (BJARNASON; FOX, 1995). As

SVMPs são enzimas que possuem uma diversidade muito grande e classificação foi proposta, baseada na similaridade e tamanho dos domínios, em quatro classes: PI, PII, PIII e PIV (BJARNASON; FOX, 1995).

Com os avanços no sequenciamento de cDNAs de glândulas de veneno de diversas espécies de serpentes, foi verificado essas proteínas são sintetizadas na forma de precursores nucleotídicos (N), denominados NI, NII, NIII e NIV, que sofrem processamento dando origem a metaloproteinases ativas ou domínios livres ativos (HITE, 1992a). Devido a essas características e baseados em estudos com cDNAs, Fox e Serrano (2008) propuseram uma nova classificação onde foram incluídas subclasses nas classes PIII e PII que refletem seu potencial de sofrer esses processamento e proteólise. Com essas modificações a classificação atual inclui as classes PI, PII, PIIa, PIIb, PIIc, PIId, PIII, PIIIa, PIIIb, PIIIc, PIIId (Figura 6). A classe PIV foi abolida e as toxinas nela foram incluídas em um sub classe da PIII, uma vez que não se identificou até o momento, nenhum transcrito codificador para uma proteína PIV.

Figura 5 – Estruturas atuais das classes de metaloproteinases
 Fonte: Fox; Serrano, (2008)

Todos os precursores das metaloproteinases são secretados na forma de zimogênios e possuem em comum um peptídeo sinal e um pro domínio. O peptídeo sinal faz o endereçamento da proteína para o retículo endoplasmático rugoso onde então é clivado. O pro domínio é a região que possui a sequência consenso **PKMCGV**T posicionada vinte aminoácidos antes do início do primeiro aminoácido N-terminal do domínio metaloproteinase. A presença desta sequência mantém a enzima na sua forma inativa, pois a cisteína presente interage com o co-fator zinco, impedindo o substrato de se ligar ao sítio ativo. Esse mecanismo é chamado “*cystein-switch*” e acontece de maneira similar nas metaloproteinases de matriz (HITE et al., 1992b; SHIMOKAWA et al., 1996). Acredita-se que as condições de pH em torno de 5,0, presença de citrato e de um tripeptído pirol-glutamato é quem mantém a proteínas inativa no lúmen da glândula de veneno (MARQUES-PORTO et al., 2008)

Dessa forma baseado na organização dos domínios e sua propriedades, segue a atual classificação das metaloproteinases:

1.6.1.1 Classe PI

As toxinas da classe PI são compostas pelo domínio metaloproteinase que contém a sequência consenso HE-XX-H-XX-G-XX-H. Nessa sequência os resíduos de histidina se ligam ao zinco e o ácido glutâmico é o resíduo catalítico (BARRET et al., 1998; RAWLINGS et al., 2008). Existem poucas estruturas cristalográficas elucidadas para essas proteínas, mas há um consenso que suas estruturas tridimensionais são semelhantes com dois subdomínios, o subdomínio maior contendo quatro α -hélices e uma folha β pregueada, e o subdomínio menor contendo uma α -hélice e várias alças (MACKESSY, 2009). Geralmente as proteínas dessa classe possuem de quatro a sete resíduos de cisteína formando de duas a três pontes dissulfeto.

Do ponto de vista funcional as SVMP PI isoladas até o momento apresentam atividade hemorrágica local, embora existam algumas com atividade mionecrótica, como a BaP1 (RUCAVADO et al., 1995) e apoptótica, como a graminelisina (WU, et al., 2001), e são menos potentes em comparação com as das classes PII e PIII. Pequenas diferenças nos sítios de ligação ao substrato (HUANG et al., 2002), e diferenças no padrão de distribuição das ponte dissulfeto que levam a diferentes

estruturas terciárias são apontadas como possíveis fatores que contribuem para a baixa atividade hemorrágica, no entanto nenhuma correlação foi ainda comprovada (FOX; SERRANO, 2005).

1.6.1.2 Classe PII

Os precursores dessa classe contêm um domínio desintegrina ligado ao domínio metaloproteinase por uma sequência espaçadora. O processamento desses precursores pode dar origem a três tipos de proteínas maduras: o dois domínios sofrem proteólise e são liberados (classe PIIa); os domínios metaloproteinase e desintegrina permanecem juntos (PIIb); os dois domínios juntos formam um dímero (PIIc). Uma característica importante é a presença da sequência canônica RGD, que caracteriza um domínio desintegrina verdadeiro e geralmente esses domínios são processados e liberados no veneno. Essa sequência pode ser substituída pela tríade XCD, onde o X pode ser tanto um resíduo de serina (Ser) ou ácido glutâmico (Glu) e caracteriza um domínio tipo desintegrina ou desintegrina símile. A presença de alguns resíduos de cisteína em determinadas posições na sequência, parece determinar se o precursor sofrerá proteólise ou não. (FOX; SERRANO, 2005). Comumente observa-se que proteólise e consequente liberação do domínio desintegrina, é o processo mais comum para as toxinas dessa classe, uma vez que apenas três toxinas, contendo ambos os domínios, foram isoladas a partir do veneno.

As desintegrinas liberadas a partir dos precursores possuem um amplo espectro de atividades biológicas que são resultado da sua capacidade de se ligar às integrinas na matriz extracelular, provocando sua disrupção e dando início ao processo hemorrágico.

1.6.1.3 Classe PIII

Nessa classe se encontram as toxinas com maior potência hemorrágica, e seus precursores são compostos pelo pro-domínio, os domínios metaloproteinase desintegrina e um domínio rico em cisteínas *Cys-Rich* (Cystein Rich Domain). A grande maioria das proteínas maduras é composta pelos três domínios (Figura 6) na

forma de monômeros e poucas em dímeros (MASUDA et al., 2001). Devido a sua composição de três domínios, possuem uma maior complexidade funcional.

Figura 6 – Estrutura tridimensional da Bothropasina (PIII). Os três domínios catalítico (azul), desintegrina (amarelo) e Cys-Rich (rosa) estão representados.

Novamente o padrão de distribuição de cisteínas, em número e em posições, determina se a proteína madura será processada ou não. Algumas formas processadas sofrem proteólise liberando os domínios desintegrina e rico em cisteína formando o domínio DC (Desintegrin-Cystein) (classe IIIa) e outras formam estruturas diméricas com os domínios DC (classe IIIb). Um fato interessante é que ambas as formas, processadas e não processadas, são encontradas no veneno, e isso se deve ao fato da existência de diversas isoformas para essas toxinas, com diferentes arranjos tridimensionais, alguns susceptíveis a proteólise.

O domínio desintegrina símile com a sequência de ligação XCD é o mais comum nessa classe, com poucos representantes contendo o domínio desintegrina verdadeiro (MAZZI et al., 2006).

As PIII estão relacionadas a diversas atividades biológicas no veneno, devido aos domínios que possuem que, em conjunto, contribuem para o quadro hemorrágico no envenenamento botrópico. Tanto as formas integra quanto as processadas DC se ligam às proteínas da matriz extracelular (MEC) inibindo a adesão celular (SOUZA et al., 2000) e a agregação plaquetária *in vitro* (KAMIGUTI

et al., 2003). Por outro lado, o domínio ACR da forma DC também inibe a agregação das plaquetas *in vitro* e, além disso, pode se ligar ao fator de von Willebrand e outras proteínas como colágeno XIV e XI (SERRANO et al., 2005a, 2006).

A classe PIV foi alvo de dúvida quanto a sua real existência. A proteína madura contém a estrutura de uma PIII onde duas subunidades de lectinas tipo C são ligadas por pontes dissulfeto à cadeia principal. Existem apenas quatro proteínas caracterizadas dessa classe, dois ativadores do fator de coagulação X (SIIGUR et al. 2001) e dois ativadores da trombina (YAMADA et al., 1996; YAMADA; MORITA, 1997). As análises de seus cDNAs mostram que as subunidades de lectina são codificadas por mRNAs diferentes, e a proteína é oligomerizada após a tradução (SIIGUR et al. 2001). Portanto, Fox e Serrano (2008) propuseram a inclusão dessas toxinas como uma subclasse das PIII (PIII_d), uma vez que investigações nas suas sequências sugerem que uma cisteína na posição 400 da cadeia é determinante para a formação de pontes dissulfeto com as lectinas, e dessa forma as PIV seriam o resultado de modificações pós traducionais em uma PIII.

1.6.2 Serinoproteinases

As alterações na cascata de coagulação provocadas pelo envenenamento por *Bothrops* têm a participação das serinoproteinases em conjunto com as metaloproteinases. As serinoproteinases de veneno (SVSP) catalisam diversas reações de proteólise em vários passos da cascata de coagulação, no sistema calicreína-cinina, células endoteliais e plaquetas.

As SVSPs fazem parte do clã PA, subclã S e família S1 das peptidases (RAWLINGS; BARRET, 2004). As proteínas dessa família têm como característica um resíduo de serina (Ser195) como sítio ativo, constituída também de uma histidina (His57) e um aspartato (Asp102), formando a tríade catalítica. A estrutura secundária consiste de dois domínios tipo β -barril, com o sítio catalítico entre os dois formando um sulco. A estrutura é mantida por seis pontes dissulfeto, das quais uma é conservada somente nas TL-SVMP (Figura 7).

Figura 7 – Estrutura da serinoproteinase AaV-SP-I ligada a N-acetilglicosamina.

As TL-SVSPs são as serinoproteinases denominadas trombina-símile e são as mais comumente encontradas nos venenos. Sua atividade biológica tem ação análoga a da trombina, clivando as cadeias α e β do fibrinogênio convertendo-o em fibrina. Duas diferenças fundamentais nesse mecanismo é que as TL- SVSPs, ao contrário da trombina que libera ambas as cadeias de fibrinopeptídeos A e B, podem liberar apenas uma cadeia por vez. A segunda diferença é algumas dessas enzimas não são capazes de ativar o fator XIII. Isso gera a formação de coágulos fracos facilmente degradados pela plasmina e por consequência provocam um processo de intenso consumo de fatores de coagulação, que acaba por gerar a incoagulabilidade sanguínea. Assim, temos representantes com atividade coagulante direta, mas com efeitos anticoagulantes indiretos. Existem ainda enzimas dessa família que possuem outras atividades biológicas análogas as da trombina como ativação da agregação/desgranulação plaquetária, por interação com a proteína receptora Gplb.

Um grupo especial de TL-SVSPs possui atividade neurológica em ratos, provocando a chamada síndrome da giroxina, que consiste em episódios em que o animal gira em torno de seu eixo axial. Esse mecanismo é ainda pouco conhecido e além da giroxina, a crotalase e o ancrod também possuem esse efeito. A batroxobina é um exemplo desse grupo que tem sido bastante estudada por seus

possíveis efeitos no sistema nervoso central, como isquemia e apoptose neuronal (WU et al., 2000, 2001).

A agregação plaquetária direta também pode ser induzida por algumas serinoproteinase denominadas PA-SVSP. Essas enzimas ativam as plaquetas e promovem a liberação de componentes como serotonina e ADP, e algumas ainda ativam o fator XIII. Essa atividade é inibida por anticorpos específicos para a proteína GP1b ou GPIIb/IIIa.

Outra atividade biológica das serinoproteinases muito importante é ação como cininogenases e são denominadas calicreína *símile*. Esse grupo hidrolisa o cininogênio do plasma e de outros órgãos liberando bradicina.

Devido a essas funções as SVSPs seu isolamento e estudo são pontos chave, para o entendimento da síndrome hemorrágica que se desenvolve no envenenamento botrópico, bem como na busca de terapêutica para tratamentos de distúrbios da coagulação.

1.6.3 Fosfolipases A₂ (PLA₂)

As PLA₂ compõem uma grande família de proteínas encontradas em todos os organismos, muito diversificada em termos de estruturas e atividade biológica. Possuem função predominantemente enzimática e catalisam a hidrólise de glicerofosfolipídios na posição *sn*-2, liberando lisofosfolipídios e ácidos graxos livres, tendo íons Ca⁺² como co-fator na sua maioria. São classificadas em quatorze grupos de acordo com suas estruturas primária e terciária, especificidade catalítica e de acordo com tecido onde são expressas. Esses critérios as dividem em secretadas (sPLA₂) citosólicas (cPLA₂), independentes de Ca⁺² (iPLA₂) e acetilhidrolases ativadoras da agregação plaquetária (PAF-AH).

As sPLA₂ são encontradas em fluídos biológicos e secreções, no suco pancreático, e venenos de serpentes, escorpiões e lagartos. As enzimas desse grupo encontradas em mamíferos, embora sejam consideradas não tóxicas, estão intimamente relacionadas a condições inflamatórias como artrites (BALSINDE et al., 1999). Por outro lado as fosfolipases de venenos de serpentes estão entre as toxinas mais potentes e estão relacionadas a diversas atividades biológicas. Assim como as metaloproteinases, as PLA₂ possuem várias isoformas e muitas dessas isoformas estão presentes concomitantemente no mesmo veneno, com atividades

biológicas diferentes. São classificadas em quatro grupos I, II, V e X, possuem baixo peso molecular, são cálcio dependentes e possuem um resíduo de histidina como sítio ativo. As que estão presentes no veneno de serpentes pertencem aos grupos I e II (SIX; DENNIS, 2000) e as do veneno de viperídeos pertencem ao grupo II, que ainda pode ser subdividido segundo dois critérios:

- De acordo com o tipo de tecido em que se expressam em seis grupos: IIA, IIB, IIC, IID, IIE e IIF. E nesse caso as fosfolipases dos veneno de serpentes se encaixam no grupo IIB (SIX; DENNIS, 2000).
- Com base no resíduo de aminoácido na posição 49 que é crítica para a atividade biológica: quatro grupos Asp49 (SCOTT et al., 1990), Lys49 (MARAGANORE et al., 1984), Ser49 (POLGAR et al., 1996), Asn49 (TSAI et al., 2004) e Arg49 (CHIJIWA et al., 2006).

Como mencionado, a substituição do aminoácido da posição 49 acarreta modificações na atividade biológica. As fosfolipases Asp49 possuem potente atividade enzimática (VAN DEN BERG et al., 1989, 2004). A substituição desse aminoácido pela Lys, Ser, Asn ou Arg em geral causa inativação da atividade enzimática, tornando a toxina miotóxica.

As PLA₂ de venenos de possuem estruturas muito variáveis, mas geral contém de 120 a 150 aa, com estrutura secundária composta por três α -hélices e duas folhas β -pregueadas antiparalelas (β -wing), mantidas por sete pontes dissulfeto e uma extremidade C-terminal estendida (SCOTT, 1997) (Figura 8). Outra característica estrutural das enzimas do grupo II é a formação de uma ponte dissulfeto entre a cisteína 133 da porção C-terminal e a cisteína 50 próxima ao sítio ativo, formando a alça de ligação ao cálcio (Figura 6). Embora esse grupo de enzimas geralmente se encontre na forma de monômeros, elas têm grande capacidade de formar complexos com outros fatores protéicos pro ligações covalentes e não covalentes. Esses complexos estão entre as mais potentes neurotoxinas conhecidas com atividade pré-sináptica. (GUBENSEK et al., 1997; BON, 1997). Na forma de monomérica, por outro lado, são também potentes miotoxinas de ação rápida (FLETCHER et al., 1997).

Figura 8 – Estrutura de uma fosfolipases A2 de *Notechis scutatus* com as principais regiões características. (Fonte: Pasin, F., 2006)

Embora tenham estruturas muito parecidas, as proteínas dessa família são caracterizadas por possuírem diversas atividades biológicas, como neurotoxicidade pré-sináptica, miotoxicidade, inibição da agregação plaquetária, atividade anticoagulante e atividade antimicrobiana, muitas delas não relacionadas com sua atividade enzimática. A existência de vários sítios relacionados a essas atividades é proposta por alguns estudos com inibidores (YANG; KING, 1980; YANG et al., 1981; BABU; GOWDA, 1994) e anticorpos (STILES; CHOUMENT, 1997; GOWDA, 1997), no entanto os mecanismos de interação envolvidos entre esses sítios e seus alvos ainda são pouco compreendidos.

No veneno de viperídeos, as PLA₂ possuem importante atividade neurotóxica pré-sináptica como é o caso da crotoxina, um complexo isolado do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, cuja subunidade CB é uma fosfolipase e bloqueia a transmissão neuromuscular (KINI et al., 2009). No entanto no gênero *Bothrops* essas toxinas possuem predominantemente efeitos neurotóxicos na pós-sinapse além de agirem na liberação de mediadores de inflamação como prostaglandinas, prostaciclina, troboxanos e leucotrienos. Esses mediadores contribuem para o aumento da permeabilidade vascular, aumento do fluxo de leucócitos, acúmulo de

fluidos e formação do edema característico (TEIXEIRA et al., 2003). Além dessa atividade enzimática, a miotoxicidade é uma efeito neurotóxico pós sináptico pronunciado no veneno de alguns viperídeos, e essa ação pode ocorrer local com dano tecidual e sistemicamente causando danos musculares extensos, grande liberação de creatina quinase (CK) no sangue, levando a mioglobinúria e insuficiência renal aguda (AZEVEDO-MARQUES et al., 1985). Nos venenos de *Bothrops*, a ação miotóxica sistêmica é rara, e a local, mais comum, caracterizada por mionecrose, formação de bolhas e formação de edema (GUTIERREZ; LOMONTE, 1995). As diferenças nas ações são dependentes da especificidade dessas miotoxinas por alvos celulares no tecido muscular (KINI; EVANS, 1989) e algumas dessas toxinas parecem ter alvos específicos nas células musculares que não estão presentes em outros tipos celulares (GUTIÉRREZ; OWNBY, 2003).

A partir do veneno botrópico foram isoladas várias fosfolipases com atividade miotóxica do tipo Asp49 e Lys49 (LOPEZ-LOZANO et al., 1998; SERRANO et al., 1999; TOYAMA, 2000; SANTO-FILHO, 2009), em geral foi observado que as toxinas Asp49 possuem alta atividade enzimática, enquanto nas Lys49 essa atividade é baixa e até mesmo inexistente. As atividades dessas toxinas estão fortemente relacionadas aos efeitos locais do envenenamento. Além disso, estão associadas aos efeitos miotóxicos, atividade anticoagulante e hemolítica indireta de algumas toxinas isoladas desse veneno (ANDRIÃO-SCARSO, 2000). Também foram relatadas atividades associadas às fosfolipases a hiperalgesia e alodinia (TEIXEIRA et al., 2003). Em conjunto, as atividades miotóxicas e catalíticas das fosfolipases do veneno botrópico, são fortemente envolvidas no dano tecidual e na resposta inflamatória, uma vez que sua ação libera diversos eicosanóides. Esses eicosanóides, principalmente PGE e PGI₂ são provocam o aumento do fluxo sanguíneo e o fluxo de leucócitos para o local da lesão contribuindo para a formação do edema.

1.6.4 Lectinas tipo C

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas que possuem a capacidade de reconhecer e se ligar a carboidratos expressos na superfície celular, podendo induzir diversos processos celulares, entre eles a aglutinação. As lectinas tipo C são uma classe de lectinas animais que compartilham o domínio de ligação ao carboidrato,

mas que são estruturalmente diferentes das primeiras e se ligam às moléculas de açúcar de modo dependente de cálcio.

Dentro dessa classe temos as lectinas de venenos que por sua vez se subdividem em dois tipos, de acordo com características estruturais e funcionais, as lectinas tipo C símile (CLPs) e as lectinas verdadeiras (DU; CLEMETSON, 2009).

As lectinas possuem de 26 a 28 kDa, e apesar de compartilharem características estruturais, os dois tipos possuem várias diferenças. As lectinas verdadeiras possuem uma alça de ligação ao cálcio, responsável pela capacidade de reconhecimento do açúcar e ocorrem na forma de homodímeros. Por outro lado, as CLPs não são capazes de reconhecer o cálcio, devido à ausência da alça de ligação ao cálcio e ocorrem na forma de heterodímeros com duas subunidades, α e β , cada uma composta por duas α -hélices e cinco folhas β -pregueadas. As subunidades são unidas por uma ponte dissulfeto, e se conectam numa estrutura denominada dímero de "loop" trocado. Essa estrutura é bem conservada nas diversas CLPs e a sua especificidade por vários ligantes se deve aos aminoácidos expostos na superfície das subunidades que são mais variáveis (DU; CLEMETSON, 2009).

Nos venenos de viperídeos, que são hemorrágicos em sua maioria, as CLP são componentes atuam inibindo ou ativando fatores de coagulação. Sua ação se dá pela ligação a glicoproteínas de superfície de plaquetas (GPS), que por sua vez contém sítios de ligação ao fator de von Willebrand (fvW) e trombina.

A estrutura que permite diversas composições de subunidades confere às CLPs de venenos de serpentes diferentes efeitos biológicos. Algumas toxinas desses venenos tanto inibem a ligação do fvW à GPIb, como ativam a agregação dependente desse fator. Dessa forma, embora com arranjos diferentes, possuem as proteínas GPIb como alvo comum (MORITA, 2004; LU et al., 2005a).

Algumas toxinas de venenos têm como alvo as proteínas GPVI, receptoras de colágeno nas plaquetas. As CLPs se agrupam com essas proteínas, ativando as plaquetas e sinalizando para o início da cascata do colágeno, de maneira análoga os peptídeos CRP (Collagen Related Peptides) envolvidos nessa via (POLGAR et al., 1997). Outras CLPs interagem com as integrinas $\alpha 2 \beta 1$, também sinalizando para via de agregação plaquetária mediada por colágeno.

As lectinas descritas no veneno botrópico têm ação na interação entre o fvW e a proteína GPIb, induzindo a agregação plaquetária, como a botrocetina (USAMI et

al.,1993); inibindo a trombina e dessa forma inibindo suas funções como formação da fibrina e agregação plaquetária, como a bothrojaracina e bothroalernina (ZINGALI et al.,1993; AROCAS et al., 1996; CASTRO et al., 1998); atividade anticoagulante pela interação com os fatores IX e X (SEKIYA et al.,1993); inibição de células tumorais e crescimento de células endoteliais (DE CARVALHO et al., 2001).

1.6.5 L-aminoácido oxidases (LAAO)

As flavoenzimas são enzimas cujo co-fator é o FAD, presentes em diversos organismos e que participam de processos como fotossíntese, reparo de DNA e apoptose. As L-aminoácido oxidases pertencem a essa família e catalisam a reação de conversão de L-aminoácidos à sua forma α -cetoácido, segundo a reação:

Essas enzimas estão presentes nos venenos de viperídeos, constituindo de 1 a 4%, mas em caso especial, a espécie *Calloselasma rhodostoma*, representam 30% do peso seco do veneno (PONNODURAI et al., 1994). Assim como as metaloproteinases, serinoproteinases e fosfolipases, as LAAO estão presentes em várias isoformas, e alguns venenos podem conter vários tipos de LAAO (STILES et al., 1991).

São proteínas homodiméricas com massa molecular variando entre 110 a 150 kDa, com duas moléculas de flavina como co-enzima. As moléculas de co-enzima, geralmente é o FAD, no entanto existem alguns relatos em que o FMN substitua o FAD (TAN, 1998). Dados de cristalografia da LAAO de *C. rhodostoma* mostram que é composta de dois monômeros de 55 kDa, cada um com quinze α -hélices e vinte e duas folhas β -pregueadas distribuídas em três domínios, o de ligação ao FAD, o ligação ao substrato e um domínio helicoidal. Devido às pequenas quantidades dessas enzimas em alguns venenos, muitas delas têm sido clonadas e caracterizadas, e as deduções de suas sequências de aminoácidos mostram que são bastante similares entre si.

As LAAOs presentes em venenos de serpentes têm sido muito estudadas nos últimos anos por possuírem várias atividades biológicas, como indução a apoptose, atividade antibacteriana, inibição da coagulação e indução/inibição da agregação das plaquetas.

Não existe consenso sobre os mecanismos para indução a apoptose e agregação plaquetária. Vários autores ligam as LAAOs os efeitos apoptóticos à exposição das células ao stress oxidativo e produção de peróxido de hidrogênio. O aumento da concentração de peróxido induziria a ativação HSPs (*Heat Shock Proteins*), fragmentação do DNA e morte celular (TEMPONE et al., 2001) ou ativação das proteínas ativadora 1, Faz/Apo 1 e p53 (SUN et al., 2003). No entanto, outros autores demonstraram que a ativação da cascata apoptótica não está unicamente ligada aos processos oxidativos na célula, mas também a interação entre a superfície celular e a mistura de glicanas presentes na enzima (ANDE et al., 2006; SAMEL et al., 2006). Quanto à agregação plaquetária a falta de consenso é se as LAAOs induzem ou inibem o processo. Ambos os processos também seriam desencadeados pela liberação de peróxido de hidrogênio, que iniciaria uma cascata de liberação de ciclooxygenases e tromboxanos, sinalizando para a agregação (DU; CLEMETSON, 2002; TOYAMA et al., 2006). Esse processo seria inibido pela redução da capacidade interação das plaquetas e o fibrinogênio pela exposição ao peróxido (TAKATSUKA et al., 2001; SAMEL et al., 2006).

As atividades antibacterianas e antileishmania também estão relacionadas à capacidade de indução de liberação de peróxidos de hidrogênio, provocando a desestabilização da parede celular dos microorganismos (TEMPONE et al., 2001; ZHANG et al. 2004; TOYAMA et al., 2006).

No veneno de *Bothrops* foram descritas LAAOs em *B. jararacussu* e *B. moojeni* (FRANÇA et al., 2007) e *B. atrox* (ALVES et al., 2007) e todas apresentaram alto grau de similaridade entre si, bem como com outras enzimas já descritas. Foi demonstrada a atividade anti *Leishmania* e anti *Trypanossoma* das toxinas das duas primeiras espécies citadas, enquanto que a toxina isolada de *B. atrox* demonstrou possuir atividade apoptótica mediada por caspases.

1.6.6 Peptídeos Potenciadores da Bradicinina (BPPs)

O veneno de algumas serpentes da família Viperidae são fontes desses peptídeos que inicialmente foram descritos por Ferreira et al. (1970) no veneno de *B. jararaca* e posteriormente foram descritos em outras espécies da família.

São constituídos de 5 a 14 aminoácidos com um grupo piroglutamil na porção N-terminal e um resíduo de prolina na porção C-terminal. Existem alguns BPPs

maiores que compartilham características similares incluindo o alto conteúdo de prolinas e o tripeptídeo Ile-Pro-Pro na porção C-terminal. A análise de sequências de cDNAs de vários desses peptídeos em *B. jararaca* mostrou que eles são codificados com um único precursor com várias repetições em tandem flanqueadas por sequências espaçadoras que provavelmente devem conter sinais para processamento (MURAYAMA et al., 1997). Nessa espécie, foram identificados vários cDNAs codificadores para esses peptídeos, sendo que alguns em alguns deles há adicionalmente na região C-terminal a sequência para um peptídeo natriurético, revelando a existência de outro tipo de peptídeo vasodilatador.

Os BPPs têm efeito hipotensivo indireto agindo nos sistemas renina-angiotensina e e calcitreína-cinina. A enzima conversora de angiotensina (ECA) é uma cininase e exerce dois papéis: degrada a bradiginina que é um vasodilatador e converte a angiotensina I em angiotensina II, que por sua vez tem efeito hipertensivo, pois aumenta a reabsorção de sódio e água pelos rins. Esses peptídeos se ligam na ECA inibindo sua ligação aos substratos, e sem sua ação há um desequilíbrio entre as concentrações de bradiginina e angiotensina II o que resulta no efeito hipotensivo e fazem com que esses peptídeos também sejam denominados inibidores da ECA.

Além do veneno de *B. jararaca*, outras espécies do gênero contém os BPPs em seu veneno, e os mesmos já foram identificados em *B. insularis* (CINTRA et al., 1990), *B. neuwiedi* (FERREIRA et al., 1998), *B. jararacussu* (HAYASHI et al., 2003), e *B. alternatus* (WERMELINGER et al., 2005).

Os BPPs representam um modelo de estudo importante para o desenvolvimento de drogas anti hipertensivas, como o Captopril que foi baseado na estrutura dos primeiros tipos isolados na década de 70. Embora tenha sido descritos em várias espécies e tenham estruturas muito similares, os mecanismos moleculares envolvendo sua estrutura gênica, processamento e secreção no veneno ainda necessitam de mais estudos que dependem cada vez mais da purificação e identificação de cDNAs, clonagem e expressão.

1.6.7 Proteínas ricas em cisteína (CRISPs)

As CRISPs foram inicialmente descritas no trato reprodutivo masculino de mamíferos, envolvidas na fusão de gametas (KIERSZENBAUM et al., 1981), mas

posteriormente foi descrita em diversos tecidos de vertebrados, como neutrófilos, plasma, mas em especial tecidos glandulares como pâncreas, ovário, timo e glândulas salivares (KRATZSCHMAR et al., 1996; UDBY et al., 1996, 2002.; JALKANEN et al., 2005).

Essas toxinas foram isoladas do veneno de espécies das três principais famílias de serpentes (Elapidae, Colubridae e Viperidae), do veneno de anfíbios do gênero *Xenopus* (OLSON et al., 2001), do lagarto *Heloderma horridus horridus* (MOCHCA-MORALES et al., 1990; MORRISSETTE et al., 1995; NOBILE et al., 1994, 1996) e do molusco *Conus textile* (MILNE et al., 2003).

São proteínas de uma única cadeia com peso molecular que varia de 20 a 30 kDa. Possuem sequências conservadas, mas a principal característica são dezesseis resíduos de cisteína muito conservados, todos participando de pontes dissulfeto, sendo que dez deles se concentram na região C-terminal (YAMAZAKI; MORITA, 2004), região essa denominada domínio rico em cisteína que dá nome a família. Existem poucos dados funcionais a respeito dessas proteínas, mas as estruturas de várias CRISPs têm sido determinadas, e se mostram bastante conservadas entre si, consistindo de duas regiões N-terminal conectada à C-terminal por uma dobra na molécula. A região N-terminal é denominada PR-1, pois tem homologia estrutural com as proteínas PR de defesa contra patógenos em plantas. A porção C-terminal é denominada domínio rico em cisteína (CRD). Segundo Guo et al. (2005) três das oito pontes dissulfeto altamente conservadas na molécula estão localizadas no domínio PR, duas se encontram na dobra as outras três no domínio CRD. Essa estrutura foi observada na stecrisp de *Trimeresurus stejnegeri* (GUO et al., 2005) na trifilina de *Trimeresurus flavoviridis* (SHIKAMOTO et al., 2005) e natrina de *Naja atra* (WANG et al., 2005).

Em venenos diversas atividades biológicas são atribuídas a essas proteínas como bloqueio de vários tipos de canais de íons (NOBILE et al., YAMAZAKI et al., 2002a), (WANG et al., 2005; MORRISSETTE et al., 1995), bloqueio da contração da musculatura lisa (YAMAZAKI et al., 2002b), indução de hipotermia em presas (MOCHA-MORALES et al., 1990) entre outras.

Essa multifuncionalidade ainda não foi bem explicada em termos de mecanismo de ação, pois os seus sítios funcionais ainda não foram determinados, acredita-se que devido a estrutura em dois domínios favoreça a existência de múltiplos sítios ativos e/ou de ligação de maneira semelhante ao modelo das PLA₂,

onde os sítios catalíticos e o farmacológico se encontram em porções distintas da molécula (KINI, 2003). Através de estudos de cristalografia foram propostas diversas regiões como candidatas a sítios ativos no bloqueio de canais iônicos, tanto regiões de alça da proteína (WANG, et al., 2005; GUO et al., 2005), como o modelo de tríade semelhante ao das serinoproteinases (MILNE et al., 2003).

1.7 Variabilidade na composição do veneno

Existe uma grande variabilidade na composição química dos venenos de serpentes as quais podem ser de caráter intraespecífico ou interespecífico (ASSAKURA, 1992; FRY, 2003). Como relatado anteriormente, o gênero *Bothrops* é taxonomicamente mal resolvido, e nos últimos anos têm sido descritas e reconhecidas diversas novas espécies dentro do gênero (SILVA; RODRIGUES, 2008; MACHADO, 2010). Com todas essas variações, o total conhecimento da composição química do veneno da grande parte dessas espécies ainda é pouco estudado, e dessa forma pouco se sabe ainda sobre a ação do soro frente a toxinas potencialmente diferentes.

No gênero *Bothrops* as variações intra específicas podem ser influenciadas por diversos fatores como tamanho, idade, dieta, dimorfismo sexual e distribuição geográfica (CHIPAUX et al., 1991; DALTRY et al., 1996). Essas variações foram observadas em *B. jararaca* (FURTADO et al., 2006; ZELANIS et al., 2010), *B. asper* (SALDARRIAGA et al., 2004) e *B. atrox* (LOPEZ-LOZANO et al., 2002; GUÉRCIO et al., 2006)

O estudo proteômico com a espécie *B. atrox* demonstrou variabilidade ontogenética em indivíduos capturados na região de Manaus (GUÉRCIO et al., 2006). Neste trabalho, verificou-se que grupos de metaloproteinases da classe PIII e serino proteinases são mais abundantes no veneno de juvenis enquanto que as da classe PI são mais abundantemente expressas em adultos. Esse estudo corroborou dados anteriores de Lopez-Lozano (2002) sobre variações no conteúdo de metaloproteinases no veneno dessa espécie. O mapa proteômico identificou ainda várias toxinas presentes somente no veneno de juvenis, entre elas além de metaloproteinases, fatores de crescimento de nervos e endotélio (VEGFs e NGFs) e proteínas ricas em cisteínas (Crisps) e toxinas somente no veneno de adultos, predominantemente fosfolipases. O veneno de sub adultos mostrou toxinas comuns

aos dois estágios. Essa variabilidade confirma dados que demonstram que o veneno de juvenis é possui maiores atividades prócoagulantes e hemorrágicas quando comparado com o de adultos (SALDARRIAGA et al., 2004).

O tratamento do envenenamento por serpentes do gênero é a administração do soro antibotrópico que consiste de uma mistura de anticorpos obtidos a partir do sangue de cavalos inoculados com uma mistura de venenos de várias espécies de *Bothrops*.

Estudos demonstraram que os venenos possuem componentes comuns e componentes característicos de cada espécie (SILES-VILARROEL et al., 1974). Devido a isso ação do soro se baseia na reatividade cruzada que existente entre os componentes do veneno de várias espécies do gênero, o que foi demonstrado por Moura da Silva et al. (1990) utilizando o veneno de cinco espécies de *Bothrops*. Essa reatividade cruzada sugere a existência de epítomos comuns aos venenos, e por isso o soro neutraliza a ação, principalmente sistêmica do veneno.

A eficácia do antiveneno é comprovada por vários estudos (OTERO et al., 1998; PARDAL et al., 2004; SEGURA et al., 2010), no entanto variações na sua habilidade de neutralizar efeitos gerados por toxinas específicas de alguns venenos tem sido avaliada.

Como abordado, a variabilidade na composição dos venenos das espécies desse gênero foi demonstrada e claramente pode refletir no processo de neutralização pelo soro principalmente nos casos de toxinas espécie-específicas.

Estudos com *B. asper* (GUTIERREZ et al., 1981; LOMONTE et al., 1987), *B. atrox* (MUNIZ et al., 2000; FURTADO et al., 2010), *B. jararaca*, *B. jararacussu* (da SILVA et al., 2007) e um grande estudo envolvendo com dezenove espécies do gênero (QUEIROZ et al., 2008) mostraram a existência dessas variações.

Esses dados são de grande importância, pois o conhecimento da composição dos venenos das várias espécies se faz cada vez mais necessário a fim padronizar o tratamento para cada região de ocorrência no que diz respeito à dose utilizada na soroterapia, a fim de evitar os possíveis efeitos colaterais de imunogenicidade, bem como terapia de suporte para os efeitos locais.

1.8 Transcriptômica e análise de toxinas de venenos de serpentes

O estudo das toxinas de venenos até a década de 80 consistia na utilização de técnicas bioquímicas para o fracionamento e purificação a partir do veneno bruto e posterior caracterização. Em muitos casos, o uso dessas técnicas demandava muito tempo e muitas vezes um alto custo para obter pequenas quantidades de toxinas, quando essas eram naturalmente pouco expressas no veneno.

As técnicas de biologia molecular proporcionaram um grande avanço no estudo dessas proteínas, uma vez que se tornaram possíveis a clonagem e análise de seus transcritos precursores, bem como a identificação de isoformas e presença de toxinas não majoritárias no veneno. No entanto, para se utilizar a abordagem por essas técnicas, a princípio havia a necessidade de conhecer pelo menos uma parte da sequência de aminoácidos da proteína alvo para então se fazer a tradução reversa e conhecer parte da sequência de DNA para ser clonada.

O início dos projetos de sequenciamento de genomas em grande escala, aliado ao desenvolvimento da Bioinformática proporcionou o acúmulo de grande quantidade de informações acerca da estrutura gênica de diversos organismos. Entretanto, até o momento o genoma de *Apis mellifera* (SOLIGNAC et al., 2007) é o único de um organismo produtor de veneno disponível.

Diante dessa pouca informação acerca de estrutura gênica de animais capazes de produzir e secretar veneno, nos estudos com expressão diferencial em tecidos a análise da molécula de cDNA tornou-se a fonte de obtenção de conhecimento sobre as toxinas e seu genes codificadores, uma vez que representa fielmente os mRNAs expressos no tecido analisado.

A era do sequenciamento de cDNAs em larga escala teve início no começo da década de 90 com o projeto de sequenciamento complementar do genoma humano (ADAMS et al., 1991). Nesse projeto a abordagem utilizada envolvia a geração de vários clones de cDNA, que eram então selecionados aleatoriamente e apenas uma das suas extremidades eram então sequenciadas automaticamente em um único passo. As sequências geradas por essa técnica, eram pequenas com tamanho entre de 400 a 600 pb e convencionou-se chamá-las de ESTs (Expressed Sequence Tag). Essa abordagem mostrou ter grande importância para a identificação de proteínas expressas diferencialmente em vários tecidos, identificação de proteínas pouco expressas e de difícil caracterização bioquímica e ainda a identificação de novas

proteínas. Uma biblioteca de cDNA é uma amostra estatisticamente representativa da diversidade gênica no sistema estudado (LEE et al., 1995).

Nos últimos anos o estudo das toxinas, suas estruturas e os processos envolvidos na produção e secreção do veneno foram fortemente impulsionados por estudos com a geração e análise de bibliotecas de cDNA. Essa abordagem se mostra bastante atraente, uma vez que milhares de clones podem ser obtidos a partir pouca quantidade de material biológico, utilizando metodologias de custo relativamente baixo.

O sequenciamento de ESTs provenientes de glândulas de veneno de serpentes permitiu a identificação de toxinas bioquimicamente já descritas, bem como novas toxinas por meio da comparação com sequências depositadas em bancos de dados tanto de DNA como de proteínas, tais como o GenBank e Swissprot. Segundo Junqueira-de-Azevedo e Ho (2002) esse tipo de abordagem parece ser o mais apropriado para uma caracterização inicial dos venenos, uma vez que as toxinas são supostamente os componentes mais abundantes nesse tecido, além de possibilitar a identificação de proteínas envolvidas nos eventos de produção e secreção do veneno.

O estudo pioneiro desse tipo traçou o perfil da expressão gênica da glândula de veneno de *B. insularis* (JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO; HO, 2002). Esse trabalho permitiu a identificação de diversas metaloproteinases, serinoproteinases, além da identificação de uma nova toxina que posteriormente foi demonstrado ser diferente das descritas até então (LEÃO, 2008).

Desde então outros trabalhos utilizando a mesma abordagem, envolvendo serpentes de diversas espécies foram desenvolvidos. Kashima et al. (2004) em seu trabalho com *B. jararacussu* identificaram um padrão de expressão completamente diferente onde eram expressas quase exclusivamente fosfolipases A2, e não foi identificado nenhum transcrito codificador para BPPs. Ainda em 2004, foi publicado o transcriptoma de *Bitis gabonica*, espécie africana da família Viperidae, onde foram identificados cDNAs para uma citocina e um inibidor de protease do tipo Kunitz (FRANCISCHETTI et al., 2004)

Além dos trabalhos pioneiros já citados, atualmente temos disponíveis sete transcriptomas de espécies da família Viperidae, além de dois de espécies da família Elapidae.

Na espécie *Deinagkistrodon acutus* foram identificadas muitas toxinas relacionadas à coagulopatias (ZHANG et al., 2006). Em *Echis ocellatus* foi identificado um novo grupo de proteases putativas do tipo renina símile (WAGSTAFF et al., 2006). Junqueira-de-Azevedo (2006) analisou o transcriptoma de *Lachesis muta* e identificou possíveis toxinas relacionadas neurotoxinas comumente encontradas em elapídeos. Pahari et al. (2007) trabalharam com uma espécie de cascavel do deserto, *Sistrurus catenatus*, e também foram identificados transcritos para neurotoxinas comuns a família Elapidae.

Outro trabalho com uma cascavel revelou a existência de possíveis cardiotoxinas e fatores de crescimento de endotélio (VEGF) incomuns dentro do gênero *Crotalus* (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2009).

Nos últimos dois anos foram reportados os primeiros trabalhos de análise de bibliotecas de cDNA com elapídeos. Leão et al. (2009) utilizaram a abordagem para a identificação de candidatos a antigênicos com fins de desenvolvimento de soro alternativo para o veneno de *Micrurus corallinus*. Já Siang et al. (2010) identificaram em *Bungarus flaviceps* peptídeos natriuréticos ainda não descritos em elapídeos asiáticos.

No gênero *Bothrops* além dos transcriptomas de *B. insularis* (JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO; HO, 2002) e *B. jararacussu* (KASHIMA et al., 2004), anteriormente citados, atualmente temos a análise trabalhos recentes de *B. jararaca* (CIDADE et al., 2006) e *B. alternatus* (CARDOSO et al., 2010) ambos com o perfil de expressão bastante semelhantes. Soma-se a esses trabalhos o transcriptoma de *B. atrox* (Neiva et al., 2009), espécie importante e pouco estudada até o momento, cuja análise representa o primeiro realizado com uma espécie de serpente da região amazônica.

Os trabalhos aqui citados representam uma fonte muito rica de informações sobre diversas espécies de serpentes que nos permite além da identificação de perfis de expressão, onde algumas toxinas parecem ser universais dentro de um determinado gênero ou família. Essas informações aliadas a outras informações obtidas com a venômica permitirão o conhecimento cada vez mais preciso do grande repertório de toxinas existentes, cujos números ainda são subestimados (TAN et al., 2003). Além disso, tais estudos nos dão informações a respeito dos processos envolvidos na evolução das toxinas e na geração da imensa variabilidade característica dessas moléculas.

2 OBJETIVOS

2.1 Gerais

Analisar o transcriptoma da glândula de veneno de *Bothrops atrox*.

2.2 Específicos

Construção de uma biblioteca de cDNA a partir da glândula de veneno *B. atrox*.

Analisar os transcritos via sequenciamento de ESTs, a fim identificar os genes expressos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Construção da Biblioteca de cDNA

3.1.1 Linhagens bacterianas e vetores

A linhagem TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) da bactéria *Escherichia coli* foi utilizada como hospedeira.

O vetor escolhido para a clonagem dos insertos de cDNA foi o plasmídeo pDNR-Lib (Clontech, Mountain View, Califórnia, EUA). Esse vetor denominado doador é específico para construção de bibliotecas de cDNA, possui como marca de seleção positiva um gene de resistência a cloranfenicol (Cm^r) e um sistema que permite a transferência dos insertos de DNA para outro vetor de expressão por recombinação. Essa recombinação é mediada por uma recombinase do bacteriófago P1 e ocorre em sítios específicos denominados *LoxP* que flanqueiam a região entre a extremidade 5' do sítio múltiplo de clonagem do vetor e a 3' do gene de resistência ao antibiótico (Figura 9). O sistema de recombinação permite ainda a seleção negativa de recombinantes incorretos por meio do gene da sacarase (*SacB*).

Figura 9 – Vetor pDNR-Lib

3.1.2 Coleta do material biológico

O material biológico foi coletado de um macho sub-adulto de *B. atrox* de cerca de 70 cm de comprimento cedido pelo serpentário da Gerência de Animais Peçonhentos do Instituto de Medicina Tropical de Manaus (IMT).

O animal teve seu veneno extraído e após 72 horas dessa extração foi anestesiado em ambiente com CO₂ e sacrificado por decaptação. Imediatamente após o sacrifício, foi feita a cirurgia para extração do par de glândulas de veneno. Cada glândula foi acondicionada separadamente em tubos plásticos do tipo Falcon, seu peso foi calculado pela diferença entre o tubo vazio e com o tecido, e cada tubo foi mergulhado em recipiente contendo nitrogênio líquido e levado ao Laboratório de Tecnologias de DNA (UFAM) para a extração do RNA, que foi realizada no mesmo dia.

3.1.3 Extração do RNA total

Utilizou-se o método do tiocianato de guanidina (CHOMCZYNSKI; SACCHI, 1987) para extração do RNA total. As glândulas foram maceradas no nitrogênio líquido com o auxílio do pistilo, e o material obtido foi colocado em dois tubos contendo 5mL e 6mL do reagente Trizol (Invitrogen). O RNA das duas glândulas foi extraído separadamente segundo protocolo do fabricante e visualizado em gel de agarose a 1%.

A concentração do material extraído foi estimada visualmente por meio de uma curva em placa contendo agarose e as concentrações de 200 ng/μl, 100 ng/μl, 50 ng/μl, 40 ng/μl, 30 ng/μl, 20 ng/μl, 10 ng/μl, 5 ng/μl e 2,5 ng/μl, respectivamente de um RNA padrão. Após a quantificação o RNA das duas glândulas foi reunido em uma única amostra.

3.1.4 Síntese dos cDNAs

Os cDNAs foram sintetizados a partir do RNA total utilizando o kit Creator Smart (Clontech).

A primeira fita foi sintetizada pela transcriptase reversa a partir da cauda poli-A do mRNA utilizando o *primer* CDS III. Ao atingir o terminal 5' do mRNA uma cauda

poli-C é adicionada à primeira fita por uma enzima terminal transferase que faz parte do sistema. Em seguida outro *primer* denominado SMART IV que contém sequência complementar a cauda poli-C, faz o pareamento com a primeira fita. Dessa forma a transcriptase troca de fita molde e continua a fazer a síntese até o final do primer. Esse processo visa maximizar a obtenção de cDNAs completos e ao mesmo tempo permite que o primer SMART IV sirva de região de ancoramento para o a síntese da segunda fita por LD- PCR (Long Distance PCR).

A reação de síntese da primeira fita foi feita, segundo instruções do fabricante, com 450 ng de RNA total, 1,2 μ M do primer SMART IV e 0,5 μ M do primer CDS III em um volume total de 5 μ L. O sistema foi incubado a 72 °C por 2 minutos, resfriado em gelo por 2 minutos, e em seguida foram adicionados 1mM de DTT, 2mM de dNTPs e 100U de transcriptase reversa em um volume final de 10 μ L. A seguir a reação foi incubada por 1 hora a 42°C e em seguida resfriada em gelo.

Para a síntese da segunda fita optou-se por uma reação de 22 ciclos que segundo o fabricante é o indicado para a concentração inicial de RNA total. O sistema utilizado para a reação continha 2 μ L da reação de síntese da primeira fita, 1,2 μ M dos *primers* 5' PCR e CDS III, dNTPs e DNA polimerase na concentração 1X, para um volume final de reação de 100 μ L.

Após a reação 5 μ L do produto de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%.

3.1.5 Digestão Enzimática

As seqüências dos *primers* utilizados para a síntese dos cDNAs contêm sítios de restrição para as enzimas *Sfi* IA e *Sfi* IB, a fim de que os insertos pudessem ser ligados ao vetor sem o uso de adaptadores e a clonagem pudesse ser direcional. Assim fez-se a reação de digestão enzimática dos insertos e para esse procedimento utilizou-se 79 μ L do produto da LD-PCR previamente tratada com proteinase K em um sistema contendo 200U da enzima *Sfi* I e volume final de 100 μ L.

As amostras foram incubadas a 50 °C por duas horas e em seguida aplicadas na coluna de fracionamento.

3.1.6 Fracionamento

Previamente à ligação dos insertos de cDNA no vetor, o material digerido foi fracionado com a finalidade de eliminar eventuais cDNAs incompletos ou truncados utilizando a coluna CHROMA SPIN-400. Ajustou-se o tempo e o volume de cada gota com 700µL de tampão.

Foram colocados 100µL do produto da digestão enzimática e 2µl de azul de bromofenol. Foi estabelecido um volume de 15 gotas para cada fração coletada em microtubos, sendo as três primeiras e as três últimas frações descartadas. As frações foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1% utilizando-se 3 µL de cada fração.

3.1.7 Ligação ao Vetor

Após a análise em gel foram reunidas as 5 frações que continham maior concentração de cDNAs e utilizados 0,5µL para o sistema de ligação com 100ng do vetor pDNR-Lib e 200U de DNA ligase, segundo recomendação do fabricante.

Após a incubação do sistema a 16 °C *overnight*, as amostras foram precipitadas e ressuspendidas em um volume final de 5µL, dos quais foi utilizado 1µL para transformação bacteriana.

3.1.8 Transformação Bacteriana

O vetores contendo os cDNAs foram inseridos por eletroporação com os parâmetros de 1900mV por 3,6 ms. As células de *E. coli* foram semeadas em placas contendo meio LB com cloranfenicol (34µg/mL), com os volumes de 5, 10, 20, 40 e 500µL por 16 horas a 37 °C.

3.1.9 Extração Plasmidial

Foram selecionados 1056 clones para extração plasmidial, que foram inoculados em placas do tipo *deep well* contendo 1,5mL de meio Circle Grow e cloranfenicol a 34µg/mL incubadas a 37 °C por 22 horas.

Após o crescimento foram retiradas alíquotas de 100µL de cada amostra de cultura e criopreservadas em placas do tipo Elisa contendo glicerol a 15% v/v a -80°C.

As mini preparações foram feitas utilizando o método da lise alcalina modificado (VASCONCELOS et al., 2002) e as amostras visualizadas por eletroforese em gel de agarose a 0,8%.

Os clones foram divididos em 12 placas de 96 poços e de uma delas selecionou-se 12 amostras para análise do perfil de restrição com as enzimas *EcoRI* e *HindIII* a fim de avaliar os tamanhos de fragmentos clonados, e para esse procedimento preparou-se uma reação com 3µL de amostra e 1 U de cada enzima em um volume final de reação de 25µL.

3.2 Sequenciamento

Após a avaliação do tamanho de fragmentos, todos os plasmídeos foram seqüenciados pelo método da terminação da elongação de cadeia (SANGER, 1977) com utilizando o Kit DYEnamic ET Terminator (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) e analisados pelo seqüenciador automático MegaBace 1000 (GE Healthcare).

3.3 Montagem e Identificação das sequências

Os arquivos das amostras seqüenciadas foram exportados para a base de análise de dados TIMINA (<http://timina.sourceforge.net/wiki/>) (BRIGIDO et al., 2005) para anotação automática, onde foi feita a análise e agrupamento das sequências.

Primeiramente as sequências foram analisadas com pacote de softwares Phred e Crosmatch (GREEN, 1996) a fim verificar a qualidade e remover as regiões de baixa qualidade presentes nas extremidades das sequências. Considerou-se como válidas para a anotação definitiva apenas sequências com mais de 150 pb e qualidade ≥ 20 .

O conjunto de sequências válidas foi então organizadas em *contigs* pelo software CAP3 (HUANG; MADAN, 1999) adotando os parâmetros de 50 pb de sobreposição e 98% de identidade.

Após o agrupamento as sequências foram comparadas com os bancos de dados de proteínas do GenBank NR (<http://www.ncbi.nih.gov>) e Swissprot release 44

(ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/swissprot/) utilizando a ferramenta BLASTx (Altschul *et.al.*, 1997). As sequências que apresentaram identidade com sequências de genes e/ou proteínas depositadas no Swissprot foram automaticamente anotadas usando 10^{-10} como valor de corte para o e-value.

As sequências agrupadas foram então classificadas segundo sua função por meio de uma anotação manual adicional, comparando-se os resultados da anotação automática com as descrições das famílias de proteínas com as quais houve similaridade. Seguida da anotação manual, foi feita a predição das arquiteturas dos domínios das proteínas possivelmente codificadas pelos *contigs*. Essa predição foi feita por comparação com os bancos de dados proteômicos do Swissprot, SP-TrEMBL e Ensembl usando o programa SMART (SCHULTZ *et al.*, 2000).

Finalmente as sequências de cada *contig* foram alinhadas com as sequências do GenBank que apresentaram melhor hit usando o programa MegAlign (Lasergene, Madison, WI, USA). Adicionalmente foi feita a tradução conceitual de cada *contig* ou *singlet*, e os resultados foram comparados com o banco de proteínas Uniprot, por meio de BLAST e alinhados utilizando o programa ClustalW, para identificação dos domínios e sequências consenso sinalizadoras de sítios ativos e resíduos de cisteínas formadoras de pontes dissulfeto.

4 RESULTADOS

4.1 Extração de RNA total

O peso de cada glândula foi estimado em 300 mg e receberam aleatoriamente a designação de amostras 1 e 2. O gel da extração mostrou que o RNA permaneceu íntegro embora a separação das duas bandas correspondentes às subunidades 28S e 18S não tenham ficado nítida (Figura 10). A concentração final das amostras foi estimada em 2,5µg/mL e 3,75 µg/mL respectivamente.

Figura 10 – Extração do RNA total da glândula de veneno de *B. atrox* (A) amostra 1 (B) amostra 2

4.2 Síntese dos cDNAs

A figura 11 abaixo ilustra os cDNAs sintetizados a partir do RNA total antes do fracionamento em coluna, onde pode-se notar que o tamanho da moléculas variou de 100pb a 2Kb.

Figura 11 – cDNAs sintetizados a partir do RNA total.

4.3 Análises de tamanho dos cDNAs

Após a transformação as placas foram avaliadas e a eficiência de transformação calculada em aproximadamente em $1,9 \times 10^5$ clones independentes por micrograma de DNA.

O tamanho dos fragmentos após a extração plasmidial foi verificado por análise de restrição de 12 clones selecionados randomicamente com as enzimas *EcoRI* e *Hind III*. Nessa análise verificou-se que o tamanho dos fragmentos encontrava-se na faixa de 200 a 2000 pb. (Figura 12)

Figura 12 – Análise de restrição para avaliação dos tamanhos de fragmentos
M – marcador 1Kb ladder 1-6, 7-12 clones analisados

4.4 Agrupamento das seqüências

A análise do sequenciamento dos 1056 clones iniciais resultou em um total de 610 ESTs com alta qualidade e que foram consideradas boas para a comparação com bancos de dados. Dessas 402 foram agrupadas em 66 grupos ou *contigs* e 208 permaneceram na forma de uma única sequência ou *singlets* (Figura 13).

Figura 13 – Agrupamento das seqüências após a anotação

A comparação das seqüências com os bancos de dados do NCBI permitiu a identificação de 211 ESTs que apresentaram similaridade com toxinas de venenos de serpentes (35%) e 146 ESTs que apresentaram similaridade com proteínas relacionadas a diversos processos celulares (24%) (Figura 14). Cada EST recebeu a designação de BATC (**B**othrops **A**trox **T**ranscript **C**luster).

Das seqüências restantes 99 apresentaram similaridade com proteínas de funções ainda desconhecidas (16%) e 154 não apresentaram similaridade com nenhuma outra proteína descrita denominadas “no hit” (25%). Essa freqüência está dentro da faixa descrita em outros transcriptomas e pode ser uma consequência do pequeno número de seqüências de venenos de serpentes atualmente depositadas nos bancos de dados.

Figura 14 – Classificação e percentual das ESTs no transcriptoma

Todas as sequências obtidas foram depositadas no banco de ESTs do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST>) sob os números de acesso FL5591281 a FL591890. A tabela 1 ilustra os resultados globais das ESTs identificadas na biblioteca.

Tabela 1 – Representação das ESTs na glândula de veneno de *B. atrox*

Função	Nº de ESTs	% total	% ident. Proteínas descritas
Similar a toxinas	211	34,50	59,10
Similar a proteínas de processos celulares	146	23,93	40,90
Nenhuma similaridade (no match)	154	25,25	-
Proteínas desconhecidas	99	16,23	-
Total	610	100,00	-

A proporção entre transcritos para toxinas e para processos celulares parece estar de acordo com trabalhos que verificaram o aumento na taxa metabólica da glândula de veneno nas primeiras vinte e quatro horas após a extração do veneno, sugerindo a ativação da cascata de sinalização para ativação do epitélio glandular e regulação positiva para síntese de RNAs e depois para a produção das toxinas componentes do veneno (PINTOR, 2010). Assim o período de setenta e duas horas

entre a extração do veneno de o par de glândulas está dentro do qual ocorre o máximo pico de atividade de síntese na glândula (ROTTENBERG, 1971).

Uma comparação feita com os transcriptomas de *B. insularis* (JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO; HO, 2002), *B. jararacussu* (KASHIMA et al., 2005), *B. jararaca* (CIDADE et al., 2006) e *Bothrops alternatus* (CARDOSO et al., 2010) mostrou uma pequena diferença na percentagem de ESTs. Com uma posterior comparação com transcriptomas de viperídeos foi observado que as percentagens de transcritos apresentando identidade com toxinas variam de 40% em *Crotalus durissus collilineatus* (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2009) a 69% em *Sistrurus catenatus edwardsii* (PAHARI et al., 2007) à exceção de *Lachesis muta* cujo resultado foi de 28% (Tabela 2). Dessa forma o padrão de expressão em termos de conteúdo de toxinas na glândula de *B. atrox* parece ser o mesmo de outras espécies da família.

Tabela 2 – Percentual de toxinas nos transcriptomas de viperídeos

Transcriptoma	Autor/Ano	Toxinas/identidade (%)	Toxinas/total (%)
<i>Bothrops insularis</i>	Junqueira-de-Azevedo e Lee-Ho - 2002	67	56,
<i>Bothrops jararacussu</i>	Kashima et al. - 2005	71	61
<i>Bothrops jararaca</i>	Cidade et al. - 2006	77	55
<i>Bothrops atrox</i>	Neiva et al. – 2009	59	34
<i>Bothrops alternatus</i>	Cardoso et al. - 2010	78	23
<i>Bitis gabonica</i>	Francischetti et al. - 2004	46	-
<i>Lachesis muta</i>	Junqueira de Azevedo et al. - 2006	37	28
<i>Echis ocellatus</i>	Wasgstaff e Harrison - 2006	57	49
<i>Deinagkistrodon acutus</i>	Zhang et al. - 2006	40	-
<i>Sistrurus catenatus edwardsii</i>	Pahari et al. 2007;	77	69
<i>Crotalus durissus collilineatus</i>	Boldrini-França et al. 2009	53	40

4.5 Análise dos grupos e predição de funções

A partir dessa fase foram considerados para análise apenas os grupos que apresentaram similaridade com proteínas descritas e com função conhecida depositadas no GenBank e com base no total dessas sequências a proporção entre os dois grupos foi calculada (Tabela 1). Dessa forma as sequências foram divididas em dois grupos nomeados proteínas relacionadas a processos celulares e toxinas. A relação entre essas sequências está representada pela Figura 15.

No grupo das toxinas a maior representatividade observada foi de transcritos codificadores para metaloproteinases e no outro grupo, transcritos relacionados a metabolismo geral.

Figura 15 – Proporção os entre grupos transcritos identificados no transcriptoma

4.5.1 Grupo das proteínas relacionadas a processos celulares

O grupo das ESTs codificadoras para proteínas relacionadas a processos celulares representa 41% do transcriptoma de *B. atrox* (Figura 15). Dentro do grupo procurou-se categorizar cada transcrito de acordo com o processo celular ao qual está relacionado (Figura 16).

Figura 16 – Distribuição das ESTs no grupo da proteínas relacionadas a processos celulares

Os transcritos correspondentes a proteínas envolvidas com metabolismo geral como NADH desidrogenase, citocromo C oxidases, ATP sintases, entre outras foram os mais abundantes, seguidos por fatores de transcrição e tradução. A grande quantidade de fatores de transcrição e tradução é esperada, pois a glândula é um tecido altamente especializado cujas taxas de transcrição e tradução têm sempre um nível basal, mas que é aumentada após a extração do veneno a fim de produzi-lo novamente. (PINTOR, 2010).

Outra característica observada foi a identificação de transcritos para proteínas ligantes de cálcio como calnexina e calmodulina. A calnexina pertence ao sistema de chaperonas do retículo endoplasmático responsável pelo enovelamento correto das proteínas. A calmodulina é uma proteína expressa exclusivamente na glândula de veneno de várias muitas espécies. Estão relacionadas à sinalização dos processos de contração/relaxamento da musculatura lisa e podem ainda exercer papel na secreção do veneno (JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO; HO, 2002). Além delas foi identificado um transcrito correspondente a calgranulina, também um ligante de cálcio da família S100 ou "EF-hand", que quando expressa no espaço extracelular age com citocina mediando processos inflamatórios (PERERA et al., 2010). Ainda dentro das proteínas relacionadas a enovelamento foram identificados dois transcritos para dissulfeto isomerase (PDI), uma chaperona redox que participa da formação de pontes dissulfeto (FREEDMAN et al., 1994). Esse dado é importante, pois algumas toxinas secretadas são ricas em pontes dissulfeto.

A evolução das toxinas de venenos de serpentes está relacionada muitas vezes a processos de duplicação gênica, e os elementos transponíveis são apontados como possíveis indutores de duplicação. No banco de dados desse trabalho foram encontrados três ESTs codificadores para a transcriptase reversa da família LINE (Long Intersperced Element) (DURVENELL; TURNER, 1998) um para transposase. Embora não sido identificado nenhum transcrito para elementos transponíveis *per se* como encontrado em *B. insularis* (JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO e HO, 2002), *L. muta* (JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO et al., 2006) e *B. alternatus* (CARDOSO et al., 2010), mas a presença dos transcritos citados sugere a presença de retro elementos nas células da glândula de veneno de *B. atrox*.

Alguns transcritos identificados mostraram-se bastante incomuns, duas ESTs codificadoras para fosfolipases citosólicas e uma EST para fosfolipase B. As fosfolipases citosólicas normalmente não são secretadas no veneno, mas estão relacionadas à sinalização celular em processos inflamatórios em ratos (UOZUMI et al., 1997). As fosfolipases B por sua vez são enzimas apresentam atividades lisofosfolipídica e transacídica, além da atividade fosfolipídica clássica e comumente são descritas como fatores de virulência em patógenos (SHEN et al., 2004; GANENDREN et al., 2006). Atividades dessas enzimas já foram identificadas no veneno de elapídeos australianos, abelhas e escorpiões. (DOERY et al., 1964;) com atividade hemolítica. Chatrath et al. (2010) confirmaram por análises transcriptômicas e proteômicas a presença de fosfolipase B no veneno de *Drysdalia coronoides* (Elapidae). Há relatos de atividade alta dessas enzimas em viperídeos africanos (MOHAMED et al., 1969) e Doery (1964) identificou baixas atividades dessa enzima em *Crotalus adamanteus*. Esse resultado em nosso banco de dados é o primeiro registro no gênero *Bothrops*, no entanto, devido ter sido identificado um único transcrito, há a necessidade de mais estudos a respeito, dessa forma, optou-se por incluí-lo no grupo das proteínas celulares, o que, no entanto, não significa que as mesmas não sejam toxinas.

Adicionalmente, foi encontrada também uma EST com identidade com a proteína a anexina A1, essa proteínas se liga a fosfolipídios e é cálcio dependente e lhe atribuídas entre outras funções à inibição da fosfolipase A2 (SEEMAN et al., 1996). Cidade et al. (2006) também identificaram esse tipo de transcrito em *B. jararaca*, mas até o momento não existe nenhum dado sobre a identificação dessa proteína no veneno.

4.5.2 Grupo das toxinas

Os 59% dos transcritos identificados correspondem a toxinas sendo que as metaloproteínas juntamente com a fosfolipase A2, serinoproteínas e lectinas do tipo C símile foram os grupos de transcritos com maior representatividade onde foi observada uma maior variabilidade no número de *contigs* no grupo das metaloproteínas e serinoproteínas. No grupo das fosfolipases foi identificado um único *contig*, porém com um grande número de sequências. Além dessas estão representadas em menor conteúdo L-aminoácido oxidases (LAAO), peptídeos potenciadores da Bradicinina (BPPs), fatores de crescimento de endotélio (VEGF) e proteínas ricas em cisteína (CRISPs). (Figura 17). Observou-se que essas famílias de toxinas também foram descritas e são bastante representativas nos venenos de *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. insularis* e *B. alternatus*.

A presença desses grupos de toxinas e suas ações confirmam os sintomas clínicos do envenenamento botrópico cujas principais manifestações são os distúrbios da cascata de coagulação, dano tecidual local e compartimental.

As possíveis funções biológicas de cada *contig* baseadas nas identidades com as famílias de proteínas já descritas serão discutidas as seguir.

Figura 17 – Distribuição das ESTs no grupo da toxinas

4.5.2. Toxinas minoritárias – CRISP, LAAO, VEGF e BPPs

Esse grupo apresentou um *singlet* para uma CRISP, e três *contigs*, sendo um para LAAO, um para VEGF e um para BPPs respectivamente.

A ablomina é uma proteína da família das CRISPs isolada do veneno de *Agkistrodon blomhoffi* com atividade bloqueadora de canais de potássio inibindo a contração da musculatura lisa em ratos. Em nosso banco de dados o *singlet* BATC145 apresentou grande similaridade com a ablomina (78%). A tradução conceitual dessa sequência e o posterior alinhamento com outras sequências de proteínas da mesma família mostraram a ausência do peptídeo sinal e domínio está incompleto, muito provavelmente por ser tratar de uma única EST. Quanto ao padrão de cisteínas observou-se a presença de doze dos dezesseis resíduos, dos quais três não puderam ser identificados devido sequenciamento do cDNA não ter sido completo. O outro resíduo de cisteína não identificado aparece substituído por uma glicina. A análise do eletroferograma mostrou uma sobreposição de sinais na região correspondente e não possibilitou afirmar tratar-se de um artefato de sequenciamento ou verdadeiramente uma substituição de base que se refletiria na substituição da cisteína por uma glicina.

O *contig* BATC13 composto por duas ESTs apresentou identidade com LAAO de *B. jararacussu*. No alinhamento observou-se que o sequenciamento não alcançou o final do mensageiro, e dessa forma a tradução conceitual permitiu a identificação de apenas metade do domínio ativo da proteína e nessa parte da sequência foram identificados dois resíduos de cisteína conservados que fazem parte de uma ponte dissulfeto, um sítio de glicosilação, e três sítios de ligação ao substrato e ao FAD.

No caso do VEGF, foi encontrado o *contig* BATC08 que apresentou similaridade apenas com a porção C-terminal da proteína de *Trimeresurus flavoviridis*. Dessa forma não foi possível identificar nenhuma das sequências canônicas e padrões de pontes dissulfeto.

A ausência de ESTs codificadoras para BPPs foi uma ocorrência surpreendente, durante o processo de anotação, uma vez que essas proteínas foram descritas em abundância no veneno de *B. insularis*, *B. jararaca* e *B. alternatus* e são relacionadas aos efeitos hipotensivos do envenenamento por *Bothrops*. No entanto, como no transcriptoma de *B. jararacussu* não foram descritas ESTs para essas proteínas, antes de assumir a ausência em nosso banco, foi feita uma análise

reversa usando a ferramenta BLASTn e comparando várias sequências descritas de mRNAs para BPPs contra o banco de *B. atrox*. Dessa forma, o *contig* BATC51 foi identificado e apresentou o mRNA codificador para o BPP de *B. jararacussu*. A análise do alinhamento mostrou que a identidade do *contig* com a região 3'-UTR, que é particularmente longa em algumas espécies de viperídeos (MURAYAMA et al., 1997; HIGUCHI et al., 1999; SOARES et al., 2005). Esses transcritos contêm várias regiões codificadoras em arranjas em *tandem* em sua região N-terminal, e dessa forma pode inferir que os transcritos correspondentes em *B. atrox* podem se arranjar da mesma maneira, embora seja preciso estudos mais aprofundados para confirmar essa estrutura.

4.5.2.2 Lectinas tipo C

As lectinas são toxinas que desempenham um papel chave no envenenamento, pois exibem diversas atividades coagulantes e anticoagulantes. O transcriptoma de *B. atrox* contém dois *contigs* contendo oito ESTs (BATC30 e 48) e um *singlet* (BATC163) com identidade com lectinas tipo C símile (CLPs), além desses o BATC65 contendo cinco ESTs apresentou identidade com uma lectina verdadeira. Todos os transcritos apresentaram similaridade com domínio de ligação ao carbono CRD (Carbohydrate Recognition Domain) que é comum a essas proteínas. O *contig* BATC30 mostrou-se 60% similar a subunidade α de bothrojaracina (AROCAS et al., 1987), isolada do veneno de *B. jararaca* e que tem duas ações biológicas, liga-se no exosítio 1 da trombina ativada, inibindo a formação de coágulos, ou pode-se ligar-se a protrombina diminuindo sua ativação. Por outro lado o BATC48 mostrou ser similar a botrocetina (USAMI et al., 1991), outra lectina muito similar à bothrojaracina, mas que tem atividade biológica diferente. A botrocetina se liga ao fator de von Willebrand, formando um complexo que induz a agregação plaquetária, através da ligação com a glicoproteína GPIb (SEN et al., 2001).

No banco do GenBank existem dados de cDNA disponíveis apenas para a bothrojaracina que consiste de dois mRNAs diferentes codificadores para as cadeias distintas α e β da proteína que são ligadas por uma única ponte dissulfeto. A botrocetina também é uma proteína heterodimérica e suas estruturas, terciária e quaternária, são muito similares. Assim, embora os dois *contigs* tenham sido separados pela anotação automática como dois transcritos codificadores para

proteínas diferentes, temos que considerar que a glândula de veneno de *B. atrox* possa expressar as duas toxinas ou os transcritos encontrados possa ser a mensagem para as duas cadeias de uma mesma proteína. Os alinhamentos mostram que ambos os *contigs* compartilham o mesmo padrão de cisteínas das toxinas citadas, mas alguns aminoácidos mutados sugerem a necessidade de sucessivos seqüenciamentos a fim de confirmar se são realmente modificações ou artefatos da técnica de sequenciamento.

Finalizando as similaridades com lectinas tipo C símile, o *singlet* BATC163 possui 74% de similaridade com a stejaggregin-A cujo cDNA foi isolado a partir da glândula de veneno de *Trimeresurus stejnegeri* (LEE et al., 2003). Como não existem estudos funcionais pra essa proteína, pois a mesma nunca foi purificada do veneno. Sua tradução conceitual do cDNA mostrou que tem a estrutura semelhante à rhodocetina, um antagonista específico da integrina $\alpha 2\beta 1$ (EBLE et al., 2009). A rhodocetina teve sua estrutura resolvida e embora seja um tetrâmero, duas de suas cadeias (γ e δ) são homólogas várias proteínas CLPs. O alinhamento do *singlet* com as duas outras seqüências citadas mostrou grande similaridade, com as cisteínas conservadas na mesma posição. Dessa forma, por similaridade, acredita-se que a toxina de nosso banco possivelmente tenha a mesma estrutura e atividade coagulante das proteínas da família lectinas tipo C símile.

O terceiro *contig* a apresentar similaridade com lectinas foi o BATC65 com 91% de identidade com a toxina denominada BiL, isolada do veneno de *B. insularis* (GUIMARÃES-GOMES et al., 2004). Diferente da bothrojaracina e botrocetina que são lectinas tipo C símile, a BiL é uma lectina verdadeira que se liga a sacarídeos e tem atividade hemaglutinadora na presença de Ca^{++} . Essa toxina é uma proteína homodimérica que possui oito pontes de dissulfeto intracadeia e uma intercadeias na posição Cys109. O alinhamento da seqüência da BiL com o *contig* BATC65 permitiu a identificação do transcrito com os nove resíduos conservados e os aminoácidos do sítio de ligação ao carbono (CRD) chave dos sítios de reconhecimento do sacarídeo e de ligação ao cálcio.

4.5.2.3 Serinoproteinases

As serinoproteinases afetam a hemostase e assim como as lectinas agem na cascata de coagulação, mas predominantemente agem como anticoagulantes (MARKLAND, 1998). Em nosso banco foram anotados dezessete ESTs reunidas em três *contigs* e um *singlet* codificadores para essas proteínas. O veneno de *B. jararaca* é abundante em serinoproteinases (SAGUCHI et al., 2005), algumas isoladas e com atividade biológica estudada. No presente trabalho foram anotados dois *contigs*, BATC20 e 66, com identidade com precursores de das serinoproteinases HS112 e HS114 (SAGUCHI et al., 2005), respectivamente. Essas proteínas foram identificadas na biblioteca de cDNA da glândula de veneno daquela espécie, e suas sequências deduzidas mostraram grande similaridade com a toxina KN-BJ2 isolada e com atividade proteolítica sobre o fibrinogênio humano (SERRANO et al., 1998). A comparação dos *contigs* com as sequências das toxinas descritas revelou índice de similaridade de 85% e 82%, respectivamente. Foram identificados a presença dos resíduos His e Asp da tríade catalítica His-Asp-Ser. Não foi possível determinar a presença do terceiro resíduo Ser devido à sequência não estar completa. Os resíduos de cisteína conservados característicos de proteínas trombina-símile, também não puderam ser determinados pelo mesmo motivo anteriormente citado, sendo que no BATC20 foram identificadas oito posições conservadas e no BATC66 foram identificadas seis posições. Dado que os resultados do seqüenciamento de nossos *contigs* são ESTs não esperamos obter sequências completas das toxinas em questão, a não identificação do terceiro resíduo catalítico, de acordo com dados de atividade do veneno bruto, bem como do isolamento de uma toxina com atividade trombina-símile de espécies coletadas da região de Manaus (CAVINATO et al., 1998), acredita-se que os transcritos presentes na biblioteca representam toxinas ativas.

O *contig* BATC58 apresentou similaridade com a toxina BthaTL de *B. alternatus* (VITORINO-CARDOSO et al., 2006). Como nos casos anteriores, essa toxina não foi isolada a partir do veneno, foi identificada a partir da clonagem do cDNA da glândula de veneno. Comparando o *contig* de nosso banco com a sequência de DNA obteve um índice de similaridade de 84%. O alinhamento das sequências deduzidas mostrou o mesmo padrão de seis pontes dissulfeto características das enzimas trombina-símile. Uma característica diferente observada no *contig* foi a substituição

do resíduo His40 por Gln40 na tríade catalítica da enzima que também foi observada por Saguchi et al. (2005) em *B. jararaca*. Essa substituição pode acarretar a perda de função catalítica, mas também pode indicar outra função tóxica com mecanismo de ação não enzimático, uma vez que foi verificado na proteína C que uma mutação no sítio catalítico não aboliu sua atividade biológica (GALE et al., 1997). O *singlet* BATC149 foi a EST que apresentou um pequeno índice de similaridade com a enzima trombina-símile de *Deinagkistrodon acutus* (ZHA et al., 2006). A análise do alinhamento da tradução conceitual das sequências permitiu apenas a identificação da região C-terminal da proteína, com dois resíduos de cisteína e a Ser179 do sítio catalítico. Essa informação não permitiu inferir nenhuma propriedade a respeito desse transcrito, exceto que codifica para o que provavelmente é uma serinoproteinase trombina-símile.

4.5.2.4 Metaloproteinases

O resultado da anotação dos transcritos para metaloproteinases mostrou que a glândula de *B. atrox* possui o segundo maior conteúdo entre os transcriptomas de *Bothrops* descritas até o momento (Figura 18).

Figura 18 – Conteúdo de transcritos para metaloproteinases em cinco espécies de Bothrops

Considerando as ESTs codificadoras para essa família de toxinas, obteve-se um total de 130 clones, reunidos em oito *contigs* e quatro clones na forma de *singlets*.

O número pequeno de *contigs* com alta quantidade de clones (Figura 19) permitiu inferir que devido à metodologia de ESTs permitir apenas a identificação de uma parte da sequência, e as metaloproteinases serem toxinas multidomínios com grande variabilidade e mRNAs longos, pequenas diferenças indicativas de isoformas da mesma família podem não ter sido detectadas.

Foi observado que a maioria dos *contigs* apresentou identidade com metaloproteinases do tipo PIII, um único apresentou identidade com precursor para o tipo PII e um *singlet* com precursor do tipo PI. Por outro lado, não foram observados *contigs* ou mesmo *singlets* com identidade com as enzimas do tipo PIV.

As metaloproteinases do tipo PIII são consideradas as hemorraginas mais potentes de todas as classes (FOX; SERRANO, 2005). O *contig* BATC16 que agrupou a maioria das sequências (55%) e apresentou 85% de similaridade com os domínios metaloproteinase e desintegrina da toxina Jararhagina de *B. jararaca* (PAINE et al., 1992) que inibe a agregação plaquetária induzida pelo colágeno tipo I, ligando-se à integrina $\alpha_2\beta_1$ (ZIGRINO et al., 2002). O alinhamento dessas regiões da sequência (Figura 09) mostrou domínio que o *contig* possui a sequência consenso do sítio de ligação ao zinco HEMGHNMGIIHH e o motivo ECD do domínio desintegrina símile. No domínio metaloproteinase foram identificadas, seis das sete cisteínas nas posições conservadas incluindo a C195, que parece ser sinal proteólise e liberação do desintegrina símile juntamente com domínio rico em cisteína (domínio DC), característico da classe PIIIa (FOX; SERRANO, 2005). Segundo Usami et al. (1994) a Jararhagina está presente no veneno nas formas íntegra e processada, denominada Jararhagina-C. Isso pode ser um indicativo de que existam várias isoformas da proteína no mesmo veneno. Essas isoformas seriam resultado de pareamentos alternativos das várias cisteínas presentes em sua sequência, levando a dobramentos alternativos que poderiam deixar a proteína mais exposta ou resistente à autólise (MOURA-DA-SILVA et al., 2003). Dessa forma, devido à grande semelhança de sequências entre Jararhagina e a metaloproteinase representada pelo BACTC16 a toxina do veneno de *B. atrox* deve sofrer o mesmo processo, e isso pode ser reforçado pela grande quantidade de sequências agrupadas no mesmo

contig. Outro fato que reforça essa possibilidade é que o *contig* apresentou tradução com identidade com jararhagina em duas janelas de leitura diferentes.

Figura 19 – Percentagens de transcritos com identidade com metaloproteinases descritas.

Os *contigs* BATC41, BATC47 e o *singlet* BATC255 se mostraram similares a proteínas indutoras de apoptose. O BATC41 com identidade (89%) com a metaloproteinase o domínio *Cys-Rich* de Halysase de *Gloydius halys* uma metaloproteinase da classe PIII que demonstrou inibir a agregação plaquetária e induzir apoptose em células endoteliais in vitro, em condições onde a atividade enzimática foi abolida, indicando o envolvimento dos domínios DC nessa atividade. (YOU et al., 2003). O BATC47 teve identidade com a proteína indutora de apoptose vascular H1V de *Trimeresurus flavoviridis* que é homóloga à VAP1(MASUDA et al., 2001). Ambas pertencem a classe PIIIb (FOX; SERRANO, 2005) e também induzem a apoptose de células endoteliais. O alinhamento das sequências mostrou que a identidade no domínio desintegrina completo e parte do domínio ACR com a sequência ECD e cisteínas nas posições conservadas. Cabe salientar que VAP1 e H1V são proteínas diméricas e não sofrem processamento. O *singlet* BATC255 por sua vez mostrou similaridade com toxina VLAIP-B isolada do veneno de *Macrovipera lebetina* (TRUMAL et al., 2005). O alinhamento das sequências alcançou 56% de similaridade com as regiões do pro-peptídeo e parte do domínio metaloproteinase. A

toxina induz a apoptose em células endoteliais impedindo que as mesmas se anexam na matriz. Além disso, é capaz de clivar o fibrinogênio e não clivar a fibrina.

A metaloproteinase denominada BOJUMET II de *B. jararacussu* é resultado da tradução conceitual de um dos transcritos descritos na biblioteca de cDNA dessa espécie (KASHIMA et al., 2004). O *contig* BATC44 apresentou alta identidade com os domínios desintegrina e ACR (89%), sendo as sequências consenso ECD idênticas. Uma vez que essa metaloproteinase não foi isolada do veneno, não existem relatos sobre sua atividade biológica, apenas foi possível inferir que pelas posições das cisteínas, a toxina expressa no veneno de *B. atrox* não é processada para a forma DC.

Ao *contig* BATC61 foi atribuída a similaridade com a toxina HF3 de *B. jararaca* o que também ocorreu com o *singlet* BATC187. No *contig* a similaridade identificada foi com o domínio ACR com um índice de 89% e no *singlet* com os domínios desintegrina e ACR com 84%. A HF3 é uma toxina da classe PIII, a mais potente do veneno de *B. jararaca* (ASSAKURA et al., 1986) e além de inibir a agregação plaquetária induz o aumento da atividade fagocitária em macrófagos (SILVA et al., 2004). O alinhamento do BATC61 permitiu identificar no domínio ACR nove cisteínas das doze esperadas para o padrão de 12 pontes (MACKESSY et al., 2010), devido à sequência não estar completa. No *singlet* 187 os domínios metaloproteinase e ACR também seguiram o mesmo padrão de distribuição de cisteínas, no entanto no domínio desintegrina foram identificadas apenas 14 resíduos, a exceção da cisteína presente no motivo de ligação à integrina ECD. Com esse padrão seriam formadas sete pontes dissulfeto que é característica de uma toxina da classe PII, assim o transcrito de *B. atrox* poderia ser agrupado com a kaouthiagina (HAMAKO et al., 1998; ITO et al., 2001) e BjussMP-I (MAZZI et al., 2006), classificadas como PIII metaloproteinases incomuns devido a diferenças de padrão de sequências no domínio desintegrina (MACKESSY et al., 2010).

No *contig* BATC19 foi observada a similaridade com parte do domínio desintegrina e o domínio ACR completo da toxina HR1a de *Trimeresurus flavoviridis* (KISHIMOTO; TAKAHASHI et al., 2002). O alinhamento de sequências mostrou os doze resíduos de cisteínas correspondentes às seis pontes dissulfeto padrão do domínio. O *contig* BATC62 apresentou similaridade com a desintegrina jararacina que é a forma processada de uma metaloproteinase da classe PIII e também inibe a agregação plaquetária. O alinhamento foi possível apenas numa região do domínio

metaloproteinase, onde foram identificados quatro resíduos de cisteína quem formam duas pontes dissulfeto.

Um único *contig* na biblioteca foi identificado como possível homólogo de uma toxina da classe PII. O BATC01 foi o segundo *contig* mais representativo em termos de números de ESTs representando aproximadamente 15% do total de transcritos de metaloproteinases. A identidade anotada desse *contig* foi com o pro-peptídeo da toxina bothrostatina (FERNANDEZ et al., 2005), uma toxina da classe PIIa recombinante, de ação hemorrágica *in vitro* via inibição da agregação de plaquetas. Uma vez que esse *contig* continha muitas sequências, foi feita uma análise manual com as ESTs que possibilitou a obtenção de três *contigs* alternativos, que, no entanto apresentaram similaridade com a mesma região do pro peptídeo de várias metaloproteinases. Uma vez que a região mencionada é comum a todas as metaloproteinases, não foi possível identificar regiões da sequência a fim de inferir alguma possível propriedade da toxina expressa por *B. atrox*.

Assim como no caso dos transcritos para metaloproteinases classe PII, foi encontrado um *singlet* com identidade com uma toxina da classe PI. O BATC213 mostrou similaridade com domínio metaloproteinase do cDNA da toxina de *B. insularis* onde foram identificados sete resíduos de cisteína, e três pontes de dissulfeto.

Como mencionado anteriormente, não foram identificados precursores para toxinas da classe PIV, nenhum transcrito mostrou identidade com as toxinas russelysina e VLFXA que são as únicas toxinas dessa classe até momento isoladas e descritas. No entanto como as metaloproteinases são alvo de freqüentes modificações pós traducionais, recentes descobertas dão indícios que as toxinas PIV podem ser na verdade toxinas da classe PIII que após a tradução se ligam a cadeias de lectinas tipo C, dando origem à toxina ativa (FOX; SERRANO, 2005).

4.5.2.5 Fosfolipase A₂

Os transcritos representativos das fosfolipases A₂ foram o segundo maior conteúdo com 14% do total das toxinas resultando em um único *contig*, BATC21, agrupando 28 ESTs. A similaridade identificada desse *contig* foi com a toxina Batha-I-PLA₂ isolada do veneno de *B. jararacussu*, uma fosfolipase Asp49, com atividade catalítica e sem atividade miotóxica. Foi verificado também que a mesma tem atividade hipotensiva e inibitória da agregação plaquetária (ANDRIÃO-ESCARSO et

al., 2002). O *contig* apresentou 76% de similaridade com a toxina descrita e a tradução conceitual mostrou, após o alinhamento foram identificadas as posições conservadas do sítio catalítico His48 e ligação ao cálcio Asp49, Tyr28, Gly30 e Gly32. Uma particularidade observada na sequência do *contig* foi uma substituição da Tyr19 para Phe19 na região do canal hidrofóbico (SCOTT et al., 1990). Podemos inferir que essa substituição possa acarretar na atividade enzimática da toxina, pois embora a substituição seja conservativa, pois ambos os aminoácidos são aromáticos, a Phe tem um caráter mais hidrofóbico que a Tyr. A possibilidade erro de sequenciamento foi afastada com a inspeção da região correspondente em várias ESTs do *contig*.

O veneno de *B. atrox* possui uma ação fortemente necrosante e as fosfolipases estão fortemente envolvidas nessa atividade. Lopez-Lozano et al. (2000) isolaram duas isoformas de fosfolipases do veneno dessa espécie, sendo uma delas miotóxica. Embora não tenha sido identificados transcritos para esse tipo de toxina, as fosfolipases são caracterizadas por possuíres várias isoformas no veneno, assim, a seleção e sequenciamento de outros clones poderão viabilizar a identificação de transcritos para a miotoxina.

5 DISCUSSÃO

Os resultados aqui apresentados foram comparados com os obtidos em trabalhos semelhantes com várias espécies de viperídeos, mas principalmente com as quatro espécies do gênero *Bothrops* (JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO; HO, 2002; KASHIMA et al., 2004; CIDADE et al., 2006; CARDOSO et al., 2010). Essa comparação permitiu a visualização de um painel com várias semelhanças, mas também grandes diferenças.

Algumas ocorrências foram bastante interessantes como a presença de um transcrito para fosfolipase B, que pelo que se pode apurar a primeira descrita no gênero *Bothrops*. Foi também encontrado um *contig* com duas ESTs possivelmente codificadoras para uma fosfolipase A₂ citosólica (cPLA₂). Existem evidências de que fosfolipases citosólicas agem como sinalizadoras em conjunto com fosfolipases A₂ secretadas na via de biosíntese de prostraglandinas (MURAKAMI et al., 2001). A presença dessas duas toxinas no veneno poderia contribuir para o intenso efeito necrosante do veneno de *B. atrox*, no entanto como as mesmas nunca foram

isoladas do veneno são necessárias investigações mais profundas a respeito desses transcritos de confirmar a expressão no veneno ou se não, qual seu papel no tecido glandular.

Grande parte dos transcritos de proteínas relacionadas a vias conhecidas de processos celulares encontradas na glândula de *B. atrox* foi descrita na outras espécies do gênero, o que mostra quais moléculas estão envolvidas nos principais processos fundamentais de formação e secreção do veneno, como o processamento e enovelamento de toxinas.

A presença de alguns mRNAs relacionados transcriptases reversas e transposases sugere a presença de retroelementos na células da glândula de veneno dessa serpente. Esses elementos que também foram identificados em outros transcriptomas como *B. gabonica*, *L. muta*, *D. acutus* e *S. catenatus edwardsii* (PAHARI et al., 2007) estão relacionados a geração de diversidade de genes codificadores para as toxinas. O embaralhamento de éxons causado pela inserção desses elementos é responsável por muitos mecanismos de origem de novos genes em invertebrados, vertebrado e plantas (LONG, 2000; LONG et al., 2003). Essa duplicação de genes, juntamente com a evolução acelerada representa mecanismos geradores da grande variabilidade observada nas toxinas de venenos descritas até o momento.

Em se tratando de toxinas a característica mais marcante foi a grande quantidade de transcritos para metaloproteinases que representaram 21% do transcriptoma e 60% das toxinas, e é o segundo maior entre as espécies de *Bothrops* (Figura 14). Outro aspecto que mereceu atenção foi a grande quantidade de transcritos reunidos em pouco *contigs*, como os *contigs* BATC01, BATC16 e BATC62 de metaloproteinases e o BATC21 de fosfolipases. Tal fato pode ser um indicativo de várias isoformas para a mesma toxina e merece uma investigação mais apurada a fim de se confirmar tal hipótese.

Nossos dados corroboram os vários resultados obtidos no estudo proteômico (GUÉRCIO et al., 2006). As toxinas minoritárias como serinoproteinases, lectinas do tipo C, L aminoácido oxidases, proteínas ricas em cisteínas (CRISPs) e fatores de crescimento de endotélio foram identificadas no transcriptoma. Os grupos de LAOs e CRISPs foram os mesmos identificados em ambos os trabalhos, já nos grupos de serinoproteinases houveram diferenças quando comparados proteoma e transcriptoma. Dos quatro grupos descritos no proteoma, não foram identificados

nenhuma EST ou *contig*, e essa diferença pode ser explicada pela alta similaridade de sequências dessas toxinas que pode dificultar a discriminação entre elas como técnica de sequenciamento empregada. Essa mesma limitação pode ter dificultado também a discriminação na identificação das lectinas.

Esse transcriptoma também revelou um padrão de expressão quase exclusivamente de metaloproteinases da classe PIII, muito semelhante a *B. insularis* e *B. alternatus*. Como são consideradas as mais potentes hemorraginas, essa predominância contribuiria para o efeito comprovadamente mais tóxico do veneno de *B. insularis* em comparação com o de *B. jararaca* (MELGAREJO, 2003). Cabe aqui salientar que a presença de um grande número de transcritos para determinadas tipos ou subtipos de metaloproteinases não necessariamente se correlaciona com a presença das mesmas no veneno, uma vez que modificações pós traducionais ocorrem frequentemente com essas toxinas. No entanto é bastante interessante que espécies que habitam ecossistemas muito diferentes entre si apresentem perfis de expressão tão parecidos. Como foi dito anteriormente, a composição do veneno sofre influencia de diversos fatores ontogenéticos e epigenéticos e no caso de *B. insularis* o endemismo, a alta densidade populacional e a restrição da dieta a determinados tipos de presa parece influenciar fortemente o conteúdo de toxinas em seu veneno. Por outro lado, no habitat de *B. atrox* é grande a diversidade na oferta de presas e, portanto, outro fator como o tipo de presa podem contribuir para esse padrão de expressão em metaloproteinases semelhante nas duas espécies. Sabe-se que indivíduos juvenis costumam alimentar-se de répteis e anfíbios, trocando a preferência por mamíferos quando adultos (DALTRY et al., 1996), e foi demonstrado que há uma variação no conteúdo e tipos de metaloproteinases dessa espécie durante o desenvolvimento (LOPEZ-LOZANO et al., 2002). Ainda corroborando dados de proteoma, foi identificada uma grande concentração de metaloproteinases da classe PIII indicadas nos grupos A, C, L, M e P correspondentes a jararhagina, bothropasina, berintractivase, ativador do fator X e BOJUMET II no veneno de indivíduos juvenis e sub adultos. Esse padrão muda no indivíduo adulto onde foi identificado um maior conteúdo de toxinas da classe PI.

Os níveis de expressão de transcritos para fosfolipases A_2 por sua vez, apresentou-se menor apenas do que o encontrado em *B. jararacussu*, que expressa quase que exclusivamente fosfolipases A_2 em seu veneno. A identificação de apenas um *contig* com similaridade com uma fosfolipase A_2 com atividade enzimática

(Asp49) apesar de ter sido isolada do veneno uma miotoxina não foi surpreendente uma vez que existem várias isoformas dessas enzimas em um mesmo veneno. Além disso, Alape-Giron et al. (2008) observaram em *B. asper* uma diferença na expressão de fosfolipases, havendo uma troca do tipo Asp49 em indivíduos juvenis para Lys49 em adultos. A espécie *B. asper* é filogeneticamente muito próxima de *B. atrox* (CASTOE; PARKINSON, 2006), a expressão em *B. atrox* pode ter um padrão parecido. Essa hipótese é reforçada pelo estudo proteômico, onde as fosfolipases foram agrupadas em cinco grupos um deles representado por enzimas Asp49 e identificado apenas no veneno de juvenis e sub adultos. Vale lembrar nesse ponto que o foi utilizado um único indivíduo macho e sub adulto para a construção da biblioteca, de maneira que os níveis de expressão da miotoxina podem ter sido tão baixos que não foram detectados nos clones selecionados para o sequenciamento.

6 CONCLUSÕES

A espécie *B. atrox*, predominante na região amazônica é a de maior importância médica, especialmente no Estado do Amazonas. O presente trabalho mostra um painel com o catálogo de transcritos comumente expressos na glândula de veneno dessa serpente, e representa o primeiro banco de dados dessa natureza de uma espécie da floresta amazônica (*rainforest*).

Encontramos altos níveis de metaloproteinases, o segundo maior dentro do gênero até o momento descrito. As toxinas de classe PIII representaram 72% do total de transcritos para essas toxinas e são consideradas as mais hemorrágicas.

A identificação de um único *contig* com muitas sequências com identidade com fosfolipases A₂ foi um achado que mereceu atenção por ser um possível indicativo da presença de várias isoformas muito semelhantes no veneno dessa serpente.

Os transcritos para serinoproteinases, lectinas confirmaram as atividades coagulantes observadas no quadro clínico do envenenamento dessas serpentes.

Foram identificados transcritos para toxinas como LAAOs, BPPs e CRISPs, que embora minoritárias, também fornecem indícios para o entendimento de certos aspectos clínicos, como hipotensão, efeitos anticoagulantes e citotóxicos.

Aspectos de processos celulares comuns na glândula de veneno puderam ser confirmados com a identificação de proteínas especializadas na transcrição,

enovelamento e formação de pontes dissulfeto, além da presença de transcritos relacionados a elementos transponíveis, considerados importantes nos processos evolutivos das toxinas.

Algumas ocorrências incomuns também foram identificadas como a presença de um transcrito para uma fosfolipase citosólica e outro para uma fosfolipase B.

O banco de dados obtido e aqui apresentado contribuirá para dar suporte a dados obtidos por técnicas proteômicas bem como para o entendimento das manifestações clínicas causadas pelo envenenamento dessa espécie.

O conhecimento das sequências codificadoras das toxinas constituintes permite a produção por técnicas de clonagem e expressão, o que possibilita a obtenção de grandes quantidades de proteínas para o estudo de seus mecanismos de ação. Por sua vez esse conhecimento pode levar ao desenvolvimento de antagonistas específicos, que possam ser utilizados em conjunto com a soroterapia, em casos onde o soro sozinho não é capaz de abolir a atividade biológica das toxinas.

Finalmente mas não menos importante, as sequências dessa biblioteca poderão também ser utilizadas em estudos que visam compreender a origem da diversidade das toxinas e de relações filogenéticas dentro do gênero.

REFERÊNCIAS*

ADAMS, M. D. et al. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. **Science**, v. 252, n. 5013, p. 1651-1656, 1991.

ALAPE-GIRON, A.; SANZ, L.; ESCOLANO, J.; FLORES-DÍAZ, M.; MADRIGAL, M., SASA, M.; CALVETE, J. J. Snake venomomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*: geographic, individual, and ontogenetic variations. **J. Proteome Res.**, v. 7, p. 3556–3571, 2008.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389–3402, 1997.

ALVES, R. M. **Isolamento e caracterização bioquímica e funcional de L-aminoácido oxidase do veneno de *Bothrops atrox***. 2007. 110 f. Dissertação (Mestrado em Toxicologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007

ANDE, S. R.; KOMMOJU, P. R.; DRAXYL, S.; MURKOVIC, M.; MACHEROUX, P.; GHISLA, S.; FERRANDO-MAY, E. Mechanisms of cell death induction by L-amino acid oxidase, a major component of ophidian venom. **Apoptosis**, v. 11, p. 1439–1451, 2006.

ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; ANGULO, Y.; DIAZ, C. ; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Myotoxic phospholipases A2 in *Bothrops* snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie**, v. 82, p. 755–763, 2000.

AROCAS, V.; ZINGALI, R. B.; GUILLIN, M. C.; BON, C.; JANDROT-PERRUS, M. Bothrojaracin: A potent two-site directed thrombin inhibitor. **Biochemistry**, v. 35, p. 9083–9089, 1996.

AROCAS, V.; CASTRO, H. C.; ZINGALI, R. B.; GUILLIN, M. C.; JANDROT-PERRUS, M.; BON, C.; WISNER, A. Molecular cloning and expression of bothrojaracin, a potent thrombin inhibitor from snake venom **Eur. J. Biochem.**, v. 248, n. 2, p. 550-557, 1987.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referência: elaboração. Rio de Janeiro, 2002

ASSAKURA, M. T., FURTADO, M. F. D., MANDELBAUM, F. R. Biochemical and biological differentiation of the venoms of the lancehead vipers (*Bothrops atrox*, *Bothrops asper*, *Bothrops marajoensis* and *Bothrops moojeni*). **Comp. Biochem., Physiol. B Comp. Chem.**, v. 102, p. 727–732, 1992.

ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P.; MANDELBAUM, F. R. Comparison of immunological, biochemical and biophysical properties of three hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops jararaca* (jararaca) **Toxicon**, v. 24, p. 943-946, 1986

AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P.; COIMBRA, T. M.; HERING, S. E.; ROSSI, M. A.; LAURE, C. J. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American Rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil, **Toxicon**, v. 4, p. 631-636, 1985.

BABU, A. S.; GOWDA, T. V. Dissociation of enzymatic activity from toxic properties of the most basic phospholipase A2 from *Vipera russelli* snake venom by guanidination of lysine residues. **Toxicon**, v. 32, p. 749–752, 1994.

BALSINDE, J.; BALBOA, M. A.; INSEL, P. A.; DENNIS, E. A. Regulation and inhibition of phospholipase A2. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 39, p.175–189. 1999.

BARRET, A. J.; RAWLINGS, N. D.; WOESSNER, J. F. **Handbook of proteolytic enzymes**. London: Academic Press, 1998.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Snake venom metalloendopeptidases: Reprolysins. **Methods Enzymol.** v. 248, p. 345–368, 1995.

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

BON, C. Multicomponent neurotoxic phospholipases A2. In: KINI, R. M. (Ed.) **Phospholipase A2 enzymes: Structure, function and mechanism**. Chichester: John Wiley & Sons. 1997. p.269–285

BRÍGIDO, M. M. et al. Bioinformatics of the *Paracoccidioides brasiliensis* EST Project. **Genetic Molecular Research** n. 4, p. 203–215, 2005.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The venomous reptiles of Latin America.** Ithaca: Comstock Press, 1989.

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

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.

CASTRO, H. C.; DUTRA, D. L.; OLIVEIRA-CARVALHO, A. L.; ZINGALI, R. B. Bothroaltein, a thrombin inhibitor from the venom of *Bothrops alternatus*. **Toxicon**, v. 36, p. 1903–1912, 1998.

CAVINATO, R. A.; REMOLD, H.; KIPNIS, T. L. Purification and characterization of thrombin like activity from the venom of *Bothrops atrox* of different geographic regions. **Toxicon**, v. 36, p. 257-268, 1998.

CHATRATH, S. T. et al. Identification of Novel Proteins from the Venom of a Cryptic Snake *Drysdalia coronoides* by a Combined Transcriptomics and Proteomics Approach **Journal of Proteome Research**, v. 10, p. 739-759, 2011.

CHIJIWA, T.; TOKUNAGA, E.; IKEDA, R.; TERADA, K.; OGAWA, T.; ODA-UEDA, N.; HATTORI, S.; NOZAKI, M.; OHNO M. Discovery of novel [Arg49] phospholipase A2 isozymes from *Protobothrops elegans* venom and regional evolution of Crotalinae snake venom phospholipase A2 isozymes in the southwestern islands of Japan and Taiwan. **Toxicon**, v. 48, p. 672–682, 2006.

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

CHOUMCZYNSKI, P; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal. Biochem.**, v. 162, p. 156-159, 1987.

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

CINTRA, A. C.; VIEIRA, C. A.; GIGLIO, J. R. Primary structure and biological activity of bradykinin potentiating peptides from *Bothrops insularis* snake venom **J. Protein Chem.** v. 9, p. 221-227, 1990.

DALTRY, J. C.; WUSTER, W.; THORPE, R. S. Diet and snake venom evolution. **Letters to Nature** n. 379, p. 537–540, 1996.

DE CARVALHO, D. D.; SCHMITMEIER, S.; NOVELLO, J. C.; MARKLAND, F. S. Effect of BJcuL (a lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*) on adhesion and growth of tumor and endothelial cells. **Toxicon**, v. 39, p. 1471–1476, 2001.

DOERY, H. M.; PEARSON, J. E. Phospholipase B in snake venoms and bee venom. **Biochem. J.**, v. 92, p. 599–602, 1964.

DU, X.; CLEMETSON, K. J. Reptile C-Type Lectins. In: MACKESSY, S. P (Ed.). **Handbook of venom and toxins of reptiles**. Florida: CRC Press, 2009. p. 359–375

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

DUVERNELL, D. D.; TURNER, B. J. Swimmer 1, a new low-copy-number LINE family in teleost genomes with sequence similarity to mammalian L1. **Molecular Biology and Evolution**, n. 15, p. 1791–1793, 1998.

EBLE, J. A.; NILAND, S.; BRACHT, T.; MORMANN, M.; PETER-KATALINIC, J.; POHLENTZ, G.; STETEFELD, J. The $\alpha 2\beta 1$ integrin-specific antagonist rhodocetin is a cruciform, heterotetrameric molecule. **The FASEB Journal**, v. 23, n. 9, p. 2917–2927, 2009

FERNANDEZ, J. H.; SILVA, C. A.; ASSAKURA, M. T.; CAMARGO, A. C. M.; SERRANO, S. M. T. Molecular cloning, functional expression and molecular modeling of bothrostatin, a new highly active disintegrin from *Bothrops jararaca* venom. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, n. 329 p. 457–464, 2005.

FERREIRA, S. H.; BARTELT, D. C.; GREENE, L. J. Isolation of bradykinin potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. **Biochemistry**, v. 13, p. 2583–2893, 1970.

FERREIRA, L. A. F.; GALLE, A.; RAID, M.; SCHRADER, M.; LEBRUN, I.; HABERMEHL, G. Isolation: Analysis and Properties of Three Bradykinin–Potentiating Peptides (BPP-II, BPP-III, and BPP-V) From *Bothrops neuwiedi* **Venom Journal of Protein Chemistry**, v. 17, p. 285–289, 1998.

FLETCHER, J. E.; SELISTRE DE ARAUJO, H. S.; OWNBY, C. L. Molecular events in the myotoxic action of phospholipases. In: KINI, R. M. (Ed.). **Venom phospholipase A2 enzymes: Structure, function and mechanism**. Chichester: John Wiley & Sons, 1997. p. 455–497.

FOX, J. W. ; SERRANO, S. M. T. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity **FEBS Journal**, v. 275, n. 12, p. 3016-3030, 2008.

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

FRANÇA, S. C.; KASHIMA, S.; ROBERTO, P. G.; MARINS, M.; TICLI, F.K.; PEREIRA, J. O.; ASTOLFI-FILHO, S., STÁBELI, R. G.; MAGRO, A. J.; FONTES, M. R. M.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M. Molecular approaches for structural characterization of *Bothrops* L-amino acid oxidases with antiprotozoal activity: cDNA cloning, comparative sequence analysis, and molecular modeling. **Biochemical and Biophysical Research Comm.**, v. 355, p. 302-306, 2007.

FRANÇA, F.O.S.; FAN, H. W. Acidente Botrópico. In: SCHVARTSMAN, S. (Ed.). **Plantas Venenosas e Animais Peçonhentos**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1992. p. 149-160.

FRANCISCETTI, I. M .B.; MY-PHAM, V.; HARRISON, J.; GARFIELD, M. K.; RIBEIRO, J. M. C. *Bitis gabonica* (Gaboon viper) snake venom gland: toward a catalog for the full-length transcripts (cDNA) and proteins. **Gene**, v. 337, p. 55-69, 2004.

FREEDMAN, R. B.; HIRST, T. R.; TUIE, M. F., Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding. **Trends Biochem. Sci.**, v. 19, p. 331–336, 1994.

FRY, B. G.; WINKEL, K. D; WICKRAMARATNA, J. C.; HODGSON, W. C.; WÜSTER. W. Effectiveness of snake antivenom: species and regional venom variation and its clinical impact. **Journal of Toxicology**, v. 22, p. 23-24, 2003.

FURTADO, M. F.; CARDOSO, S. T.; SOARES, O. E.; PEREIRA, A. P.; FERNANDES, D. S.; TAMBOURGI, D. V.; SANT'ANNA, O. A. Antigenic cross-reactivity and immunogenicity of *Bothrops* venoms from snakes of the Amazon region **Toxicon**, v. 55, p. 881-887, 2010

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

GANEDREN, K.; CARTER, E.; SORREL, T.; WIDMER, F.; WRIGHT, F. Phospholipase B activates enzymes of *Cryptococcus neoformans* human lung epithelial cell lines **Microbes and Infection**, v. 20, p. 1-10, 2006

GOMES, N.; PUERTO, G. Atlas anatômico de *Bothrops jararaca* Wied, 1824 (Serpentes: Viperidae) **Memórias do Instituto Butantan**, v. 55, p. 69-100, 1993

GOWDA, T. V. Interaction of snake venom phospholipase A2 with plant isolates. In: KINI, R. M. (Ed.). **Venom phospholipase A2 enzymes: Structure, function and mechanism**. Chichester: John Wiley & Sons, 1997. p. 205–221.

GREENE, H. W., The ecological and behavioral context of pitviper evolution. In: CAMPBELL, J. A.; BRODIE Jr., E. D. (Ed.). **Biology of the Pitvipers**. Tyler: Selva, 1992. p. 107–118.

GREEN, P. **PHRAP documentation** Available in: <http://www.bozeman.mbt.washington.edu/phrap.docs/phrap.html>. Acesso em: 15 Jul. 2007.

GUBENŠEK, F.; KRIZAJ, I.; PUNGERCAR, J. Monomeric phospholipase A2 neurotoxins. In: KINI, R. M. (Ed.). **Venom phospholipase A2 enzymes: Structure, function and mechanism**. Chichester : John Wiley & Sons, 1997. p. 245–268.

GUÉRCIO, R. A. P. et al. Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. **Proteome Science**, n. 4, p. 1-14, 2006.

GUIMARAES-GOMES, V.; OLIVEIRA-CARVALHO, A.L.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L.; DUTRA, D.L.S; PUJOL-LUZ, M.; CASTRO, H.C.; HO, P.L.; ZINGALI, R.B. Cloning, characterization, and structural analysis of a C-type lectin from *Bothrops insularis* (BiL) venom **Arch. Biochem., Biophys.**, v. 432, n. 1, p. 1-11, 2004.

GUO, M.; TENG, M.; NIU, L.; LIU, Q.; HUANG, Q.; HAO, Q. Crystal structure of the cysteine-rich secretory protein stecrisp reveals that the cysteine-rich domain has a K⁺ channel inhibitor-like fold. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 12405–12412, 2005.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; DIAZ, C., Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon**, n. 45, p. 997–1011, 2005.

GUTIERREZ, J. M.; OWNBY, C. L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A2: Insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon**, v. 42, p. 915–931, 2003.

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

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Local Tissue Damage Induced by Bothrops Snake Venoms. A Review. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 51, p. 211–223, 1989.

GUTIÉRREZ, J. M.; CHAVES, F.; BOLAÑOS, R.; CERDAS, L.; ROJAS, E.; ARROYO, A.; PORTILLA, E. Neutralización de los efectos locales del veneno de *Bothrops asper* por un antiveneno polivalente. **Toxicon**, v. 19, p. 493–500, 1981

HAMAKO, J.; MATSUI, T.; NISHIDA, S.; NOMURA, S.; FUJIMURA, Y.; ITO, M.; OZEKI, Y.; TITANI, K. Purification and characterization of kaouthiagin, a von Willebrand factor-binding and cleaving metalloproteinase from *Naja kaouthia* cobra venom **Thromb. Haemost.**, v. 80, p. 499–505, 1998.

HAYASHI, M.A. et al. The C-type natriuretic peptide precursor of snake brain contains highly specific inhibitors of the angiotensin-converting enzyme, **J. Neurochem.**, v. 85, n. 4, p. 969–977, 2003.

HIGUCHI S; MURAYAMA N; SAGUCHI K; OHI, H; FUJITA Y; CAMARGO ACM et al. Bradykinin-potentiating peptides and C-type natriuretic peptides from snake venom. **Immunopharmacology**, v. 44, p. 129–135, 1999

HITE, L. A.; J. W, FOX,; BJARNASON, J. B. A new family of proteinases is defined by several snake venom metalloproteinases. **Biol. Chem. Hoppe Seyler**, v. 373, p. 381–385, 1992a.

HITE, L. A.; SHANNON, J. D.; BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Sequence of a cDNA clone encoding the zinc metalloproteinase hemorrhagic toxin e from *Crotalus atrox*: Evidence for signal, zymogen, and disintegrin-like structures. **Biochemistry**, v. 31, p. 6203–6211, 1992b.

HOGUE, A. R. Preliminary account on Neotropical Crotalinae (Serpentes: Viperidae). **Mem. Inst. Butantan**, v. 32, p. 109-184, 1965.

HUANG, K. F.; CHIOU, S. H.; KO, T. P.; YUAN, J. M.; WANG, A. H. The 1.35 Å structure of cadmium substitute TM-3, a snake-venom metalloproteinase from Taiwan habu: Elucidation of the TNF α -converting enzyme-like active-site structure with a distorted octahedral geometry of cadmium. **Acta Cryst.**, D58, p. 1118–1128, 2002.

HUANG X.; MADAN A. CAP3: a DNA sequence assembly program. **Genome Research**, n. 9 p. 868–877, 1999.

ITO, M.; HAMAKO, J.; SAKURAI, Y.; MATSUMOTO, M.; FUJIMURA, Y.; SUZUKI, M.; HASHIMOTO, K.; TITANI, K.; MATSUI, T. Complete amino acid sequence of kaouthiagin, a novel cobra venom metalloproteinase with two disintegrin-like sequences. **Biochemistry**, v. 40, p. 4503-4511, 2001.

JALKANEN, J.; HUHTANIEMI, I.; POUTANEN, M. Mouse cysteine-rich secretory protein 4 (CRISP4): A member of the crisp family exclusively expressed in the epididymis in an androgen-dependent manner. **Biol. Reprod.**, v. 72, p. 1268–1274, 2005

JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M et al. *Lachesis muta* (Viperidae) cDNAs Reveal Diverging Pit Viper Molecules and Scaffolds Typical of Cobra (Elapidae) Venoms: Implications for Snake Toxin Repertoire Evolution **Genetics**, v. 173, p. 877-889, 2006.

JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; HO, P. L. A survey of gene expression and diversity in the venom glands of the pitviper snake *Bothrops insularis* through the generation of expressed sequence tags (ESTs). **Gene**, n. 299, p. 279-291, 2002.

JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; FARSKY, S. H. P.; OLIVEIRA, M. L. S.; HO, P. L. Molecular cloning and expression of a functional snake venom vascular endothelium growth factor (VEGF) from the *Bothrops insularis*, pit viper. **J. Biol. Chem.**, n. 276, p. 39836–39842, 2001.

KAMIGUTI, A. S.; GALLAGHER, P.; MARCINKIEWICZ, C.; THEAKSTON, R. D. G.; ZUZEL, M.; FOX, J. W. Identification of sites in the cysteine-rich domain of the class PIII snake venom Metalloproteinases responsible for inhibition of platelet function. **FEBS Letters**, n. 549, p.129–134, 2003.

KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R. M.; THEAKSTON, R. D. G.; ZUZEL, M. Insight into the mechanism of hemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v. 34, p. 627-642, 1996.

KASHIMA, S. et al. Analysis of *Bothrops jararacussu* venomous gland transcriptome focusing on structural and functional aspects1: I—gene expression profile of highly expressed phospholipasesA2. **Biochimie**, n. 86, p.211-219, 2004.

KIERSZENBAUM, A. L.; LEA, O.; PETRUSZ, P.; FRENCH, F. S.; TRES, L. L. Isolation, culture, and immunocytochemical characterization of epididymal epithelial cells from pubertal and adult rats. **Proc. Nat. Acad.Sci. USA**, v. 78, p. 1675–1679, 1981.

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

KISHIMOTO, M.; TAKAHASHI, T. Molecular cloning of HR1a and HR1b, high molecular hemorrhagic factors, from *Trimeresurus flavoviridis* venom **Toxicon**, n. 40 v. 9, p. 1369-1375, 2002.

KOUYOUUMDJIAN, J. A.; POLIZELLI, C. Acidentes Ofídicos causados por *Bothrops moojeni*: correlação do Quadro Clínico com o Tamanho da Serpente. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 31, n. 2, p. 84-90, 1989.

KRATZSCHMAR, J.; HAENDLER, B; EBERSPAECHER, U.; ROOSTERMAN, D.; DONNVER, P.; SCHLEUNING, W. D. The human cysteine-rich secretory protein (CRISP) family. Primary structure and tissue distribution of CRISP-1, CRISP-2 and CRISP-3. **Eur. J. Biochem.**, v. 15, p. 827–836, 1996.

LEÃO, L. **Análise transcriptômica das glândulas de veneno da *Micrurus corallinus* (Cobra Coral) e identificação de candidatos antigênicos para um soro alternativo**. 2008. 138 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

LEE, W. H.; ZHUANG, Q. Y.; ZHANG, Y. Cloning and characterization of a blood coagulation factor IX-binding protein from the venom of *Trimeresurus stejnegeri*. **Toxicon**, n. 41, p. 765–772, 2003.

LEE, N.H. et al. Comparative expressed-sequence-tag analysis of differential gene expression profiles in PC-12 cells before and after nerve growth factor treatment **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 8303-8307, 1995.

LOMONTE, B. **Tissue damage and inflammation induced by snake venoms**. 1994. 88 p. Ph. D. Thesis (Immunology) – Immunology Department, Göteborg University, Göteborg, 1994.

LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J. M.; MORENO, E.; CERDAS, L. Antibody neutralization of a myotoxin from the venom of *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon**, v. 25, p. 443-449, 1987.

LONG, M.; BETRAN, E.; THORNTON, K.; WANG, W., The origin of new genes: glimpses from the young and old. **Nat. Rev. Genet.**, v. 4, p. 865–875, 2003.

LONG, M. A new function evolved from gene fusion. **Genome Res.**, v. 10, p. 1655–1657, 2000.

LÓPEZ-LOZANO, J. L. et al. Ontogenetic variation of metalloproteinases and plasma coagulant activity in venoms of wild *Bothrops atrox* specimens from Amazonian rain forest. **Toxicon**, n. 40, p. 997-1006, 2002.

LÓPEZ-LOZANO, J. L.; MORHY, L.; SOUSA, M. V.; FONTES, W.; DIAS, A. K. B.; MUNIZ, E.; BUHRNHEIM, P. Isolation, characterization and N-terminal amino acid sequence of two phospholipases A2 isoforms from *Bothrops atrox* snake venom from Manaus-Brazil. **Toxicon**, v. 38, p. 487-595. Supplement. V symposium of the Brazilian Society on Toxinology, 1998.

LU, Q.; NAVDAEV, A.; CLEMETSON, J. M.; CLEMETSON, K. J. Snake venom C-type lectins interacting with platelet receptors. Structure-function relationships and effects on haemostasis. **Toxicon**, v. 45, p. 1089–1098, 2005.

MACHADO, T. **Filogenia molecular das espécies de Bothrops do grupo neuwiedi (Serpentes, Viperidae)**. 2010. 104 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

MACKESSY, S. P (Ed.). **Handbook of venom and toxins of reptiles** Flórida: CRC Press, 2009.

MALLOW D.; LUDWIG D.; NILSON, G. **True Vipers: Natural History and Toxinology of Old World Vipers**. Florida: Krieger Publishing Company, 2003.

MARAGANORE, J. M.; MERUTKA, G.; CHO, W.; WELCHES, W.; KEZDY, F. J.; HEINRIKSON, R. L. A new class of phospholipases A₂ with lysine in place of aspartate 49. Functional consequences for calcium and substrate binding. **J. Biol. Chem.**, v. 259, p.13839–13843, 1984.

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

MARQUES-PORTO, R.; LEBRUN, I; PIMENTA, D. C. Self-proteolysis regulation in the *Bothrops jararaca* venom: The metallopeptidases and their intrinsic peptidic inhibitor **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 147, p. 424–433, 2008.

MASUDA, S.; HAYASHI, H.; ATODA, H.; MORITA, T.; ARAKI, S. Purification, cDNA cloning and characterization of the vascular apoptosis-inducing protein, HV1, from *Trimeresurus flavoviridis*. **European. J. Biochem.**, v. 268, n. 11 p. 3339–3345, 2001.

MAZZI, M. V. et al. Molecular characterization and phylogenetic analysis of B_jussuMP-I: A RGD-P-III class hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom. **J. Mol. Graph. Model.**, v. 26, p. 69–85, 2006.

MELGAREJO, A. R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MALAQUE, C. M. S.; HADDAD Jr, V. (Ed.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003. p. 72–86.

MILNE, T. J.; ABBENANTE, G.; TYNDALL, J. D. A.; HALLIDAY, J. ; LEWIS, R. J. Isolation and characterization of a cone snail protease with homology to CRISP proteins of the pathogenesis-related protein superfamily. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 31105–31110, 2003.

MOCHCA-MORALES, J.; MARTIN, B. M.; POSSANI, L.D. Isolation and characterization of helothermine, a novel toxin from *Heloderma horridum horridum* (Mexican beaded lizard) venom. **Toxicon**, v. 28, p.299–309, 1990.

MOHAMED, A. H.; KAMEL, A.; AYOBE, M. H. Studies of phospholipase A and B activities of Egyptian snake venoms and a scorpion toxin **Toxicon**, v. 6, p. 293–298, 1969.

MORITA, T. C-type lectin-related proteins from snake venoms. **Curr. Drug Targets Cardiovasc. Haematol.Disord.**, v. 4, p. 357–373, 2004.

MORRISSETTE, J. et al. Primary structure and properties of Helothermine, a peptide toxin that blocks ryanodine receptors. **Biophys. J.**, v. 68, p. 2280–2288, 1995.

MOURA-DA-SILVA, A. M. et al. Evidence for heterogeneous forms of the snake venom metalloproteinase jararhagin: a factor contributing to snake venom variability. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 409, p. 395–401, 2003.

MOURA-DA-SILVA, A.M. et al. Antigenic crossreactivity of venoms obtained from snakes of genus *Bothrops*. **Toxicon**, v. 28, p. 181-188; 1990.

MUNIZ; E. G. et al. Neutralizing potency of horse antiotheropic Brazilian antivenom against *Bothrops* snake venoms from the Amazonian rain forest. **Toxicon**, v. 38, p. 1859-1863, 2000.

MURAKAMI, M.; KUDO, I. Diversity and a regulatory function of mammalian secretory phospholipase A₂s **Adv. Immunol.**, v. 77, p. 163-194, 2001.

MURAYAMA, N.; et al. Cloning and sequence analysis of a *Bothrops jararaca* cDNA encoding a precursor of seven bradykinin-potentiating peptides and a C-type natriuretic peptide. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 94, n. 4, p. 1189–1193, 1997

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

NOBILE, M; NOCET, F; PRESTIPINO, G; POSSANI, L. D. Helothermine, a lizard venom toxin, inhibits calcium current in cerebellar granules. **Exp. Brain Res.**, v. 110, p. 15–20, 1996.

NOBILE, M.; MAGNELLI, V., LAGOSTENA, L.; MOCHCA-MORALES. J; POSSANI L.D.; PRESTIPINO, G. The toxin helothermine affects potassium currents in newborn rat cerebellar granule cells. **J. Membr. Biol.**, v. 139, p. 49–55, 1994

OLIVEIRA, M. E. When and where to find a pitviper: Activity patterns and habitat use of the Lancehead, *Bothrops atrox*, In Central Amazonia, Brazil **Herpetological Natural History**, v. 8, p. 101-110, 2001.

OLSON, J. H.; XIANG, X; ZIEGERT, T.; KITTELSON, A.; RAWLS, A.; BIEBER, A. L.; CHANDLER, D.E. Allurin, a 21-kDa sperm chemoattractant from *Xenopus* egg jelly, is related to mammalian sperm-binding proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, p. 11205–11210, 2001.

OTERO-PATÍÑO, R. et al. The Regional Group on Antivenom Therapy Research (Regather) A randomized, blinded, comparative trial of one pepsin-digested and two whole IgG antivenoms for *Bothrops* snake bites in uraba, Colombia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 58, n.2, p. 183–189, 1998.

PAHARI, S.; MACKESSY, S. P.; KINI, R. M. The venom gland transcriptome of the Desert Massasauga Rattlesnake (*Sistrurus catenatus edwardsii*): towards an understanding of venom composition among advanced snakes (Superfamily Colubroidea) **BMC Molecular Biology**, v. 8, p. 115-132, 2007.

PAINE, M. J.; DESMOND, H. P.; THEAKSTON, R. D.; CRAMPTON, J. M. Purification, cloning, and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloproteinase, jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. Insights into the disintegrin gene family. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 22869–22876, 1992.

PARDAL, P.P.O. et al. Clinical trial of two antivenoms for the treatment of *Bothrops* and *Lachesis* bites in the north-eastern Amazon region of Brazil. **Trans. R.Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 98, p. 28–42, 2004.

PERERA, C.; MCNEIL, H. P.; GECZY, C.L. S100 calgranulins in inflammatory arthritis. **Immunol. Cell Biol.**, v. 88, p. 41–49, 2010.

POLGAR, J. et al. Platelet activation and signal transduction by convulxin, a C-type lectin from *Crotalus durissus terrificus* (tropical rattlesnake) venom via the p62/GPVI collagen receptor. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 13576–13583, 1997.

POLGAR, J.; MAGNENAT, E. M.; PEITSCH, M. C.; WELLS, T. N.; CLEMETSON, K. J. Asp-49 is not an absolute prerequisite for the enzymic activity of low-Mr phospholipases A2: Purification, characterization and computer modelling of an enzymically active Ser-49 phospholipase A2, ecarpholin S, from the venom of *Echis carinatus sochureki* (Saw-scaled viper). **Biochem. J.**, v. 319, p. 961–968, 1996.

PONNUDURAI, G.; M. CHUNG, C. M.; TAN, N. H. Purification and properties of the L-amino acid oxidase from Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*) venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 313, p. 373–378, 1994.

QUEIROZ, G. P.; PESSOA, L. A.; PORTARO, F. C. V.; FURTADO, M. F. D.; TAMBOURGI, D. V. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus **Toxicon**, v. 52, p. 842-851, 2008.

RAWLINGS, N. D.; MORTON, F. R.; KOK, C. Y.; KONG, J. ; BARRETT, A. J. MEROPS: the peptidase database **Nucleic Acids Res.**, v. 36, p. D320–D325, 2008

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Serine peptidases and their clans. In: RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; WOESSNER, J.F. (Ed.) **Handbook of proteolytic enzymes**. 2nd ed. San Diego: Academic Press Ltd, 2004.

ROSENFELD, G. Sintomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: BÜCHERL, W.; BUCKLEY, E. (Ed.). **Venomous animals and their venoms. Venomous vertebrates. Volume II**. New York, London: Academic Press, 1971. p. 346-381.

ROTENBERG, D.; BAMBERGER, E. S.; KOCHVA, E. Studies on Ribonucleic Acid Synthesis in the Venom **Biochem. J.**, v. 121, p. 609-612, 1971.

RUCAVADO, A.; LOMONTE, B; OVADIA, M.; GUTIERREZ. J. M Local tissue damage induced by BaP1, a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* (Terciopelo) snake venom. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 63, p. 186–199, 1995.

SAGUCHI, K. et al. Molecular cloning of serine proteinases from *Bothrops jararaca* venom gland **Toxicon**, v. 46, p. 72-83, 2005.

SALDARRIAGA, M. M.; OTERO, R.; NUÑEZ, V.; TORO, M. F.; DÍAZ, A.; GUTIÉRREZ, J. M. Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colômbia. **Toxicon**, v. 42, p. 405-411, 2004.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T., **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SAMEL, M.; VIJA, H.; RONNHOLM, G.; SUGIIR, J.; KALKKINEN, N.; SUGIIR, E. Isolation and characterization of an apoptotic and platelet aggregation inhibiting L-

amino acid oxidase from *Vipera berus berus* (common viper) venom. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1764, p. 707–714, 2006.

SANDNER-MONTILLA, F. Una nueva especie del género *Bothrops* (Serpentes, Crotalidae, Bothropinae) de La región de Guanare, Estado Portuguesa, Venezuela **Mem. Cient. Ofidiol.**, v. 4, p. 1-19, 1979.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; CALSON, A. R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 74, p. 5463–5467, 1977.

SANTOS-FILHO, N. **Caraterização funcional e estrutural de uma fosfolipase A2 acida tóxica isolada da peçonha de Bothrops moojeni**. 2009. Dissertação (Mestrado em Toxicologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SCHULTZ, J.; COPLEY, R. R.; DOERKS, T.; PONTING, C. P.; BORK, P., SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. **Nucleic Acids Res.**, v. 28, p. 231–234, 2000.

SCOTT, D. L. Phospholipase A2 structure and catalytic properties. In: KINI, R. M. (Ed.). **Venom phospholipase A2 enzymes: Structure, function and mechanism**. Chichester : John Wiley & Sons, 1997. p. 97–128.

SCOTT, D. L.; WHITE, S. P.; OTWINOWSKI, Z.; YUAN, W.; GELB, M. H.; SIGLER, P. B. Interfacial catalysis: The mechanism of phospholipase A2. **Science**, v. 250, p. 1541–1546, 1990.

SEEMANN, J.; WEBER, K.; OSBORN, M.; PARTON, R.G.; GERKE, V. The association of annexin I with early endosomes is regulated by Ca²⁺ and requires an intact N-terminal domain. **Mol. Biol. Cell**, v. 7, p. 1359–1374. 1996.

SEGURA, A. et al. Preclinical assessment of the neutralizing capacity of antivenoms produced in six Latin American countries against medically-relevant *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 56, p. 980-989, 2010.

SEKIYA, F.; ATODA, H.; MORITA T. Isolation and characterization of an anticoagulant protein homologous to botrocetin from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry** v. 32, p. 6892–6897, 1993.

SEN, U.; VASUDEVAN, S.; SUBBARAO, G.; MCCLINTOCK, R. A.; CELIKEL, R.; RUGGERI, Z. M.; VARUGHESE, K. I. Crystal structure of the von Willebrand factor modulator botrocetin. **Biochemistry**, v. 40, p. 345–352, 2001.

SERRANO, S. M. T.; KIM, J.; WANG, D.; DRAGULEV, B.; SHANNON, J. D.; MANN, H. H.; VEIT, G.; WAGENER, R.; KOCH, M.; FOX, J. W. The cysteine-rich domain of snake venom metalloproteinases is a ligand for von Willebrand factor A domains: Role in substrate targeting. **J. Biol. Chem.**, v. 281, p. 39746–39756, 2006.

SERRANO, S. M. T.; JIA, L. G.; WANG, D.; SHANNON, J. D.; FOX, J. W. Function of the cysteine-rich domain of the haemorrhagic metalloproteinase atrolysin A: Targeting adhesion proteins collagen I and von Willebrand factor. **Biochem. J.**, v. 391, p.69–76, 2005.

SERRANO, S. M. T.; REICHL, A. P.; MENTELE, R.; AUERSWALD, E. A.; SANTORO, M. L.; SAMPAIO, C. A. M.; CAMARGO, A. C. M.; ASSAKURA, M. T. A Novel Phospholipase A2, BJ-PLA2, from the Venom of the Snake *Bothrops jararaca*: Purification, Primary Structure Analysis, and Its Characterization as a Platelet-Aggregation-Inhibiting Factor 1 **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 367, p. 26–32, 1999.

SERRANO, S. M.; HAGIWARA, Y.; MURAYAMA, N.; HIGUCHI, S.; MENTELE, R.; SAMPAIO, C. A.; CAMARGO, A. C.; FINK, E. Purification and characterization of a kinin-releasing and fibrinogen-clotting serine proteinase (KN-BJ) from the venom of *Bothrops jararaca* and molecular cloning and sequence analysis of its cDNA **Eur. J. Biochem.**, v. 251, p.845-853,1998.

SHEN, D.; NOODEH, A. D.; KAZEMI, A.; GRILLOT, R.; ROBSON, G.; BRUGÈRE, J. Characterization and expression of phospholipases B from the opportunistic fungus *Aspergillus fumigatus* **FEMS Microbiology Letters** v. 239, 87–89, 2004.

SHIKAMOTO, Y.; SUTO, K.; YAMAZAKI, Y.; MORITA, T.; MIZUNO, D. H. Crystal structure of a CRISP family Ca²⁺-channel blocker derived from snake venom. **J. Mol. Biol.**, v. 350, p. 735–743, 2005.

SHIMOKAWA, K.; JIA, L. G.; WANG, X. M.; FOX, J. W. Expression, activation, and processing of the recombinant snake venom metalloproteinase, pro-atrolysin E. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 335, p. 283–294, 1996.

SIIGUR, E.; TONISMAGI, K. TRUMMAL; K. SAMEL, M.; VIJA, H.; SUBBI, J.; SIIGUR, J. Factor X activator from *Vipera lebetina* snake venom, molecular

characterization and substrate specificity. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1568, p. 90–98, 2001.

SILES-VILARROEL, M.; FURLANETTO, R. S.; ROLIM-ROSA, R.; ZELANTE, F.; NAVAS, J. Contribuição ao estudo imunoquímico de venenos botrópicos. II. Análise comparativa dos componentes antigênicos comuns de seis espécies de venenos botrópicos. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 38, p. 31-40, 1974.

SILVA, V. X.; RODRIGUES, M. T. Taxonomic revision of the *Bothrops neuwiedi* complex (Serpentes, Viperidae) with description of a new species. **Phyllomedusa**, v.7, n.1, p. 45-90, 2008.

SILVA, N.M.V. et al. Evaluation of three Brazilian antivenom ability to antagonize myonecrosis and hemorrhage induced by *Bothrops* snake venoms in a mouse model. **Toxicon**, v. 50, p. 196-205, 2007.

SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: Classification and characterization. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1488, p. 1–19, 2000.

SOARES, M. R. et al. Identification of novel bradykin-potentiating peptides and C-type natriuretic peptide from *Lachesis muta* venom. **Toxicon**, v. 46, p. 31–38. 2005

SOLIGNAC, M.; ZHANG, L.; MOUGEL, F.; LI, B.; VAUTRIN, D.; MONNEROT, M.; CORNUET, J.; WORLEY, K. C.; WEINSTOCK, G. M., GIBBS, R. A. The genome of *Apis mellifera*: dialog between linkage mapping and sequence assembly **Genome Biology**, v.8, p. 403-406, 2007.

SOUZA, D. H. et al. The desintegrin domain of the snake venom metalloproteinase alternagin inhibits alpha2beta1 integrin-mediated cell adhesion **Arch. Biochem., Biophys.**, v. 384, p. 341-350, 2000.

STILES, B. G.; CHOUMENT, V. Antibody studies with venom phospholipases. In KINI, R. M. (Ed.). **Venom phospholipase A2 enzymes: Structure, function and mechanism**. Chichester : John Wiley & Sons, 1997. p. 223–244.

STILES, B.G.; SEXTON, F.W.; WEINSTEIN, S.A.. Antibacterial effect in different snake venoms: Purification and characterization of antibacterial protein from *Pseudechis australis* (Australian king or mulga snake) venom. **Toxicon**, v. 29, p. 1129–1141, 1991.

SUN, L.K., YOSHII, Y.; HYODO, A.; TSURUSHIMA, H. et al. Apoptotic effect in the glioma cells induced by specific protein extracted from Okinawa habu (*Trimeresurus flavoviridis*) venom in relation to oxidative stress. **Toxicol. In Vitro**, v. 17, p. 169-177, 2003.

TAKATSUKA, H., SAKURAI, Y.; YOSHIOKA, A.; KOKUBO, T.; USAMI, Y. et al. Molecular characterization of L-amino acid oxidase from *Agkistrodon halys blomhoffii* with special reference to platelet aggregation. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1544, p. 267-277, 2001.

TAN, N.H. L-amino acid oxidases and lactate dehydrogenases. In: BAILEY, G.S. (Ed.). **Enzymes from snake venom**. Fort Collins: Alaken, 1998. p. 579-598.

TEIXEIRA, C. F. P.; FERNANDES, C. M. ZULIANI, J. P.; ZAMUNER, S. F. Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 181-184, 2005.

TEIXEIRA, C. F. P.; LANDUCCI, E. C. T.; ANTUNES, E.; CHACUR, M.; CURY, Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2. **Toxicon**, v. 42, p. 947-962, 2003.

TEMPONE, A. G et al. *Bothrops moojeni* venom kills *Leishmania* spp. with hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 280, p. 620-624, 2001.

TOYAMA, M. H. et al. Isolation of a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicon**, v.47, p. 47-57, 2006.

TOYAMA, M. H. **Miotoxinas PLA₂ “like” de Bothrops pirajai**: caracterização molecular e biológica. 2000. 96 f. Tese (Doutorado em Biologia Funcional) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

TRUMMAL, K.; TONISMAGI, K.; SIIGUR, E.; AASPOLLU, A.; LOPP, A.; SILLAT, T.; SAAT, R.; KASAK, L.; TAMMISTE, I.; KOGERMAN, P.; KALKKINEN, N.; SIIGUR, J. A novel metalloprotease from *Vipera lebetina* venom induces human endothelial cell apoptosis. **Toxicon**, v. 46, p. 46-61, 2005.

TSAI, I. H.; WANG, Y. M.; CHEN, Y. H.; TSAI, T. S.; TU, M. C. Venom phospholipases A2 of bamboo viper (*Trimeresurus stejnegeri*): Molecular characterization, geographic variations and evidence of multiple ancestries. **Biochem. J.**, v. 377, p. 215-223, 2004.

UDBY, L.; COWLAND, J. B.; JOHNSEN, A. H.; SORENSEN, O. E.; BORREGAARD, N.; KJELDSEN, L. An ELISA for SGP28/CRISP-3, a cysteine-rich secretory protein in human neutrophils, plasma, and exocrine secretions. **J. Immunol. Methods**, v. 263, p. 43–55, 2002.

UOZUMI, N.; KUME, K.; NAGASE, T.; NAKATANI, N.; ISHII, S.; TASHIRO, F.; KOMAGATA, Y.; MAKI, K.; IKUTA, K.; OUCHI, Y.; MIYAZAKI, J.; SHIMIZU, T. Role of cytosolic phospholipase A2 in allergic response and parturition. **Nature**, v. 390, p. 618–622, 1997.

USAMI, Y.; FUJIMURA, Y.; SUZUKI, M.; OZEKI, Y.; NISHIO, K.; FUKUI, H.; TITANI, K. Primary structure of two-chain botrocetin, a von Willebrand factor modulator purified from the venom of *Bothrops jararaca* **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 90, p. 928–932, 1993.

VAN DEN BERGH, C. J.; SLOTBOOM, A. J.; VERHEIJ, H. M.; DE HAAS, G. H. The role of Asp-49 and other conserved amino acids in phospholipases A2 and their importance for enzymatic activity. **J. Cell Biochem.**, v. 39, n. 4, p. 379–390, 1989.

VASCONCELOS, A. T. R. et al. Brazilian National Genome Project Consortium. The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 100, p. 11660–11665, 2003.

VITORINO-CARDOSO, A. F.; PEREIRA RAMOS, O. H.; HOMSI-BRADENBURGO, M. I.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. Insights into the substrate specificity of a novel snake venom serine peptidase by molecular modeling. **Comp Biochem. Physiol B Biochem. Mol Biol.**, v. 144, p. 334–342, 2006.

WAGLER, J. *Serpentum Brasiliensium species novae, ou histoire naturelle des espèces nouvelles de serpens*. In: SPIX, J. **Animalia nova sive species novae. natrix bahiensis Typis Franc. Seraph. Hübschmanni**. 1824. p. 75.

WAGSTAFF, S. C.; HARRISON, R. A. Venom gland EST analysis of the saw-scaled viper, *Echis ocellatus*, reveals novel $\alpha 9\beta 1$ integrin-binding motifs in venom metalloproteinases and a new group of putative toxins, renin-like aspartic proteases **Gene**, v. 377, p. 21–32, 2006.

WANG, J.; SHEN, B.; GUO, M.; LOU, X.; DUAN, Y.; CHENG, X. P.; TENG, M.; NIU, L.; LIU, Q.; HUANG, Q.; HAO, Q. Blocking effect and crystal structure of natrin toxin, a cysteine-rich secretory protein from *Naja atra* venom that targets the BKCa channel. **Biochemistry**, v. 44, p. 10145–10152, 2005.

WARRELL, D. A. Snakebites in Central and South America: Epidemiology, clinical features, and clinical management. In: Campbell, J.A.; Lamar, W.W. (Eds.) **The venomous reptiles of the western hemisphere**. Vol. II. NY: Cornell University Press, 2004.

WARRELL, D. A. Clinical toxicology of snakebite in Asia. In: MEIER, J.; WHITE, J. (Eds.) **Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons**. Flórida: CRC Press, 1995b. p. 493–594.

WARRELL, D. A. Clinical toxicology of snakebite in Africa and the Middle East/Arabian Peninsula. In: MEIER, J.; WHITE, J. (Ed.) **Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons**. Flórida: CRC Press, 1995a. p. 433–492.

WERMELINGER, L. S.; DUTRA, D. L. S.; OLIVEIRA-CARVALHO, A. L.; SOARES, M. R.; BLOCH JR., C.; ZINGALI, R. B. Fast analysis of low molecular mass compounds present in snake venom: identification of ten new pyroglutamate-containing peptides **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.19, n. 12, p. 1703–1708, 2005.

WU, W. B.; CHANG, S. C.; LIAU, M. Y.; HUANG, T. F. Purification, molecular cloning and mechanism of action of graminelysin I, a snake-venom-derived metalloproteinase that induces apoptosis of human endothelial cells. **Biochem. J.**, v. 357, p. 719–728, 2001.

WU, W.; KUANG, P.; JIANG, S.; YANG, J.; SUI, N.; CHEN, A.; KUANG, P.; ZHANG, X. Effect of batroxobin on expression of c-Jun in left temporal ischemic rats with spatial learning and memory disorder. **J. Trad.Chin. Med.** v. 20, p.147–151, 2000.

WUSTER, W.; PEPPIN, L.; POOK, C. E.; WALKER, D. E. A nesting of vipers: Phylogeny and historical biogeography of the Viperidae (Squamata: Serpentes). **Mol. Phyl. Evol.**, v. 49, p. 445–459, 2008.

WUSTER, W.; SALOMÃO, M. G.; DUCKETT, G. J.; THORPE, S. R.; BBSSP Mitochondrial DNA Phylogeny of the *Bothrops atrox* Species Complex (Squamata:Serpentes:Viperidae) **Kaupia**, v. 8, p.135-144, 1999.

YAMADA, D.; MORITA, T. Purification and characterization of a Ca²⁺ -dependent prothrombin activator, multactivase, from the venom of *Echis multisquamatus* **J Biochem.**, v. 122, n. 5, p. 991-997, 1997

YAMADA, D.; SEKIYA, F.; MORITA, T. Isolation and characterization of carinactivase, a novel prothrombin activator in *Echis carinatus* venom with a unique catalytic mechanism. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 5200–5207, 1996.

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

YAMAZAKI, Y.; KOIKE, H.; SUGIYAMA, Y.; MOTOYOSHI, K.; WADA, T.; HISHINUMA, S.; MITA, M.; MORITA, T. Cloning and characterization of novel snake venom proteins that block smooth muscle contraction. **Eur.J. Biochem.**, v. 269, p. 2708–2715, 2002b.

YAMAZAKI, Y.; BROWN, R.L.; MORITA, T. Purification and cloning of toxins from elapid venoms that target cyclic nucleotide-gated ion channels. **Biochemistry**, v. 41, p. 11331–11337, 2002a.

YANG, C. C.; KING, K.; SUN, T. P. Carbamylation with cyanate of basic phospholipase A2 from the venom of *Naja nigricollis* (Spitting cobra). **Toxicon**, v. 19, p. 783–795, 1981.

YANG, C. C.; KING, K. Chemical modification of the histidine residue in basic phospholipase A2 from the venom of *Naja nigricollis*. **Biochim. Biophys. Acta** v. 614, p. 373–388, 1980.

YOU, K.; SEO, H.J.; CHUNG, K.H.; KIM, D.S. A novel metalloprotease from Gloydius halys venom induces endothelial cell apoptosis through its protease and disintegrin-like domains. **J. Biochem.**, v. 134, p. 739–749, 2003.

ZELANIS, A. et al. Analysis of the ontogenetic variation in the venom proteome/peptidome of Bothrops jararaca reveals different strategies to deal with prey **J. Proteome Research**, v. 9, n. 5, p. 2278–2291, 2010.

ZHANG, B.; LIU, Q.; YIN, W.; ZHANG, X.; HUANG, Y.; LUO, Y.; QIU, P.; SU, X.; YU, J.; HU, S.; YAN, G. Transcriptome analysis of *Deinagkistrodon acutus* venomous gland focusing on cellular structure and functional aspects using expressed sequence tags **BMC genomics**, v. 7, p. 152–162, 2006.

ZHANG, H.; YAN, Q.; SUN, M.; TENG, M.; NIU, L. Hydrogen peroxide produced by two amino acid oxidases mediates antibacterial actions. **J. Microbiol.**, v. 42, p. 336–339, 2004.

ZIGRINO, P.; KAMIGUTI, A. S.; EBLE, J.; DRESCHER, C.; NISCHT, R. ; FOX, J. W.; MAUCH, C. The Repolysin Jararhagin, a Snake Venom Metalloproteinase, Functions as a Fibrillar Collagen Agonist Involved in Fibroblast Cell Adhesion and Signaling. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 40528 –40535, 2002.

ZINGALI, R. B.; JANDROT-PERRUS, M.; GUILLIN, M. C.; BON, C. Bothrojaracin, a new thrombin inhibitor isolated from *Bothrops jararaca* venom: Characterization and mechanism of thrombin inhibition. **Biochemistry**, v. 32, p. 10794–17802, 1993.

ZULIANI, J. P.; FERNANDES, C. M.; ZAMUNER, S. R.; GUTIÉRREZ, J.M.; TEIXEIRA, C. F. P. Inflammatory events induced by Lys-49 and Asp-49 phospholipases A2 isolated from *Bothrops asper* snake venom: role of catalytic activity. **Toxicon**, v. 45, p. 335–346, 2005.

ANEXO

ARTIGO DE PERIÓDICO

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

Transcriptome analysis of the Amazonian viper *Bothrops atrox* venom gland using expressed sequence tags (ESTs)

Márcia Neiva^{a,b,*}, Fabricio B.M. Arraes^c, Jonso Vieira de Souza^a, Gandhi Rádis-Baptista^d, Álvaro R.B. Prieto da Silva^f, Maria Emilia M.T. Walter^e, Marcelo de Macedo Brigido^e, Tetsuo Yamane^c, Jorge Luiz López-Lozano^g, Spartaco Astolfi-Filho^a

^a Laboratório de Tecnologias de DNA, Universidade Federal do Amazonas, Av. Gen. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, 69077-000, Manaus, AM, Brazil

^b Programa de Pós Graduação Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, Av. Lineu Prestes, 1730, ICB-IV, Cidade Universitária, 05508-900 São Paulo, Brazil

^c Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Biotecnologia da Amazônia, Av. Gov. Danilo de Matos Areosa, 690, 69075-351, Manaus, AM, Brazil

^d Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Av. Abolição, 3207, 60165-081, Fortaleza, CE, Brazil

^e Laboratório de Biologia Molecular, Universidade de Brasília, Campus Universitário, Asa Norte 70910-900, Brasília, DF, Brazil

^f Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, Av. Vital Brasil, 1500, 05503-900 São Paulo, Brazil

^g Gerência de Animais Peçonhentos, Instituto de Medicina Tropical, Av. Pedro Teixeira 25, 69040-000, Manaus, AM, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 September 2008

Received in revised form 4 January 2009

Accepted 9 January 2009

Available online 19 January 2009

Keywords:

Bothrops atrox

ESTs

Snake venom

Venom toxins

Pit viper

Transcriptome

ABSTRACT

Bothrops atrox is a highly dangerous pit viper in the Brazilian Amazon region. We produced a global catalogue of gene transcripts to identify the main toxin and other protein families present in the *B. atrox* venom gland. We prepared a directional cDNA library, from which a set of 610 high quality expressed sequence tags (ESTs) were generated by bioinformatics processing. Our data indicated a predominance of transcripts encoding mainly metalloproteinases (59% of the toxins). The expression pattern of the *B. atrox* venom was similar to *Bothrops insularis*, *Bothrops jararaca* and *Bothrops jararacussu* in terms of toxin type, although some differences were observed. *B. atrox* showed a higher amount of the PIII class of metalloproteinases which correlates well with the observed intense hemorrhagic action of its toxin. Also, the PLA₂ content was the second highest in this sample compared to the other three *Bothrops* transcriptomes. To our knowledge, this work is the first transcriptome analysis of an Amazonian rain forest pit viper and it will contribute to the body of knowledge regarding the gene diversity of the venom gland of members of the *Bothrops* genus. Moreover, our results can be used for future studies with other snake species from the Amazon region to investigate differences in gene patterns or phylogenetic relationships.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The genus *Bothrops* (Viperidae) comprises more than 30 species and subspecies of snake that inhabit distinct

geographical regions of Central and South America (Cidade et al., 2006). In the Brazilian Amazon, *Bothrops atrox* (commonly known as the Amazonian lancehead) is the pit viper most often involved in human snakebites. López-Lozano et al. (2002) reported that more than 90% of snakebite patients who sought medical care at the Medicine Tropical Institute (IMT – Manaus-AM) were victims of this species of pit viper. Available statistics from Amazonia are underestimated in general because many victims fail to reach a hospital before dying.

* Corresponding author. Programa de Pós Graduação Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, Av. Lineu Prestes, 1730, ICB-IV, Cidade Universitária, 05508-900 São Paulo, Brazil. Tel.: +55 11 2592 2837/ 92 3647 4230; fax: +55 92 3647 4230.

E-mail addresses: thom06@usp.br (M. Neiva), sastolfi@ufam.edu.br (S. Astolfi-Filho).

The principal clinical effects of poisoning by *B. atrox* are life-threatening bleeding caused by blood coagulation disturbance, shock, and renal failure. Necrosis and bacterial infection at the site of the bite may result in permanent physical disabilities.

In Brazil, the treatment for envenomation by any *Bothrops* species involves the use of polyspecific *Bothrops* antivenoms. The absence of *B. atrox* venom in the preparation of this antivenom suggests that its efficacy against this venom results from the extensive cross-reactivity of *Bothrops* antigenic epitopes. Nevertheless, in the northern regions of Brazil, snakebite treatment utilizing bothropic antivenom has less effect on envenomed patients largely due to the lack of neutralization of the myotoxic effect. Although clinical studies have demonstrated the efficacy of polyspecific antivenom (Otero-Patiño et al., 1998; Pardal et al., 1994), it is important to know how the variability existent among snake venoms can affect the antivenom response.

Variation in snake venoms has been described not only among species but also within a species. These variations are caused mainly by ontogenetic changes that affect the biochemical and pharmacological profiles of the venom (Saldarriaga et al., 2003). The genus *Bothrops* is a heterogeneous group of snakes that display wide variations in their venom's electrophoretic patterns (Chippaux et al., 1991). Geographical variations in venom protein profiles of *Bothrops asper* venom have been observed by Alape-Giron et al. (2008). Additionally, López-Lozano et al. (2002) and Guércio et al. (2006) observed differences in metalloproteinases and toxin content in *B. atrox* venom. Salazar et al. (2007) have also demonstrated several differences among *B. atrox* venoms collected from Bolivia and Brazil. Sexual dimorphism has also been shown to play a role in determining the different venom compositions of *Bothrops jararaca* (Furtado et al., 2006).

There are very few studies that examine the composition of *B. atrox* venom and currently there is any protocol for standardization of this venom. Furthermore, there are very few protein sequences available concerning to *B. atrox* venom. Using a proteomic approach, Guércio et al. (2006) identified the main toxin classes in venom of juvenile, sub-adult and adult members of the *B. atrox* species. They found that proteins in these venoms belong mainly to the classes of metalloproteinases, lectins, serino-proteinases, bradykinin-potentiating peptides (BPPs) and phospholipases A2.

In the present work, we investigate the pattern of toxin expression in the *B. atrox* venom, based on the analysis of expressed sequence tags (ESTs) from the venom gland cDNA library of a single sub-adult specimen.

Such an approach was previously conducted to describe the venom transcriptomes of *Bothrops insularis* (Junqueira-de-Azevedo and Ho, 2002), *Bothrops jararacussu* (Kashima et al., 2004) and *B. jararaca* (Cidade et al., 2006). In addition to providing new information about toxin transcripts, such studies revealed significant similarities in the patterns of gene expression in the venom gland of these three species of *Bothrops*.

In the present report, a global survey of *B. atrox* ESTs will provide information that can be compared to existing *Bothrops* transcriptome datasets, and can offer supporting

evidence for published proteomic data. The results of this survey can also serve as the basis for a molecular phylogenetic study of toxin evolution.

2. Material and methods

2.1. cDNA library construction

A young male adult specimen of *B. atrox* captured in the Manaus region (Amazonas State, Brazil) and maintained in the Herpetarium of the Tropical Medicine Institute – IMT-AM, Manaus was kindly provided by Dr. Jorge Luiz López-Lozano's research group.

Snake venom was extracted by milking. Seventy-two hours after milking, the animal was anesthetized with CO₂ and sacrificed by decapitation. Then, the pair of venom glands was dissected and kept in liquid nitrogen until use.

Total RNA was prepared from the venom glands using the Trizol reagent (Invitrogen Life technologies, CA, USA). The RNA quality and quantity were verified by examining a denaturing agarose electrophoretic gel and then spectrophotometrically using the ratio of absorbances at 260 and 280 nm. A directional *B. atrox* venom gland cDNA library was constructed using the Creator Smart cDNA Synthesis System (Clontech, Mountain View, CA, USA). First strand of cDNA was synthesized from total RNA and the second strand was obtained by long distance PCR (LD-PCR), following the manufacturer's instructions.

Small sized and truncated cDNAs were removed by size fractionation of the entire library through a CHROMA SPIN-400 column. We collected 13 fractions of which the first five and last three have been discarded. The five remaining fractions were pooled and an aliquot of each was ligated into a pDNR-Lib vector. *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen Life Technologies, CA, USA) cells were transformed with recombinant plasmids by electroporation and spread onto LB plates that contained chloramphenicol (34 µg/mL). To verify the quality of the library, bacterial clones were randomly chosen and the recombinant plasmid was rescued. Then, the plasmid was digested with Eco RI and HindIII to check the insert sizes.

A set of 1056 independent clones were selected and inoculated into 96 well microplates with CircleGrow broth (containing chloramphenicol), and then cultured for 22 h. Plasmids were prepared using the alkaline lysis method (Sambrook et al., 1989). This was followed by filtration on a MultiScreen MAGVN250 (Millipore), precipitation with 70% ethanol and resuspension in sterile deionized water (Vasconcelos et al., 2003).

The plasmids were sequenced using the chain termination method (Sanger et al., 1977) on a DYEnamic ET Terminator Kit (GE Healthcare, Fairfield, CT, USA) and then they were analyzed on a MegaBace 1000 automated sequencer (GE Healthcare, Fairfield, CT, USA).

2.2. Assembly and identification of ESTs

EST electropherogram files were exported for automated analysis by the TIMINA (<http://timina.sourceforge.net/wiki/>) pipeline for sequence analysis and clustering (Brígido et al., 2005). Sequence quality was first analyzed

with the Phred and Crossmatch software packages to remove low quality ends (Green, 1996). After this preliminary analysis, only good quality sequences (phred > 20) with a length longer than 150 bp were displayed in the table for definitive annotation.

The collection of good quality sequences was organized into clusters with CAP3 software. We took into account overlaps of 50 bp that had at least 98% identity (Huang and Madan, 1999). The clustered sequences were compared to protein GenBank NR (<http://www.ncbi.nih.gov>) and Swissprot release 44 (<ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/swissprot/release/>) databases using the BLASTx program (Altschul et al., 1997). Gene descriptions and EC numbers from Swissprot best hits and their associated product names were automatically assigned using 10^{-10} as the e-value cut off. Thereafter, the ESTs were manually inspected by comparing the BLAST results with the automatically annotated EC numbers for functional classification. After this an additional annotation allowing the identification of protein domain architectures was conducted comparing the clusters sequences with the Swissprot, SP-TrEMBL and stable Ensembl proteomes databases using the SMART software (Schultz et al., 2000).

Finally an alignment was done with the sequence of best hit for each cluster using MegAlign software (Lasergene, Madison, WI, USA).

3. Results and discussion

3.1. Analysis of cDNA quality and sequence clustering

The cDNAs lengths were confirmed by agarose gel electrophoresis of digests of randomly chosen clones. Results showed that synthesized cDNAs encompassed a range of 200–2000 bp long.

The sequencing procedure rendered a total of 610 high quality sequences of which 402 were clustered in 66 contigs. By querying the NCBI databases with *B. atrox* ESTs, we identified 211 ESTs that matched snake venom toxins (59.4%). These ESTs formed 26 clusters of which BATC21, 30, 48, 65 and 163 represent full sequences of known protein domains.

This was rather different from what has been observed in *B. jararaca* (77.6%) (Cidade et al., 2006), *B. jararacussu* (71.6%) (Kashima et al., 2004) and *B. insularis* (67%) (Junqueira-de-Azevedo and Ho, 2002).

Aside from the toxin transcripts, we found 146 ESTs matching proteins involved in cellular processes (41.1%), 154 ESTs with no database matches (25.2%) (these might represent unique proteins in the venom), and 99 ESTs matching described proteins with no functional attributes (16.2%) (Table 1).

All obtained clusters were deposited in the EST database of GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST>) under accession numbers FL591281–FL591890.

3.2. ESTs identification and predictive functional assignment

The ESTs of *B. atrox* were grouped in transcripts coding for proteins related to cellular processes and toxins (Table 1).

Table 1

Representation of ESTs in the *B. atrox* venom gland.

Function	No. of ESTs	% of total	% of matching
Similar to toxins	211	34.6	59.4
Similar to cellular processes proteins	146	23.9	41.1
No database match	154	25.2	–
Unknown proteins	99	16.2	–

Comparing the proportion of *B. atrox* transcripts encoding toxins to that proportion in other transcriptomes, there is an abundance of such transcripts preferentially expressed in *Bothrops* venom glands (Fig. 2) (Cidade et al., 2006; Kashima et al., 2004; Junqueira-de-Azevedo and Ho, 2002).

In *B. atrox*, it was also observed that the major classes of toxins are also found in *B. jararaca*, *B. jararacussu* and *B. insularis* (Table 2). The cDNAs coding for the main toxins found in the *B. atrox* venom gland are listed in Table 3.

3.2.1. Metalloproteinases/desintegrins

As observed in *B. insularis* (Junqueira-de-Azevedo and Ho, 2002) and in *B. jararaca* (Cidade et al., 2006), toxin transcripts for metalloproteinase are also the most abundant toxin transcripts in *B. atrox* venom gland (61.6% of total toxin ESTs). Moreover, this percentage is the highest among the four *Bothrops* species (Figs. 1 and 2).

According to current classifications, snake venom metalloproteinases (SVMPs) are usually divided into four classes depending on the organization of their domains (Hite et al., 1994). These classes are PI (metalloproteinase domain), PII (metalloproteinase and desintegrin domains), PIII (metalloproteinase, desintegrin and cysteine-rich domains) and PIV (same PIII domains plus a lectin-like domain linked by disulfide bonds). Recently Fox and Serrano (2005) proposed a classification which divided PII and PIII classes into subclasses reflecting the potential for proteolytic processing and the formation of dimeric structures.

SVMPs also known as hemorrhagins are associated to diverse functional activities interfering with the blood coagulation and hemostatic plug formation or by degrading the basement membrane or extracellular matrix components (Matsui et al., 2000) and other more recent studies

Table 2

Putative toxin transcripts classes identified in *B. atrox* venom gland transcriptome.

Toxins	No. of clusters	No. of ESTs	% of total	Redundancy
Metalloproteinase	11	130	21.3	11.8
Serine-proteinase	4	17	2.8	4.3
C-type lectin	5	14	2.3	2.8
Phospholipase A ₂	1	28	4.6	28
BPP*	1	15	2.5	15
LAO	1	3	0.5	3.0
svVEGF	1	2	0.3	2.0
Cysteine-rich protein	1	1	0.2	1.0
PLA ₂ inhibitor	1	1	0.2	1.0
Total	26	211	34.6	

BPP – Bradykinin-potentiating peptide; svVEGF – snake venom vascular endothelium growth factor; LAO – L-amino acid oxidase.

Table 3Cluster identification and putative toxin-encoding clusters in *B. atrox* venom.

Cluster	Reads	Annotation	e-value
Metalloproteinases			
BATC01	19	Bothrostatin precursor [<i>Bothrops jararaca</i>]	1.0E–104
BATC16	72	Jararhagin precursor [<i>Bothrops jararaca</i>]	0.0
BATC19	4	HR1a metalloproteinase [<i>Trimeresurus flavoviridis</i>]	2.0E–58
BATC41	2	Halysase [<i>Gloydius halys</i>]	1.0E–35
BATC44	9	Metalloprotease BOJUMET II [<i>Bothrops jararacussu</i>]	1.0E–110
BATC47	2	Vascular apoptosis-inducing protein [Trimeresurus flavoviridis]	1.0E–71
BATC61	3	Hemorrhagic metalloproteinase HF3 [<i>Bothrops jararaca</i>]	5.0E–47
BATC62	16	Desintegrin Jararacin precursor [<i>Bothrops jararaca</i>]	2.0E–48
BATC187	1	Hemorrhagic metalloproteinase HF3 [<i>Bothrops jararaca</i>]	1.0E–120
BATC213	1	Metalloproteinase precursor [<i>Bothrops insularis</i>]	9.0E–82
BATC255	1	VLAIP-B [<i>Macrovipera lebetina</i>]	2.0E–89
Serine proteinases			
BATC20	10	Venom serine proteinase HS112 precursor [<i>Bothrops jararaca</i>]	1.0E–93
BATC58	2	Venom serine protease BthaTL [<i>Bothrops alternatus</i>]	
BATC66	4	Venom serine proteinase HS114 precursor [<i>Bothrops jararaca</i>]	
BATC149	1	Venom thrombin-like enzyme [<i>Deinagkistrodon acutus</i>] (acubin)	7.0E–20
C-type Lectins			
BATC30	2	Bothrojaracin chain A precursor [<i>Bothrops jararaca</i>]	2.0E–37
BATC48	5	Botroctetin B chain [<i>Bothrops jararaca</i>]	1.0E–102
BATC65	5	C-type lectin [<i>Bothrops insularis</i>]	1.0E–76
BATC163	1	Stejaggregin-A alpha chain [Trimeresurus stejnegeri]	1.0E–69
BATC180	1	Renin binding protein C-type lectin like	
Phospholipase A2			
BATC21	28	Hypotensive Phospholipase A2 [<i>Bothrops jararacussu</i>]	7.0E–55
Phospholipase A2 inhibitor			
BATC178	1	Phospholipase A2 inhibitory protein Annexin A1	2.0E–28
Cysteine-rich venom proteins			
BATC145	1	Ablomin [<i>Agkistrodon blomhoffi</i>]	1.0E–108
Bradykinin-potentiating peptide precursors			
BATC51	16	mRNA for Bradykinin-potentiating peptide [<i>Bothrops jararacussu</i>]	0.0
Others			
BATC08	2	Vascular endothelial growth factor [Trimeresurus flavoviridis]	1.0E–28
BATC13	3	L-Amino acid oxidase precursor [<i>Bothrops jararacussu</i>]	1.0E–115

indicated that these proteins have another functionalities as apoptotic and inflammatory activities (Fox and Serrano, 2005).

B. atrox transcriptome clusters showed a high redundancy of PIII metalloproteinase homologs, a single assembling group was identified as a PI metalloproteinase and another single assembling group assigned as a PII metalloproteinase homolog. The BATC16 cluster contains most of the metalloproteinase transcripts (55.38%), and shares similarity with the *B. jararaca* metalloproteinase jararhagin (Paine et al., 1992). This cluster had a high similarity score in sequence with jararhagin metalloproteinase and desintegrin domains (85.2%) as well an identical zinc metal binding site and DECD.

Three clusters, BATC41, BATC47 and BATC255, are similar to the apoptosis-inducing proteins. BATC41 had 89.7% of similarity with ACR (Adam Cysteine-Rich domain) of halysase from *Gloydius halys* (You et al., 2003), BATC47 had similarity with desintegrin and ACR domains of VAIP from *Trimeresurus flavoviridis* (Masuda et al., 2001) with 80% of identity, and BATC255 was 56.7% similar with M12B propeptide and repolysin domain of VLAIP-B from *Macrovipera lebetina* (Trummel et al., 2005). These proteins hydrolyze the α -chain and (more slowly) the β -chain of fibrinogen.

The BATC44 cluster has a high similarity with metalloproteinase *B. jararacussu* BOJUMET II (Kashima et al., 2004). It possesses the identical desintegrin domain SECD and a high identity score (89%) with desintegrin and ACR domains. Two other clusters, BATC61 and BATC187, have been assigned as *B. jararaca* HF3 homologs. In the first cluster, sequence similarity is limited to an ADAM cysteine-rich domain with 81% similarity. In the second cluster, we identified both desintegrin and cysteine-rich domains that reach a similarity of 76.3% to the apoptosis-inducing protease homolog from the viper *M. lebetina*. The cluster BATC62 was identified as a *B. jararaca* jararacin homolog and was identified as a repolysin domain. Finally, the cluster BATC213 showed similarity with the repolysin family domain (87.2%) and it was assigned as a *B. insularis* metalloproteinase precursor homolog. BLAST searches for the BATC19 cluster showed that it shared 63.4% of similarity with ACR domain of a *T. flavoviridis* HR1a metalloproteinase (Kishimoto and Takahashi, 2002).

A single cluster was identified as a PII metalloproteinase homolog. BATC01 was the second most represented group (19 sequences) representing 14.6% of the total toxin transcripts. BLAST results showed 82% of similarity between it and the *B. jararaca* bothrostatin repolysin family propeptide domain (Fernandez et al., 2005).

An analysis of all metalloproteinase clusters showed a similar pattern to that observed in *B. jararaca* and *B. insularis* concerning PII and PIII putative homolog identification. PIV proteins or precursors were not found in our EST dataset.

One interesting observation surrounds the predominance of transcripts encoded metalloproteinase PIII class in *B. atrox* venom gland just like in the *B. insularis* transcriptome (Junqueira-de-Azevedo and Ho, 2002). Since

Fig. 1. Graphics showing the comparison of metalloproteinase transcripts in the venom gland of four *Bothrops* species.

members of PIII class cause inhibition of collagen-induced platelet aggregation through their interactions with integrin $\alpha 2\beta 1$ (Kamiguti et al., 2003; Jia et al., 2000) (this activity may even be enhanced by the cysteine-rich domains these proteins), they are considered as one of the most potent hemorrhagins (Gutiérrez et al., 2005; Markland, 1998). Manual annotation using SMART allowed predicting metalloproteinase domains for clusters BATC01, BATC16, BATC62, BATC213 and BATC255. For the clusters BATC19, BATC41 and BATC61 it was predicted only ACR domain and for the clusters BATC44 and BATC47 it was identified both desintegrin and ACR domains characteristic of PIII metalloproteinases.

It is important to consider that posttranslational modifications are common in this class of proteins. PII metalloproteinases transcripts can be processed giving rise to PI metalloproteinases (Takeya et al., 1992) and PIII metalloproteinases to short desintegrins or PIV metalloproteinases. Thus the predominance of cDNAs encoding PIII metalloproteinases not necessarily means a high concentration of protein in the venom.

Besides the presence of certain domains does not necessarily denote hemorrhagic capability although in terms of potency (Fox and Serrano, 2005).

Nevertheless clinical data show the hemorrhagic character of *B. atrox* venom and our results may provide support to reinforce and helps us understand how it could be as toxic as *B. insularis* venom and more potent than *B. jararaca* venom (Cidade et al., 2006).

3.2.2. Phospholipase A₂

Phospholipases A₂ (PLA₂) are enzymes which hydrolysing specifically the acid-ester linkage in the sn-2 position of glycerophospholipids releasing fatty acids from lysophospholipids. These enzymes have high toxicity and it is believed that venom PLA₂s evolved from pancreatic enzymes that aid in the digestion of prey by gene duplication and changes in regions of exons (Kini and Chan, 1999) acquiring a wide range of pharmacological effects such neurotoxicity, coagulation and anticoagulation, myotoxicity, edema induction and cardiotoxicity (Dunn and Broady, 2001).

Fig. 2. Graphics showing the EST toxin transcripts content in *B. atrox* venom gland. BPP – Bradykinin-Potentiating Peptide; PLA₂ – phospholipase A₂; svVEGF – snake venom vascular endothelium growth factor; LAO – L-amino acid oxidase.

PLA₂ is largely responsible for the intense local pain and damage caused by *Bothrops* bites. An inflammatory response is initiated through the enhancement of vascular permeability and neutrophil recruitment (Zuliani et al., 2005). The cDNAs coding for these classes of enzymes were the second most frequently observed in the *B. atrox* transcriptome, although they showed a high redundancy in only one cluster. This cluster, named BATC21, is comprised of 28 ESTs sharing 76.8% similarity with the *B. jararacussu* hypotensive PLA₂ homolog (Andrião-Escarso et al., 2000). Cluster inspection showed conserved His48, Asp49, Tyr52 and Asp99 key residues at the catalytic site. In addition the residues comprising the calcium-binding loop Tyr28, Gly30 and Gly32 were identified as is the case with *B. jararacussu* PLA₂.

3.2.3. Serine proteinases

Serine proteinases affect hemostasis by acting upon coagulation cascade components. These enzymes act predominantly as anticoagulants due to their consumption of coagulation factors (Markland, 1998). The common catalytic amino acids for these enzymes are serine, histidine and aspartate.

In our database, we found that four clusters could be assigned as serine proteinase homologs. BATC20 and BATC58 were assigned as VSP HS112 precursors of *B. jararaca* and VSP BthaTL of *Bothrops alternatus* homologs and the similarity scores were 82% and 84.1% respectively. Nevertheless, both clusters also showed a slight similarity (70%) to batroxobin – a thrombin-like enzyme isolated from *B. atrox* venom that releases fibrinopeptide A from fibrinogen (Itoh et al., 1987). BATC66 and BATC149 clusters were exclusively identified as thrombin-like enzyme homologs isolated from *B. jararaca* (VSP HS114) with 85.5 % of similarity (Saguchi et al., 2005) and *Deinagkistrodon acutus* venoms (Zha et al., 2006) with similarity score of only 23%.

Though the three of four clusters showed high similarity with thrombin-like enzymes, none seemed to be present in the complete catalytic triad, HDS. The BATC20 and BATC66 clusters, for example, lack the serine residue. In the BATC58 cluster, a replacement of the Hys residue with Asp residue was verified and this substitution probably causes an abolishment of catalytic activity. A complete lack of the typical catalytic residues was found in BATC149; therefore it is likely that BATC58 and BATC149 clusters do not represent functional serine proteinases.

3.2.4. C-type lectins

The C-type lectin-like proteins are enzymes that have also been shown to act on various parts of the coagulation cascade. They exhibit anticoagulant and procoagulant effects depending on their binding characteristics. They can inhibit the conversion of prothrombin into thrombin by binding to coagulation factors IX and X (Lee et al., 2003) or they can directly inhibit thrombin by binding to its exosites 1 and 2 (Arocas et al., 1997). They can also inhibit platelet aggregation by binding to GPIb (Shin et al., 2000) and stimulate platelet aggregation through activation of the Willebrand factor.

Amino acid sequences of CLP are commonly almost identical (15–40%) to the carbohydrate-recognition domain

(CRD) of C-type lectins including mammalian mannose-binding protein (MBP) (Weis et al., 1991, 1992) and snake venom galactose-specific lectin (Hirabayashi et al., 1991).

The *B. atrox* transcriptome showed four clusters assigned as putative distinct members of the C-type lectin family. All cluster had similarity with CRD (carbohydrate-recognition domain) typical of this proteins. BATC30 was 60% identical to bothrojaracin chain A precursor (Arocas et al., 1997) which directly binds thrombin. It is interesting to note that in this cluster a region prior to CRD domain was identified as a transmembrane domain by SMART program. This region was very similar to signal peptide of bothrojaracin with two residues substitutions (Lys5 – Ile5; Val13 – Phe13). BATC48, with 71% similarity to bothrocetin (Usami et al., 1993) could bind to and activate the von Willebrand factor and consequently its interaction with platelet glycoprotein (GP) Ib (Sen et al., 2001). BATC65 is 91.9% identical to *B. insularis* C-type lectin and might present hemagglutinating activity. BATC163 is 74.7% similar to Stejaggregin-A obtained from *Trimeresurus stejnegeri* venom and is another cluster of C-type lectin.

3.2.5. Bradykinin-potentiating peptides (BPPs)

BPPs (Bradykinin-potentiating peptides) are proline-rich peptides formed from 5 to 14 amino acids with a pyroglutamyl residue at the N-terminus and an Ile-Pro-Pro (IPP) sequence at the C-terminus. These peptides act by inhibiting the angiotensin-converting enzyme (ACE) preventing the formation of angiotensin II from angiotensin I (Hayashi and Camargo, 2005) and thus acting as vasodilator.

BPPs are involved with the hypotensive effect of the venom of the *Bothrops* species. Because of this, they have been used as models for the development of new antihypertensive drugs (Fernandez et al., 2004).

Surprisingly, we were not able to find any clusters for these peptides. However, using BLASTn we were able to identify a single cluster (BATC51 with 15 ESTs) that matched the long 5' UTR of a BPP mRNA from *B. jararacussu*.

3.2.6. Others toxins

In the *B. atrox* EST database, we found another cluster coding for toxins such cysteine-rich secretory proteins (CRISPs), L-amino acid oxidase (LAO) and snake venom vascular endothelium growth factor (svVEGF).

In the literature, little information about the action of CRISPs is known, although they seems to inhibit the smooth muscle contraction and block the triggering of the cyclic-nucleotide-gated ion channels (Yamazaki and Morita, 2004; Oispov et al., 2005). On the other hand, LAO induces apoptosis and creates indirect hemorrhagic effects by affecting platelet function. Snake venom (sv-)VEGFs act by increasing vascular permeability which probably contributes to the hypotensive action of the venom by facilitating the dispersion of its components (Junqueira-de-Azevedo et al., 2001).

3.3. Clusters related to cellular functions

Clusters encoding proteins with common cellular functions comprise 41.1% of the *B. atrox* venom gland transcripts. The clusters were categorized in groups according

to the biochemical pathways that their corresponding proteins are presumed to be involved in. Transcripts related to general metabolism were the most abundant in our database followed by transcription and translation related functions (Fig. 3). However, this was not the same as the pattern of expression observed in *B. insularis* (Junqueira-de-Azevedo and Ho, 2002) and *B. jararaca* (Cidade et al., 2006). Most transcripts found in this last category are for ribosomal proteins and elongation factors. According to Junqueira-de-Azevedo and Ho (2002), this result might be explained by what is expected for a specialized tissue in which the main function is to produce and secrete toxic proteins into the lumen of venom glands.

Among transcripts for protein processing, our database reveals clusters for calnexin, calmodulin, and other EF hand protein members. All of these belonging to the calcium binding protein family. Calmodulins are exclusively expressed in the venom gland from many species, but they are neither secreted into the venom nor contribute to the makeup of the venom. Their function is related to the export of toxins out of the cell and they may play a fundamental role in toxin secretion (Junqueira-de-Azevedo and Ho, 2002). Calnexin belongs to the ER chaperone system, which is responsible for the correct folding of proteins. Two clusters encoding protein disulfide isomerase (PDI) were also found. These are redox proteins responsible for disulfide bond assembly (Freedman et al., 1994).

We identified five clusters for reverse transcriptase. Three of them were from the teleost LINE family (Duvernell and Turner, 1998) and one was a transposase. We cannot identify any transcript related to retrotransposable elements previously identified in *B. insularis* (Junqueira-de-Azevedo and Ho, 2002), but the presence of reverse transcriptase and transposase transcripts suggests the presence of retro-elements in the cells of *B. atrox* venom glands. Another uncommon occurrence in the *B. atrox* transcriptome was the detection of two ESTs encoding cytosolic phospholipase A2 and phospholipase B-like proteins. These proteins had not previously been described in snake venoms. Therefore, we reasoned that we should keep these clusters in the group of ESTs related to cellular processes for further investigation.

Additionally, we found an EST encoding for the protein annexin, which is also known as lipocortin. Cluster

BATC178 had a similarity score of 36.1% with Annexin A1 from *Sus scrofa*. This protein binds to phospholipids in a calcium-dependent manner and a complex set of functions was reported for these proteins, including inhibition of phospholipase A₂ activity (Seemann et al., 1996). The annexin homolog was identified for the first time as a venom gland transcript in *B. jararaca* (Cidade et al., 2006) and, until now, that had been the only known occurrence of this homolog.

Alignment of BATC178 sequence with 31 sPLA₂ and one pancreatic cPLA₂ sequences allowed concluding that this is not a specific region of low molecular weight phospholipase A₂ capable of inhibiting its activity (Cordella-Miele et al., 1993). Thus further studies are needed to verify whether this cDNA really encoding an annexin PLA₂ inhibitor.

4. Discussion

Comparing our dataset with those of the other three *Bothrops* transcriptomes (Junqueira-de-Azevedo and Ho, 2002; Kashima et al., 2004; Cidade et al., 2006), we noticed some similarities and principally some noteworthy differences. The major classes of transcripts expressed in *B. atrox* venom gland are those belonging to a class of metalloproteinases as is the case in *B. insularis* and *B. jararaca*. Nevertheless, this family of enzymes in *B. atrox* transcriptome represents more than 60% of all ESTs. Such number is the highest among the four *Bothrops* transcriptomes known.

Another interesting fact is the high content of PIII metalloproteinases transcripts, which is also similar to the *B. insularis* venom gland. PIII metalloproteinases are the most potent toxins from this family and their predominance in *B. insularis* venom contributes to its higher toxic effects compared to *B. jararaca* venom (Melgarejo, 2003). This deserves attention because *B. atrox* and *B. insularis* inhabit greatly different ecosystems and geographical regions that are very distant, respectively, the rain forest and a South Atlantic island. Our results surprisingly show a similar pattern of toxin expression in the venoms of both species.

It is known that the composition of snake venom depends on diverse ontogenetic and epigenetic factors such as like geographic distribution, diet, age and sex (Chippaux et al., 1991; Daltry et al., 1996). Moreover, endemism seems to influence snake venom of snakes inhabiting islands. This is the case for *B. insularis*, in which its venom evolved according to the presence of high snake density and low food availability in Queimada Grande Island (São Paulo coast, Brazil).

On the other hand, *B. atrox* lives in a habitat in the rain forest, where great quantities and large diversity of prey (food) are available. There are also many ontogenetic factors that may operate on venom evolution. Young *Bothrops* snakes prey on lizards, birds and amphibians and preferentially start eating small mammals when they become adults (Daltry et al., 1996).

In fact the relative number of toxin sequences belonging to a given protein family may not correlate with the relative abundance of this toxin family in the venom, due

Fig. 3. Graphics showing toxin and cellular processes transcript relationship in the *B. atrox* venom gland.

posttranslational modifications which frequently occurs. Nevertheless our results corroborate a proteomic study in which are evidenced the qualitative and quantitative changes in the toxins content of juvenile, sub-adult and adult crude venom of *B. atrox* from Amazonian rain forest recently published (Guércio et al., 2006) and the same protein groups found in venom are represented in transcriptome.

The results of such study indicate a large concentration of PIII type which was identified as groups A, C, L, M and P corresponding to jararhagin, bothropasin, berynthrinase, a factor X activator protein from *M. lebetina*, and BOJUMET II homologs in juvenile and sub-adult venom which changed to a large PI-type content in adult venom. Another metalloproteinase groups identified as D and O corresponding to bothrostatin, PII class metalloproteinase from *B. insularis* and Agkistin (Wang et al., 2003). Transcripts assigned as jararhagina, BOJUMET II and bothrostatin, and PII class metalloproteinase from *B. insularis* homologs by Blast searches were observed in our study. On the other hand, we identified some transcripts that encode for metalloproteinases not identified at work as VAPs, halysase, HR1 metalloproteinases.

The level of transcripts encoding PLA₂ enzymes observed in *B. atrox* was higher than in *B. insularis* and *B. jararaca* but lower than in *B. jararacussu*. PLA₂ toxins are commonly present in many isoforms and a single cluster encoded for a non-myotoxic toxin (Asp49 PLA₂) was identified in our dataset. Alape-Giron et al. (2008) observed in *B. asper* venom a shift between Asp49 PLA₂ in juveniles and Lys 49 PLA₂ in adults. Since *B. asper* is phylogenetically close related to *B. atrox* (Castoe and Parkinson, 2006), our results indicate that the same pattern of amino acid replacement may be matched by both snake species. The proteomic characterization grouped in PLA₂ in five groups of which the groups Y and Δ were detected only in juvenile and sub-adult stages and group Y were composed by Asp49 PLA₂.

Others toxins described in the proteomic study as serine proteinases, C-type lectins, L-amino oxidases (LAOs), Cysteine-Rich Secretory Proteins (CRISPs) and vascular endothelial growth factors also were identified in transcriptome analysis. The only clusters encoding LAO and CRISP were the same described on venom proteome.

Concerning serine proteinases detected on venom there was some differences when comparing it with transcripts. From the four groups E, N, Q and R none of which was identified in clusters. This difference could be explained by the high homology of these proteins and may be is difficult to discriminate with employed technique. C-type lectins transcripts encoding Bothrocetin α chain was different from the protein detected on the venom.

For the first time, we describe the detection of an EST in *B. atrox* encoding a phospholipase B-like protein in the venom gland. In addition, an EST encoding a cytosolic phospholipase A2 was also described.

Interestingly, the clustering of C-type lectin ESTs suggests that *B. atrox* venom may exert an inhibitory effect on the coagulation cascade, but this hypothesis needs further clinical support.

Noteworthy, ESTs related to several biochemical pathways related to essential cellular functions were found in

B. atrox and in other *Bothrops* transcriptomes, what offers worthy information about molecules that might play fundamental role in venom gland function, like toxin processing and fold. Finally, the presence of reverse transcriptase and transposase transcripts suggests the presence of retro-elements in the cells of *B. atrox* venom glands. These elements were identified in others transcriptomes like *Bitis gabonica* (Franscischetti et al., 2004), *Lachesis muta* (Junqueira-de-Azevedo et al., 2006), *D. acutus* (Zhang et al., 2006), *Sistrurus catenatus edwardsii* (Pahari et al., 2007) and are related with the generation of toxin gene diversity. Exon shuffling with these elements has been established as a genetic mechanism for the origin of new genes in invertebrates, vertebrates and plants (Long, 2000; Long et al., 2003). This gene multiplication followed by accelerated Darwinian evolution may represent a mechanism which generates the variability of toxin families.

5. Conclusions

We have provided a catalogue of transcripts commonly expressed in Amazonian *B. atrox* venom gland. Our database constitutes the first collection of ESTs from a pit viper that inhabits the South American rain forest. In this sense, this dataset contributes to support and corroborate proteomic and clinical studies, as well as to comprehend the gene diversity present in the venom gland of snakes of the same species inhabiting distinct geographical regions.

Last but not least, our report will serve as an additional source of information about snake toxin cDNA sequences, which can be used as a comparative tool for other projects related to the molecular phylogenetic and gene expression profile of pit vipers.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Cnpq) and Superintendência da Zona Franca de Manaus (SUFRAMA).

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interests.

References

- Alape-Giron, A., Sanz, L., Escolano, J., Flores-Díaz, M., Madrigal, M., Sasa, M., Calvete, J.J., 2008. Snake enomics of the lancehead pit-viper *Bothrops asper*: geographic, individual, and ontogenetic variations. *J. Proteome Res.* 7, 3556–3571.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402.
- Andrião-Escarso, S.H., Soares, A.M., Rodrigues, V.M., Angulo, Y., Diaz, C., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Giglio, J.R., 2000. Myotoxic phospholipases A2 in *Bothrops* snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothrospoxins from *Bothrops jararacussu*. *Biochimie* 82, 755–763.
- Arocas, V., Castro, H.C., Zingali, R.B., Guillin, M.C., Jandrot-Perrus, M., Bon, C., Wisner, A., 1997. Molecular cloning and expression of

- bothrojaracin, a potent thrombin inhibitor from snake venom. *Eur. J. Biochem.* 248, 550–557.
- Brígido, M.M., Walter, M.E., Oliveira, A.G., Inoue, M.K., Anjos, D.S., Sandes, E.F., Gondim, J.J., Carvalho, M.J., Almeida Jr., N.F., Felipe, M.S., 2005. Bioinformatics of the *Paracoccidioides brasiliensis* EST Project. *Genet. Mol. Res.* 4, 203–215.
- Castoe, T.A., Parkinson, C.L., 2006. Bayesian mixed models and the phylogeny of pitvipers (Viperidae: Serpentes). *Mol. Phylogenet. Evol.* 39, 91–110.
- Chippaux, J.P., Williams, V., White, J., 1991. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon* 29, 1279–1303.
- Cidade, D.A.P., Simão, T.A., Dávila, A.M.R., Wagner, G., Junqueira-de-Azevedo, I.L.M., Ho, P.L., Bond, C., Zingale, R.B., Albano, R.M., 2006. *Bothrops jararaca* venom gland transcriptome: analysis of the gene expression pattern. *Toxicol. Anal.* 48, 437–461.
- Cordella-Miele, E., Miele, L., Mukherjee, A.B., 1993. Identification of a specific region of low molecular weight phospholipases A2 (residues 21–40) as a potential target for structure-based design of inhibitors of these enzymes. *PNAS* 90, 10290–10294.
- Daltry, J.C., Wuster, W., Thorpe, R.S., 1996. Diet and snake venom evolution. *Lett. Nat.* 379, 537–540.
- Duvenneil, D.D., Turner, B.J., 1998. Swimmer 1, a new low-copy-number LINE family in teleost genomes with sequence similarity to mammalian L1. *Mol. Biol. Evol.* 15, 1791–1793.
- Dunn, R.D., Broady, S.M.T., 2001. Snake inhibitors of phospholipase A2 enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1533, 29–37.
- Fernandez, J.H., Neshich, G., Camargo, A.C.M., 2004. Using bradykinin-potentiating peptide structures to develop new antihypertensive drugs. *Genet. Mol. Res.* 3, 554–563.
- Fernandez, J.H., Silva, C.A., Assakura, M.T., Camargo, A.C.M., Serrano, S.M.T., 2005. Molecular cloning, functional expression and molecular modeling of bothrostatin, a new highly active disintegrin from *Bothrops jararaca* venom. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329, 457–464.
- Fox, J.W., Serrano, S.M.T., 2005. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 repolysin family of metalloproteinases. *Toxicol. Anal.* 45, 969–985.
- Francischetti, I.M., My-Pham, V., Harrison, J., Garfield, M.K., Ribeiro, J.M., 2004. *Bitis gabonica* (Gaboon viper) snake venom gland: toward a catalog for the full-length transcripts (cDNA) and proteins. *Gene* 337, 55–69.
- Freedman, R.B., Hirst, T.R., Tuite, M.F., 1994. Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding. *Trends Biochem. Sci.* 19, 331–336.
- Furtado, M.F., Travaglia-Cardoso, S.R., Rocha, M.M., 2006. Sexual dimorphism in venom of *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae). *Toxicol. Anal.* 48, 401–410.
- Green, P., 1996. PHRAP Documentation. University of Washington, Seattle. Available from: <http://bozeman.mbt.washington.edu/phrap.docs/phrap.html>.
- Guérrio, R.A.P., Shevchenko, A., Shevchenko, A., López-Lozano, J.L., Paba, J., Sousa, M.V., Ricart, C.A.O., 2006. Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. *Proteome Sci.* 4, 11.
- Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., Escalante, T., Díaz, C., 2005. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicol. Anal.* 45, 997–1011.
- Hayashi, M.A.F., Camargo, A.C.M., 2005. The bradykinin-potentiating peptides from venom gland and brain of *Bothrops jararaca* contain highly site specific inhibitors of the somatic angiotensin-converting enzyme. *Toxicol. Anal.* 45, 1163–1170.
- Hirabayashi, J., Kusunoki, T., Kasai, K., 1991. Complete primary structure of a galactose-specific lectin from the venom of the rattlesnake *Crotalus atrox*. *Homologies with Ca2C-dependent type lectins.* *J. Biol. Chem.* 266 (4), 2320–2326.
- Hite, L.A., Jia, L.G., Bjarnason, J.B., Fox, J.W., 1994. cDNA sequences for four snake venom metalloproteinases: structure, classification and their relationship to mammalian reproductive proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 308, 182–191.
- Huang, X., Madan, A., 1999. CAP3: a DNA sequence assembly program. *Genome Res.* 9, 868–877.
- Itoh, N., Tanaka, N., Mihashi, S., Yamashina, I., 1987. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme. *J. Biol. Chem.* 262, 3132–3135.
- Jia, L.G., Wang, X.M., Shannon, J.D., Bjarnason, J.B., Fox, J.W., 2000. Inhibition of platelet aggregation by the recombinant cysteine-rich domain of the hemorrhagic snake venom metalloproteinase, atroxlysin A. *Arch. Biochem. Biophys.* 373, 281–286.
- Junqueira-de-Azevedo, I.L.M., Ching, A.T.C., Carvalho, E., Faria, F., Nishiyama, Jr. M.Y., Ho, P.L., Diniz, M.R.V., 2006. *Lachesis muta* (Viperidae) cDNAs reveal diverging pit viper molecules and scaffolds typical of Cobra (Elapidae) venoms: implications for snake toxin repertoire evolution genetics. *Toxicon* 53, 877–889.
- Junqueira-de-Azevedo, I.L.M., Ho, P.L., 2002. A survey of gene expression and diversity in the venom glands of the pitviper snake *Bothrops insularis* through the generation of expressed sequence tags (ESTs). *Gene* 299, 279–291.
- Junqueira-de-Azevedo, I.L.M., Farsky, S.H.P., Oliveira, M.L.S., Ho, P.L., 2001. Molecular cloning and expression of a functional snake venom vascular endothelium growth factor (VEGF) from the *Bothrops insularis* pit viper. *J. Biol. Chem.* 276, 39836–39842.
- Kamiguti, A.S., Gallagher, P., Marcinkiewicz, C., Theakston, R.D.G., Zuzel, M., Fox, J.W., 2003. Identification of sites in the cysteine-rich domain of the class PIII snake venom metalloproteinases responsible for inhibition of platelet function. *FEBS Lett.* 549, 129–134.
- Kashima, S., Roberto, P.G., Soares, A.M., Astolfi-Filho, S., Pereira, J.O., Giulati, S., Faria Jr., M., Xavier, M.A.S., Fontes, M.R.M., Giglio, J.R., França, S.C., 2004. Analysis of *Bothrops jararacussu* venomous gland transcriptome focusing on structural and functional aspects: 1:1 – gene expression profile of highly expressed phospholipases A2. *Biochimie* 86, 211–219.
- Kini, R.M., Chan, Y.M., 1999. Accelerated evolution and molecular surface of venom phospholipase A2 enzymes. *J. Mol. Evol.* 48, 125–132.
- Kishimoto, M., Takahashi, T., 2002. Molecular cloning of HR1a and HR1b, high molecular hemorrhagic factors, from *Trimeresurus flavoviridis* venom. *Toxicol. Anal.* 40, 1369–1375.
- Lee, W.H., Zhuang, Q.Y., Zhang, Y., 2003. Cloning and characterization of a blood coagulation factor IX-binding protein from the venom of *Trimeresurus stejnegeri*. *Toxicol. Anal.* 41, 765–772.
- Long, M., 2000. A new function evolved from gene fusion. *Genome Res.* 10, 1655–1657.
- Long, M., Betran, E., Thornton, K., Wang, W., 2003. The origin of new genes: glimpses from the young and old. *Nat. Rev. Genet.* 4, 865–875.
- López-Lozano, J.L., Sousa, M.V., Ricart, C.A., Chávez-Ortégui, C., Sanchez, E.F., Muniz, E., Bührnheim, P.F., Morhy, L., 2002. Ontogenetic variation of metalloproteinases and plasma coagulant activity in venoms of wild *Bothrops atrox* specimens from Amazonian rain forest. *Toxicol. Anal.* 40, 997–1006.
- Markland, F.S., 1998. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicol. Anal.* 36, 1749–1800.
- Matsui, T., Fujimura, Y., Titani, K., 2000. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1477, 146–156.
- Masuda, S., Hayashi, H., Atoda, H., Morita, T., Araki, S., 2001. Purification, cDNA cloning and characterization of the vascular apoptosis-inducing protein, HV1, from *Trimeresurus flavoviridis*. *Eur. J. Biochem.* 268 (11), 3339–3345.
- Melgarejo, A.R., 2003. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: Cardoso, J.L.C., França, F.O.S., Wen, F.H., Malaque, C.M.S., Haddad Jr., V. (Eds.), *Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. Sarvier, São Paulo, pp. 72–86.
- Oispor, A.V., Levashov, M.Y., Tsetlin, V.I., Utkin, Y.N., 2005. Cobra venom contains a pool of cysteine-rich secretory proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 328, 177–182.
- Otero-Patiño, R., Cardoso, J.L.C., Higashi, H.G., Nunez, V., Diaz, A., Toro, M.F., Garcia, M.E., Sierra, A., Garcia, L.F., Moreno, A.M., Medina, M.C., Castañeda, N., Silva-Diaz, J.F., Murcia, M., Cardenas, S.Y., Dias da Silva, W. D. The Regional Group on Antivenom Research (Regather), 1998. A randomized, blinded, comparative trial of one pepsin-digested and two whole IgG antivenoms for *Bothrops* snake bites in uraba, Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58 (2), 183–189.
- Pahari, S., Mackessy, S.P., Kini, R.M., 2007. The venom gland transcriptome of the Desert Massasauga Rattlesnake (*Sistrurus catenatus edwardsii*): towards an understanding of venom composition among advanced snakes (Superfamily Colubroidea). *BMC Mol. Biol.* 8, 115.
- Paine, M.J., Desmond, H.P., Theakston, R.D., Crampton, J.M., 1992. Purification, cloning, and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloproteinase, jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. Insights into the disintegrin gene family. *J. Biol. Chem.* 267, 22869–22876.
- Pardal, P.P.de O., Souza, S.M., Monteiro, M.R.C.da C., Fan, H.W., Cardoso, J.L.C., França, F.O.S., Tomy, S.C., Sano-Martins, I.S., Sousa-e-Silva, M.C.C., Colombini, M., Kodera, N.F., Moura-da-Silva, A., Cardoso, D.F., Velarde, D.T., Kamiguti, A.S., Theakston, R.D.G., Warrell, R.D.G., 1994. Clinical trial of two antivenoms for the treatment of *Bothrops* and *Lachesis* bites in the north-eastern Amazon region of Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 98, 28–42.
- Saguchi, K., Hagiwara-Saguchi, Y., Murayama, N., Ohi, H., Fujita, Y., Camargo, A.C., Serrano, S.M., Higuchi, S., 2005. Molecular cloning of serine proteinases from *Bothrops jararaca* venom gland. *Toxicol. Anal.* 46, 72–83.
- Salazar, A.M., Rodriguez-Acosta, A., Girón, María E., Aguilar, I., Guerrero, B., 2007. A comparative analysis of the clotting and fibrinolytic activities

- of the snake venom (*Bothrops atrox*) from different geographical areas in Venezuela. *Thromb. Res.* 120, 95–104.
- Saldarriaga, M.M., Otero, R., Núñez, V., Toro, M.F., Díaz, A., Gutiérrez, J.M., 2003. Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. *Toxicon*, 405–411.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, second ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 5463–5467.
- Schultz, J., Copley, R.R., Doerks, T., Ponting, C.P., Bork, P., 2000. SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucleic Acids Res.* 28, 231–234.
- Seemann, J., Weber, K., Osborn, M., Parton, R.G., Gerke, V., 1996. The association of annexin I with early endosomes is regulated by Ca^{2+} and requires an intact N-terminal domain. *Mol. Biol. Cell* 7 (9), 1359–1374.
- Sen, U., Vasudevan, S., Subbarao, G., McClintock, R.A., Celikel, R., Ruggeri, Z.M., Varughese, K.I., 2001. Crystal structure of the von Willebrand factor modulator botrocetin. *Biochemistry* 40, 345–352.
- Shin, Y., Okuyama, I., Hasegawa, J., Morita, T., 2000. Molecular cloning of glycoprotein Ib-binding protein, flavocetin A, which inhibits platelet aggregation. *Thromb. Res.* 99, 239–247.
- Takeya, H., Nishida, S., Miyata, T., Kawada, S., Saisaka, Y., Morita, T., Iwanaga, S., 1992. Coagulation factor X activating enzyme from Russell's viper venom (RW-X). A novel metalloproteinase with disintegrin (platelet aggregation inhibitor)-like and C-type lectin-like domains. *J. Biol. Chem.* 267, 14109–14117.
- Trummel, K., Tonismagi, K., Siigur, E., Aaspollu, A., Lopp, A., Sillat, T., Saat, R., Kasak, L., Tammiste, I., Kogerman, P., Kalkkinen, N., Siigur, J., 2005. A novel metalloprotease from *Vipera lebetina* venom induces human endothelial cell apoptosis. *Toxicon* 46, 46–61.
- Usami, Y., Fujimura, Y., Suzuki, M., Ozeki, Y., Nishio, K., Fukui, H., Titani, K., 1993. Primary structure of two-chain botrocetin, a von Willebrand factor modulator purified from the venom of *Bothrops jararaca*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 928–932.
- Vasconcelos, A.T.R. Brazilian National Genome Project Consortium, 2003. The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 11660–11665.
- Wang, S.H., Shen, X.C., Yang, G.Z., Wu, X.F., 2003. cDNA cloning and characterization of Agkistin, a new metalloproteinase from *Agkistrodon halys*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301, 298–303.
- Weis, W.J., Kahn, R., Fourme, R., Drickamer, K., Hendrickson, W.A., 1991. Structure of the calcium-dependent lectin domain from a rat mannose-binding protein determined by MAD phasing. *Science* 254, 1608–1615.
- Weis, W.I., Drickamer, K., Hendrickson, W.A., 1992. Structure of a C-type mannose-binding protein complexed with an oligosaccharide. *Nature* 360, 127–134.
- Yamazaki, Y., Morita, T., 2004. Structure and function of snake venom cysteine-rich secretory proteins. *Toxicon* 44, 227–231.
- You, K., Seo, H.J., Chung, K.H., Kim, D.S., 2003. A novel metalloprotease from *Gloydius halys* venom induces endothelial cell apoptosis through its protease and disintegrin-like domains. *J. Biochem.* 134 (5), 739–749.
- Zha, X.D., Huang, H.S., Zhou, L.Z., Xu, K.S., 2006. Thrombin-like enzymes from venom gland of *Deinagkistrodon acutus*: cDNA cloning, mechanism of diversity and phylogenetic tree construction. *Acta Pharmacologica Sinica* 27, 184–192.
- Zhang, B., Liu, Q., Yin, W., Zhang, X., Huang, Y., Luo, Y., Qiu, P., Su, X., Yu, J., Hu, S., Yan, G., 2006. Transcriptome analysis of *Deinagkistrodon acutus* venomous gland focusing on cellular structure and functional aspects using expressed sequence tags. *BMC Genomics* 7, 152.
- Zuliani, J.P., Fernandes, C.M., Zamuner, S.R., Gutiérrez, J.M., Teixeira, C.F.P., 2005. Inflammatory events induced by Lys-49 and Asp-49 phospholipases A2 isolated from *Bothrops asper* snake venom: role of catalytic activity. *Toxicon* 45, 335–346.