



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA

PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DA GLÂNDULA DE PEÇONHA

DE *Bothrops pauloensis* (*Bothropoides pauloensis*)

Aluno: RENATA SANTOS RODRIGUES

Orientador: VERIDIANA DE MELO RODRIGUES ÁVILA

UBERLÂNDIA – MG

2010



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DA GLÂNDULA DE PEÇONHA

DE *Bothrops pauloensis* (*Bothropoides pauloensis*)

Aluno: RENATA SANTOS RODRIGUES

Orientador: VERIDIANA DE MELO RODRIGUES ÁVILA

**Tese apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia como parte
dos requisitos para obtenção do
Título de Doutor em Genética e
Bioquímica (Área Bioquímica)**

UBERLÂNDIA – MG

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

D541a Rodrigues, Renata Santos, 1977-

Análise do perfil de expressão gênica da glândula de peçonha de
Bothrops pauloensis (Bothropoides pauloensis) [manuscrito] / Renata
Santos Rodrigues. - 2010.

157 f. : il.

Orientador: Veridiana de Melo Rodrigues Ávila.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui bibliografia.

1. Cobra venenosa - Veneno - Teses. 2. Proteínas - Teses. I. Ávila,
Veridiana de Melo Rodrigues. II. Universidade Federal de Uberlândia.
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 615.99:598.126



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DA GLÂNDULA DE PEÇONHA

DE *Bothrops pauloensis* (*Bothropoides pauloensis*)

Aluno: RENATA SANTOS RODRIGUES

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof^a Dr^a Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Examinadores: Prof^a Dr^a Eliane Candiani Arantes

Prof^o Dr Andreimar Martins Soares

Prof^o Dr^a Maria Inês Homsi Brandeburgo

Prof^a Dr^a Amélia Hamaguchi

Data da Defesa: 25-06-2010

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Tese foram contempladas.

DEDICATÓRIA

⊕ À Dra VERIDIANA DE MELO RODRIGUES ÁVILA

POR SER MÃE CIENTÍFICA, MEU ESPELHO PROFISSIONAL, MEU EXEMPLO DE RETIDÃO, SABEDORIA, ALEGRIA, AMOR E SUPERAÇÃO. OBRIGADA PELO APRENDIZADO, PELAS BRONCAS, POR TODOS OS MOMENTOS QUE CRESCEMOS JUNTAS. OBRIGADA PELA CONFIANÇA DEPOSITADA EM MIM DURANTE ESSES ANOS.

COM VOCÊ AO MEU LADO TUDO FOI TÃO FÁCIL QUANDO PARECIA SER IMPOSSÍVEL. SER ORIENTADA POR VOCÊ FOI UM PRIVILÉGIO, MINHA ETERNA ADMIRAÇÃO E SINCERA GRATIDÃO.

 AOS MEUS PAIS, MARIA EMÍLIA (MINHA VIDA) E JOSÉ RODRIGUES PELA PACIÊNCIA, EDUCAÇÃO, AMOR, CARINHO, DEDICAÇÃO E ALEGRIA. NÃO TENHO PALAVRAS PARA AGRADECER OS MOMENTOS DE INCENTIVO E APOIO DADO AO LONGO DE 11 ANOS EM QUE ESTIVE NA VIDA ACADÊMICA. HOJE REALIZO UM SONHO, GRAÇAS A VOCÊS.

 AOS MEUS IRMÃOS JÚNIOR, TARCÍLIA E MÁRIO E CUNHADOS LÍVIA E FERNANDO PELA ALEGRIA, AMOR, PACIÊNCIA E APOIO EM TODAS AS ETAPAS DE MINHA VIDA ACADÊMICA, SEREI ETERNAMENTE GRATA A VOCÊS.

 A MINHA PRINCESA ANA LAURA, A LUZ DOS MEUS OLHOS, O MOTIVO DO MEU ESFORÇO. “TE AMO MAIS QUE TUDO NESSA VIDA”.

 AOS MEUS TIOS, TIAS, PRIMAS E PRIMOS QUE SEMPRE ESTIVERAM PRESENTE EM MINHA VIDA, FAZENDO DE CADA FERIADO FAMILIAR UMA GRANDE FESTA.

 AOS MEUS AVÓS QUE APESAR DE AUSENTES SEMPRE SERÃO
EXEMPLOS DE VIDA.

AGRADECIMENTOS

- A DEUS SEMPRE, POR TER ME DADO SAÚDE SUFICIENTE PARA TRILHAR ESSE LONGO CAMINHO.
- A Dra. MARIA INÊS QUE ME ACOLHEU A 11 ANOS ATRÁS EM SEU LABORATÓRIO E ME APRESENTOU ESSE LADO BOM DE SER UMA PEÇONHENTA, MINHA ETERNA GRATIDÃO.
- A Dra. AMÉLIA HAMAGUCHI PELO ENORME CARINHO E DEDICAÇÃO EM TODOS OS MOMENTOS DA MINHA VIDA, SOU MUITA GRATA PELOS SEUS ENSINAMENTOS.
- A Dra. HELOÍSA SELISTRE (UFSCar) POR ME RECEBER DE BRAÇOS ABERTOS, PELA DISPONIBILIDADE EM NOS AJUDAR SEMPRE QUE PRECISAVAMOS. OBRIGADA PELOS CONSELHOS.
- AO Dr. ANDREIMAR MARTINS SOARES (USP-RP) POR TODOS ESSES ANOS DE CONVÍVIO, DE ENSINAMENTOS, DE AMIZADE E DE CONFIANÇA.
- A Dra. ELIANE CANDIANI (USP-RP) PELA ALEGRIA DE SEMPRE E DISPONIBILIDADE EM ME RECEBER NO SEU LABORATÓRIO A QUALQUER MOMENTO. OBRIGADA PELA CONFIANÇA.

 AO Dr. FLÁVIO HENRIQUE SILVA (UFSCar) POR DISPONIBILIZAR SEU LABORATÓRIO PARA REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS DE BIOLOGIA MOLECULAR E PELA GRANDE AMIZADE.

 AO Dr. JUAN J. CALVETE (INSTITUTO DE BIOMEDICINA DE VALENCIA, CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS - CSIC) POR TER-ME RECIBIDO DE FORMA TÃO CARINHOSA EM SEU LABORATÓRIO, PELOS ENSINAMENTOS E APRENDIZADO QUE FICARÃO PARA O RESTO DE MINHA VIDA.

 A Dra. LÍBIA SANZ (INSTITUTO DE BIOMEDICINA DE VALENCIA, CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS - CSIC) POR SER MÃE, PELA COMPREENSÃO, AMIZADE, DISPONIBILIDADE DURANTE OS DOIS MESES DE ESTADIA NO LABORATÓRIO EM VALÊNCIA-ESPAÑA.

 AO Dr. ANTÔNIO ROBERTO OTAVIANO POR SEMPRE ESTAR PERTO NAS HORAS MAIS DIFÍCEIS E TAMBÉM MAIS ALEGRES.

 AO DR. CARLOS UEIRA VIERA POR TODA SIMPATIA E DISPOSIÇÃO EM NOS AJUDAR SEMPRE.

 A TODOS OS PROFESSORES DO INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA (INGEB) QUE FORAM PRIMORDIAIS DURANTE OS 11 ANOS DE MINHA FORMAÇÃO, MUITO OBRIGADA.

 A JOHARA BOLDRINI FRANÇA, SÃO MUITOS OS AGRADECIMENTOS QUE TENHO A LHE FAZER, CONSEGUIMOS UMA SINTONIA TÃO PERFEITA NO TRABALHO QUE A CONSEQUÊNCIA DISSO FOI O INÍCIO DE NOSSA AMIZADE. SOU E SEREI ETERNAMENTE GRATA A TODOS OS BONS E MAUS MOMENTOS QUE PASSAMOS JUNTAS E POR CADA DIA DE MINHA VIDA APRENDER MUITO COM VOCÊ, MINHA ADMIRAÇÃO ETERNA.

 AO LUIZ FERNANDO MEU GRANDE AMIGO DE LONGA DATA, SEMPRE PRESENTE EM MINHA VIDA. APRENDEMOS MUITAS COISAS JUNTOS, ERRAMOS MUITO, MAS A AMIZADE SEMPRE PERMANECEU. TENHO GRANDE ADMIRAÇÃO POR VOCÊ.

 A PAULA, PELAS CONVERSAS, CONSELHOS, PUXÕES DE ORELHA, PELOS BONS MOMENTOS QUE VIVEMOS AO LONGO DE NOSSA CARREIRA ACADÊMICA. OBRIGADA POR SER ESSA AMIGA TÃO DEDICADA, TÃO INTELIGENTE E TÃO BATALHADORA, SUA MANEIRA DE SER É UM EXEMPLO QUE LEVAREI PARA TODA MINHA VIDA.

 AO FERNANDO E A KESSER (UFSCar) PELA TOTAL DEDICAÇÃO AOS EXPERIMENTOS REALIZADOS NO LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR, PELA AMIZADE, ACOLHIDA, APRENDIZADO E CARINHO.

 AOS AMIGOS DO INGEB, FAUSTO, PAULA DE SOUZA, RAFAEL, LUCIANA CALÁBRIA E ALEXANDRE AZENHA, OBRIGADA POR ESTAREM SEMPRE POR PERTO, NOS BONS E MAUS MOMENTOS, PELAS BARRAS QUE SEGURAMOS JUNTOS NA PÓS-GRADUAÇÃO.

 AOS MEUS AMIGOS ESPANHÓIS GEMA, JORDI, PILAR, PAULA, ALICIA, CARLOS E MARLIETE PELA AJUDA NOS EXPERIMENTOS, POR DEIXAREM O AMBIENTE LABORATORIAL SEMPRE AGRADÁVEL E PELOS PASSEIOS PELA BELA CIDADE DE VALÊNCIA.

 ÀS ANTIGAS AMIZADES, PORÉM NÃO ESQUECIDAS, DO LABORATÓRIO DE QUÍMICA DE PROTEÍNAS E PRODUTOS NATURAIS, CARLA, CRIS, MARÍLIA, DAIANA E CAROL, VOCÊS FORAM ESSENCIAS NESTA CONQUISTA.

 AOS COLEGAS DO LABORATÓRIO DE QUÍMICA DE PROTEÍNAS E PRODUTOS NATURAIS DÉBORA, LETÍCIA, DAIANA, FRANCIS, DAVI, LINO, THOMAZ, MÁRIO, SÂMELA, SARAH, OBRIGADA PELO CONVÍVIO DIÁRIO.

 A TIANINHA E D. NENZINHA POR ESTAREM SEMPRE A DISPOSIÇÃO EM NOS AJUDAR, OBRIGADA POR TODOS OS MOMENTOS.

 ÀS MINHAS AMIGAS, MEUS SUPORTES, CARINA, CRISTINA, NAIRINHA E CAMILA TAKENO, OBRIGADA POR TODOS OS CONSELHOS, PELO AMOR E AMIZADE. SOU O MELHOR PEDAÇO DE CADA UMA DE VOCÊS.

 AOS FUNCIONÁRIOS DA SECRETARIA DO INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA, EM ESPECIAL, A MARLENE, GRANDE COMPANHEIRA E AMIGA, JUSCIANE, MADSON E ANA PAULA.

 AO GÉRSO POR SEMPRE ESTAR A DISPOSIÇÃO EM SANAR MINHAS DÚVIDAS E PELA PACIÊNCIA.

 A FAPEMIG (FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DE MINAS GERAIS) PELO APOIO FINANCEIRO.

 A TODOS QUE DIRETA OU INDIRETAMENTE CONTRIBUÍRAM PARA REALIZAÇÃO DESTE TRABALHO.

“A CIÊNCIA É A PROCURA DA VERDADE. NÃO É UM JOGO
NO QUAL UMA PESSOA TENTA BATER SEUS OPONENTES E
PREJUDICAR OUTRAS PESSOAS.”

LINUS PAULING

ESTE TRABALHO FOI DESENVOLVIDO NO LABORATÓRIO DE QUÍMICA
DE PROTEÍNAS E PRODUTOS NATURAIS (INSTITUTO DE GENÉTICA E
BIOQUÍMICA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA (UFU –
UBERLÂNDIA-MG) SOB A ORIENTAÇÃO DA PROFESSORA Dra VERIDIANA DE
MELO RODRIGUES ÁVILA E NO LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR
(DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO) DA UNIVERSIDADE FEDERAL
DE SÃO CARLOS (UFSCar – SÃO CARLOS-SP) SOB A SUPERVISÃO DO
PROFESSOR Dr. FLÁVIO HENRIQUE SILVA.

Sumário

DEDICATÓRIA	V
AGRADECIMENTOS	VIII
APRESENTAÇÃO	1
APRESENTAÇÃO	2
CAPÍTULO 1	4
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	4
1- FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	5
1.1- SERPENTES E ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS	5
1.2- PEÇONHAS OFÍDICAS: SÍNTese, COMPOSIÇÃO E VARIABILIDADE	7
1.3- METALOPROTEINASES (MPs)	9
1.4- SERINOPROTEINASES (SPs)	14
1.5- FOSFOLIPASES A ₂ (PLA ₂)	17
1.6- L-AMINOÁCIDO OXIDASES (LAAO)	23
1.7- PEPTÍDEOS POTENCIALIZADORES DE BRADICININA (BPPs)	26
1.8- LECTINAS	27
1.9- FATORES DE CRESCIMENTO	29
1.10- APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS	30
2- REFRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
CAPÍTULO 2	61

ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DA GLÂNDULA DE PEÇONHA DE BOTROPS PAULOENSIS (BOTROPOIDES PAULOENSIS)	61
RESUMO	62
ABSTRACT	64
1- INTRODUÇÃO	66
2- OBJETIVOS	71
3- MATERIAL E MÉTODOS	73
3.1- EXTRAÇÃO DAS GLÂNDULAS VENENÍFERAS DAS SERPENTES <i>B. PAULOENSIS</i> E OBTENÇÃO DO RNA TOTAL	74
3.2- QUANTIFICAÇÃO DO RNA TOTAL PARA A CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE cDNA	75
3.3- EXTRAÇÃO DO RNA MENSAGEIRO	76
3.4- CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE cDNA DE <i>B. PAULOENSIS</i>	76
3.5- SEQUENCIAMENTO DA BIBLIOTECA DE cDNA DE <i>B. PAULOENSIS</i>	78
3.6- ANÁLISES DAS SEQÜÊNCIAS	79
3.7- AMPLIFICAÇÃO DO cDNA CODIFICANTE DA <i>BPLAAO</i>	80
3.8- IDENTIFICAÇÃO DE SEQUÊNCIAS HOMÓLOGAS, ALINHAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA	82
3.9- MODELAGEM MOLECULAR	82
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	84

<i>4.1- TOXINAS PRESENTES NO TRANSCRIPTOMA DA GLÂNDULA DE PEÇONHA DE B. PAULOENSIS</i>	87
<i>4.2- CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASES</i>	94
<i>4.3- CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE PLA₂</i>	95
<i>4.4- CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE BPP</i>	100
<i>4.5- CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE LECTINAS TIPO-C</i>	101
<i>4.6- CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE SERINOPROTEINASES</i>	102
<i>4.7- CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE LAAO</i>	104
<i>4.8- OUTRAS TOXINAS PRESENTES NO TRANSCRIPTOMA DA GLÂNDULA DE PEÇONHA DE B. PAULOENSIS</i>	105
<i>4.9- PROTEÍNAS CELULARES</i>	110
<i>4.10- CLONAGEM DA Bp-LAAO DE B. PAULOENSIS</i>	111
5- CONCLUSÃO	119
6- REFRÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121

Lista de Figuras

CAPÍTULO 1

Figura 1: Serpente *Bothrops (Bothropoides) pauloensis* mantida no serpentário da Universidade Federal de Uberlândia – UFU.

Figura 2: Esquema das diferentes classes de metaloproteinases.

Figura 3: Esquema comparativo do modo de ação catalítica da trombina e SVTLEs sobre o fibrinogênio.

Figura 4: Reação química catalisada pelas L-aminoácido oxidases (LAAO).

CAPÍTULO 2

Figura 1: Esquema do vetor pDONR™ 222, retirado do manual do *kit CloneMiner cDNA Library Construction* (Invitrogen).

Figura 2: Esquema do vetor pTZ57R/T, retirado do manual do kit *The Ins T/A clone PCR Product* (Fermentas).

FIGURA 3: Amostra de RNA total extraído da glândula de peçonha de *B. pauloensis* aplicada em gel de agarose 1%.

Figura 4: Perfil de expressão de toxinas, proteínas celulares e “no hits” encontrados na glândula de peçonha de *B. pauloensis*.

Figura 5: Abundância relativa de toxinas (%) encontradas na glândula de peçonha de *B. pauloensis* (total de 277 clones).

Figura 6: Análise comparativa da expressão de toxinas presentes nas glândulas de peçonhas de serpentes de 5 espécies botrópicas.

Figura 7: Alinhamento da sequência BP018 da biblioteca de *B. pauloensis* com outras sequências de PLA₂s de serpentes botrópicas.

Figura 8: Proporção de proteínas celulares encontradas na glândula de peçonha de *B. pauloensis* (% do total de clones).

Figura 9: Análise do produto de RT-PCR em gel de agarose a 1% para DNA.

Figura 10: Sequência de cDNA e resíduos de aminoácidos deduzidos de Bp-LAAO (GenBank EU870608).

Figura 11: Relações evolutivas das LAAOs.

Figura 12: Diagrama do modelo estrutural teórico da Bp-LAAO de *B. pauloensis* obtido após simulação dinâmica molecular.

Lista de Tabelas

CAPÍTULO 1

Tabela 1: Classificação das fosfolipases A₂ secretadas (sPLA₂).

Tabela 2: Medicamentos e kits de diagnósticos clínicos derivados de peçonhas ofídicas.

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Toxinas isoladas e caracterizadas das serpentes do complexo *B.*

neuwiedi

Tabela 2: Catálogo de transcritos codificantes de toxinas presentes na glândula de peçonha de *B. pauloensis*.

Tabela 3: Ocorrência das classes estruturais, redundância (clones/cluster), proporção de todos os transcritos (% total) e de transcritos identificados (%hits).

Tabela 4: Seqüências homólogas a Bp-LAAO selecionadas no banco de dados (NCBI).

Lista de Abreviaturas

- attB1: adaptador B1
- attB2: adaptador B2
- BiL: lectina tipo-C da peçonha de *B. insularis*
- BLAST: ferramenta de alinhamento local básico de pesquisa (*Basic local alignment and search tool*).
- BnPTX-I: fosfolipase A₂ básica Asp49 de *B. neuwiedi pauloensis*
- BnPTX-II: fosfolipase A₂ básica Asp49 de *B. neuwiedi pauloensis*
- BnSP-7: fosfolipase A₂ básica Lys49 de *B. neuwiedi pauloensis*
- Bp-LAAO: L-aminoácido oxidase da peçonha de *Bothrops pauloensis*
- BPP: peptídeos potencializadores de bradicinina
- Bp-PLA₂: fosfolipase A₂ ácida Asp49 de *B. pauloensis*
- BPr-TXI: fosfolipase A₂ ácida Asp49 de *B. pauloensis*, encontrada na biblioteca do presente estudo
- BpSPI: *thrombin-like* isolada da peçonha de *B. pauloensis*
- BthA-I: fosfolipase A₂ ácida Asp49 de *B. jararacussu*
- BthTX-I: bothropstoxina I, fosfolipase A₂ básica Lys49 de *B. jararacussu*
- BthTX-II: bothropstoxina II, fosfolipase A₂ básica Asp49 de *B. jararacussu*
- ccdB: gene que codifica uma proteína inibidora da enzima DNA girase de *E. coli*
- cDNA: DNA complementar.
- CDR: domínio rico em cisteína
- CNP: peptídeo natriurético tipo-C
- CRD: domínio de reconhecimento de carboidratos
- CRISP: proteínas secretadas ricas em cisteína

CRVP: proteínas de peçonha ricas em cisteína

CTL: lectinas tipo-C

CTL-*like*: lectinas tipo-C *like*

domínio PR-1: domínio contendo proteínas relacionadas a patógenos do grupo 1

ECA I: enzima conversora de angiotensina I

ECA II: enzima conversora de angiotensina II

ESTs: *Expressed Sequence Tags*

FAD: flavina adenina dinucleotídeo

FpA: fibrinopeptídeo A

FpB: fibrinopeptídeo B

GP: glicoproteína

IPTG: *Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*

LAAO: L- amino ácido oxidase

MMPs: Metaloproteinases de Matrix

NCBI: Centro Nacional de Informação Biotecnológica

NGF: fator de crescimento neural

ORF: *open reading frame*

p75^{NTR}: receptores neurotróficos universais de baixa afinidade

PCR: reação polimerásica em cadeia

PDI: proteínas dissulfeto isomerase

pDONR 222: vetor utilizado para clonagem

PG: prostaglandinas

PLA₂: fosfolipase A₂

SVL: lectinas de peçonha de serpentes

SVMP: Metaloproteinases de peçonha de serpentes (*Snake Venom Metaloproteinase*).

SVSPs: Serinoproteinases de peçonha de serpentes (*Snake Venom Serinoproteases*)

SVTLE: *Snake Venom thrombin-like*

Trk: receptores tirosina cinase de alta afinidade

VEGF: fator de crescimento vascular endotelial

X-Gal: *bromo-chloro-indolyl-galactopyranoside*

APRESENTAÇÃO

Apresentação

As peçonhas de serpentes, de uma forma geral, são constituídas por uma grande variedade de proteínas e peptídeos com efeitos tóxicos que podem atuar de forma isolada ou sinérgica potencializando os danos teciduais locais ou sistêmicos. As toxinas estão presentes na peçonha em diversas formas estruturalmente relacionadas que muitas vezes apresentam diferentes atividades biológicas, assim como alterações na especificidade de ligação ao substrato.

O interesse pelo estudo das características químicas e funcionais de toxinas isoladas de peçonhas ofídicas não é devido somente à sua relevância no envenenamento, mas também pela sua possível utilização como valiosos instrumentos de pesquisa em outras áreas do conhecimento.

Com os avanços nos campos da biologia molecular, biotecnologia e bioinformática, houve um aumento significativo no estudo da caracterização estrutural e funcional de várias toxinas, na investigação do padrão de expressão gênica (transcriptoma) pela glândula de peçonha e no desenvolvimento de enzimas recombinantes. Estes estudos geram conhecimentos que podem ser utilizados no tratamento de uma diversidade de doenças, além de oferecerem ferramentas para análise de processos evolucionários relacionados à origem das toxinas.

Este trabalho consiste na análise do perfil de expressão gênica da glândula de peçonha de *B. pauloensis* e caracterização molecular de uma L-aminoácido oxidase gerada a partir da biblioteca de cDNA.

O trabalho foi elaborado segundo as normas do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia e redigido em capítulos. O capítulo 1 apresenta a fundamentação teórica sobre aspectos epidemiológicos dos acidentes ofídicos, composição da peçonha botrópica e as aplicações terapêuticas de componentes isolados de peçonhas de serpentes. O capítulo 2 consiste nas análises do padrão de expressão de toxinas por estudo do transcriptoma e caracterização molecular de uma L-aminoácido oxidase presente na biblioteca de *B. pauloensis*.

CAPÍTULO 1

Fundamentação Teórica

1- Fundamentação Teórica

1.1- Serpentes e Aspectos Epidemiológicos

Durante anos na história da civilização, as serpentes peçonhentas assumiram peculiaridades culturais. Na arte, ciência e religião representaram valores simbólicos envolvendo inúmeras crenças. Originadas há aproximadamente 135 milhões de anos (Coates & Ruta, 2000), as serpentes são caracterizadas como um grupo monofilético independente, originado dos lagartos ou de algum ancestral destes (Kochva, 1986). Atualmente, consistem em um dos grupos mais bem sucedidos dos vertebrados e apesar do formato corporal altamente conservado, este grupo exibe uma grande riqueza de espécies e conquistou uma enorme variedade de ambientes (Lee & Scanlon, 2002).

As serpentes estão inseridas na classe Reptilia (<http://www.reptile-database.org>), a qual é dividida em quatro ordens:

- *Crocodylia* – composta por 23 espécies. Representada por crocodilos, gaviais e jacarés.
- *Rhynchocephalia* – composta por duas espécies representadas por tuataras da Nova Zelândia.
- *Testudines* – composta por aproximadamente 313 espécies entre tartarugas, cágados e jabutis.
- *Squamata* – consiste na maior ordem e comprehende aproximadamente 8.228 espécies entre serpentes e lagartos.

Atualmente, as serpentes constituem o segundo grupo mais diversificado dos répteis, com aproximadamente 3200 espécies existentes no mundo, sendo que 371 espécies de serpentes ocorrem no Brasil (Bérnuls, 2010). Dentre as famílias encontradas no Brasil, somente duas são consideradas peçonhentas (Elapidae e Viperidae), pois possuem glândulas especializadas na produção de peçonha e aparelho inoculador (Cardoso, 2003).

Esta classificação possui, no entanto um caráter pragmático, pois serpentes da família Colubridae possuem glândulas cefálicas que secretam substâncias químicas para auxiliar na digestão da presa que podem ser tóxicas para os seres humanos, além de um primitivo sistema de inoculação de peçonha (Cardoso, 2003, Jackson, 2007).

Segundo dados do Ministério da Saúde (2008), as serpentes do gênero *Bothrops* (Família Viperidae) são encontradas em todo território nacional e são responsáveis por aproximadamente 73,5% dos acidentes ofídicos que ocorrem no país. As espécies mais conhecidas no Brasil são *Bothrops atrox* na região Norte, *B. erythromelas* no Nordeste, *B. moojeni* nas regiões Centro-Oeste e Sudeste, *B. jararaca* na região Sul e Sudeste, *B. jararacussu* no Cerrado da região central e em florestas tropicais do Sudeste, *B. alternatus* distribuída pelo Sul do país e *Bothrops neuwiedi* encontrado em todo território nacional, exceto na Bacia Amazônica.

A espécie *Bothrops neuwiedi*, conhecida como jararaca pintada ou boca de sapo, descrita por Amaral (1925), foi durante muito tempo dividida em doze subespécies de acordo com padrões de coloração e área de ocorrência. Entretanto, Silva (2000) realizou uma revisão sistemática do complexo *Bothrops neuwiedi* onde as 12 subespécies passaram a ser consideradas sete espécies distintas. Nessa reclassificação *Bothrops neuwiedi pauloensis* passou a ser denominada *Bothrops pauloensis*, classificação aceita pela Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH 2005). Posteriormente, Fenwick *et al*, (2009) propuseram uma nova reclassificação dos gêneros *Bothrops*, *Bothriopsis* e *Bothrocophias* baseado-se em evidências moleculares e morfológicas o que resultou na alteração do gênero de diversas espécies. Segundo esta nova classificação, *Bothrops pauloensis* foi renomeada como *Bothropoides pauloensis* (Figura 1).



Figura 1: Serpente *Bothrops (Bothropoides) pauloensis* mantida no serpentário da Universidade Federal de Uberlândia – UFU. **Fonte:** Renata Santos Rodrigues.

No Brasil a espécie *B. pauloensis* tem sido registrada em Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e São Paulo (Silva, 2000). Habita ambientes do cerrado brasileiro, *sensu stricto*, campo cerrado, campo sujo ou campo limpo nas zonas geográficas do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, inclusive em áreas alteradas pelo processo de urbanização (Valle & Brites, 2008).

1.2- Peçonhas Ofídicas: Síntese, Composição e Variabilidade

As peçonhas ofídicas despertam interesse devido à diversidade de propriedades bioquímicas, funcionais e estruturais. A peçonha produzida nas glândulas veneníferas possui a função de paralisar ou matar as presas e defender contra predadores. A glândula de peçonha teve origem pela especialização de glândulas salivares sendo assim, parte dos componentes da peçonha tem relação com enzimas digestivas (Kochva, 1986).

Os mecanismos celulares que regulam a produção e secreção de proteínas nesse órgão são desconhecidos. Sabe-se que a produção da peçonha depende dos níveis protéicos armazenados no lúmen glandular. A proporção de grânulos secretores nas células glandulares representa apenas 4% do volume celular e

acredita-se que a secreção de toxinas ocorra continuamente após a síntese (Junqueira-de-Azevedo & Ho, 2002).

As peçonhas das serpentes são provavelmente, as mais complexas de todas as peçonhas animais conhecidas, contendo 20 ou mais componentes diferentes, sendo que mais de 90% do seu peso seco corresponde a proteínas, com uma grande variedade de enzimas. (Varanda & Gianinni, 1999; Calvete *et al*, 2007).

Dentre as várias classes de toxinas encontradas na peçonha das serpentes podem-se destacar as metaloproteinases, serinoproteinases, fosfolipases A₂, L-aminoácido oxidases, peptídeos potencializadores de bradicinina, miotoxinas, disintegrinas, lectinas tipo C, entre outras de composição minoritária (Bjarnason & Fox, 1994; Kamiguti *et al*, 1996; Matsui *et al*, 2000; Lu *et al*, 2005a). Em geral, muitas dessas toxinas possuem múltiplos alvos de ação e agem de maneira sinérgica, aumentando assim a sua toxicidade.

De forma resumida, são descritas três principais ações fisiopatológicas das peçonhas botrópicas:

- Ação inflamatória aguda: é causada pela ação de um conjunto de toxinas com especificidades diversas. Estas podem promover a liberação de mediadores da resposta inflamatória ou agir sobre o endotélio vascular (Moura-da-Silva *et al*, 1996; Clissa *et al*, 2001; Teixeira *et al*, 2003).

- Ação sobre a coagulação sanguínea e plaquetas: decorrente da ação de proteases que atuam sobre alguns fatores da cascata de coagulação sanguínea, como o fator X, fator V, fibrinogênio, trombina e a protrombina (White, 2005; Lu *et al*, 2005a). Além das toxinas citadas acima, as disintegrinas podem agir sobre as plaquetas inibindo a agregação plaquetária (Kamiguti *et al*, 1996; Lu *et al*, 2005a).

- Ação hemorrágica: é atribuída a componentes específicos denominados hemorraginas, que são metaloproteinases dependentes de zinco, que agem sobre a membrana basal dos capilares, associadas à plaquetopenia e alterações na coagulação.

O resultado desses múltiplos efeitos pode ser visualizado por um quadro clínico caracterizado por um marcante dano tecidual que incluem sintomas como dor, edema, inflamação, necrose, além de distúrbios sistêmicos como

coagulopatias, alterações cardiovasculares, choque hipovolêmico e alterações renais (Warrel, 1995).

As metaloproteinases são abundantes nas peçonhas ofídicas e vários estudos de caracterização funcional e estrutural vêm sendo realizados. Em paralelo, estudos de análise do padrão de expressão de toxinas têm revelado que as metaloproteinases são as toxinas que apresentam maior variabilidade nas peçonhas das serpentes da família Viperidae. Devido a esse conjunto de informações, essas toxinas se tornaram importantes alvos de pesquisa nos últimos anos (Junqueira-de Azevedo & Ho, 2002; Cidade *et al*, 2006; Neiva *et al*, 2009).

1.3- METALOPROTEINASES (MPs)

De um modo geral, as metaloproteinases (E.C.3.4.24) são hidrolases do tipo endopeptidases que dependem da ligação de um metal, na maioria das vezes, um íon zinco (Zn^{2+}) em seu sítio catalítico para desempenhar suas atividades. Estas enzimas, também denominadas de zinco-metaloproteinases são divididas de acordo com a estrutura primária de seus domínios e incluem os grupos das zincinas (subdivididas em gluzincinas e metzincinas, dependendo do quarto resíduo responsável pela coordenação do íon zinco, que pode ser glutamato ou histidina, respectivamente), inverzincinas, carboxipeptidases e DD-carboxipeptidases. As metzincinas são subdivididas em astacinas (encontradas em crustáceos), serralisinas (encontradas em bactérias), matrixinas (encontradas na matriz extracelular de mamíferos) e reprodilinas (presentes nas peçonhas de serpentes e ADAMs) (Bode *et al*, 1993; Stöcker *et al*, 1995; Matsui *et al*, 2000; Fox & Serrano, 2005).

As metaloproteinases de peçonha de serpentes (SVMPs – *Snake Venom Metalloproteinases*) compreendem um amplo grupo de proteínas da família zinco dependentes, que juntamente com as ADAMs (*A Disintegrin And Metalloproteinase*) e as ADAMTs (*A Disintegrin And Metalloproteinase with*

Thrombospondin motifs) pertecem à subfamília das reprodilinas. Essas enzimas apresentam grande homologia no domínio metaloproteinase e em alguns casos, nos domínios localizados na porção carboxi-terminal subsequente (Fox & Serrano, 2008).

As SVMPs compreendem uma série de proteínas com massas moleculares variadas (20-110kDa), que estão presentes em grandes quantidades nas peçonhas viperíidas e em algumas peçonhas de serpentes da família Elapidae e Colubridae (Junqueira-de Azevedo & Ho, 2002; Ching et al, 2006). Estas enzimas são sintetizadas como precursores latentes multimodulares que sofrem diferentes processamentos, gerando tanto moléculas cataliticamente ativas ou domínios livres, não catalíticos conhecidos como disintegrinas.

De acordo com a distribuição dos seus domínios estruturais, as SVMPs foram divididas em classes e subclasses. Essas enzimas são sintetizadas em diferentes combinações dos seguintes domínios:

- ✓ *Peptídeo sinal*: É composto por aproximadamente 18 aminoácidos e é responsável pelo direcionamento da proteína nascente para o interior do retículo endoplasmático para processamento e secreção;
- ✓ *Pró domínio*: É composto por aproximadamente 200 aminoácidos, está envolvido na inativação da enzima no interior das glândulas veneníferas e contém um motivo conservado PKMCGV que está relacionado com o mecanismo *cystein-switch*. De acordo com esse mecanismo, o grupo tiol presente na seqüência conservada do pró-domínio interage com o zinco presente no sítio ativo, bloqueando a ligação do substrato. Dessa forma é necessária a remoção do grupo tiol do sítio ativo para ativar a enzima. A ativação da enzima pode ocorrer por atividade catalítica residual ou por ação de outras proteases da peçonha (Bode et al, 1993; Stöcker et al, 1995).
- ✓ *Metaloproteinase*: É composto de aproximadamente 215 aminoácidos, apresentando regiões conservadas presentes também nas metaloproteinases de matriz (*Matrix Metalloproteinases –MMPs*), sendo a seqüência **HEXXHXXGXXH** (H: histidina, E: ácido glutâmico, G: glicina, B: resíduo hidrofóbico e X: qualquer aminoácido) relacionada ao sítio de

ligação do átomo de zinco. Este domínio apresenta um resíduo de metionina na porção carboxi-terminal na alça abaixo do sítio ligante de zinco (*met-turn*), que fornece estabilidade aos três resíduos de histidina envolvidos na catálise (Bode *et al*, 1993; Stöcker *et al*, 1995).

- ✓ *Disintegrina ou Disintegrina-Like*: Podem variar de 41 a 100 resíduos de aminoácidos, contendo pontes dissulfeto. O domínio disintegrina foi primeiramente caracterizado como peptídios encontrados em peçonhas viperídeas, sendo capazes de se ligar a integrinas das plaquetas com alta afinidade por meio do motivo RGD (Gould *et al*, 1990; Scarborough *et al*, 1993; Morris *et al*, 1995; Kang *et al*, 1999; Souza *et al*, 2000; Mariano-Oliveira *et al*, 2003; Cominetti *et al*, 2003; Cominetti *et al*, 2004). Algumas substituições no motivo RGD foram previamente descritas, como motivos DCD, ECD sendo denominados domínios *disintegrinas-like* (Paine *et al*, 1992; Hite *et al*, 1994; Zhou *et al*, 1995; Selistre-de-Araújo *et al*, 1997; Souza *et al*, 2000). Outros domínios como MLD e KTS, bem como várias disintegrinas homo e heterodiméricas têm sido descritas nos últimos anos (Calvete *et al*, 2005; Marcinkiewicz, 2005).
- ✓ *Rico em Cisteínas*: Possui alta densidade de resíduos de cisteína, contendo por volta de 112 resíduos de aminoácidos. O domínio rico em cisteína está localizado na porção C-terminal do domínio disintegrina em metaloproteinases PIII (Cominetti *et al*, 2003).
- ✓ *Lectinas tipo-C*: foram encontradas associadas com dois membros de metaloproteinases da classe PIV, a RVV-X (ativador do fator X purificado da peçonha de *Vipera russelli*) e VLFXA (ativador do fator X purificado da peçonha de *Vipera lebetina*). Esta última por meio de análises por cDNA, revelou ser sintetizada a partir de 3 RNAs independentes que codificam uma metaloproteinase PIII (cadeia pesada) e duas lectinas tipo-C (cadeia leve).

Baseado na estrutura dos domínios, as SVMPs foram classificadas em 3 classes e 11 subclasses designadas: P-Ia, PII-a, P-IIb, P-IIc, P-IIId, D-I, P-IIe, P-IIIa, P-IIIb, P-IIIc, P-IIIId (Fox & Serrano, 2008) (Figura 2). O critério para classificar as SVMPs foi baseado na presença ou ausência dos domínios não catalíticos que

são observados via transcriptoma ou proteínas isoladas da peçonha. Na subclasse P-Ia estão as metaloproteinases com massa molecular entre 20 e 30kDa, com baixa ou nenhuma atividade hemorrágica. Esta subclasse origina-se de precursores contendo os domínios pré, pró e catalítico, cujas proteínas (quando processadas) ou maduras passam a apresentar apenas o domínio catalítico que contém a seqüência ligante de zinco.

A subclasse P-II é composta pelos domínios pré, pró, catalítico e disintegrina. Na subclasse P-IIa temos as metaloproteinases de baixa massa molecular e também as disintegrinas que possuem de 50 a 60 aminoácidos, incluindo em sua maioria uma seqüência RGD que compete com o fibrinogênio plasmático pela integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ presente na superfície de plaquetas, inibindo assim a agregação plaquetária (Calvete *et al*, 2005). Alternativas quanto à composição do domínio, mostram diferentes formas destas toxinas P-IIb (domínio catalítico e disintegrina não processado), P-IIc (presença do domínio catalítico e disintegrinas na forma dimérica), P-IId (disintegrinas homodiméricas) e P-IIe (disintegrinas heterodiméricas)

A classe P-III é caracterizada por apresentar toxinas com alta atividade hemorrágica, e massa molecular entre 60 e 110kDa. Esta classe contem os seguintes domínios: pré, pró, catalítico, domínio tipo disintegrina e rico em cisteína. O domínio tipo-disintegrina é semelhante aos peptídeos disintegrinas, no entanto exibem substituições funcionais na sequência RGD, tais como ECD e DCD, e é expresso sempre em conjunto com o domínio rico em cisteína. Essa classe também apresenta subclasses que são definidas de acordo com a composição de domínios. A classe PIII-d, anteriormente classificada como P-IV (Bjarnason & Fox, 1994) é caracterizada pela adição de dois domínios tipo lectina na porção carboxi-terminal da proteína.

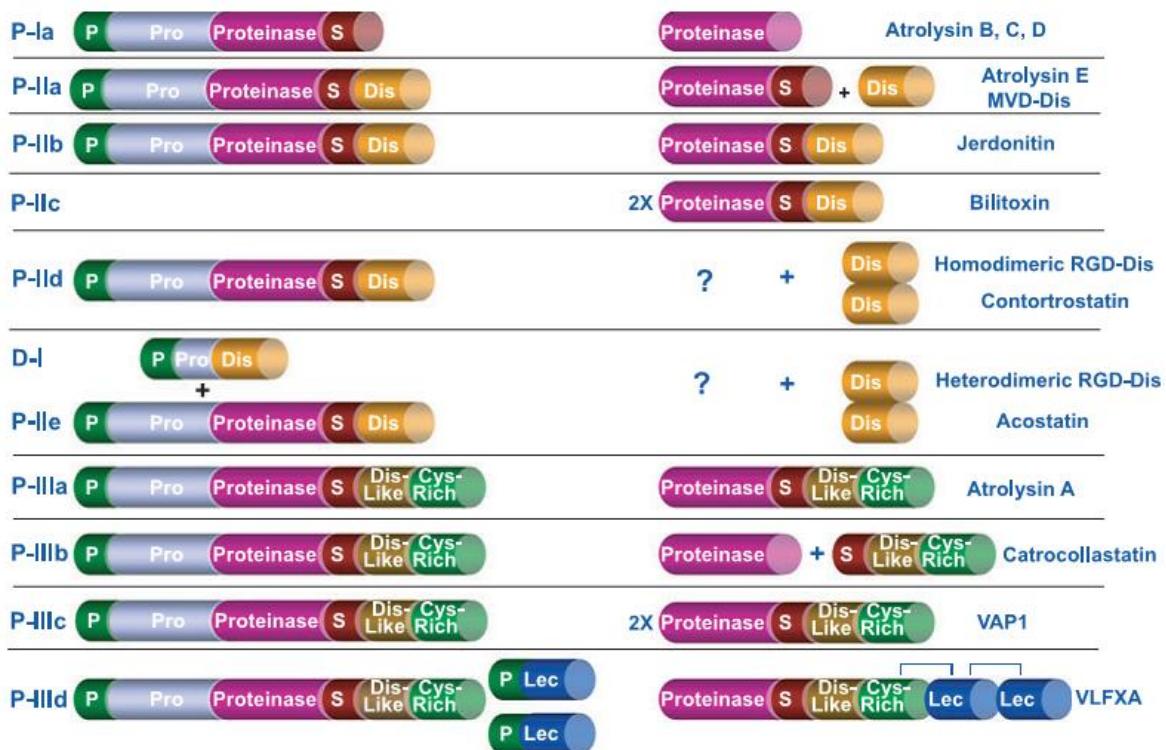


Figura 2: Esquema das diferentes classes de metaloproteases. P (domínio pré), Pro (domínio pro), Proteinase (domínio metaloprotease), S (domínio espaçador), Dis (domínio disintegrina), Dis-Like (domínio semelhante à disintegrina), Cys-Rich (domínio rico em cisteína), Lec (domínio semelhante à lectina) (Fox & Serrano, 2008).

A diversidade estrutural das SVMPs confere a estas toxinas a capacidade de interferir em diversos sistemas celulares, afetando a hemostasia de diferentes maneiras. De modo geral, as SVMPs são capazes de hidrolisar proteínas da membrana basal, incluindo fibronectina, laminina e colágeno tipo IV (Gutiérrez & Rucavado, 2000).

O mecanismo de ação das SVMPs está relacionado à proteólise de componentes da matriz extracelular (Gutiérrez *et al*, 2005), proteínas plasmáticas e proteínas de membrana celular (Kamiguti *et al*, 2003) e à interação com receptores específicos, como integrinas de superfície de plaquetas (De Luca *et al*, 2003), células endoteliais (Souza *et al*, 2000; Cominnetti *et al*, 2004) e fibroblastos (Zigrino *et al*, 2002), ativando ou inibindo a resposta celular. Esses efeitos podem

resultar em várias alterações fisiopatológicas, tais como, inflamação, inibição da agregação plaquetária, apoptose e hemorragia (Gutiérrez *et al*, 2005).

Estudos estruturais de metaloproteinases sugerem que o mecanismo de catálise se deve à presença de uma molécula de água localizada entre o grupo carboxílico do resíduo Glu335 catalítico e o íon zinco. A molécula da água provoca um aumento da polarização na região, isto possibilita a transferência de um próton da molécula de água para o Glu335, o qual se torna um nucleófilo e ataca o grupo carbonil da ligação peptídica do substrato, levando o íon zinco a um estado de transição pentacoordenado. Com a transferência do próton do Glu para o nitrogênio da ligação peptídica do substrato, este é clivado liberando os produtos da reação e a enzima é regenerada com a incorporação de uma nova molécula de água (Stocker *et al*, 1995; Ramos & Selistre-de-Araújo, 2006).

O mecanismo de ação das metaloproteinases tem sido investigado em vários sentidos, porém existe um consenso em considerar a hidrólise de componentes da membrana basal nos capilares e microvasos como um passo chave neste processo (Gutiérrez *et al*, 2005).

1.4- SERINOPROTEINASES (SPs)

Dentre as diversas proteínas que interferem na hemostasia de mamíferos, interagindo com proteínas da cascata de coagulação e da via fibrino(geno)lítica, destacam-se aquelas encontradas nas peçonhas de serpentes da família Viperidae.

As serinoproteases da peçonha de serpentes (SVSPs – *Snake Venom Serinoproteases*) são classificadas como Tripsina S1 de clã SA (Rawlings & Barrent, 2004), pois possuem estrutura semelhante à tripsina. Apesar desta similaridade estrutural, estas toxinas frequentemente atuam em substratos macromoleculares específicos (Halfon & Craik, 1998) e compreendem um grupo de enzimas que catalisam uma ampla gama de reações, que interferem em pontos distintos da cascata de coagulação, por ativação ou inibição específica de

componentes envolvidos na agregação plaquetária, coagulação sanguínea e fibrinólise (Braud *et al*, 2000).

As SVSPs são glicoproteínas sintetizadas como zimogênios e possuem cadeia polipeptídica única com massas moleculares variadas, dependendo da quantidade de carboidratos que a molécula apresenta na estrutura. Além disso, elas diferem uma da outra pelo número variável de sítios de glicosilação N- ou O-ligados.

SVSPs em sua maioria possuem enovelamento típico da enzima digestiva quimotripsina, caracterizada pela presença de dois domínios assimétricos de folhas β , separados pela tríade catalítica (Lesk & Fordham, 1996) composta pela Ser195 na região C-terminal, além da His57 e do Asp102 na região C-terminal, de acordo com numeração do quimiotripsinogênio.

O mecanismo de ação destas enzimas consiste no ataque nucleofílico realizado pela hidroxila de um resíduo ativo de serina sobre o grupo carbonil de ligações peptídicas. Concomitantemente, a His57 captura o próton da hidroxila, interagindo com o Asp102, resultando em um estado de transição tetraédrico estabilizado pelos grupos amino da Ser195 e da Gly193. Finalmente, um próton é transferido da His57 ao fragmento polipeptídico C-terminal da ligação rompida, e a enzima é regenerada por um mecanismo similar onde uma molécula de água atua como nucleófilo (Silva Jr & De Simone, 2004).

Em geral, estudos indicam que as SVSPs são constituídas de aproximadamente 230 resíduos de aminoácidos com doze resíduos de cisteína, os quais formam seis pontes dissulfeto (Serrano & Maroun, 2005). As serinoproteinases apresentam alto grau de semelhança na sequência de aminoácidos, mas apesar disto, elas são altamente específicas em atuar em diferentes substratos tais como fibrinogênio, cininogênio e plaminogênio (Serrano & Maroun, 2005). Dessa forma, algumas serinoproteinases atuam sobre um ou mais substratos, enquanto outras apresentam atividade limitada. As SVSPs que apresentam atividade coagulante *in vitro* são referidas como *thrombin-like*, pois mimetizam algumas funções da trombina, como a capacidade em degradar o fibrinogênio, formando coágulos de fibrina.

A sequência motivo do sítio ativo das enzimas “*thrombin-like*” das peçonhas de serpentes é altamente conservada, no entanto algumas diferenças são observadas no que diz respeito à especificidade da atividade catalítica sobre o fibrinogênio, quando comparadas com a trombina.

O fibrinogênio é uma glicoproteína envolvida nas etapas finais da coagulação sanguínea, e composto por três cadeias α , $\beta\beta$ e γ . Algumas enzimas “*thrombin-like*” das peçonhas de serpentes clivam ambas as cadeias do fibrinogênio, $\alpha\alpha$ e $\beta\beta$, liberando fibrinopeptídeos A (FpA) e fibrinopeptídeos B (FpB), mas a maioria delas atua preferencialmente em apenas uma das cadeias do fibrinogênio (Pirkle, 1998; Markland, 1998; Matsui *et al*, 2000; Bortoleto *et al*, 2002). Markland (1998) designou a subfamília das enzimas “*thrombin-like*” como venombinas A, B ou AB, para definir toxinas que atuam de forma semelhante à trombina, liberando fibrinopeptídeos A, B ou AB da molécula de fibrinogênio, respectivamente.

Castro *et al*, (2004) recomendam o uso da designação *Snake Venom Thrombin Like Enzyme* (SVTLE) para esta subfamília de serinoproteinases. Deste modo, SVTLEs podem ser agrupadas de acordo com a liberação de fibrinopeptídeos em três categorias: SVTLE-AB, SVTLE-A, SVTLE-B (Figura 3).

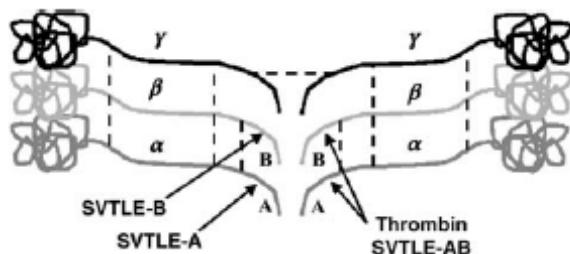


Figura 3: Esquema comparativo do sítio de ação catalítica da trombina e SVTLEs sobre o fibrinogênio. As cadeias do fibrinogênio são representadas pelos símbolos α , β e γ , enquanto que os fibrinopeptídeos liberados pela ação hidrolítica são representados pelas letras A e B (Castro *et al*, 2004).

São descritas na literatura várias enzimas “*thrombin-like*” purificadas de peçonhas botrópicas, as quais são caracterizadas pela preferência em liberar

especificamente os fibrinopeptídeos A, B ou AB do fibrinogênio. Da peçonha de *Bothrops jararaca* já foram isoladas a botrombina (Nishida *et al*, 1994), e a TL-BJ (Serrano *et al*, 2000), estas toxinas apresentam massa molecular de aproximadamente 30kDa. A botrombina e a TL-BJ liberam hidroliticamente o fibrinopeptídeo A enquanto a jararassina-I libera o B. Exemplos de SVTLEs que liberam ambos os fibrinopeptídeos A e B são a jararacussina da peçonha de *B. jararacussu* (Bortoleto *et al*, 2002) e THLE isolada de *Trimeresurus flavoviridis* (Komori *et al*, 2002).

As SVTLEs, na maioria dos casos, não atuam sobre outros fatores da coagulação que não o fibrinogênio. Entretanto, com base na literatura algumas enzimas como contortrixobina (*Agkistrodon contortrix contortrix*) ativam os fatores XIII e V (Amiconi *et al*, 2000), a botrombina e trombocitina respectivamente isoladas de *Bothrops jararaca* e *Bothrops atrox* ativam o fator VIII (Castro *et al*, 2004), a cerastocitina (*Cerastes cerastes*) é capaz de ativar o fator X, que consiste em uma característica rara e interessante na subfamília das SVTLEs (Marrakchi *et al*, 1995).

Costa et al, (2009) isolaram uma serinoprotease *thrombin-like* da peçonha de *B. pauloensis* denominada BpSP-I. Esta enzima atua sobre a cadeia α do fibrinogênio e tem atividade *calicreína-like*. Por outro lado, esta enzima foi incapaz de atuar sobre o fator X e plasmina e, além disso, não induziu agregação plaquetária e atividade proteolítica sobre a caseína.

Dentre as SVTLEs, algumas possuem diferentes atividades biológicas sobre o sistema hemostático e vale citar que elas também podem atuar em outros processos, como nos sistemas complemento, nervoso e renal (Torrent *et al*, 2007).

1.5- FOSFOLIPASES A_2 (PLA $_2$)

As fosfolipases (PLA $_2$ s) (E.C.3.1.1.4) são enzimas que atuam sobre membranas celulares clivando os fosfolipídios em ácidos graxos e lisofosfolipídios. As fosfolipases são divididas em diferentes tipos, variando de

acordo com o sítio de hidrólise. Sua descoberta foi baseada na observação do suco pancreático de mamíferos e da peçonha de serpentes na hidrólise de fosfatidilcolina (Wittcoff, 1951).

As PLA₂s possuem importantes papéis no catabolismo de lipídeos da dieta e no metabolismo geral de lipídeos estruturais de membranas celulares. Com a ação da enzima, os fosfolipídios são hidrolisados desestruturando a membrana e comprometendo a sua permeabilidade seletiva. A hidrólise ocorre especificamente na ligação éster do carbono 2, liberando ácidos graxos e lisofosfolipídios em uma reação dependente de cálcio (Arni & Ward, 1996; Kudo & Murakami, 2002; Kini, 2003). Estas enzimas apresentam um importante papel em várias funções celulares, incluindo manutenção dos fosfolipídios celulares, geração de prostaglandinas (PGs) e leucotrienos, transdução de sinais, proliferação celular e contração muscular. (Dennis *et al*, 1991; Santos-Filho *et al*, 2008; Oliveira *et al*, 2009).

As PLA₂s constituem uma superfamília de enzimas pertencentes a 15 grupos e seus subgrupos, e que também podem ser divididas em cinco tipos distintos: 1) as PLA₂s secretadas (sPLA₂) encontradas em plantas, insetos, mamíferos, peçonhas de serpentes entre outros, 2) as PLA₂s citossólicas (cPLA₂), 3) as PLA₂s independentes de Ca²⁺ (IPLA₂), 4) as acetil-hidrolases de fatores ativadores de plaquetas (PAF-AH) e 5) as PLA₂s lisossomais (Schaloske & Dennis, 2006). Este sistema de classificação agrupa as PLA₂ de acordo com a seqüência de aminoácidos, origem, mecanismo catalítico, características bioquímicas adicionais, funcionais e estruturais.

As sPLA₂s são enzimas que apresentam massa molecular variando entre 13 e 18 kDa, contendo usualmente de 5 a 8 pontes dissulfeto (Schaloske & Dennis, 2006). Estas enzimas apresentam uma histidina no sítio ativo e requerem a presença de íons cálcio (Ca²⁺) para a catálise. As PLA₂s dos grupos IA, IB, IIA, IIB, IIC, IID, IIE, IIF, III,V, IX, X, XIA, XIB, XII, XIII, XIV são representantes das sPLA₂s (Tabela 1).

Tabela 1: Classificação das fosfolipases A₂ secretadas (sPLA₂). Adaptada de Schaloske & Dennis, 2006

Grupo	sPLA ₂	Fonte	Massa Relativa (Mr)	Pontes Dissulfeto
IA	sPLA ₂	Hydrophiidae e Elapidae	13-15	7
IB	sPLA ₂	Pâncreas Suíno e Humano	13-15	7
IIA	sPLA ₂	Crotalinae, Fluído Sinovial Humano	13-15	7
IIB	sPLA ₂	Víbora de Gaboon	13-15	6
IIC	sPLA ₂	Rato e Testículo Murino	15	8
IID	sPLA ₂	Humano, Pâncreas Murino e Baço	14-15	7
IIE	sPLA ₂	Humano, Cérebro Murino, Coração e Útero	14-15	7
IIF	sPLA ₂	Humano, Testículo Murino, Embrião	16-17	6
III	sPLA ₂	Humano, Murino, Lagarto e Abelha	15-18	8
			55 (humano e murino)	
V	sPLA ₂	Humano, Coração Murino, Pulmão e Macrófago	14	6
IX	sPLA ₂	Veneno de Caracol (conodipine-M)	14	6
X	sPLA ₂	Baço Humano, Timo e Leucócitos	14	8
XIA	sPLA ₂	Broto Verde de Arroz (PLA ₂ - I)	12.4	6
XIB	sPLA ₂	Broto Verde de Arroz (PLA ₂ - II)	12.9	6
XII	sPLA ₂	Humano e Murino	19	7
XIII	sPLA ₂	Parvovírus	<10	0
XIV	sPLA ₂	Fungo Simbiótico e Bactéria	13-19	2

Do ponto de vista médico, existe um grande interesse no entendimento do mecanismo de ação das fosfolipases A₂, pois essas enzimas estão envolvidas em vários processos inflamatórios humanos e envenenamentos ofídicos e por abelhas. São encontradas em uma variedade de fluidos biológicos, plantas, bactérias, eritrócitos, plaquetas e leucócitos polimorfonucleares. No entanto, as mais conhecidas e mais estudadas são aquelas encontradas em tecidos pancreáticos de mamíferos e nas peçonhas de répteis e insetos (Dennis, 1994; Soares e Giglio, 2003; Soares *et al*, 2004).

As peçonhas animais consistem em ricas fontes de fosfolipases A₂ as quais apresentam uma variedade de efeitos farmacológicos e/ou tóxicos, como mionecrose, inibição da agregação plaquetária, neurotoxicidade, cardiotoxicidade, hipotensão e indução de edema (Gutiérrez & Lomonte, 1997; Harris *et al*, 2000; Singh *et al*, 2000; Soares *et al*, 2004; Santos-Filho *et al*, 2008).

As fosfolipases A₂ de peçonha de serpentes estão reunidas em dois grupos: as enzimas do grupo IA que são encontradas em peçonhas de serpentes da família Elapidae e Hydrophiidae e as do grupo IIA são encontradas em peçonhas das serpentes crotálicas e viperídeas (Ward *et al*, 2001) (Tabela 1).

As PLA₂s pertencentes ao grupo IIA foram divididas em subgrupos, dos quais destacam-se: (a) PLA₂s Asp49, enzimas que apresentam um resíduo de aspartato na posição 49 sendo cataliticamente ativas; (b) PLA₂s Lys49, apresentam uma substituição do resíduo de aspartato pela lisina na mesma posição e apresentam pouca ou nenhuma atividade enzimática sobre substratos artificiais. Ambos os subgrupos das PLA₂ podem ter caráter básico, com ponto isoelétrico variando entre 7,0 e 10,0 (Gutiérrez & Lomonte, 1997; Ownby *et al*, 1999; Soares *et al*, 2004). Além dos subgrupos acima, podemos citar outras variantes como: Asn 49 (Tsai *et al*, 2004; Wei *et al*, 2006), Ser49 (Krizaj *et al*, 1991; Polgar *et al*, 1996); Gln49 (Bao *et al*, 2005) e Arg49 (Chijiwa *et al*, 2006; Mebs *et al*, 2006), que apresentam atividade catalítica reduzida ou perdem atividade quando comparadas com as fosfolipases A₂ Asp49 (Bao *et al*, 2005).

As seqüências representantes dos domínios estruturais (D₄₂XCCXXHD₄₉) e dos sítios de ligação ao cálcio (X₂₇CGXGG₃₂), são altamente conservadas nas PLA₂s cataliticamente ativas do grupo II (Kudo & Murakami, 2002).

Segundo Renetseder e colaboradores (1985), os resíduos de His48, Asp49, Tyr52 e Asp99 são altamente conservados no sítio ativo dos grupos I e II das PLA₂s. O grupo carboxila do resíduo de aspartato presente na posição 49, juntamente com três oxigênios carbonil da cadeia principal dos resíduos Tyr28, Gly30 e Gly32, estão envolvidos na ligação ao Ca²⁺, que funciona como um cofator no mecanismo de hidrólise (Verheij *et al*, 1980; Scott *et al*, 1990). Este cofator orienta tanto o substrato fosfolipídico, como estabiliza o intermediário

catalítico tetraédrico (Scott *et al*, 1990) e, na sua ausência, as PLA₂s são cataliticamente inativas.

O mecanismo proposto por Verheij *et al* (1981), e revisado por Berg *et al* (2001), sugere que os resíduos His48, Asp99 e uma molécula de água formam uma tríade catalítica. A seqüência do mecanismo ocorre em três etapas: (a) desprotonação da molécula de água pela díade catalítica His48/Asp99; (b) ataque nucleofílico na ligação éster *sn*-2 do glicerofosfolípideo pela água desprotonada e a formação do intermediário tetraédrico, que é estabilizado pelo cofator Ca²⁺; e (c) finalmente o colapso do intermediário da reação, com a liberação dos produtos da hidrólise, ácido graxo e lisofosfolipídio.

Atualmente, pesquisadores procuram elucidar o mecanismo de ação das PLA₂s sobre seus substratos por meio da interação da enzima com a membrana. De acordo com o modelo proposto, as PLA₂s se mantêm cataliticamente inativas em meio aquoso devido à baixa afinidade das PLA₂s Asp49 ao íon cálcio. Quando a enzima penetra parcialmente na região hidrofóbica da bicamada lipídica, várias mudanças conformacionais ocorrem tornando o sítio ativo mais acessível ao seu cofator e também ao seu substrato. A hidrólise procede e seus produtos parecem aumentar a afinidade da enzima à membrana (Wacklin *et al*, 2007).

A substituição do resíduo Asp49 por Lys49 afeta drasticamente a ligação do cálcio às PLA₂, justificando a baixa ou inexistente atividade catalítica. Apesar disto, as PLA₂ Lys49 demonstram atividade lítica sobre membrana através de um mecanismo independente de cálcio. Estudos com peptídeos sintéticos, mapeando sítios de interação com moléculas neutralizantes e mutagênese sítio dirigida, tem demonstrado que existe uma região molecular contendo aminoácidos hidrofóbicos e catiônicos presentes na região C-terminal das PLA₂ Lys49 que é essencial para sua atividade miotóxica, bactericida e sobre lipossomos (Lomonte *et al*, 2003; Chioato & Ward, 2003; Ambrosio *et al*, 2005).

Algumas fosfolipases A₂ básicas da peçonha de *B. n. pauloensis* foram isoladas e caracterizadas. Rodrigues *et al* (1998), isolaram duas fosfolipases A₂ Lys49 denominadas BnSP6 e BnSP7 que não apresentaram atividade catalítica sobre substratos artificiais, porém foram capazes de causar miotoxicidade e edema. Por outro lado, as fosfolipases A₂ básicas Asp49 denominadas BnP TX-I e

BnPTXII apresentam atividade catalítica, citotoxicidade *in vitro*, miotoxicidade, edema e letalidade em camundongos (Rodrigues *et al*, 2004).

As fosfolipases A₂ ácidas Asp49 das peçonhas de serpentes também têm sido amplamente caracterizadas. Estas enzimas em geral, possuem ponto isoelétrico que variam de 4,3 a 5,3 e apresentam uma alta atividade catalítica (Nisenbon *et al*, 1986; Ketelhut *et al*, 2003; Rodrigues *et al*, 2007; Santos-Filho *et al*, 2008), podendo ou não apresentar atividade miotóxica, sendo esta menos expressiva quando comparada à miotoxicidade induzida por PLA₂ básicas.

Várias PLA₂ ácidas já foram isoladas e caracterizadas dentre estas podemos citar três PLA₂ ácidas de *B. neuwiedi* (P1, P2 e P3) com atividade miotóxica (Daniele *et al*, 1995; 1997), uma PLA₂ ácida de *B. alternatus* que apresentou efeito tóxico sobre tecidos como fígado, pulmões e coração (Nisenbom *et al*, 1986), quatro PLA₂ ácidas de *B. jararacussu* que apresentaram também efeito tóxico (Ketelhut *et al*, 2003), duas PLA₂ ácidas de *B. insularis* com atividade miotóxica (Cogo *et al*, 2006), uma PLA₂ ácida de *B. erythromelas* com uma potente ação de inibitória da agregação plaquetária e indução de liberação de prostaglandinas I₂ por células endoteliais (Modesto *et al*, 2006), uma PLA₂ ácida de *B. pauloensis* com elevada atividade hemolítica indireta, inibição da agregação plaquetária, intensa atividade edematógênica e miotoxicidade (Rodrigues *et al*, 2007) e uma PLA₂ ácida de *B. moojeni* que induz edema de pata em camundongos, atividade citotóxica sobre bactérias, fungos e células tumorais (Santos-Filho *et al*, 2008).

Devido a sua relativa abundância em várias fontes naturais, à alta estabilidade e metodologias de purificação bem definidas, as PLA₂ em geral, estão entre as toxinas mais estudadas e muitas delas possuem sua estrutura terciária determinada como a piratoxina- III (*B.pirajai*) (Rigden *et al*, 2003), a miotoxina-I (*B.moojeni*) (Marchi-Salvador *et al*, 2005) e a BthA-I-PLA₂ (*B.jararacussu*) (Magro *et al*, 2005).

1.6- L-AMINOÁCIDO OXIDASES (LAAO)

As L-aminoácido oxidases (E.C.1.4.3.2) são flavoproteínas que apresentam ligações não covalentes com a flavina adenina dinucleotídeo (FAD) ou flavina mononucleotídeo (FMN) e estão presentes nas peçonhas de várias espécies de serpentes (Iwanaga & Suzuki, 1979; Curti *et al*, 1992; Butzke *et al*, 2005).

Estas enzimas são usualmente homodiméricas, ácidas ou básicas e apresentam massa molecular entre 110-150 kDa na forma nativa e 55-66 kDa em suas formas monoméricas, com ponto isoelétrico entre 4,4 – 8,5 (Souza *et al*, 1999, Ponnudurai *et al*, 1994, Tan & Swaminathan, 1992, Tan & Saifuddin, 1989, Torii *et al*, 1997, Abe *et al*, 1998, Du & Clemetson, 2002, Ali *et al*, 2000, Toyama *et al*, 2006, Samel *et al*, 2006). São responsáveis pela coloração amarela das peçonhas ofídicas devido à presença de riboflavina que faz parte do grupo prostético (FAD ou FMN) das LAAOs, o que facilita sua purificação (Takatsuka *et al*, 2001; Manrique, 2005).

As LAAOs apresentam 3-4% de carboidratos em sua estrutura e estas glicosilações contribuem para a microheterogeneidade encontrada em algumas LAAOs já isoladas. As glicosilações destas enzimas parecem ser de fundamental importância para a secreção e solubilidade protéica, bem como para as ações farmacológicas que estas apresentam.

As LAAOs catalisam a desaminação oxidativa de um substrato L-aminoácido para um α -cetoácido com a produção de amônio e peróxido de hidrogênio. Os elétrons retirados durante a reação de desidrogenação catalisada pela LAAO sobre o L-aminoácido, reduzem o grupo prostético FAD da enzima, convertendo-o em FADH_2 , que posteriormente reduz oxigênio molecular até o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxidando novamente a molécula de FADH_2 e regenerando a enzima (Geyer *et al*, 2001) (Figura 4).

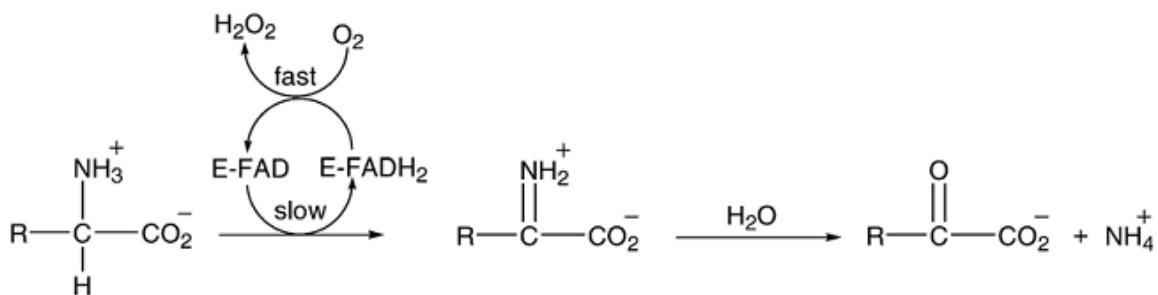


Figura 4: Reação química catalisada pelas L-aminoácido oxidases (LAAO). Os produtos da reação são um iminoácido, como intermediário, seguido de uma hidrólise espontânea, gerando assim um α -cetoácido e amônio.

Estas enzimas apresentam especificidade catalítica pelos aminoácidos hidrofóbicos e aromáticos, incluindo L-fenilalanina, L-triptofano, L-tirosina e L-leucina. A afinidade pelos aminoácidos polares e básicos é bem mais reduzida, sendo que aqueles carregados positivamente como L-lisina e L-arginina fazem interação eletrostática desfavorável com a Arg₃₂₂ do sítio catalítico da enzima (Moustafa *et al*, 2006).

As LAAOs de peçonhas ofídicas geralmente apresentam estruturas homodiméricas, sendo que uma subunidade se mantém unida a outra por ligações não covalentes. Cada monômero contém 15 estruturas em α -hélice e 22 em folhas β -pregueada distribuídas em três domínios: domínio ligante de substrato, domínio ligante de FAD e um terceiro helicoidal, sendo que na interface entre o domínio ligante de substrato e helicoidal há uma distância de 25 \AA formando um sulco que chega até o sítio ativo, provavelmente utilizado para a liberação do produto. A estrutura do domínio ligante de FAD consiste em três regiões descontínuas entre os resíduos 35-64, 242-318 e 446-486. O domínio ligante de substrato é composto pelos seguintes resíduos de aminoácidos 5-25, 73-129, 233-236 e 323-420, enquanto o domínio helicoidal é composto dos resíduos 130-230 (Pawelek *et al*, 2000).

A purificação de LAAOs de peçonhas de serpentes tem sido descrita por vários grupos de pesquisa, sendo que enzimas de diferentes origens exibem distinta especificidade, estabilidade, atividade biológica e tóxica (Du & Clemetson, 2002). A maioria das LAAOs isoladas apresentam grande similaridade em relação

à massa molecular, pl e seqüência N-terminal. A LAAO isolada de *Agkistrodon halys blomhoffi* apresenta 90% de similaridade com a seqüência N-terminal da LAAO isolada da peçonha de *Crotalus atrox* (Torii *et al*, 1997) e 88% com *C. adamanteus* (Raibekas & Massey, 1998).

O mecanismo de ação destas toxinas ainda não foi completamente elucidado, contudo, alguns trabalhos descrevem amplos efeitos biológicos e farmacológicos, como indução de apoptose (Surh & Kim, 1996; Torii *et al*, 1997; Souza *et al*, 1999; Ali *et al*, 2000, Zhang *et al*, 2004), atividade bactericida (Stiles *et al*, 1991; Souza *et al*, 1999; Ehara *et al*, 2002; Stábeli *et al*, 2004; Toyama *et al*, 2006; Izidoro *et al*, 2006; Torres *et al*, 2010; Sun *et al*, 2010); citotoxicidade (Ahn *et al*, 1997, Souza *et al*, 1999, Butzke *et al*, 2005; Izidoro *et al*, 2006; Wei *et al*, 2009); alteração na função plaquetária (Li *et al*, 1994, Stábeli *et al*, 2004, Toyama *et al*, 2006, Izidoro *et al*, 2006, Wei *et al*, 2009, Sun *et al*, 2010); hemorragia (Sakurai *et al*, 2003); edema (Izidoro *et al*, 2006), leishmanicida (Tempone *et al*, 2001, Torres *et al*, 2010) e antiHIV (Zhang *et al*, 2003). Muitos desses efeitos biológicos das LAAOs são creditados aos efeitos secundários do peróxido de hidrogênio produzido durante a reação enzimática (Torii *et al*, 1997; Li *et al*, 1994, Suhr & Kim, 1999).

Algumas LAAOs foram isoladas de peçonhas das serpentes do gênero *Bothrops*. Dentre estas pode-se destacar a LAAO de *B. moojeni* que apresenta efeito leishmanicida (Tempone *et al*, 2001), a de *B. alternatus* que possui efeito bactericida (Stábeli *et al*, 2004), a de *B. pirajai* apresentando atividade bactericida e antitumoral (Izidoro *et al*, 2006), a de *B. pauloensis* (Rodrigues *et al*, 2009) e *B. marajoensis* (Torres *et al*, 2010) com atividade leishmanicida e bactericida.

Dentre essas, apenas a LAAO de *Caloselasma rodhostoma* foi amplamente caracterizada e teve sua estrutura tridimensional determinada (Moustafa *et al*, 2006). Kommoju *et al* (2007), mostraram com sucesso a expressão do recombinante ativo de LAAO de *C. rodhostoma* em *Pichia pastoris* (levedura), enfatizando que as propriedades catalíticas e especificidade pelos substratos foram similares aos da enzima nativa.

As LAAOs formam uma família de proteínas com atividades biológicas diversificadas, sendo que os resultados obtidos até o presente momento indicam

que o peróxido de hidrogênio, liberado durante a reação química catalisada pelas LAAOs, é o metabólito responsável por muitos desses efeitos. Análises estruturais e funcionais dessa classe de enzimas são de grande importância, pois além de uma melhor elucidação quanto ao mecanismo de ação, estes estudos, podem contribuir para aumentar o potencial de aplicação biotecnológica na clínica-farmacêutica.

1.7- PEPTÍDEOS POTENCIALIZADORES DE BRADICININA (BPPs)

As peçonhas de serpentes são conhecidas por serem fontes ricas de peptídeos bioativos. Os peptídeos potencializadores de bradicinina (BPPs) são peptídeos com baixa massa molecular e não apresentam pontes dissulfeto, sendo que alguns são conhecidos como inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) e previnem a formação da angiotensina II e a degradação da bradicinina.

Esses peptídeos são ricos em resíduos de prolina, possuem um ácido piroglutâmico (Pyr) na porção N-terminal, geralmente uma sequência Ile-Pro-Pro na porção C-terminal e são codificados por uma proteína contendo 256 resíduos de aminoácidos. O polipeptídeo precursor é composto por um peptídeo sinal (~25 aa) na porção N-terminal, seguido pela seqüência dos BPPs ou análogos (5-13 aa), uma seqüência espaçadora com número incerto de aminoácidos, uma seqüência ligante (~144 aa) com função indefinida e uma seqüência do peptídeo natriurético tipo-C (CNP) contendo 22 aminoácidos com uma sequência sinal anterior de processamento com 10 aminoácidos (Ferreira, 1970, Murayama *et al*, 1997, Higuchi *et al*, 1999, Menin *et al*, 2008). Na literatura foi descrito um peptídeo potencializador de bradicinina isolado de *Lachesis muta* (*Lm-BPP 1*) que não apresenta o Pyr na porção N-terminal (Soares *et al*, 2005).

As pesquisas com peptídeos potenciadores de bradicinina tiveram início em 1965, por Ferreira e colaboradores, que observaram um fator na peçonha de *B. jararaca* capaz de potenciar a ação da bradicinina. Estes fatores estavam

associados ao controle da pressão sanguínea e outros processos fisiopatológicos. Posteriormente, estes estudos levaram ao desenvolvimento do Captopril®, o primeiro inibidor do sítio ativo da ECA e um dos fármacos mais utilizados no tratamento de hipertensão.

Além de BPPs isolados da peçonha de *B. jararaca* outros peptídeos foram identificados e seqüenciados como BPP-III (*B. neuwiedi*) (Ferreira *et al*, 1998), Cdt1a (*Crotalus durissus terrificus*) (Gomes *et al*, 2007) e *Lm-BPP 1* (*Lachesis muta*) (Soares *et al*, 2005).

Atualmente, as ferramentas proteômicas e genômicas são metodologias importantes para a descoberta de novos peptídeos de peçonhas animais e isso pode levar à identificação de novos componentes que podem ser utilizados como reagentes em diagnósticos clínicos.

1.8- LECTINAS

As lectinas de peçonhas de serpentes (SVL) são proteínas sintetizadas exclusivamente nas glândulas veneníferas. Este grupo de proteínas pode ser dividido em duas classes distintas: lectinas tipo-C (CTL) e as proteínas semelhantes à lectinas tipo-C (CTL-like), ambas estruturalmente conservadas, mas com funções biológicas diversificadas.

Em geral, as CTLs são homodiméricas e cada monômero é composto de aproximadamente 135 aminoácidos e quatro pares de pontes dissulfeto entre as cadeias (Abreu *et al*, 2006).

As CTLs são proteínas ligantes de carboidratos especificamente D-galactose e lactose, sendo que algumas podem reconhecer D-manoze (Zha *et al*, 2001). São dependentes de cálcio (Ca^{2+}) e possuem uma região altamente conservada constituída de 115 a 130 resíduos de aminoácidos denominada Domínio de Reconhecimento de Carboidrato (CRD), região na qual os carboidratos se ligam (Lu *et al*, 2005b). Este domínio na maioria das CTLs é composto pelos seguintes resíduos de aminoácidos conservados: Gln96, Pro97, Asp98, Tyr100, Glu104, Asn119, Asp120 e Gln121. Além disso, outros resíduos foram descritos como importantes para o CRD, Gly12, Cys31, Gly69, Thr82, Asp83, Thr87, Trp92,

Cys106, Gly114, Trp118, Cys123 e Cys13 (Drickamer, 1988; Guimarães-Gomes et al, 2004).

A superfície envolvida na ligação com o carboidrato (CRD) é carregada negativamente em todas as lectinas e apresenta uma forma côncava que acomoda o carboidrato e o íon cálcio, permitindo a interação das CTLs com o grupo hidroxila do carboidrato, modulando assim a função hemaglutinante (Abreu et al, 2006).

Muitas CTLs de peçonhas ofídicas têm sido purificadas e caracterizadas, porém poucas destas foram parcialmente ou totalmente seqüenciadas como as CTLs de *C. atrox*, *L. muta stenophrys*, *Agkistrodon p. piscivorus*, *Trimeresurus okinavensis* e *Bothrops jararacussu*. Estas apresentam atividades biológicas tais como aglutinação, atividade mitogênica sobre linfócitos, agregação plaquetária, indução de edema, inibição da proliferação celular, indução de inflamação, nefrotoxicidade e citotoxicidade (Marcinkiewicz et al, 2000, Hapt et al, 2005, Panunto et al 2006).

As CLT-like são encontradas somente em peçonhas ofídicas e possuem similaridade com as descritas anteriormente, com exceção do clássico loop ligante de carboidrato e cálcio. Elas se ligam a uma ampla variedade de fatores da coagulação e receptores de plaquetas, o que evidencia que apresentam mais de um sítio de interação e podem interagir com mais de um receptor/proteína.

De acordo com seus alvos específicos, as CTL-like podem ser classificadas em: (a) CTL-like ligantes do fator IX e/ou fator X que possuem massa molecular em torno de 30kDa e são heterodiméricas ligadas por ponte dissulfeto, (b) CTL-like ligantes de trombina e protrombina, que possuem 30kDa, são formadas por cadeias homólogas distintas ligadas por pontes dissulfeto e apresentam caráter ácido (c) CTL-like ligantes do fator de von Willebrand que são compostas por duas cadeias heterólogas ligadas por pontes dissulfeto e (d) CTL-like ligantes a receptores plaquetários, que são heterodiméricas, com duas subunidades α e duas β e possuem massa molecular de aproximadamente 150kDa.

As buscas por um melhor entendimento quanto à estrutura e função destas proteínas direcionaram vários pesquisadores a identificar seqüências de *CTL-like* através de técnicas de biologia molecular. A primeira seqüência por cDNA de uma

lectina foi uma CTL da peçonha de *T. stejnegeri* (Xu *et al*, 1999). Posteriormente, uma CTL-like de *T. stejnegeri* foi clonada e apresentou seqüências similares às CTL-like de *Echis ocellatus*, *E. pyramidum leakeyi*, *E. carinatus sochureki* e *Bitis arietans* (Harrison *et al*, 2003).

1.9- FATORES DE CRESCIMENTO

Os fatores de crescimento estão presentes nas peçonhas ofídicas, porém são pouco estudados devido à baixa expressão destes em relação às toxinas predominantes. Dentre estes podemos citar os fatores de crescimento neural (NGF) e endotelial (VEGF),

O fator de crescimento neural (NGF) pertence à família de fatores neurotróficos e consiste em um polipeptídeo responsável pela manutenção e sobrevivência neuronal (Cohen *et al*, 1954). Os NGFs presentes nas peçonhas ofídicas desempenham também efeitos farmacológicos não relacionados ao sistema nervoso como indução do extravasamento plasmático e liberação de histamina em células sanguíneas (Kostiza *et al*, 1995). A maioria das atividades biológicas conhecidas desempenhadas por NGF ocorre via ligação a duas classes de receptores transmembrana: receptores neurotróficos universais de baixa afinidade p75^{NTR}, e receptores tirosina cinase de alta afinidade (Trk) (Connor & Dragunow, 1998). Os receptores Trk ativam sinais positivos, como o aumento no crescimento e sobrevivência dos neurônios e o estímulo da maquinaria transcricional que controla o crescimento de axônios e dendritos, porém os receptores p75^{NTR} são conhecidos por ativarem tanto sinais positivos quanto negativos, como ação pró-apoptótica (Casaccia-Bonelli *et al.*, 1999; Micera *et al.*, 2007).

Boldrini-França *et al* (2009), a partir de uma biblioteca parcial de cDNAs da glândula da peçonha de *Crotalus durissus collilineatus*, identificaram somente um clone correspondente a NGF em um total de 198 seqüências identificadas como toxinas. Isso indica uma baixa expressão deste componente pela glândula de peçonha desta espécie de serpente em relação aos outros componentes tóxicos.

Os fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF) são responsáveis pela criação de novos vasos sanguíneos durante o desenvolvimento embrionário, agindo também em condições patológicas. As proteínas homólogas aos VEGFs na peçonha de serpentes desempenham diversas atividades, como aumento da permeabilidade capilar e indução de mitose em células endoteliais (Tokunaga *et al*, 2005). Alguns destes fatores foram isolados, caracterizados e até clonados, porém ainda não se sabe se todas as espécies de serpentes expressam esta proteína em sua peçonha.

Estudos no campo da toxinologia cresceram bastante e durante os últimos 20 anos várias toxinas já foram isoladas de diversas espécies, porém algumas delas ainda permanecem com sua estrutura e função desconhecidas. Dessa forma, torna-se de fundamental importância o aprofundamento na investigação funcional e estrutural das toxinas ofídicas, o qual poderá fornecer novas ferramentas e/ou tratamentos mais eficazes na minimização dos efeitos dos envenenamentos ofídicos.

1.10- APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS

As pesquisas de novos agentes terapêuticos são baseadas no desenvolvimento racional de novos compostos por modelagem molecular, síntese química e triagem de compostos naturais de origem microbiana, vegetal ou animal. A grande maioria de compostos com potencial terapêutico é isolada de extratos vegetais que apresentam metabólitos ativos, provenientes do seu metabolismo secundário. Por outro lado, tem sido verificado que peçonhas de origem animal, como as peçonhas ofídicas, apresentam substâncias com potencial terapêutico.

Porém, os componentes originais das peçonhas ofídicas são geralmente inadequados como fármacos, necessitando de intervenções por métodos químicos para que haja possibilidade de sua utilização como agentes terapêuticos. Alguns exemplos de medicamentos provenientes de proteínas ofídicas que tiveram progresso clínico são mostrados na Tabela 2 (Adaptado de Koh *et al*, 2006).

Tabela 2: Medicamentos e Kits de Diagnósticos Clínicos Derivados de Peçonhas Ofídicas (Adaptado de Koh *et al*, 2006).

Fármaco/Nome Comercial	Fonte	Indicação	Mecanismo de Ação
Captopril®	<i>Bothrops jararaca</i>	Tratamento de Hipertensão	Inibição da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA)
Integrilina®	<i>Sistrurus miliarus barbouri</i>	Uso em Angioplastia Coronária	Antagonista do Receptor da Glicoproteína (GP) IIb/IIIa Humana Plaquetária; Inibição da Agregação Plaquetária
Aggrastat®	<i>Echis carinatus</i>	Tratamento de Angina	Antagonista Reversível do Receptor da Glicoproteína Plaquetária (GP) IIb/IIIa; Inibição da Agregação Plaquetária
Ancrod®	<i>Agkistrodon rhodostoma</i>	Tratamento de AVC	Inibidor de Fibrinogênio
Defibrase®	<i>Bothrops moojeni</i>	Infarto Cerebral Agudo, Angina Peitoral	Inibição da Trombina e Protrombina
Hemocoagulase®	<i>Bothrops atrox</i>	Prevenção e Tratamento de Hemorragia	Efeito tipo Trombina e Atividade Tromboplastina
Protac®	<i>Agkistrodon contortrix contortrix</i>	Diagnóstico Clínico de Desordem Hemostática	Ativação da Proteína C
Reptilase®	<i>Bothrops jararaca</i>	Diagnóstico de Desordens da Coagulação Sanguínea	—
Ecarin®	<i>E. carinatus</i>	Diagnóstico	Ativação de Protrombina
Exanta®	Cobra	Coagulopatias	Inibidor de Trombina e Anticoagulante

Considerando a aplicação terapêutica desses componentes, talvez a mais importante descoberta em pesquisa toxinológica no desenvolvimento de novos medicamentos tenha sido a descoberta do Captopril®, um composto derivado da peçonha de *Bothrops jararaca* e que atua de maneira muito intensa nos níveis pressóricos do sangue de mamíferos ao inibir a enzima conversora de

angiotensina (Ferreira *et al*, 1970). Este desenvolvimento foi um marco no tratamento da hipertensão arterial. Ao bloquear a formação da angiotensina I ocorre uma vasodilatação que, em última análise diminui os níveis pressóricos sistêmicos. Outra substância de igual importância é a *Ancrod*, um agente de ação fibrinolítico desenvolvido a partir da peçonha de *Agkistrodon rhodostoma*, utilizado no tratamento de trombose venosa profunda e também de obstruções coronarianas.

Várias outras substâncias estão sendo desenvolvidas com o objetivo de tratar doenças como câncer e doenças cardiovasculares, distúrbios de coagulação, assim como substâncias de uso biotecnológico empregadas na pesquisa em universidades e na indústria. Muitas destas apresentam efeito citotóxico sobre células tumorais de animais e de humanos, além de mostrar alto potencial bactericida, antifúngico, antiparasitário entre outros.

As disintegrinas são promissoras candidatas para o desenvolvimento de fármacos por interagirem especificamente com determinadas classes de integrinas. Podem ser utilizadas no tratamento de doenças importantes e severas como tromboembolia e câncer.

O potencial das disintegrinas como agentes farmacêuticos tem sido avaliado amplamente. A trigamina e a rodostomina são potentes inibidores da agregação plaquetária induzida por células tumorais (Gould *et al*, 1990, Sheu *et al*, 1997). No entanto as duas disintegrinas utilizam vias diferentes para alcançar seus objetivos. A trigamina é um antagonista específico da interação com células de câncer de mama, enquanto a rodostomina inibe a agregação plaquetária antagonizando a interação com células de adenocarcinoma de colo (Gould *et al*, 1990).

O pentapeptídeo sintético cíclico RGD cilengitide também conhecido como EMD121974, é inibidor das integrinas $\alpha V\beta 3$ e $\alpha V\beta 5$ e está sendo estudado como medicamento antiangiogênico e anticancerígeno (Stupp *et al*, 2007). Essas disintegrinas estão envolvidas na formação de novos vasos que consiste em um processo essencial no desenvolvimento do câncer.

Dessa forma, as peçonhas ofídicas são consideradas novas fontes para o descobrimento e a formulação de fármacos que podem ser utilizadas como agentes terapêuticos para melhorar a qualidade de vida da população.

2- REFRÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, Y.; SHIMOYAMA, Y.; MUNAKATA, H.; ITO, J.; NAGATA, N.; OHTSUKI, K. Characterization of an apoptosis-inducing factor in Habu snake venom as a glycyrrhizin (GL)-binding protein potently inhibited by GL *in vitro*, **Biol. Pharm. Bull.** v. 21, p. 924–927. (1998).

ABREU, P. A.; ALBUQUERQUE, M. G.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. Structure-function inferences based on molecular modeling, sequence-based methods and biological data analysis of snake venom lectins. **Toxicon**. v. 48, p. 690-701, 2006.

AHN, M.Y.; LEE, B.M.; KIM, Y.S. Characterization and cytotoxicity of L-amino acid oxidase from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*), **Int. J. Biochem. Cell Biol.** v. 29, p. 911–919, 1997.

ALI, S.A.; STOEVA, S.; ABBASI, A.; ALAM, J.M.; KAYED, R.; FAIGLE, M.; NEUMEISTER, B.; VOELTER, W. Isolation, structural, and functional characterization of an apoptosis-inducing L-amino acid oxidase from leaf-nosed viper (*Eristocophis macmahoni*) snake venom, **Arch. Biochem. Biophys.** v.15, p. 216-226, 2000.

AMARAL, A. A general consideration of snake poisoning and observations of neotropical pit vipers. **Contrib. Harvard Inst. Trop. Biol.** v. 2, p. 1-64, 1925.

AMBROSIO, A. L. B.; NONATO, M. C.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; ARNI, R.; WARD, R. J.; OWNBY, C. L.; DE SOUZA, D. H. F.; GARRATT, R. C. A molecular mechanism for Lys49 phospholipase A₂ activity based on ligand-induced conformational change. **J. Biol. Chem.** v. 280, p. 7326-7335, 2005.

AMICONI, G.; AMORESANO, A.; BOUMIS, G., BRANCACCIO, A.; DE CRISTOFARO, R.; DE PASCALIS, A.; DI GIROLAMO, S.; MARAS, B.; SCALONI, A. A novel venomabin B from *Agkistrodon contortrix contortrix*: evidence for

recognition properties in the surface around the primary specificity pocket different from thrombin. **Biochemistry**, v. 39, p. 10294-10308, 2000.

ARNI, R. K.; WARD, R. J. Phospholipase A₂ – a structural review. **Toxicon**. v. 34, p. 827-841, 1996.

BAO, Y.; BU, P.; JIN, L.; WANG, H.; YANG, Q.; AN, L. Purification, characterization and gene cloning of a novel phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon blomhoffii ussurensis*. The **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 37, p. 558 - 565, 2005.

BERG, O. G.; GELB, M. H.; TSAI, M. D.; JAIN, M. K. Interfacial enzymology: the secreted phospholipase A₂-paradigm. **Chem. Rev.** v. 101, p. 2613-2654, 2001.

BÉRNILS, R. S. Brazilian reptiles – List of species. <http://www.sbherpetologia.org.br>. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Acessado em 16/05/2010. 2010.

BJARNASON, K. B. & FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmac. Ther.** v. 62, p. 325, 1994.

BODE, W.; GOMIS-RÜTH, F. X.; STOCKLER, W. Astacins, serralysins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXX-HXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. **FEBS Letters**. v. 331, p. 134-140, 1993.

BOLDRINI-FRANÇA, J.; RODRIGUES, R. S.; FONSECA, F. P. P.; MENALDO, D. L.; FERREIRA, F. B.; HENRIQUE-SILVA, F.; SOARES, A. M.; HAMAGUCHI, A.; RODRIGUES, V. M.; OTAVIANO, A. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. *Crotalus durissus collilineatus* venom gland transcriptome: Analysis of gene expression profile. **Biochimie**. v. 91, p. 586-595, 2009

BORTOLETO, R. K.; MURAKAMI, M. T.; WATANABE, L.; SOARES, A. M.; ARNI, R. K. Purification, characterization and crystallization of jararacussin-I, a fibrinogen-clotting enzyme isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. **Toxicon**. v. 40, p. 1307-1312, 2002.

BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**. v. 82, p.851-859, 2000.

BUTZKE, D.; HURWITZ, R.; THIEDE, B.; GOEDERT, S.; RUDEL, T. Cloning and biochemical characterization of APIT, a new L-amino acid oxidase from *Aplysia punctata*, **Toxicon**. v. 46, p. 479-489, 2005.

CALVETE, J. J. Structure-function correlations of snake venom disintegrins. **Curr. Pharm. Des.** v. 11, p. 829-835, 2005.

CALVETE, J. J.; MARCINKIEWICZ, C.; SANZ, L. Snake venomics of *Bitis gabonica gabonica*. Protein family composition, subunit organization of venom toxins and characterization of dimeric disintegrins bitisgabonin-1 and bitisgabonin-2. **J. Proteome Res.** v. 6. p.326-336, 2007.

CARDOSO, J. L. C. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo-SP: Sarvier, 2003. 468 p.

CASACCIA-BONNEFIL, P.; GU, C.; CHAO, M. V. Neurotrophins in cell survival/death **Adv. Exp. Med. Biol.** v. 468, p. 275-82, 1999.

CASTRO, H. C.; ZINGALI, R. B.; ALBUQUERQUE, M. G.; PUJOL-LUZ, M.; RODRIGUES, C. R. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. **Cell. Mol. Life Sci.** v. 61, p. 843-856, 2004.

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.

CHING, A. T. C.; ROCHA, M. T.; LEME, A. F. P.; PIMENTA, D. C.; FURTADO, M. F. D.; SERRANO, S. M. T.; HO, P. L.; JUNQUEIRA-de-AZEVEDO, I. L. M. Some aspects of the venom proteome of the Colubridae snake *Philodryas olfersii* revealed from a Duvernoy's (venom) gland transcriptome. **FEBS Letters**. v. 580, p. 4417-4422, 2006.

CHIOATO, L.; WARD, R. J. Mapping structural determinants of biological activities in snake venom phospholipase A₂ by sequence analysis and site directed mutagenesis. **Toxicon**. v. 42, p. 869-883, 2003.

CIDADE, D. A. P.; SIMÃO, T. A.; DÁVILA, A. M. R.; WAGNER, G.; JUNQUEIRADE-AZEVEDO, I. L. M., HO, P. L.; BON, C. ZINGALI, R. B.; ALBAO, R. M. *Bothrops jararaca* venom gland transcriptome: Analysis of the gene expression pattern. **Toxicon**. v. 48, p. 437, 461, 2006.

CLISSA, P. B.; LAING, G.D.; THEAKSTON, R. D.; MOTA, I.; TAYLOR, M.J.; MOURA-DA-SILVA A.M. The effect of jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom, on pro-inflammatory cytokines released by murine peritoneal adherent cells. **Toxicon**. v. 39, p. 1567-1573, 2001.

COATES, M. & RUTA, M. Nice snakes, shames about the legs. **Trends Ecol. Evol.** v.14, p. 503-507, 2000.

COGO, J. C.; LILLA, S.; SOUZA, J. H.; HYSLOP, S.; DE NUCCI, G. Purification, sequencing and structural analysis of two acidic phospholipases A2 from the

venom of *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa). **Biochimie.** v. 88, p. 1947-1959, 2006.

COHEN, S.; LEVI-MONTALCINI, R.; HAMBURGER, V. A nerve growth-stimulating factor isolated from sarcomas 37 and 180. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 40, p. 1014-1018, 1954.

COMINETTI, M. R.; RIBEIRO, J. U.; FOX, J. W.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. BaG, a new dimeric metalloproteinase/disintegrin from the *Bothrops alternatus* snake venom that interacts with a5b1 integrin. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 416, p. 171-179, 2003.

COMINETTI, M.R.; TERRUGGI, C.H.B.; RAMOS, O.H.P.; FOX, J.W.; MARIANO-OLIVEIRA, A.; DE FREITAS, M.S.; FIGUEIREDO, C.C.; MORANDI, V.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S. Alternagin-C, a disintegrin-like protein, induces vascular endothelial cell growth factor (VEGF) expression and endothelial cell proliferation *in vitro*. **J. Biol. Chem.** v.279, p 18247–18255, 2004.

CONNOR, B.; DRAGUNOW, M. The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. **Brain Res. Rev.** v. 27, n. 1, p. 1-39, 1998.

COSTA, F. L. S.; RODRIGUES, R. S.; IZIDORO, L. F. M.; MENALDO, D. L.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; FULY, A. L.; SOARES, S. G.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; BARRAVIERA, B.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Biochemical and functional properties of a thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon.** v. 54, p. 725-735, 2009.

CURTI, B.; RONCHI, S.; SIMONETTA, P. M. D and L-amino acid oxidase. In: Mueller. F. **Chemistry and Biochemistry of Flavoenzyme**. v. 3, Ed. CRC Press. Boca Roton. p. 69-94, 1992.

DANIELLE, J. J.; BIANCO, I. D.; FIDELO, G. D. Kinetic and pharmacological characterization of phospholipase A₂ from *Bothrops neuwiedi* venom. **Arch. Biochim. Biophys.** v. 318, p. 65-70, 1995.

DANIELLE, J. J; BIANCO, I. D.; DELGADO, C.; BRIONES CARRILLO, D.; FIDELO, G. D. A new phospholipase A₂ isoform isolated from *Bothrops neuwiedi* (yarara chica) venom with novel kinetic and chromatographic properties. **Toxicon**. v. 35, p. 1205-1215. 1997.

DE LUCA, M.; WARD, C. M.; OHMORI, K.; ANDREWS, R. K.; BERNDT, M. C. Jararhagin and jaracetin: novel snake venom inhibitors of the integrin collagen receptor, $\alpha 2\beta 1$. **Biochem. J.** v. 369, p. 129–139, 2003.

DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation and function of phospholipase A₂. **J. Biol. Chem.** v. 269, p. 13057-13060, 1994.

DENNIS, E. A.; RHEE, S. G.; BILLAH, M. M.; HANNUN, Y. A. Role of phospholipase in generating lipid second messengers in signal transduction. **Faseb J.** v. 5, p. 2068-2077, 1991.

DRICKAMER, K. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. **J. Biol. Chem.** v. 20, p. 9557-9560, 1988

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

EHARA, T.; KITAJIMA, S.; KANZAWA, N.; TAMIYA, T.; TSUCHIYA, T. Antimicrobial action of achacin is mediated by L-amino acid oxidase activity. **FEBS Lett.** v. 531, p. 509–512, 2002.

FENWICK , A. M.; GUTBERLET JR, R. L.; EVANS, J.; PARKINSON, C. L. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**. 156, 617–640, 2009.

FERREIRA, L. A. F.; GALLE, A.; RAIDA, 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*. **J. Protein Chem.** v. 17, 1998.

FERREIRA, S. H. A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. **Br. J. Pharmacol.** v. 24, p. 163-169, 1965.

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

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.

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

GEYER, A.; FITZPATRICK, T. B.; PAWELEK, P. D.; KITZING, K.; VRIELINK, A.; GHISLA, S.; MACHEROUX, P. Structure and characterization of the glycan moiety

of L-amino acid oxidase from Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. **Eur. J. Biochem.** v. 268, p. 4044-4053, 2001.

GOMES, C. L.; KONNO, K.; CONCEIÇÃO, I. M.; IANZER, D.; YAMANOUYE, N.; PREZOTO, B. C.; ASSAKURA, M. T.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; YAMANE, T.; SANTOS, R. A.; CAMARGO, A. C. M.; HAYASHI, M. A. F. Identification of novel bradykinin-potentiating peptides (BPPs) in the venom gland of a rattlesnake allowed the evaluation of the structure-function relationship of BPPs. **Biochem. Pharmacol.** v. 74, p. 350-1360, 2007.

GOULD, R. J.; POLOKOFF, M. A.; FRIEDMAN, P. A.; HUANG, T. F.; HOLT, J. C.; COOK, J. J.; NIEWIAROWSKI, S. Disintegrins: a family of integrin inhibitory proteins from viper venoms. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v. 195, p. 168-171, 1990.

GUIMARÃES-GOMES, V.; OLIVEIRA-CARVALHO, A. L.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; 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, p. 1-11, 2004.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. In: Kini, R. M. (Ed.), **Venom phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism**, pp. 321-352, 1997.

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

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; DÍAZ, C. Hemorrhage induced by snake venom mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon**. v. 45, p. 997-1011, 2005.

HALFON, S.; CRAIK, C. S. Introduction: serine peptidases and their clans. In: Barret, A. J., Rawlings, N. D., Woessner, J. F. (Eds), **Handbook of Proteolytic Enzymes**, Academic Press, London, pp.3-4, 1998.

HARRIS, J. B.; GRUBB, B. D.; MALTIN, C. A.; DIXON, R. The neurotoxicity of the venom phospholipase A₂, notexin and taipoxin. **Exp. Neurol.** v. 161, p. 517-526, 2000.

HARRISON, R. A.; OLIVER, J.; HASSON, S. S.; BHARATI, K.; THEAKSTON, R. D. G. Novel sequences encoding venom C-type lectins are conserved in phylogenetically and geographically distinct *Echis* and *Bitis* viper species. **Gene.** v. 315, p. 95-102, 2003.

HAVT, A.; TOYAMA, M. H.; NASCIMENTO, N. R. F.; TOYAMA, D. O.; NOBRE, A. C. L.; MARTINS, A. M. C.; BARBOSA, P. S. F.; NOVELLO, J. C.; BOSCHERO, A. C.; CARNEIRO, E. M. A novel C-type animal lectin isolated from *Bothrops pirajai* is responsible for the snake venom major effects in the isolated kidney. **Biochemistry and Cell Biology. Biochimie et Biologie Cellulaire.** v. 37, p. 130-141, 2005

HIGUCHI, S.; MURAYAMA, N.; SAGUCHI, K.; OHI, H.; FUJITA, Y.; CAMARGO, A. M. C.; OGAWA, T.; DESHIMARU, M.; OHNO, M. Bradykinin-potentiating peptides and C-type natriuretic peptides from snake venom. **Immunopharmacology.** v. 44, p. 129-135, 1999.

HITE, L.A.; JIA, L.G.; BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. cDNA sequences for four snake venom metalloproteinases: structure, classification, and their relationship to mammalian reproductive proteins. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 308 n. 1 p. 182-91, 1994.

IWANAGA, S.; SUZUKI, T. Enzymes in snake venoms, In: Lee CY (ed.). **Snake Venoms**. Springer-Verlag, New York, p. 61–158, 1979.

IZIDORO, L.F.; RIBEIRO, M.C.; SOUZA, G.R.; SANT'ANA, C.D.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; GOULART, L.R.; BELEBONI, R.O.; NOMIZO, A.; SAMPAIO, S.V.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M. Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. **Bioorg. Med. Chem.** v. 14, p. 7034–7043, 2006.

JACKSON, K. The evolution of venom-conducting fangs: insights from developmental biology. **Toxicon**. v.49, p. 975-981, 2007.

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**. v. 299, p. 279-292, 2002.

KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R. M.; THEAKSTON, R. D. Insights into the mechanism of hemorrhage caused by snake venom metalloproteinase. **Toxicon**. v. 34, p.627-632, 1996.

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 P-III snake venom metalloproteinases responsible for inhibition of platelet function. **FEBS Letters** v. 549, p. 129-134, 2003.

KANG, I. C.; LEE, Y. D.; KIM, D. S. A novel disintegrin salmosin inhibits tumor angiogenesis. **Cancer Res.** v. 59, p. 3754-3760, 1999.

KETELHUT, D. F. J.; HOMEM DE MELO, M.; VERONESE, E. L. G.; ESMERALDINO, L. E.; MURAKAMI, M. T.; ARNI, R. K.; GIGLIO, J. R.; CINTRA, A. C. O.; SAMPAIO, S. V. Isolation, characterization and biological activity of

acidic phospholipase A₂ isoforms from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochimie.** v. 85, p. 983-991, 2003.

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

KOCHVA, E. The origin of snakes and evolutionary of the venom apparatus. **Toxicon.** v. 25, n.1, p.65-106, 1986.

KOH, D. C. I.; ARMUGAN, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine, **Cell. Mol. Life Sci.** v.63, p. 3030-3041, 2006.

KOMMOJU, P.; MACHEROUX, P.; GHISLA, S. Molecular cloning, expression and purification of L-amino acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. **Protein Expr. Purif.** v. 52, p. 89-95, 2007.

KOMORI, Y.; TANAKA, K.; NIKAI, T. Characterization of Habu thrombin like enzyme (THLE) with a new N-terminal sequence from the venom of *Trimeressurus flavoviridis* (habu). **J. Nat. Toxins.** v. 11, p. 205-212, 2002.

KOSTIZA, T.; DAHINDEN, C. A.; RIHS, S.; OTTEN, U.; MEIER, J. Nerve growth factor from the venom of the Chinese cobra *Naja naja atra*: purification and description of nonneuronal activities. **Toxicon.** v. 33, p. 1249-1261, 1995.

KRIZAJ, I.; BIEBER, A. L.; RITONJA, A.; GUBENSEK, F. The primary structure of ammodytin L, a myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Vipera ammodytes* venom, **Eur. J. Biochem.** v. 202, p. 1165 - 1168, 1991.

KUDO, I.; MURAKAMI, M. Phospholipases A₂ enzymes. **Prostaglandins other Lipid Mediat.** v. 69, p. 3-58, 2002.

LEE, M. S. Y.; SCANLON J. D. Snake phylogeny based on osteology, soft anatomy and ecology. **Biol. Rev.** v. 77, p. 333-401, 2002.

LESK, A. M.; FORDHAM, W. D. Conservation and variability in the structures of serine proteinases of the chymotrypsin family. **J. Mol. Biol.** v. 258, p. 501-537, 1996.

LI, Z. Y.; YU, T. F.; LIAN, E. C. Purification and characterization of L-amino acid oxidase from King cobra (*Ophiophagus hannah*) venom and its effects on human platelet aggregation. **Toxicon**. v. 32, p. 1348-1358, 1994.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERÓN, L. An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, v. 42, p. 885 - 901, 2003

LU, Q.; CLEMETSON, J. M.; CLEMETSON, K. J. Snake venoms and hemostasis. **J. Thromb. Haemost.** v. 3, p. 791-799. 2005a.

LU, Q.; NAVDAE, 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, 2005b.

MAGRO, A. J.; TAKEDA, A. A. S.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M. Structure of a BthA-I complexed with p-bromophenacyl bromide: possible correlations with lack of pharmacological activity. **Acta Crystallogr.** v. 61, p. 1670-1677, 2005.

MANRIQUE, F. E. L. Purificación, caracterización y actividad biológica de uma L-aminoacido oxidase presente em el veneno de La serpiente *Bothrops atrox* “jergon”. **Tese de Doutorado**-Universidade Nacional Mayor de Marco. Lima-Peru. p. 116. 2005.

MARCHI-SALVADOR, D. P.; SILVEIRA, L. B.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of myotoxin-I, a Lys49 phospholipase A₂ from *Bothrops moojeni*. **Acta Crystallogr.** v. 61, p. 882-884, 2005.

MARCINKIEWICZ, C. Functional characteristic of snake venom disintegrins: potential therapeutic implication. **Curr. Pharm. Des.** v. 11, p. 815-827, 2005.

MARCINKIEWICZ, C.; LOBB, R. R.; MARCINKIEWICZ, M. M.; DANIEL, J. L.; SMITH, J. B.; DANGELMAIER, C.; WEINREB, P. H.; BEACHAM, D. A.; NIEWIAEROWISKI, S. Isolation and characterization of EMS16, a C-type protein from *Echis multisquamatus* venom, a potent and selective inhibitor of the alpha2beta1 integrin. **Biochemistry.** v. 39, p. 9859-9867, 2000.

MARIANO-OLIVEIRA, A.; COELHO, A. L.; TERRUGGI, C. H.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; BARJA-FIDALGO, C.; DE FREITAS, M. S. Alternatin-C, a nonRGD-disintegrin, induces neutrophil migration via integrin signaling. **Eur. J. Biochem.** v. 270, p. 4799-4808, 2003.

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

MARRAKCHI, N.; ZINGALI, R. B.; KAROUI, H.; BON, C.; EL AYEB, M. Cerastocytin, a new thrombin like platelet activator from the venom of the Tunisian viper *Cerastes cerastes*. **Biochim. Biophys. Acta.** v.1244, p. 147-156, 1995.

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

MEBS, D.; KUCH, U.; CORONAS, F. I. V.; BATISTA, C. V. F.; GUMPRECHT, A.; POSSANI, L. D. Biochemical and biological activities of the venom of the Chinese

pitviper *Zhaoermia mangshanensis*, with the complete amino acid sequence and phylogenetic analysis of a novel Arg49 phospholipase A₂ myotoxin. **Toxicon.** v. 47, p. 797 - 811, 2006.

MENIN, L.; PERCHUC, A.; FAVREAU, P.; PERRET, F.; MICHALET, S.; SCHONI, R.; WILMER, M.; STOCKLIN, R. High throughput screening of bradykinin-potentiating peptides in *Bothrops moojeni* snake venom using precursor ion mass spectrometry. **Toxicon.** v.51, p. 1288-1302, 2008.

MICERA, A.; LAMBIASE, A.; STAMPACHIACCHIERE, B.; BONINI, S.; BONINI, S.; LEVI-SCHAFFER, F. Nerve growth factor and tissue repair remodeling: trkA(NGFR) and p75(NTR), two receptors one fate. **Cytokine Growth Factor Rev.** v. 18, p. 245-56, 2007.

MINISTERIO DA SAÚDE – Histórico do ofidismo 2008. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/historico_ofidismo.pdf>. Acesso em 16 maio 2010.

MODESTO, J. C. A.; SPENCER, P. J.; FRITZEN, M.; VALENÇA, R. C.; OLIVA, M. L.; DA SILVA, M. B.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; GUARNIERI, M. V. BE-I-PLA₂: a novel acidic phospholipase A₂ from *Bothrops erythromelas* venom: isolation, cloning and characterization as potent anti-platelet and inductor of prostaglandin I₂ release by endothelial cells. **Biochem. Pharmacol.** v. 72, p. 377-384, 2006.

MORRIS, V. L.; SCHMIDT, E. E.; KOOP, S.; MACDONALD, I. C.; GRATTAN, M.; KHOKHA, R.; McLANE, M. A.; NIEWIAROWSKI, S.; CHAMBERS, A. F.; GROOM, A. C. Effects of the disintegrin eristostatin on individual steps of hematogenous metastasis. **Exp. Cell Res.** v. 219, p. 571-578, 1995.

MOURA-DA-SILVA, A.M.; LAING, G.D; PAINE, M.J.L. Processing of pro-tumour necrosis factor by venom metalloproteinases: a hypothesis explaining local tissue damage following snake bite. **Europ. J. Immunol.** v. 26, p.2000-2005, 1996.

MOUSTAFA, I.M.; FOSTER, S.; LYUBIMOV, A.Y.; VRIELINK, A. Crystal structure of LAAO from *Calloselasma rhodostoma* with an L-phenylalanine substrate: insights into structure and mechanism. **J. Mol. Biol.** v. 364, p. 991-1002, 2006.

MURAYAMA, N.; HAYASHI, M. A. F.; OHI, H.; FERREIRA, L. A. F.; HERMANN, V. V.; SAITO, H.; FUJITA, Y.; HIGUCHI, S.; FERNANDES, B. L.; YAMANE, T.; CAMARGO, A. C. M. Cloning and sequence analysis of *Bothrops jararaca* cDNA encoding a precursor of seven bradykinin-potentiating peptides and a C-type natriuretic peptide. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** v. 94, p. 1189-1193, 1997.

NEIVA, M.; ARRAES, F. B. M.; SOUZA, J. V.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; PRIETO DA SILVA, A. R. B.; WALTER, M. E. M. T.; BRIGIDO, M. M.; YAMANE, T.; LÓPEZ-LOZANO, J. L.; ASTOLFI-FILHO, S. Transcriptome analysis of the Amazonian viper *Bothrops atrox* venom gland using expressed sequence tags (ESTs). **Toxicon**. v. 53, p. 427-436, 2009.

NISENBOM, H. E.; SEKI, C.; VIDAL, J. C. Phospholipase A₂ from *Bothrops alternatus* (vibora de la cruz) venom. Purification and some characteristic properties. **Toxicon**. v. 24, p. 259-272, 1986.

NISHIDA, S.; FUJIMURA, Y.; MIURA, S.; OZEKI, Y.; USAMI, Y.; SUZUKI, M.; TITANI, K.; YOSHIDA, E.; SUGIMOTO, M.; YOSHIOKA, A.; FUKUI, H. Purification and characterization of bothrombin, a fibrinogen-clotting serine protease from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry**. v. 33, p. 1843-1849, 1994.

OLIVEIRA, C. F.; LOPES, D. S.; MENDES, M. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; HAMAGUCHI, A.; ALCÂNTARA, T. M.; CLISSA, P. B.; RODRIGUES, V. M.

Insights of local tissue damage and regeneration induced by BnSP-7, a myotoxin isolated from *Bothrops (neuwiedi) pauloensis* snake venom. **Toxicon.** v. 53, p. 560-569, 2009.

OWNBY, C. L.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; WHITE, S. P.; FLETCHER, J. E. Lysine 49 phospholipase A₂ proteins. **Toxicon.** v. 37, p. 411-445, 1999.

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

PANUNTO, P. C.; DA SILVA, M. A.; LINARDI, A.; BUZIN, M. P.; MELO, S. E.; MELLO, S. M.; PRADO-FRANCESCHI, J.; HYSLOP, S. Biological activities of a lectin from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon.** v. 47, p. 21-31, 2006.

PAWELEK, P. D.; CHEAH, J.; COULOMBE, R.; MACHEROUX, P.; GHISLA, S.; VRIELINK, A. The structural of L-amino acid oxidase reveals the substrate trajectory into an enantiomerically conserved active site. **EMBO J.** v. 19, p. 4204-4215, 2000.

PIRKLE, H. Thrombin-like enzymes from snake venoms: an updated inventory. **Thromb. Haemost.** v.79, p. 675-683, 1998.

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-M(r) 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.; CHUNG.; TAN, M.C. 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.

RAIBEKAS, A. A.; MASSEY, V. Primary structure of the snake venom L-amino acid oxidase shows high homology with the mouse B cell interleukin 4-induced protein. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 248, p. 476-478, 1998.

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

RAWLINGS, N. D.; BARRET, A. J. Serine peptidases and their clans, In **Handbook of proteolytic enzymes.** N. D. Rawlings, A. J. Barret, and J. f. Woessner. 2nd ed. San Diego: Academic Press Ltd. 2004.

RENETSEDER, R.; BRUNIE, S.; DIJKSTRAT, B. W.; DRENTHT, J.; SIGLER, P. B. A Comparison of the crystal structures of phospholipase A₂ from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom. **J. Biol. Chem.** v. 260, p. 11627 – 11634, 1985.

RIGDEN, D. J.; HWA, L. W.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M. H.; POLIKARPOV, I. The structure of the D49 phospholipase A₂ piratoxin III from *Bothrops pirajai* reveals unprecedented structural displacement of the calcium binding loop: possible relationship to cooperative substrate binding. **Acta Crystallogr.** v. 59, p. 255-262, 2003.

RODRIGUES, R. S.; IZIDORO, L. F. M.; TEIXEIRA, S. S.; SILVEIRA, L. B.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; GIGLIO, J. R.; FULY, A. L.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Isolation and

functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A₂ from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon.** v. 50, p. 153-165, 2007.

RODRIGUES, R. S.; SILVA, J. F.; BOLDRINI-FRANÇA, J.; FONSECA, F. P. P.; OTAVIANNO, A. R.; HENRIQUE-SILVA, F.; HAMAGUCHI, A.; MAGRO, A. J.; BRAZ, A. S. K.; DOS SANTOS, J.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; FONTES, M. R. M.; FULY, A.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Structural and functional properties of Bp-LAAO, a new L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Biochimie.** v. 91, p. 490-501, 2009.

RODRIGUES, V. M.; MARCUSSI, S.; CAMBRAIA, R. S.; ARAÚJO, A. L.; MALTA-NETO, N. R.; HAMAGUCHI, A.; FERRO, E. A. V.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R.; SOARES, A. M. Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipase A₂ from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom. **Toxicon.** v. 44, p. 305-314, 2004.

RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; MANCIN, A. C.; FONTES, M. R. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R. Geographic variations in the composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venoms: biochemical characterization and biological activity. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 121, p. 215-222, 1998.

SAKURAI, Y.; SHIMA, M.; MATSUMOTO, T.; TAKATSUDA, H.; NISHIYA, K.; KASUDA, S.; FUJIMURA, Y.; YOSHIOKA, A. Anticoagulant activity of M-LAO, L-amino acid oxidase purified from *Agkistrodon halys blomhoffii*, through selective inhibition of factor IX. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1649, p. 51-57, 2003.

SAMEL, M.; VIJA, H.; RÖNNHOLM, G.; SIIGUR, J.; KALKKINEN, N.; SIIGUR, 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.

SANTOS-FILHO, N. A.; SILVEIRA, L. B.; OLIVEIRA, C. Z.; BERNARDES, C. P.; MENALDO, D. L.; FULY, A. L.; ARANTES, E. C.; SAMPAIO, S. V.; MAMEDE, C. C.; OLIVEIRA, F.; SOARES, A. M. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I₂ inductor phospholipase A₂ isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**. v. 52, p. 908-917, 2008.

SBH, Lista de espécies de répteis do Brasil, Sociedade Brasileira de Herpetologia. Disponível: www.sbherpetologia.org.br/checklist/repteis.html. 2005.

SCARBOROUGH, R. M.; ROSE, J. W.; NAUGHTON, M. A.; PHILLIPS, D. R.; NANNIZZI, L.; ARFSTEN, A.; CAMPBELL, A. M.; CHARO, I. F. Characterization of the integrin specificities of disintegrins isolated from American pit viper venoms. **J. Biol. Chem.** v. 268, p. 1058-1065, 1993.

SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. **Bioch. Biophys. Acta**. v. 1761, p. 1246-1259, 2006.

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.

SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; SOUZA, D. H. F.; OWNBY, C. L. Analysis of a cDNA sequence encoding a novel member of the snake venom metalloproteinase, disintegrin-like, cystein-rich (MDC) protein family from *Agkistrodon contortrix laticinctus*. **Biochim. Biophys. Acta**. v. 1342, p. 109-115, 1997.

SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteases: sequence homology vs. Substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**. v. 45, p. 1115-1132, 2005.

SERRANO, S. M.; SAMPAIO, C. A.; MENTELE, R.; CAMARGO, A. C.; FINK, E. A novel fibrinogen-clotting enzyme, TL-BJ, from the venom of the snake *Bothrops jararaca*: Purification and characterization. **Thromb. Haemost.** v. 83, p. 438-444, 2000.

SHEU, J. R.; YEN, M. H.; KAN, Y. C.; HUNG, W. C.; CHANG, P. T.; LUK, H. N. Inhibition of angiogenesis in vitro and in vivo: comparison of the relative activities of triflavin, an Arg-Gly-Asp-containing peptide and anti- $\alpha_v\beta_3$ integrin monoclonal antibody. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1336, p. 445-454, 1997.

SILVA JR., F.P., DE-SIMONE, S. G. S1 subsite in snake venom thrombin-like enzymes: can S1 subsite lipophilicity be used to sort binding affinities of trypsin-like enzymes to small-molecule inhibitors? **Bioorg. Med. Chem.** v. 12, p. 2571-2587, 2004.

SILVA, V.X. Revisão sistemática do complexo (Serpentes, Viperidae, Crotalinae). **Tese de Doutorado.** Universidade Federal de São Paulo, 134p. 2000.

SINGH, S. B.; ARMUGAM, A.; KINI, R. M.; KANDIAH, J. Phospholipase A₂ with platelet aggregation inhibitor activity from *Austrelaps superbus* venom: protein purification and cDNA cloning. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 375, p. 289-303, 2000.

SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M.; GIGLIO, J. R. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms: structure-function relationship. **Curr. Org. Chem.** v. 8, p. 1677-1690, 2004.

SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R. Chemical modifications of phospholipase A₂ from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties. **Toxicon.** v. 42, p. 855-868, 2003.

SOARES, M. R., OLIVEIRA-CARVALHO, A. L., WERMELINGER, L. S., ZINGALI, R. B., HO, P. L., JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M., DINIZ, M. R. V. Identification of novel bradykinin-potentiating peptides and C-type natriuretic peptide from *Lachesis muta* venom. **Toxicon**. v. 46, p. 31–38, 2005.

SOUZA, D. H.; IEMMA, M. R.; FERREIRA, L. L.; FARIA, J. P.; OLIVA, M. L.; ZINGALI, R. B.; NIEWIAROWSKI, S.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. The disintegrin-like domain of the snake venom metalloprotease alternagin inhibits alpha2-beta1 integrin-mediated cell adhesion. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 384, p. 341-350, 2000.

SOUZA, D.H.F.; EUGENIO, L.M.; FLETCHER, J.E.; JIANG, M.; GARRATT, R.C.; OLIVA, G.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S. Isolation and structural characterization of a cytotoxic L-amino acid oxidase from *Agkistrodon contortrix laticinctus* snake venom: preliminary crystallographic data, **Arch. Biochem. Biophys.** v. 368, p. 285–290, 1999.

STÁBELI, R.G.; MARCUSSI, S.; CARLOS, G.B.; PIETRO, R.C.L.R.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; GIGLIO, J.R.; OLIVEIRA, E.B.; SOARES, A.M. Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom, **Bioorg. Med. Chem.** v. 12, p. 2881–2886, 2004.

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

STOCKER, W.; GRAMS, F.; BAUMANN, U.; REINEMER, P.; GOMIS-RUTH, F. X.; MCKAY, D. B.; BODE, W. The metzincins-topological and sequential relations

between the astacins, adamalysins, serralysins and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. **Protein Sci.** v. 4, p. 823-840, 1995.

STUPP, R.; BENT, V. D.; MIRIMANOFF, R. O.; BRANDES, A. A.; HEGI, M. E.; WELLER, M. Targeted therapies and anti-angiogenic treatments in newly diagnosed malignant glioma. **Eur. J. Cancer Suppl.** v.5, p.32-33, 2007.

SUHR, S.M.; KIM, D.S. Comparison of the apoptotic pathways induced by L-amino acid oxidase and hydrogen peroxidase, **J. Biochem.** v. 125, p. 305–309, 1999.

SUHR, S.M.; KIM, D.S. Identification of the snake venom substance that induces apoptosis, **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 224, p. 134–139, 1996.

SUN, M. Z.; GUO, C.; TIAN, Y.; CHEN, D.; GREENAWAY, F. T.; LIU, S. Biochemical, functional and structural characterization of Akbu-LAAO: A novel snake venom l-amino acid oxidase from *Agkistrodon blomhoffii ussurensis*. **Biochimie.** v. 92, p.343-349, 2010.

TAKATSUKA, H.; SAKURAI, Y.; YOSHIOKA, A.; KOKUBO, T.; USAMI, Y.; SUZUKI, M. 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.; SAIFUDDIN, M. N. Isolation and characterization of an unusual form of L-amino acid oxidase from King cobra (*Ophiophagus hannah*) venom. **Biochem. Int.** v. 19, p. 937-944, 1989.

TAN, N. H.; SWAMINATHAN, S. Purification and properties of the L-amino acid oxidase from monocellate cobra (*Naja naja kaouthia*) venom. **Int. J. Biochem.** v. 24, p. 967-973, 1992.

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.; ANDRADE JR, H.F.; SPENCER, P.J.; LOURENÇO, C.O.; ROGERO, J.R.; NASCIMENTO, N. *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.

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

TORII, S.; NAITO, M.; TSURUO, T. Apoxin I, a novel apoptosis inducing factor with L-amino acid oxidase activity purified from Western Diamondback Rattlesnake venom, **J. Biol. Chem.** v. 272, p. 9539–9542, 1997.

TORRENT, R.M.R.; BONGIOVANNI, B.; LEIVA, L.C.; DUFFARD, A.M.E.; JUAN P. RODRÍGUEZ, J.P.; PÉREZ, O.C.A.; DUFFARD, R. Neurotoxicological effects of a thrombin-like enzyme isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom (preliminary study). **Toxicon**, v.50 , p 144–152, 2007.

TORRES, A. F. C.; DANTAS, R. T.; TOYAMA, M. H.; FILHO, E. D.; ZARA, F. J.; QUEIROZ, M. G. R.; NOGUEIRA, N. A. P.; OLIVEIRA, M. R.; TOYAMA, D. O.; MONTEIRO, H. S. A.; MARTINS, M. V. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: Phospholipase A₂ and L-amino acid oxidase. **Toxicon**. v. 55, p. 795-804, 2010.

TOYAMA, M.H.; TOYAMA, D.O.; PASSERO, L.F.D.; LAURENTI, M.D.; CORBETT, C.E.; TOMOKANE, T.Y.; FONSECA, F.V.; ANTUNES, E.; JOAZEIRO,

P.P.; BERIAM, L.O.S.; MARTINS, M.A.C.; MONTEIRO, H.S.A.; FONTELES, M.C. Isolation of a new l-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom, **Toxicon**. v. 47, p. 47–57, 2006.

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.

VALLE, A. L.; BRITES, V. L. C. Nomes populares e aspectos ecológicos de Bothrops pauloensis (Amaral, 1925) em áreas antropizadas do Triângulo e Alto Paranaíba, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Zoociências**. v. 10, p. 155-161, 2008.

VARANDA, E. A.; GIANNINI, M.J.S.M. Bioquímica de venenos de serpentes. In: Barraviera, B. editor. **Venenos: aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos**. 1^a ed. Rio de Janeiro: EPUB; p. 205 –23. 1999.

VERHEIJ, H. M.; SLOTBOOM, A. J.; DE HAAS, G. H. Structure and function of phospholipase A₂. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.** v. 91, p. 91-203, 1981.

VERHEIJ, H. M.; VOLWERK, J. J.; JASEN, E. H.; PUYK, W. C.; DIJKSTRA, B. W.; DRENTH, J.; DE HAAS, G. H. Methylation of histidine-48 in pancreatic phospholipase A₂. Role of histidine and calcium ion in the catalytic mechanism. **Biochemistry**. v. 19, p. 743-750, 1980.

WACKLIN, H. P.; TIBERG, F.; FRAGNETO, G.; THOMAS, R. K. Distribution of reaction products in phospholipase A₂ hydrolysis. **Biochim. Biophys. Acta**. v. 1768, p. 1036-1049, 2007.

WARD, R. J.; OLIVEIRA, A. H.; BORTOLETO, R. K.; ROSA, J. C.; FAÇA, V. M.; GRENNE, L. J. Refolding and purification of Bothropstoxin-I, a Lys49-phospholipase A₂ homologue expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli*. **Protein. Expr. Purif.** v. 21, n. 21, p. 134-140, 2001.

WARRELL, D.A. Clinical toxicology of snakebite in Asia. In J Meier, J White (eds), **Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons**, CRC Press, Boca Raton, p. 493-594. 1995.

WEI, J. F.; WEI, X. L.; CHEN, Q. Y.; HUANG, T.; QIAO, L. Y.; WANG, W. Y.; XIONG, Y. L.; HE, S. H. N49 phospholipase A₂, a unique subgroup of snake venom group II phospholipase A₂. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1760, p. 462 - 471, 2006.

WEI, J. F.; YANG, H. W.; WEI, X. L.; QIAO, L. Y.; WANG, W. Y.; HE, S. H. Purification, characterization and biological activities of the l-amino acid oxidase from *Bungarus fasciatus* snake venom. **Toxicon**. v. 54, p. 262-271, 2009.

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

WITTCOFF, H. **The phosphatides**. Ed. Reinhold Publishing Corporation New York, p. 99-115, 1951.

XU, Q.; WU, X. F.; XIA, Q. C.; WANG, K. Y. Cloning of a galactose-binding lectin from the venom of *Trimeressurus stejnegeri*. **Biochem. J.** v. 341, p. 733-737, 1999.

YOU, W.K.; JANG, Y.J.; CHUNG, K.H.; JEON, O.H.; KIM, D.S.; Functional roles of the two distinct domains of halysase, a snake venom metalloprotease, to inhibit human platelet aggregation. **Biochem. Biophys. Res.** v. 339, p. 964-970, 2006.

ZHA, H. G.; LEE, W. H.; ZHANG, Y. Cloning of cDNAs encoding C-type lectins from *Elapidae* snakes *Bungarus fasciatus* and *Bungarus multicinctus*. **Toxicon.** v. 39, p.1887-1892, 2001.

ZHANG, H.; TENG, M.; NIU, L.; WANG, Y.; WANG, Y.; LIU, Q.; HUANG, Q.; HAO, Q.; DONG, Y.; LIU P. Purification, partial characterization, crystallization and structural determination of AHP-LAAO, a novel L-amino-acid oxidase with cell apoptosis-inducing activity from *Agkistrodon halys pallas* venom, **Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.** v. 60, p. 974-977, 2004.

ZHANG, I.; WANG, J.H.; LEE, W.H.; WANG, Q.; LIU, H.; ZHENG, Y.T.; ZHANG, Y. Molecular characterization of *Trimeresurus stejnegeri* venom L-amino acid oxidase with potential anti-HIV activity. **Biochem. Biophys Res. Commun.** v. 309, p. 598–604, 2003.

ZHOU, Q.; SMITH, J.B.; GROSSMAN, M.H. Molecular cloning and expression of catrocollastatin, a snake-venom protein from *Crotalus atrox* (western diamondback rattlesnake) which inhibits platelet adhesion to collagen. **Biochem. J.** v. 15 n. 307 p. 411-7, 1995.

ZIGRINO, P.; KAMIGUTI, A.S.; EBLE, J.; DRESCHER, C.; NISCHT, R.; FOX, J.W.; MAUCH, C. The reprolysin jararhagin, a snake venom metalloproteinase, functions as a fibrillar collagen agonist involved in fibroblast cell adhesion and signaling. **J. Biol. Chem.** v. 277, p 40528–40535, 2002.

CAPÍTULO 2

ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA
DA GLÂNDULA DE PEÇONHA DE *Bothrops*
pauloensis (*Bothropoides pauloensis*)

Resumo

As peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* consistem em uma fonte de peptídeos e proteínas que apresentam importantes ações farmacológicas ocasionando efeitos locais e sistêmicos como edema, sangramentos e necrose muscular. Muitas toxinas da peçonha de *B. pauloensis* têm sido isoladas e caracterizadas através de métodos bioquímicos tradicionais. Com o objetivo de analisar o perfil transcrional da glândula de peçonha de *B. pauloensis* e desvendar o potencial farmacológico de seus constituintes a nível molecular, foi gerada um biblioteca parcial de cDNA, e as seqüências obtidas foram identificadas por análises de similaridade contra bancos de dados internacionais existentes. Os resultados demonstraram que de um total de 1152 clones seqüenciados, 668 correspondem às seqüências de qualidade (> 100pb), havendo um grande predomínio de transcritos que codificam toxinas em relação aos que codificam proteínas envolvidas em funções celulares. Entre as seqüências que codificam toxinas (41,5%), as metaloproteinases (38%) apresentaram maior freqüência, seguidas pelas fosfolipases A₂ (27%), peptídeos potencializadores de bradicinina (16,5%) e lectinas tipo-C (8,2%). Outros clones são expressos em menor freqüência como serinoproteinases (5,1%), L-aminoácido oxidases (2,7%), fatores de crescimento neural (NGF) (1,0%), endotelial vascular (VEGF) (0,3%) e hialuronidase (0,3%). Dentre os transcritos que codificam proteínas celulares a maioria consiste em moléculas envolvidas em funções fisiológicas da glândula de peçonha. A maioria desses transcritos celulares está envolvida na expressão gênica e protéica, o que reflete uma alta

especialização do tecido para a síntese de toxinas. As análises do transcriptoma da glândula de peçonha de *B. pauloensis* possibilitaram a identificação de um cluster BP028 contendo 7 sequências correspondentes à L-aminoácido oxidase. A clonagem e amplificação desta svLAAO gerou um fragmento de 1548 pares de bases (pb) que codificam uma proteína madura de 516 resíduos de aminoácidos, com massa molecular de 58 kDa, pl 6,3 e apenas um sítio de glicosilação. Segundo análises filogenéticas, as svLAAOs de serpentes Viperidae e Elapidae apresentaram evidente separação, indicando uma correlação significativa com a especiação, demonstrando que os genes correspondentes a estas sequências são ortólogos.

Abstract

Bothrops snake venoms are rich sources of peptides and proteins that have important pharmacological actions causing local and systemic effects such as swelling, bleeding and muscle necrosis. Many toxins from the venom of *B.pauloensis* have been isolated and characterized by classical biochemical methods. Aiming to describe the transcriptional profile of the gland of *B. pauloensis* and unveil the pharmacological potential of its products at the molecular level a partial cDNA library has generated and the sequences obtained were identified by similarity analysis against existing international databases. The results show that a total of 1152 clones sequenced, 668 correspond to the sequences of quality, with a high prevalence of transcripts that encode toxins when compared with those that code for proteins involved in cellular functions. Among the sequences encoding toxins (41.5%), metalloproteinases (38%) showed a higher frequency, followed by phospholipase A2 (27%), bradykinin potentiators peptides (16.5%) and C-type lectins (8.2%). Other clones are expressed at lower frequency as serineproteinases (5.1%), L-amino acid oxidase (2.7%), nerve growth factors (NGF) (1.0%) and vascular endothelial growth factors (VEGF) (0.3%), hyaluronidase (0.3%). After analysis of sequences in banks, it was found that there was not only the identification of toxins, but also some cellular transcripts, mostly involved in physiological functions of the gland. Most of these transcripts are involved in cellular gene and protein expression, which reflects a highly specialized tissue for the synthesis of toxins. The analysis of the transcriptome of the gland of *B. pauloensis* allowed the identification of a BP028

cluster containing seven sequences of transcripts encoding LAAO. Cloning and amplification of LAAO generated a fragment of 1548 base pairs (bp) encoding a mature protein of 516 amino acid residues with a molecular mass of 58 kDa, pI 6.3 and only one glycosylation site. According to the phylogenetic analysis svLAAOs from Viperidae and Elapidae snake showed clear separation, indicating a significant correlation with speciation, demonstrating that genes corresponding to these sequences are orthologous

1- INTRODUÇÃO

A peçonha de cada espécie de serpente é constituída por um coquetel de diferentes peptídeos e proteínas com potencial farmacológico. A ação das toxinas encontradas na peçonha de serpentes do gênero *Bothrops* resulta em dois efeitos distintos, porém integrados: os danos locais e sistêmicos. Os danos locais estão associados principalmente com mionecrose e edema (Gutiérrez & Lomonte, 1995) causado pelas fosfolipases A₂ e metaloproteinases que destroem componentes da parede vascular e matriz extracelular causando desordens na permeabilidade dos vasos. Os danos sistêmicos são ocasionados por desordens na coagulação sanguínea (Markland, 1998; Fox & Serrano, 2005), resultado da inibição, degradação e ativação de algumas proteínas como protrombina, fator II, fator X, fator de von Willebrand, pela ação de serinoproteinases, metaloproteinases, disintegrinas e lectinas tipo-C (Markland, 1998). Algumas metaloproteinases rompem o endotélio vascular causando hemorragia generalizada, quadro observado na maioria dos envenenamentos botrópicos. Outro efeito é ocasionado pelos peptídeos potencializadores de bradicinina que inibem a enzima conversora de angiotensina (ECA) desencadeando um quadro de hipotensão.

Diversos peptídeos e toxinas de peçonhas de serpentes foram isolados e caracterizados, porém muitos ainda permanecem pouco explorados ou mesmo desconhecidos em virtude da dificuldade em purificar os componentes menos expressos em quantidades suficientes para caracterização estrutural e funcional.

Uma abordagem muito utilizada nos dias atuais, com o intuito de obtenção de um perfil geral de toxinas presentes na glândula de peçonhas, tem sido as análises transcriptômicas. Esse estudo possibilita a geração de *ESTs* (*Expressed*

Sequence Tags) que são sequências contendo informações valiosas para o estudo da complexidade e variabilidade de toxinas presentes na peçonha.

Com o grande número de seqüências geradas, torna-se possível a identificação de toxinas já isoladas pelos métodos convencionais de purificação ou a descrição de novas toxinas após análises comparativas com banco de dados de seqüências de DNA e proteínas. Muitas vezes permite a identificação de novas toxinas, que por abordagens objetivas e direcionadas, não poderiam ser descobertas (Junqueira-de Azevedo & Ho, 2002).

Além disso, o transcriptoma não contribui somente para o entendimento no campo das toxinas, mas também mostram a diversidade de proteínas presentes na peçonha fornecendo uma amostra representativa da diversidade da expressão gênica naquele sistema.

Durante os últimos anos, bibliotecas de cDNAs de glândulas de serpentes foram construídas, e uma diversidade de ESTs foram geradas, contribuindo para um melhor conhecimento biológico da peçonha, além de permitir a seleção de possíveis candidatos antigênicos para o desenvolvimento de soros. Dos estudos transcrpcionais de glândula de peçonha de serpentes previamente realizados destacam-se os das espécies *Bothrops insularis* (Junqueira-de-Azevedo & Ho, 2002), *Bothrops jararacussu* (Kashima et al, 2004), *Bothrops jararaca* (Cidade et al, 2006), *Agkistrodon acutus* (Qinghua et al, 2006), *Philodryas olfersii* (Ching et al, 2006), *Echis ocellatus* (Wagstaff & Harrison, 2006), *Bitis gabonica gabonica* (Calvete et al, 2007), *Sistrurus catenatus edwardsii* (Pahari et al, 2007), *Bothrops atrox* (Neiva et al, 2009), *Crotalus durissus collilineatus* (Boldrini-França et al, 2009) e *Bothrops pauloensis* (presente trabalho).

Análises do padrão de expressão gênica da glândula de peçonha de *B. pauloensis*, anteriormente descrita como *B. neuwiedi pauloensis* (Silva, 2000) fornecerão novas informações sobre a complexidade e variabilidade de toxinas, pois apesar do grande número de toxinas isoladas e bem caracterizadas das peçonhas de serpentes do complexo *B. neuwiedi* (Tabela 1), este trabalho se mostra pioneiro quanto às análises transcricionais e clonagem de uma L- amino ácido oxidase de *B. pauloensis*, denominada Bp-LAAO.

Tabela 1: Toxinas isoladas e caracterizadas das serpentes do complexo *B. neuwiedi*

ESPÉCIE	TOXINA	M(r) (kDa)	ATIVIDADE	REFÉNCIA
<i>B. neuwiedi</i>	PLA ₂	---	Inibição da cadeia transportadora de elétons	Vidal et al, 1966
<i>B. neuwiedi</i>	Metaloproteínas (NHFa e NHFb)	46 e 58	Hemorrágica e Miotóxica	Mandelbaum et al, 1984 Queiroz et al, 1985
<i>B. neuwiedi</i>	Proteína	60	Ativador de Protrombina	Govers-Riemslag et al, 1987
<i>B. neuwiedi</i>	Metaloproteínas	---	Antigênica	Mandelbaum & Assakura, 1988
<i>B. neuwiedi</i>	Peptídeos (BPP-II, BPP-III, BPP-V)	1,3; 1,0 e 1,0	Potencializador de Bradicinina	Ferreira et al, 1998
<i>B. n. pauloensis e B. n. urutu</i>	Mictoxina (BNSP-7)	13,7	Miotóxica, Edematogênica, PLA ₂ , Necrotica, Inflamatória, Antibactericida, Bloqueadora Neuromuscular, Lise de Membranas Artificiais	Rodrigues et al, 1998 Oliveira et al, 2009
<i>B. neuwiedi</i>	Proteína (<i>bothrojaracina-like</i>)	27	Inibidora de trombina e Indutora de Agregação Plaquetária	Castro et al, 1999
<i>B. n. goyazensis, B. n. paranaensis, B. n. diporus</i>	PLA ₂	~15	Neuromuscular, PLA ₂	Abreu et al, 2007
<i>B. pauloensis</i>	Fosfolipase (Bp-PLA ₂)	15,8	Edematogênica e Miotóxica	Rodrigues et al, 2007
<i>B. neuwiedi</i>	Metaloprotease (BnP1)	24	Miotóxica, Hemorrágica, Indutora de Apoptose, Fibrinogenolítica e Fibrinólética	Baldo et al, 2008
<i>B. neuwiedi</i>	Metaloprotease (neuwiedase)	22	Fibrinogenolítica, Miotóxica, Inflamatória, Hemorrágica, Anti- <i>Toxoplasma gondii</i>	Rodrigues et al, 2000; 2001 Bastos et al, 2008
<i>B. pauloensis</i>	PLA ₂ Lys49 (Bp-12)	13,7	Bloqueadora Neuromuscular	Randazzo-Moura et al, 2008
<i>B. neuwiedi</i>	Peptídeos Recombinantes (neuwiedase)	---	Antigênica	Cardoso et al, 2009
<i>B. pauloensis</i>	Enzima (Glicoproteína) <i>thrombin-like</i> (BpSP1)	34	Procoagulante, Calicreina-like, Fibrinogenolítica, Proteolítica	Costa et al, 2009
<i>B. neuwiedi</i>	Metaloprotease (neuwiedase)	---	Inflamatória	Lopes et al, 2009
<i>B. pauloensis</i>	LAAO (Bp-LAAO)	58	Leishmanicida, Antitumoral, Bactericida, Indutora de Agregação Plaquetária	Rodrigues et al, 2009

2- OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi gerar e analisar uma biblioteca de cDNA da glândula de peçonha de *B. pauloensis* dando ênfase nos estudos de homologia, estrutura e análise filogenética de uma L-aminoácido oxidase (Bp-LAAO).

3- MATERIAL E MÉTODOS

*3.1- EXTRAÇÃO DAS GLÂNDULAS VENENÍFERAS DAS SERPENTES *B. pauloensis* E OBTENÇÃO DO RNA TOTAL*

Uma serpente da espécie *B. pauloensis*, medindo cerca de 50 cm de comprimento, com aproximadamente 3 anos de idade foi utilizada neste trabalho. Esta foi doada pelo Serpentário Bioativas, localizado na cidade de Batatais-SP. As glândulas de peçonha foram retiradas pelo Biólogo Luiz Henrique Anzaloni (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ FMRP-USP) e posteriormente armazenadas no ultrafreezer a uma temperatura de -80°C.

As glândulas da serpente *B. pauloensis* foram retiradas três dias após a extração da peçonha, para estimular a produção de mRNAs nas células glandulares.

Inicialmente as glândulas foram maceradas em 1 mL de Trizol® para cada 100 mg de tecido, agitando em vórtex e incubando por 5 min a 30°C. Foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio, as amostras foram agitadas vigorosamente por 15 s e incubadas a 30°C por 2 min, seguido de centrifugação a 12000xg por 15 min a 4°C. A fase aquosa foi transferida para tubo de eppendorf, ao qual foram adicionados 500 µL de isopropanol para cada mL de trizol, e incubado a temperatura ambiente por 10 min, seguido de centrifugação a 12000xg por 10 minutos, a 4°C. O precipitado foi lavado com etanol 75 % e centrifugado a 7500xg por 5 min à 4°C. Depois de secagem ao ar, o material foi ressuspêndido em H₂O/DEPC (água livre de RNases).

3.2- QUANTIFICAÇÃO DO RNA TOTAL PARA A CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE cDNA

O RNA total obtido foi avaliado para determinar a concentração da amostra pela leitura de absorbância a 260nm e o cálculo foi realizado pela seguinte fórmula:

$$[\text{RNA}] = \text{D.O.} \times \text{Fator de Diluição} \times \text{Fator de Correção}$$

[RNA]: concentração de RNA total na solução analisada.

D.O. : absorbância da solução em A260nm.

Fator de Diluição: número de vezes que a solução de RNA total foi diluída para obtenção do volume final.

Fator de Correção: número constante relativo à solução de RNA para determinar cálculos de concentração. Para A260nm o valor é igual a 40.

A análise da integridade do RNA total foi realizada por meio da visualização de suas bandas características, sendo 2,5 µL aplicados em gel de agarose 1%.

O grau de pureza do RNA total foi estimado por uma relação direta entre a absorbância da solução a 260 e a 280nm, quantificados no NanoDrop ND-1000.

$$\frac{\text{D.O.260nm}}{\text{D.O.280nm}}$$

Se o valor obtido por esta relação é próximo de 2, significa que há predomínio de ácidos nucléicos em relação a contaminantes protéicos.

3.3- EXTRAÇÃO DO RNA MENSAGEIRO

A partir do RNA total, o RNAm foi purificado por meio do Kit Polyatract® mRNA Isolation Systems (Promega). Este sistema permite a extração de tecidos ou células lisadas. A seqüência da cauda poli A de RNAm foi usada como substrato para hibridização do oligo(dT) biotinilado (sonda) e posteriormente centrifugado para eliminação de restos celulares e proteínas. A estreptavidina associada à biotina garante a eficiência do método utilizado nesta etapa. A purificação do RNAm extraído da glândula de peçonha de *B. pauloensis* iniciou com a ligação da sonda oligo (dT) biotinilada ao RNAm, esse complexo hibridiza com as partículas paramagnéticas de estreptavidina (AS-PMPs) que contém partículas de óxido de ferro incorporadas. A estreptavidina não possui carga magnética, mas é capaz de gerar um dipolo responsável pela atração quando exposta a um campo magnético. O eppendorf contendo a solução híbrida (RNAm/biotina/estreptavidina) foi submetido ao suporte magnético para a captura do RNAm. As partículas foram lavadas e o RNAm purificado foi eluído pela adição de 15 µL de água (livre de nucleases). O RNAm foi quantificado em espectrômetro NanoDrop ND-1000 e sua integridade foi verificada em gel de agarose 1%.

*3.4- CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE cDNA de *B. pauloensis**

Para a construção da biblioteca de cDNA, 3 µg de RNAm foram utilizados juntamente com o kit CloneMiner™ cDNA Library Construction (Invitrogen). Este

sistema dispensa o uso de enzimas de restrição, utilizando o sistema Gateway. Para síntese do cDNA foi utilizado um primer biotinilado com a sequência adaptadora (attB2) e com oligo(dT), o qual hibridiza com a cauda poli-A do mRNA. Após a síntese da primeira fita pela transcriptase reversa e da fita complementar pela DNA polimerase I, outro adaptador (attB1) foi ligado à extremidade 5' do cDNA (a biotina presente na extremidade 3' impossibilita a ligação dos adaptadores com eles mesmos). O cDNA resultante foi fracionado por cromatografia de coluna com resina Sephadex S-500 HR, possibilitando a eliminação dos resíduos e separado de acordo com o tamanho dos fragmentos, dentre os quais os maiores foram selecionados para a clonagem. A tecnologia “Gateway” consiste na clonagem utilizando um sistema de recombinação sítio-específica observado nos bacteriófagos lambda, capaz de mover as seqüências de cDNA para vetores específicos. As seqüências adaptadoras (attB1 e attB2) inseridas nos cDNAs são idênticas àquelas existentes nos plasmídeos, possibilitando uma rápida integração das seqüências desejadas dentro dos vetores específicos. Os vetores pDONR 222 (Figura 1) foram recombinados com os cDNAs contendo os adaptadores e transformados em células competentes de *E. coli* ElectroMAX DH10B, resistente ao fago T1. Os clones foram selecionados em placas contendo kanamicina (25 µg/mL), uma vez que o vetor pDONR 222 garante resistência a este antibiótico. Além disso, clones não recombinantes são inviáveis, pois portam a sequência completa do gene ccdB que codifica uma proteína inibidora da enzima DNA girase de *E. coli*, impedindo a replicação do DNA e garantindo que apenas as bactérias transformantes com vetores recombinados formem colônias.

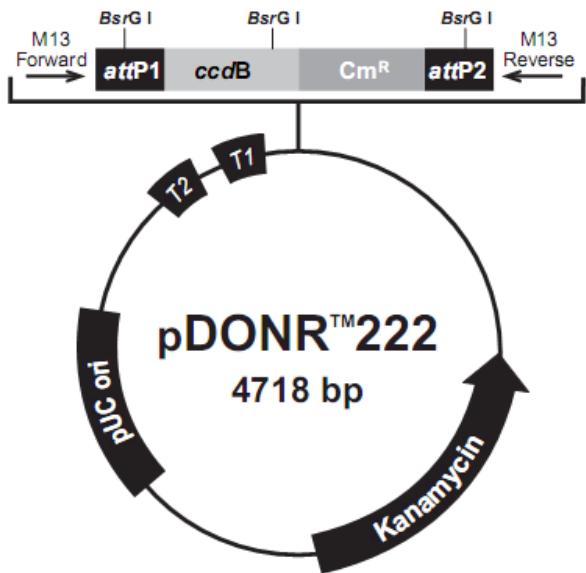


Figura 1: Esquema do vetor pDONR™ 222, retirado do manual do kit CloneMiner cDNA Library Construction (Invitrogen). **Fonte:** www.invitrogen.com (acessado em 01-05-2010).

3.5- SEQUENCIAMENTO DA BIBLIOTECA DE cDNA de *B. pauloensis*

As colônias recombinantes provenientes da biblioteca foram plaqueadas e inoculadas em placas de 96 poços contendo 200 µL de meio Circle Grow (glicerol 10%, kanamicina 25 µg/mL) para a geração das culturas permanentes. O DNA plasmidial foi extraído em placas, seguindo o protocolo de miniprep descrito por Sambrook *et al* (1989).

As reações de sequenciamento foram preparadas em gelo, utilizando-se cerca de 250 ng de DNA plasmidial pDONR 222 (INVITROGEN) contendo os cDNAs clonados, 5 pmol do primer universal M13-Forward e 4 µL do pré-mix Kit

DYEnamic ET Dye Terminator (GE HEALTHCARE) em um volume total de 10 µL. As reações foram submetidas a 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 20 s, hibridização a 50 °C por 15 s e extensão a 60 °C durante 60 s. As reações foram realizadas evitando ao máximo a exposição à luz.

Para a precipitação, a cada poço foram adicionados 28 µL de etanol 100 % e 1 µL de acetato de amônio 7,5 M, as placas foram invertidas 15 vezes e mantidas durante 15 min à temperatura ambiente em local escuro. Foram centrifugadas na centrífuga EPPENDORF 5810R, a 2750xg, 15 °C, durante 45 min. Em seguida as placas foram invertidas e o sobrenadante foi desprezado. Foi utilizado 170 µL de etanol a 70 % para a lavagem, centrifugou por 10 min, e após o descarte do sobrenadante as placas foram submetidas a um spin invertido, 300 rpm durante 1 min. As placas foram secadas em estufa a 50 °C durante 20 min e ressuspensionadas em 10 µL de tampão desnaturante *Loading Solution* (GE HEALTHCARE). As amostras foram injetadas no seqüenciador MegaBACE 1000 Flexyble, de 48 capilares (GE HEALTHCARE) durante 60 s a 2 kV e as corridas foram realizadas durante 120 min a 9 kV.

3.6- ANÁLISES DAS SEQÜÊNCIAS

Os eletroferogramas foram analisados pelo software *Base Caller Cimarron* 3.12, a fim de remover seqüências de baixa qualidade. Seqüências nucleotídicas que compõem o vetor, adaptador e *ESTs* menores que <100 pb foram excluídos. Os *ESTs* foram agrupados em “clusters”, através do software *CAP3*, utilizando seqüências com pelo menos 90% de identidade e 50% de sobreposição mínima.

Cada cluster foi pesquisado no *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov – acessado em 01-05-2010) utilizando o algoritmo BLASTN para identificação de seqüências semelhantes com *e-value* < 10^{-10} .

3.7- AMPLIFICAÇÃO DO cDNA CODIFICANTE DA *BpLAAO*

Após análises em banco de dados internacional *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov – acessado em 01-05-2010) das seqüências geradas, dois pares de *primers* foram desenhados de acordo com seqüências de regiões conservadas de LAAOs já depositadas, para obtenção da *ORF* (*open read frame*) completa e utilizando como molde o clone BP028 obtido da presente biblioteca.

Os primers utilizados foram:

- LAAO forward 5'(ATGAATGTCTTCTTATGTTCTC) 3'
- LAAO reverse 5'(CTCAGAACGACGATTCACATC) 3'
- LAAO internal forward 5'(GGAAATCTGAGTCCTGGAGC) 3'
- LAAO internal reverse 5'(CGCTTCTTGGCGGAAGGG) 3'

Após a amplificação do cDNA de interesse, os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 1%. A purificação das bandas presentes no gel foi feita utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean Up System (Promega).

O kit The Ins T/A clone PCR Product (Fermentas) foi utilizado para a clonagem do cDNA de interesse em plasmídeo pTZ57R/T (Figura 2). As bactérias foram selecionadas em meio contendo ampicilina e visualizadas após adição de IPTG e X-Gal no meio de cultura. Após a seleção, as colônias de bactérias

recombinantes foram analisadas por PCR e por eletroforese em gel de agarose 1% para confirmação da clonagem. Os produtos obtidos foram purificados e submetidos à sequenciamento utilizando o Kit *DYEnamic ET Dye Terminator* (GE Healthcare, UK) em MEGA-BACE 1000 sequenciador automático de DNA (GE Healthcare, UK). Os eletroferogramas foram analisados pelo software *Base Caller Cimarron 3.12* gerando sequências que foram alinhadas pelo software Bioedit 7.0.5.3.

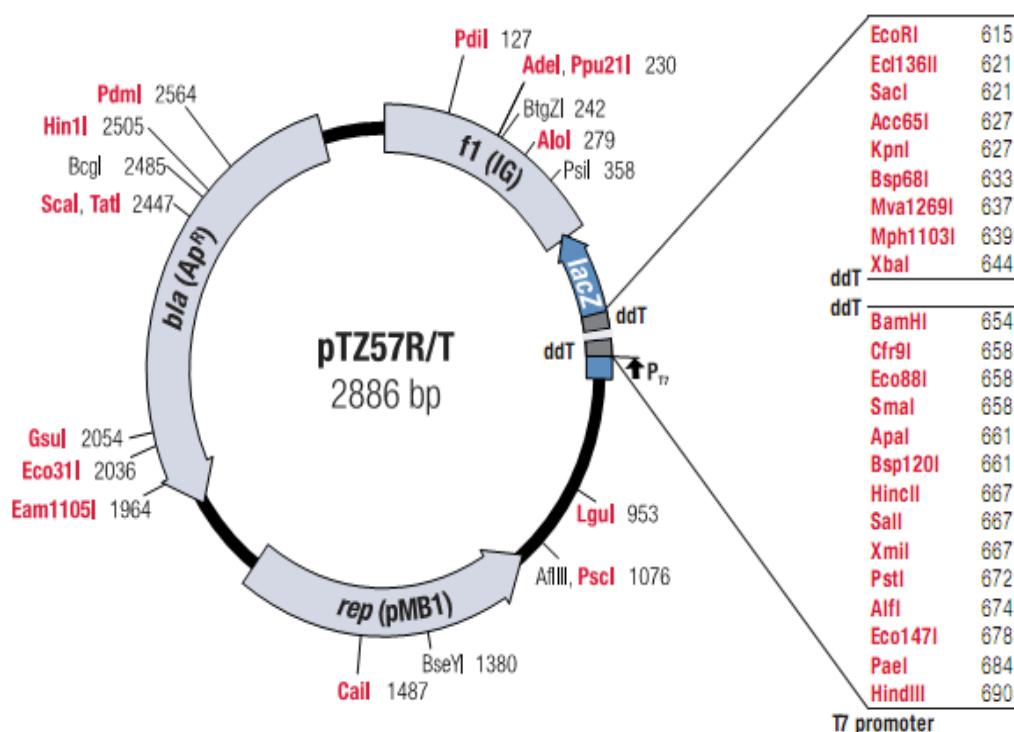


Figura 2: Esquema do vetor pTZ57R/T, retirado do manual do kit The Ins T/A clone PCR Product (Fermentas). **Fonte:** www.fermentas.com (acessado em 01-05-2010).

3.8- IDENTIFICAÇÃO DE SEQUÊNCIAS HOMÓLOGAS, ALINHAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA

As sequências homólogas foram obtidas a partir do banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> - acessado em 01-05-2010) usando o algorítimo BLASTP e a sequência da Bp-LAAO como sequência de consulta. Para o alinhamento das sequências depositadas com a Bp-LAAO foi utilizado o programa AMAP v.2.0 (Schwartz & Pachter, 2007). A determinação dos possíveis sítios de glicosilação foi realizada utilizando o programa NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/> - acessado em 10-05-2010). A análise filogenética foi executada utilizando os programas TREE-PUZZLE v.5.2 (Schmidt *et al*, 2002), MrBayes v.3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) e MEGA v.4.0.2 (Tamura *et al*, 2007). Estes experimentos foram realizados sob a supervisão do Professor Dr. Marcos R. M. Fontes da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP – Botucatu – São Paulo.

3.9- MODELAGEM MOLECULAR

O modelo cristalográfico da L-aminoácido oxidase de *Calloselasma rhodostoma* (PDB code 2iid_chain A) foi selecionado como molde para a modelagem estrutural teórica da Bp-LAAO de acordo com dados obtidos pelo programa HHpred (Soding *et al*, 2005), disponível pelo Instituto Max-Planck de Biologia do Desenvolvimento (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>- acessado em 10-05-2010). O modelo inicial da estrutura da Bp-LAAO foi gerado pelo programa

MODELLER 8v2 utilizando o modelo selecionado. Estes experimentos foram realizados sob a supervisão do Professor Dr. Marcos R. M. Fontes da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP – Botucatu – São Paulo.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

A descrição das atividades farmacológicas, ações patológicas, propriedades catalíticas, entre outros, ainda constituem uma base fundamental no entendimento do funcionamento das peçonhas ofídicas. Entretanto, atualmente a atribuição destas propriedades só passa a ter valor reconhecido quando vinculada com suas bases moleculares. Com isso, uma melhor compreensão dos aspectos funcionais das peçonhas das serpentes requer, antes de tudo, um conhecimento de sua composição em termos bioquímicos.

Os estudos das peçonhas ofídicas, baseado em fracionamento cromatográfico e caracterização de componentes, é um processo lento e oneroso. Com o surgimento das tecnologias “ômicas” houve um rápido crescimento quanto à diversidade de substâncias encontradas nas peçonhas, porém a obtenção de informações mais extensivas sobre a estrutura primária de proteínas ainda é um desafio.

As abordagens transcriptômicas têm sua vantagem na facilidade de se obter grande quantidade de informações sobre seqüências de toxinas e traçar um perfil de expressão gênica nas glândulas de peçonhas (Junqueira-de-Azevedo & Ho, 2002). A partir deste princípio, alguns trabalhos buscam realizar a caracterização transcriptômica de diversas espécies, porém nenhum deles abordou sistematicamente uma espécie do complexo *neuwiedi*, razão pela qual o presente trabalho foi desenvolvido.

O RNA total (Figura 3) obtido da glândula de peçonha de *B. pauloensis* apresentou uma ótima qualidade, a relação entre as absorbâncias da solução a 260nm e 280nm, de aproximadamente 2, revelou seu alto grau de pureza sendo utilizado para obtenção do RNAm o qual foi utilizado para a construção de uma

biblioteca de cDNA. Após análises em gel de agarose para confirmação da clonagem dos transcritos, estes foram seqüenciados. As seqüências foram analisadas em programas de bioinformática para remoção de segmentos contendo vetores e seqüências de baixa qualidade.

Subsequentemente, as *ESTs* foram agrupadas em sequências únicas no qual revelaram que alguns transcritos altamente expressos apresentavam muitas sequências diferindo uma das outras em poucas bases ou em apenas um nucleotídeo. Isto pode indicar a presença de alguns genes parálogos derivados da duplicação gênica. De fato, estas sequências são reconhecidas como “isoformas” de transcritos codificantes de toxinas.

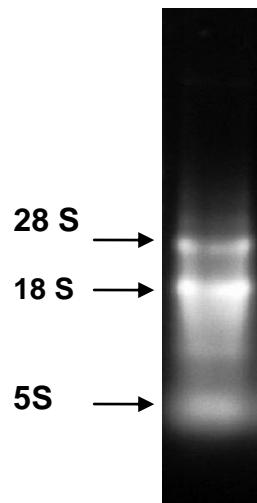


FIGURA 3: Amostra de RNA total extraído da glândula de peçonha de *B. pauloensis* aplicada em gel de agarose 1%. As bandas correspondentes ao RNA ribossômico 28 S, 18 S e 5 S.

*4.1- TOXINAS PRESENTES NO TRANSCRIPTOMA DA GLÂNDULA DE PEÇONHA DE *B. pauloensis**

O banco de *ESTs* de *B. pauloensis* gerou 1152 seqüências, estas foram submetidas a análises de bioinformáticas para remoção das seqüências de baixa qualidade (<100pb), resultando em 668 (57,9%) seqüências de qualidade que foram separadas em dois grupos distintos: transcritos que codificam toxinas e transcritos que codificam proteínas celulares.

É possível notar que as toxinas são os transcritos mais abundantes, representando 41,5% do total de seqüências. No entanto os transcritos celulares são menos expressos, apenas 31,3% do total de clones identificados (Figura 4).

Os transcritos “NO HIT” encontrados no transcriptoma de *B. pauloensis* (27,2%) representam sequências que não apresentaram homologia com qualquer gene depositado no GenBank, (Figura 4). A alta abundância de novas sequências representando um grande número de genes não identificados, sugerem a complexidade e a diversidade dos genes expressos na glândula de peçonha de *B. pauloensis*. Dessa forma estudos futuros podem revelar novos genes expressos neste orgão especializado, bem como auxiliar na compreensão do mecanismo de produção e secreção dessas toxinas e na evolução das glândulas veneníferas.

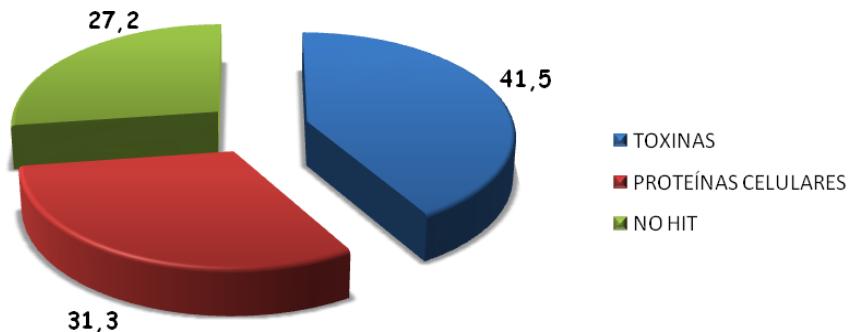


Figura 4: Perfil de expressão de toxinas, proteínas celulares e “no hits” encontrados na glândula de peçonha de *B. pauloensis* (% do total de clones).

As sequências transcritas que codificam toxinas foram agrupadas e apresentaram semelhanças significativas com as toxinas encontradas no banco de dados ($e\text{-value} < 10^{-10}$). Estas sequências foram depositadas no GenBank dbEST com os números de acesso GR955220 a GR955276, que são os clusters que neste trabalho foram identificados como BP001 a BP057. De um total de 55 grupos, 26 grupos foram compostos por clones individuais (*singletons*) e 29 grupos com duas ou mais sequências (*contigs*) (Tabela 2).

As toxinas foram agrupadas de acordo com as classes de cada proteína, enquanto os grupos para as proteínas celulares foram reunidos de acordo com as categorias funcionais. A figura 5 apresenta a abundância relativa de cada classe distinta de toxinas encontradas na glândula de peçonha de *B. pauloensis*.

Tabela 2: Catálogo de transcritos codificantes de toxinas presentes na glândula de peçonha de *B. pauloensis*

Cluster	Nº de ESTs	Anotação	e-value
BPP			
BP001	3	gb AY310914.1 Bothrops jararacussu bradykinin-potentiating/C-type natriuretic peptide precursor isoform 1 mRNA	7e ⁻⁴⁶
BP002	2	gb AY310914.1 Bothrops jararacussu bradykinin-potentiating/C-type natriuretic peptide precursor isoform 1 mRNA, partial cds	3e ⁻¹⁹
BP003	2	dbj D85843.1 Bothrops jararaca mRNA for bradykinin-potentiating peptide and C-type natriuretic peptide precursor, complete cds	6e ⁻²⁶
BP004	1	gb AF171670.2 Bothrops jararaca bradykinin-potentiating/C-type natriuretic peptide mRNA, complete cds	4e ⁻³²
BP005	11	gb AF490531.1 Bothrops insularis cluster BITB01A bradykinin-potentiating/c-type natriuretic protein precursor, mRNA, complete cds	0.0
BP006	25	gb AY310914.1 Bothrops jararacussu bradykinin-potentiating/C-type natriuretic peptide precursor isoform 1 mRNA, partial cds	0.0
BP007	1	gb AY310916.1 Bothrops jararaca bradykinin-potentiating/C-type natriuretic peptide-related pseudogene mRNA, complete sequence	7e ⁻⁵³
BP008	1	gb AY310916.1 Bothrops jararaca bradykinin-potentiating/C-type natriuretic peptide-related pseudogene mRNA, complete sequence	2e ⁻²⁴
BP009	1	dbj D85843.1 Bothrops jararaca mRNA for bradykinin-potentiating peptide and C-type natriuretic peptide precursor, complete cds	6e ⁻²²
Total	47		
CRISPs			
BP012	1	gb AY181983.1 Crotalus atrox catrin mRNA, complete cds	3e ⁻¹¹⁴
BP013	1	gb AY423708.1 Trimeresurus stejnegeri cysteine-rich secretory protein mRNA	2e ⁻⁴¹
Total	2		
Fosfolipase A₂			
BP014	1	emb X53471.1 VAPPLA2 V.ammodytes mRNA for phospholipase A2	9e ⁻²²
BP015	3	gb U01026.1 U01026Crotalus scutulatus scutulatus Mojave Toxin preproacidic subunit	4e ⁻¹⁸⁰
BP016	4	gb DQ359953.1 Bothrops erythromelas phospholipase A2 precursor, mRNA, complete cds	2e ⁻¹²²
BP017	5	gb AY299391.1 Bothrops jararacussu myotoxic A2-like phospholipase mRNA, complete cds	1e ⁻¹²²
BP018	16	gb AY299391.1 Bothrops jararacussu myotoxic A2-like phospholipase mRNA, complete cds	0.0
BP019	13	dbj D31774.1 TRUCTGPLAA Trimeresurus gramineus cTgPLA2-I mRNA for phospholipase A2, complete cds	0.0
BP020	22	gb AY299391.1 Bothrops jararacussu myotoxic A2-like phospholipase mRNA, complete cds	0.0
BP021	2	gb AY299391.1 Bothrops jararacussu myotoxic A2-like phospholipase mRNA, complete cds	7e ⁻⁹⁴
BP022	1	gb AF490535.1 Bothrops insularis cluster BITP01A phospholipase A2 precursor, mRNA, complete cds	1e-16

BP023	2	gb AY299391.1 Bothrops jararacussu myotoxic A2-like phospholipase mRNA, complete cds	1e-87
BP024	1	dbj AB440236.1 Trimeresurus flavoviridis phospholipase A2 gene cluster (PfPLA1(psi), PfPLA2, PfPLA3(psi), PfPLA4, PfPLA5)	2e-19
BP025	3	gb DQ359953.1 Bothrops erythromelas phospholipase A2 precursor, mRNA, complete cds	2e-141
BP026	1	dbj D31774.1 TRUCTGPLAA Trimeresurus gramineus cTgPLA2-I mRNA for phospholipase A2, complete cds	0.0
Total	74		
Hialuronidase			
BP027	1	gb DQ840258.1 Bitis arietans clone Ba Hy-L-1000 truncated hyaluronidase mRNA, complete cds	0.0
Total	1		
LAAO			
BP028	7	gb AF093248.1 Crotalus atrox FAD-containing L-amino acid oxidase Apoxin 1 mRNA, complete cds	0.0
BP029	1	emb FM177950.1 Echis ocellatus mRNA for L-amino oxidase (lao-Eoc167 gene)	6e-22
Total	8		
Lectina tipo- C			
BP030	2	gb AY962524.1 Bothrops jararaca bothojaracin chain A precursor, mRNA, complete cds	1e-78
BP031	7	gb AY962525.1 Bothrops jararaca bothojaracin chain B precursor, mRNA, complete cds	8e-151
BP032	2	gb AY962524.1 Bothrops jararaca bothojaracin chain A precursor, mRNA, complete cds	4e-71
BP033	10	gb AY962524.1 Bothrops jararaca bothojaracin chain A precursor, mRNA, complete cds	0.0
BP034	1	gb AY522720.1 Bothrops insularis C-type lectin mRNA, complete cds	2e-56
BP035	1	emb FM177948.1 Echis ocellatus mRNA for C-type lectin (ctl-Eoc124 gene)	5e-46
BP036	1	dbj D83332.1 TFLFIXB Trimeresurus flavoviridis mRNA for factor IX/factor X binding protein B chain, complete cds	6e-15
Total	24		
NGF			
BP037	2	gb AF306533.1 Crotalus durissus terrificus nerve growth factor mRNA, complete cds	0.0
BP038	1	gb AY007318.1 Bothrops jararacussu putative neurotrophic growth factor precursor (NGF) mRNA, complete cds	2e-65
Total	3		
Ohanina			
BP039	1	gb DQ103590.1 Ophiophagus hannah Ohanin precursor, gene, complete cds	1e ⁻⁴⁰
Total	1		
VEGF			
BP040	1	gb AY033151.1 Bothrops insularis vascular endothelial growth factor precursor, mRNA, complete cds	3E ⁻⁸⁰
Total	1		

Serinoproteinases			
BP041	1	gb AF490536.1 Bothrops insularis cluster BITS01A serine proteinase precursor, mRNA, complete cds	0.0
BP042	14	gb DQ396477.1 Lachesis muta serine protease precursor, mRNA, complete cds	0.0
Total	15		
Metaloproteinases			
BP043	2	gb AY258153.1 Bothrops jararacussu metalloprotease BOJUMET III mRNA, partial cds	6e ⁻¹³⁴
BP044	7	gb AY071905.1 Gloydius halys metalloproteinase mRNA, complete cds	0.0
BP045	1	gb AF490534.1 Bothrops insularis cluster BITM06A metalloproteinase precursor, mRNA, complete cds	2e ⁻¹¹⁸
BP046	4	gb AF149788.5 Bothrops jararaca hemorrhagic metalloproteinase HF3 mRNA, complete cds	0.0
BP047	7	gb AF149788.5 Bothrops jararaca hemorrhagic metalloproteinase HF3 mRNA, complete cds	0.0
BP048	3	dbj AB051849.1 Trimeresurus flavoviridis mRNA for vascular apoptosis-inducing protein, complete cds	0.0
BP049	1	gb AY255004.1 Bothrops jararacussu metalloprotease BOJUMET II mRNA, partial cds	2e ⁻¹¹⁴
BP050	1	gb AY736107.1 Bothrops insularis insularinase and insularin precursor, mRNA, complete cds	3e ⁻³⁷
BP051	3	gb AY255004.1 Bothrops jararacussu metalloprotease BOJUMET II mRNA, partial cds	0.0
BP052	1	gb AY736107.1 Bothrops insularis insularinase and insularin precursor, mRNA, complete cds	3e ⁻¹³
BP053	1	gb U01234.1 CRLPREHTA Crotalus atrox hemorrhagic toxin a, atrolysin a (Ht-a) mRNA, partial cds	4e ⁻⁹⁰
BP054	1	gb DQ375437.1 Bothrops jararaca venom metalloproteinase bothrojarin2 mRNA, partial cds	4e ⁻⁵⁸
BP055	54	gb U01235.1 CRLPREHTB Crotalus atrox prepro-hemorrhagic toxin b, atrolysin b (Ht-b) mRNA, complete cds	0.0
BP056	1	gb AY255004.1 Bothrops jararacussu metalloprotease BOJUMET II mRNA, partial cds	8e ⁻¹⁵
BP057	14	gb AY736107.1 Bothrops insularis insularinase and insularin precursor, mRNA, complete cds	0.0
Total	101		

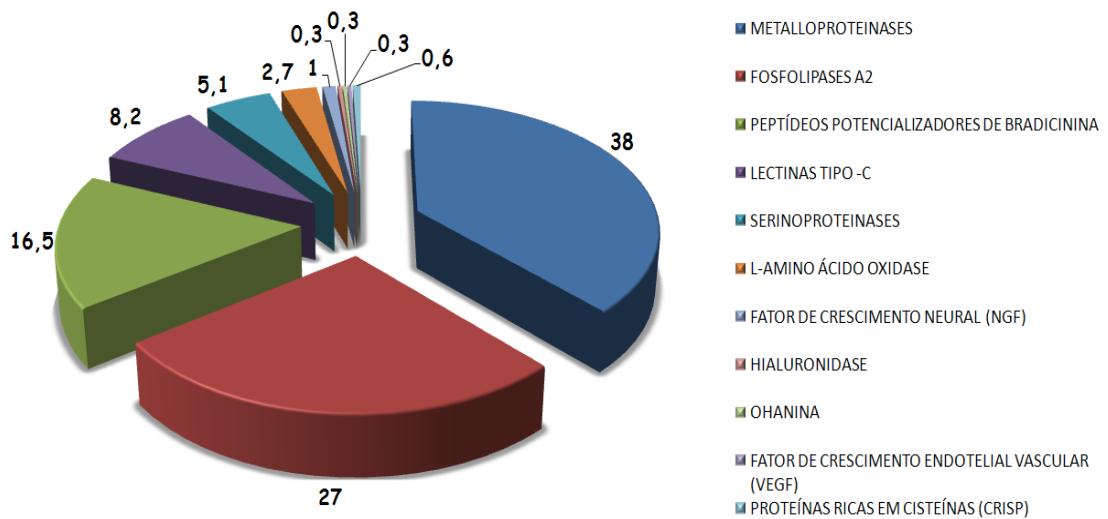


Figura 5: Abundância relativa de toxinas (%) encontradas na glândula de peçonha de *B. pauloensis* (total de 277 clones).

Como identificado nas bibliotecas de *B. insularis* (Junqueira-de-Azevedo & Ho, 2002), *B. jararaca* (Cidade *et al*, 2006) e *B. atrox* (Neiva *et al*, 2009), os transcritos mais abundantes para a biblioteca de *B. pauloensis* foram as metaloproteinases (Figura 6). A elevada expressão de metaloproteinases na glândula de peçonha de *B. pauloensis* confirma o alto potencial proteolítico e hemorrágico de sua peçonha (Vale *et al*, 2008).

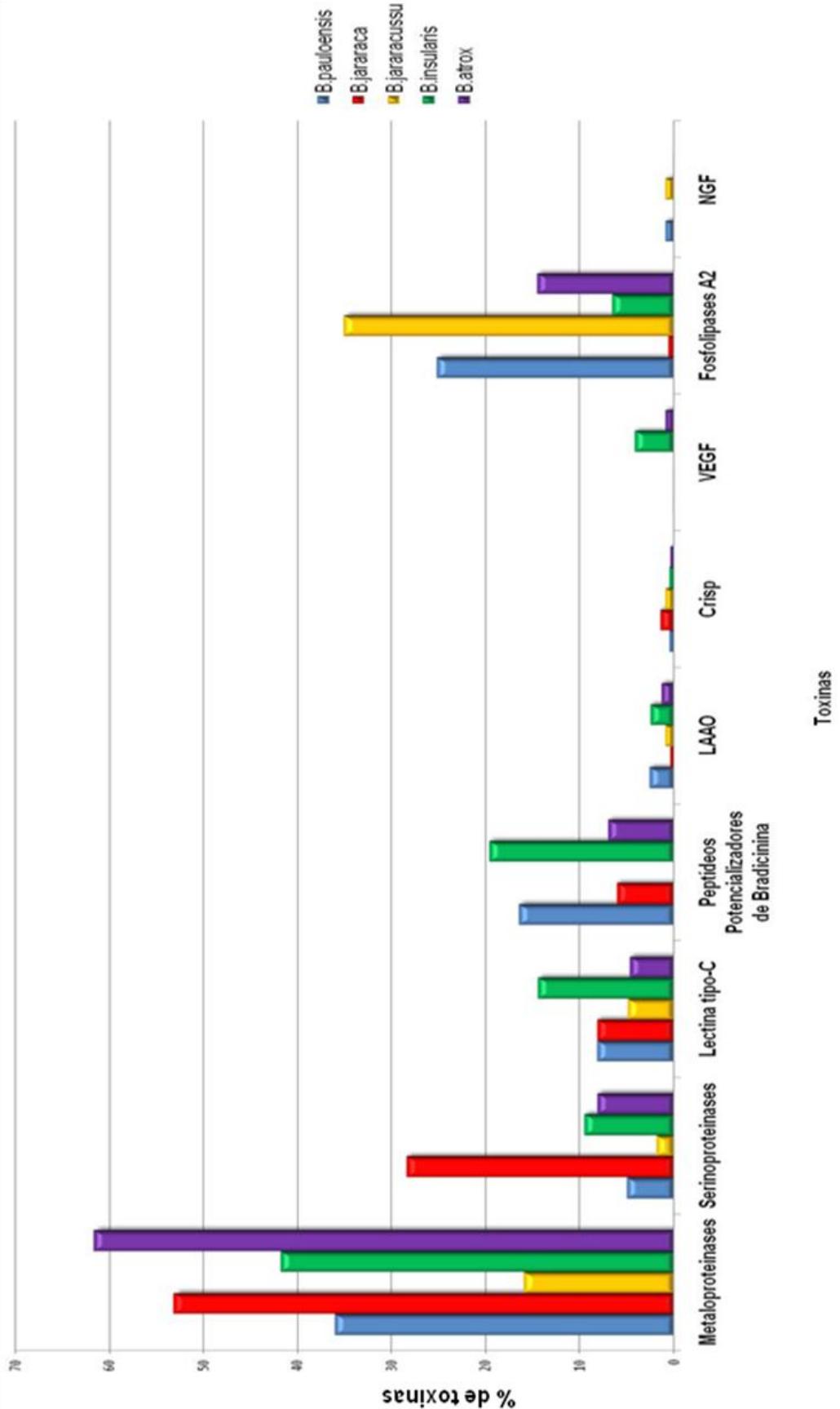


Figura 6: Análise comparativa da expressão de toxinas presentes nas glândulas de peçonha de serpentes de 5 espécies botrópicas. *B. pauloensis* (presente trabalho), *B. jararaca* (Cidade et al., 2006), *B. jaracussu* (Kashima et al., 2004), *B. insularis* (Junqueira-de-Azevedo & Ho, 2002) e *B. atrox* (Neiva et al., 2009).

4.2- CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE METALOPROTEINASES

As metaloproteinases foram organizadas em 15 grupos originados de 101 sequências (15.12% do total de clones sequenciados) representando 38% dos clones de toxinas (Tabela 2, 3 e Figura 5). O *cluster* BP055 (*GenBank* GR955274) é representado 54 vezes na biblioteca de cDNA e mostrou 87% de identidade com a atrolisina B da peçonha de *C. atrox*, uma metaloproteinase da classe PI que possui a sequência HELGH no sítio ligante de Zn²⁺. Outro *cluster* que apresentou elevada abundância foi BP057 (*GenBank* GR955276) representando 14 ESTs e 86% de identidade com a insularinase (PII, não hemorrágica) isolada da peçonha de *B. insularis*. Os *clusters* BP043 e BP051 mostraram similaridade com as metaloproteinases BOJUMET III e BOJUMET II de *B. jararacussu*, respectivamente (Kashima *et al*, 2004) (Tabela 2).

É interessante ressaltar que na biblioteca de *B. pauloensis* existe um predomínio de transcritos que codificam metaloproteinases PIII, fato também observado para as bibliotecas de *B. insularis* (Junqueira-de-Azevedo & Ho, 2002) e *B. atrox* (Neiva *et al*, 2009). É importante considerar que as modificações pós-traducionais são comuns nesta classe de toxinas dando origem as demais classes. Dessa forma, o predomínio de cDNAs que codificam metaloproteinases PIII em um determinado transcriptoma, não está relacionado com a elevada concentração destas toxinas na peçonha (Fox & Serrano, 2008).

Tabela 3: Ocorrência das classes estruturais, redundância (clones/cluster), proporção de todos os transcritos (% total) e de transcritos identificados (%hits).

Toxinas	Nº de	Nº de	Clones/Cluster	% Total	% Hits
	Clusters	Clones			
Metaloproteinases	15	101	6,7	15,12	20,78
Fosfolipases A ₂	13	74	5,7	11,07	15,22
BPPs	9	47	5,2	7,3	9,67
Lectinas tipo-C	7	24	3,4	3,6	4,93
Serinoproteinases	2	15	7,5	2,24	3,08
LAAO	2	8	4	1,2	1,64
NGF	2	3	1,5	0,5	0,61
Hialuronidase	1	1	1	0,15	0,20
Ohanina	1	1	1	0,15	0,20
VEGF	1	1	1	0,15	0,20
CRISP	2	2	1	0,30	0,40
Total	55	277	5,03	41,51	56,93

4.3- CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE PLA₂

Dentre as proteínas bioativas mais abundantes nas peçonhas ofídicas, as PLA₂ se destacam por causar danos locais após o envenenamento botrópico,

como mionecrose e edema, além disso são responsáveis pela ação inflamatória. Algumas peçonhas botrópicas (*B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*) são conhecidas por causar graves danos musculares quando comparadas com as peçonhas de *B. jararaca* e *B. erythromelas* (Zamuner et al, 2004). Estes dados corroboram com nossos resultados, no qual as PLA₂ podem contribuir com a gravidade dos efeitos locais causados pela peçonha de *B. pauloensis* uma vez que estas representam 27% do total de toxinas transcritas (Figura 5).

Como mostrado na figura 6, os transcritos que codificam as PLA₂ são mais expressos nos transcriptoma de *B. jararacussu* (Kashima et al, 2004), seguido de *B. pauloensis* e *B. atrox* (Neiva et al, 2009). Da peçonha de *B. jararacussu* duas PLA₂s foram isoladas, as bothropstoxinas I e II (BthTX-I e BthTX-II). A BthTX-I é uma proteína básica, Lys-49, possui atividade miotóxica, citotóxica, induz edema, bloqueia transmissão neuromuscular, desencadeadora de hiperalgesia e letal; a BthTX-II é uma PLA₂ Asp49, capaz de induzir edema, apresentar atividade miotóxica, citotóxica, anticoagulante, hemolítica, indução de agregação plaquetária, é letal e possui baixa atividade catalítica quando comparada com a BthA-I, uma Asp49 ácida presente na peçonha da mesma espécie (Homsy-Brandeburgo et al, 1988; Pereira et al, 1998; Andrião-Escarso et al, 2000).

Por outro lado, análises do transcriptoma de *B. jararaca* (Cidade et al, 2006) e *B. insularis* (Junqueira-de-Azevedo & Ho, 2002) mostraram apenas 0,7% e 6,7% de PLA₂s transcritas respectivamente, sugerindo que os danos locais ocasionados pela peçonha destas espécies podem estar intimamente relacionados com a presença de outras toxinas que não as PLA₂s (Figura 6).

Boldrini-França *et al* (2009), caracterizaram o perfil de expressão gênica da glândula de peçonha de *Crotalus durissus collilineatus* e observaram que mais de 50% dos transcritos codificam toxinas, dentre estas a crotoxina perfaz um total de 88% destes transcritos. A crotoxina é composta por duas subunidades A e B, onde a subunidade A (crotoxina A ou crotapotina) tem caráter ácido e não enzimático, enquanto a crotoxina B é uma PLA₂ básica. A crotoxina B (PLA₂) foi representada em formas variáveis comparadas com a crotoxina A e muitas sequências codificantes desta toxina foram identificadas como isoformas CB1 da peçonha de *C. d. terrificus*.

As sequências de PLA₂s da biblioteca de *B. pauloensis* foram agrupadas em treze *clusters* (BP014 a BP026), sendo que destes 8 são representantes de Asp49 (básicas e ácidas) e 5 para Lys49 (Tabela 2). Os *clusters* BP014, BP019, BP022, BP024, BP025 e BP026 alinharam com as PLA₂s básicas Asp49 de *Vipera ammodytes*, *Trimeresurus gramineus*, *B. insularis*, *T. flavoviridis*, *B. erythromelas* e *T. gramineus* respectivamente. Os clusters BP015 e BP016 alinharam com PLA₂s ácidas Asp49 de *Crotalus scutulatus scutulatus* e *Bothrops neuwiedi pauloensis* respectivamente.

Duas fosfolipases A₂ básicas Asp49 (BnpTX-I e BnpTX-II) da peçonha de *B. neuwiedi pauloensis* foram isoladas e parcialmente sequenciadas (Rodrigues *et al*, 2004). Como pode ser observado na tabela 2, não foram encontrados transcritos correspondentes a estas duas toxinas.

Rodrigues *et al* (2007), isolaram uma fosfolipase A₂ Asp49 ácida de *B. pauloensis* (Bp-PLA₂) cuja sequência N-terminal apresentou elevada identidade com PLA₂ ácidas Asp49 já isoladas de peçonhas botrópicas. De acordo com os

dados analisados no transcriptoma de *B. pauloensis*, a Bp-PLA₂ não foi encontrada dentre os transcritos, embora o cluster BP016 presente nesta biblioteca codifique uma PLA₂ ácida denominada BPr-TXI (*GeneBank* GQ850458). Até o momento, esta toxina não foi isolada a partir da peçonha de *B. pauloensis* mas de acordo com as análises *in silico*, a sequência encontrada apresenta um resíduo de aspartato altamente conservado na posição 49 (Asp49) que está envolvido intimamente com o Ca²⁺ que é essencial na atividade catalítica desta classe de enzimas.

As análises dos transcritos mostram que o cluster BP020 (*GenBank* GR955239) o mais expresso (22 clones), codifica uma toxina similar (86%) a uma fosfolipase A₂ miotóxica (Lys-49) de *B. jararacussu* (Tabela 2). Rodrigues *et al*, (1998) e Soares *et al*, (2000) isolaram e caracterizaram respectivamente uma fosfolipase A₂ Lys49 miotóxica denominada BnSP-7 da peçonha de *B. neuwiedi pauloensis*, esta toxina apresentou elevada similaridade com miotoxinas Lys-49 de outras peçonhas botrópicas. O cluster BP018, o segundo mais expresso desta classe, apresentou 98% de identidade com a BnSP-7 e 100% de identidade com a BthTX-I da peçonha de *B. jararacussu* (Figura 7).

Figura 7: Alinhamento da sequência BP018 da biblioteca de *B. pauloensis* com outras sequências de PLA₂ de serpentes botrópicas. BnSP7 (PLA₂ básica Lys49 da peçonha de *B. neuwiedi pauloensis*); BtTX-I (PLA₂ básica Lys49 da peçonha de *B. jararacussu*); MjTX-I (PLA₂ básica Lys49 da peçonha de *B. moojeni*). Os resíduos marcados em vermelho são as regiões conservadas Gly30 e Gly32 ligantes de cálcio. Os resíduos marcados em azul são as regiões conservadas His48 e Tyr52. (%) de identidade.

4.4- CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE BPP

Os peptídeos potencializadores de bradicinina agem inibindo a enzima conversora de angiotensina (ECA) prevenindo a formação de agiotensina II agindo como um vasodilatador. Estão envolvidos com os quadros de hipotensão observados após envenenamentos ocasionados por espécies botrópicas. Estes foram primeiramente descritos na peçonha de *B. jararaca* e utilizados como substrato de modelagem para a síntese de medicamentos hipotensores amplamente utilizados no mundo, o Captopril® e o Enalapril.

As análises do transcriptoma de *B. pauloensis* identificaram 9 *clusters* (47 ESTs) que correspondem aos transcritos que codificam os peptídeos potencializadores de bradicinina (BPP) (Tabela 2), perfazendo 16,5% do total de toxinas encontradas no transcriptoma de *B. pauloensis* (Figura 5).

O *cluster* BP005 consiste em uma sequência parcial que apresentou 87% de identidade com um transcrito de BPP descrito no transcriptoma de *B. insularis* (Tabela 2). É interessante observar que dos 9 *clusters* encontrados, 5 *clusters* são idênticos a precursores de peptídeos potencializadores de bradicinina encontrados na biblioteca de *B. jararaca*. No entanto de acordo com a figura 5, podemos observar que a maior quantidade de transcritos para esta classe foi detectado na biblioteca de *B. insularis*, e apenas o *cluster* BP005 contendo 11 clones apresentou identidade com estes transcritos identificados.

Junqueira-de-Azevedo & Ho, (2002) analisaram a biblioteca de *B. insularis* mostrando um predomínio de 19,7% de transcritos para BPPs (Figura 6), sendo

que em um único *cluster* ocorreram 61 clones, sugerindo uma maior redundância para este grupo. Quando comparamos os transcritos de BPP encontrados para *B. insularis* e *B. pauloensis* podemos observar que as serpentes *B. insularis* se tornaram especializadas na produção de quantidades elevadas de BPPs extremamente conservadas, enquanto que *B. pauloensis* apresentaram uma maior variabilidade entre os precursores de BPPs.

4.5- CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE LECTINAS TIPO-C

As lectinas tipo-C são proteínas diméricas, presentes nas peçonhas ofídicas, que contém um domínio de reconhecimento a carboidratos. As peçonhas usualmente contêm as lectinas tipo-C, que se ligam preferencialmente a galactose e são cálcio dependentes (Xu *et al*, 1999), e as lectinas tipo-C *like* que apresentam uma variedade de atividades biológicas principalmente sobre a cascata de coagulação. Os membros da primeira classe apresentam atividade hemaglutinante enquanto os membros da segunda classe exibem efeitos anticoagulante ou procoagulante, que fazem destes promissores candidatos ao desenvolvimento de novas drogas (Andrews *et al*, 2001).

Os *clusters* encontrados para as lectinas tipo-C representam 8,2% das toxinas, 3,6% das sequências totais e 4,93% do total de sequências transcritas (Figura 5 e Tabela 3). As lectinas tipo-C apresentaram 24 ESTs que foram agrupados em 7 *clusters* (Tabela 2), sendo que a maioria apresentou homologia com a bothrojaracina, isolada da peçonha de *B. jararaca*, (Aroucas *et al*, 1997) uma lectina tipo-C *like* que se liga diretamente a trombina.

Até o momento, não foi relatado o isolamento e caracaterização de lectinas tipo-C da peçonha de *B. pauloensis*, no entanto a quantidade de transcritos encontrados mostra que essas proteínas podem contribuir no desencadeamento de alterações na hemostasia apresentados por tal peçonha.

Kashima *et al*, (2004) mostraram que o transcriptoma de *B. jararacussu* possuía apenas um *cluster* para lectinas tipo-C, o qual codifica uma lectina tipo-C homodimérica ligante de galactose. Este *cluster* é composto por 25 *ESTs* que correspondem a 7,4% das toxinas encontradas. A presença de lectinas tipo-C na peçonha de *B. jararacussu* foi descrita e associada com a forte atividade hemaglutinante observada.

Uma lectina tipo-C da peçonha de *B. insularis* (BiL) foi clonada e caracterizada, apresentando atividade hemaglutinante que foi inibida por galactose, lactose e EDTA, evidenciando que esta seria uma lectina tipo-C (Guimarães-Gomes *et al*, 2004). O transcriptoma de *B. insularis* apresentou 16 *clusters* para lectinas tipo-C, dois destes apresentaram maior similaridade com lectinas tipo-C verdadeiras (Junqueira-de Azevedo & Ho, 2002).

4.6- CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE SERINOPROTEINASES

As serinoproteinases ofídicas são enzimas capazes de afetar a hemostasia, agindo em uma variedade de fatores da cascata de coagulação causando o desequilíbrio no sistema hemostático da presa (Matsui *et al*, 2000).

Estas enzimas através de evoluções adaptativas aceleradas geraram variantes com diversas funções (Fry *et al*, 2006) incluindo especificamente a

degradação e ativação de componentes sanguíneos que estão envolvidas na coagulação e fibrinólise (Serrano & Maroun, 2005), ativando o sistema calicreína/cinina ou afetando agregação plaquetária. Um grande número de isoformas têm sido descritas para serinoproteinases presentes nas peçonhas ofídicas, nas quais pequenas mudanças na sequência ou estrutura têm grande impacto na atividade (Serrano & Maroun, 2005).

Nas análises transcricionais de *B. pauloensis*, as serinoproteinases (5.1%) geraram apenas dois *clusters* (Figura 5 e Tabela 2), sendo que um destes (BP041- GenBank GR955260) apresentou apenas uma sequencia com 97% de identidade com o *cluster* BITS01A de *B. insularis* que possui identidade com a batroxobina (*B. atrox*). Como observado no cluster BP042 de *B. pauloensis*, os 14 clones apresentaram 89% de identidade com transcritos de serinoproteinases presentes na biblioteca de *Lachesis muta* (Tabela 2).

Cidade *et al*, (2006) analisaram os transcritos presentes na glândula de peçonha de *B. jararaca* e observaram que as serinoproteinases eram a segunda classe de toxinas mais abundantes no transcriptoma, perfazendo um total de 28,5% (Figura 6). A elevada quantidade de cDNAs codificantes para serinoproteinases demonstraram coerência com os efeitos patológicos observados por acidentes causados por esta espécie, sendo o consumo dos fatores da coagulação e a má formação dos coágulos de fibrina, o principal efeito destas toxinas no envenenamento (Matsui *et al*, 2000).

Pahari *et al*, (2007) realizaram estudos transcriptômicos para a glândula da peçonha de *Sistrurus catenatus edwardsii* que apresentou uma elevada abundância de transcritos de serinoproteinases (37,5%) pertencentes a 19

clusters. O *cluster* (DQ439973) contém apenas a região 3'UTR e este apresentou 90% de identidade com a região 3'UTR de serinoproteinases presentes na glândula de *B. jararaca*.

Recentemente, uma serinoproteinase da peçonha de *B. pauloensis* (BpSPI) foi isolada e caracterizada (Costa *et al*, 2009) sendo a sua sequência N-terminal distinta das demais sequências de serinoproteinases encontradas na biblioteca, sugerindo a presença de isoformas na peçonha de *B. pauloensis*.

4.7- CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE LAAO

As L-aminoácidos oxidases são enzimas que representam de 1 a 9% da peçonha total de serpentes (Du & Clemetson, 2002). Elas agem sobre L-aminoácidos, gerando H₂O₂, contribuindo para inibir a agregação plaquetária e causando danos celulares (Nathan *et al*, 1982).

Após o agrupamento das sequências geradas pela biblioteca de *B. pauloensis*, essas enzimas representaram 2,7% das toxinas expressas, 1,2% do total de sequências e 1,64% do total de sequências transcritas (Figura 5 e Tabela 3). Apesar da baixa expressão nas glândulas de peçonha, várias LAAOs vêm sendo isoladas e caracterizadas a partir das peçonhas ofídicas (Tempone *et al*, 2001; Stábeli *et al*, 2004; Izidoro *et al*, 2006; Alves *et al*, 2008; Samel *et al*, 2008; Rodrigues *et al*, 2009; Torres *et al*, 2010).

No presente trabalho, dois *clusters* gerados (BP028 e BP029), o primeiro apresentou 7 ESTs com 88% de identidade com uma L-aminoácido oxidase da

peçonha de *C. atrox*. Nenhum dos clusters apresentou sequência completa, devido provavelmente ao seu cDNA (2,7 Kb) ser muito longo.

Estudos recentes mostram que as L-aminoácidos oxidases são proteínas multifuncionais com ação edemato-gênica, indução de apoptose, atividade bactericida, anticoagulante, anti-HIV e antiparasitária. Estes efeitos são mediados pela liberação de água oxigenada no processo de oxidação, mas existe também uma interação direta entre a LAAO e as células alvo que pode ter importantes funções (Tempone *et al*, 2001; Toyama *et al*, 2006).

Com isso, um melhor entendimento da estrutura e das ações farmacológicas das LAAOs poderia facilitar a utilização destas enzimas para o desenho de drogas anticâncer e anti-HIV, bem como o uso de drogas no tratamento de doenças infecciosas causadas por parasitas como a *Leishmania*.

4.8- OUTRAS TOXINAS PRESENTES NO TRANSCRIPTOMA DA GLÂNDULA DE PEÇONHA DE *B. pauloensis*

Os fatores de crescimento neural (NGFs) pertencem à família das neurotrofinas e são responsáveis por modular o desenvolvimento, manutenção e sobrevivência de neurônios do sistema nervoso central e periférico. Além disso, estas moléculas apresentam ação pleiotrópica por ativar uma diversidade de vias metabólicas envolvidas ou não com o sistema nervoso.

Para os transcritos de NGF (1%) encontrados na biblioteca de *B. pauloensis* (Figura 5), três seqüências se destacam formando dois *clusters* que apresentam similaridade com transcritos de *C. d. terrificus* e *B. jararacussu*. Um dos *clusters*

(BP038) é representado por um *singleton*, confirmando a baixa taxa de expressão desta toxina (Tabela 2).

Kashima *et al*, (2002) compararam a sequência de NGF clonado de *B. jararacussu* com as seqüências de outros fatores de serpentes da subfamília *Crotalinae* depositadas em banco de dados internacional e constataram uma alta homologia entre estes componentes da peçonha. Porém, a análise filogenética destas seqüências demonstrou notável diferença dos NGFs desta subfamília com os fatores de serpentes da família *Elapidae*. Boldrini-França *et al*, (2009) relataram um transcrito de NGF na biblioteca de *C. d. collilineatus* que apresentou 100% de identidade com o NGF descrito para *C. d. terrificus*.

Um grande número de pesquisas relacionadas ao assunto vem sendo publicado nas últimas décadas, devido ao interesse terapêutico atribuído à proteção que os fatores de crescimento neural demonstram exercer sobre suas células-alvo.

As hialuronidases são enzimas não tóxicas conhecidas como “fator de espalhamento”, pois elas catalisam a quebra do ácido hialurônico, o principal componente da matriz extracelular em vertebrados e auxilia na difusão de outras toxinas durante o envenenamento. Estão presentes em testículos, baço, pele, olho, fígado, rim útero, placenta, lágrima e sangue (Menzel & Farr, 1998), além de possuir características comuns essenciais para a atividade enzimática, conservadas entre diversas espécies (Csoka *et al*, 1999). Também são encontradas em vários tipos de peçonhas e venenos, como em serpentes, lagartos e artrópodes (escorpiões, aranhas, vespas, lagartas e abelhas), atuando como imunógeno nesses últimos. Em serpentes, a enzima potencializa a

toxicidade da peçonha e contribui para danos no local da picada, visto que distorce a integridade da matriz extracelular por meio da degradação do ácido hialurônico (Girish *et al*, 2002; Shashidharamurthy *et al*, 2002; Girish & Kemparaju, 2006). Estas enzimas são mais bem descritas para as peçonhas crotálicas, mas surpreendentemente uma seqüência foi encontrada no transcriptoma de *B. pauloensis*. As hialuronidases representam menos que 1% do peso seco das peçonhas botrópicas, por isso a grande dificuldade em sua purificação.

O cluster (BP027) referente a hialuronidase, (Tabela 2) foi o único encontrado dentre os transcritos gerados no transcriptoma. Existem algumas seqüências de hialuronidases depositadas no GenBank, mas nenhuma pertencente ao gênero *Bothrops*.

Ohanina foi primeiramente isolada da peçonha de *Ophiophagus hannah* mostrando ser responsável por causar hipolocomoção e hiperalgesia em camundongos (Pung *et al*, 2005). Essas ações farmacológicas são provavelmente mediadas por meio de seu efeito no sistema nervoso central (Pung *et al*, 2006). Diferente de outras proteínas presentes nas peçonhas que são ricas em resíduos de cisteína e pontes dissulfeto, ohanina apresenta apenas um resíduo de cisteína em sua estrutura.

O cluster BP039 (Tabela 2) encontrado no transcriptoma de *B. pauloensis* apresentou 95% de identidade com a ohanina descrita em *O. hannah*. Alguns relatos da literatura apresentam exemplos de ohanina como a *Naja kaouthia* (Thai cobrin – P82885) (Fry *et al*, 2006). Ohanina é o primeiro membro da nova

subfamília de proteínas contendo o domínio B30.2-like com um pequeno segmento N-terminal e foi denominada vespryns (Pung *et al*, 2006).

As svVEGFs são proteínas presentes em algumas peçonhas ofídicas, aumentam a permeabilidade vascular e apresentam importantes funções durante os primeiros estágios no envenenamento.

No transcriptoma estudado, estas proteínas representam 0,3% do total de toxinas encontradas (Figura 5), uma representação não significativa quando comparada com os transcritos codificantes de VEGF encontrados em *B. insularis* (4,3%) (Figura 6). Junqueira-de-Azevedo *et al*, (2001) clonaram e expressaram uma VEGF de *B. insularis*, mostrando o potencial da proteína em aumentar a permeabilidade vascular, agindo assim como um agente de dispersão da toxina e provavelmente contribuindo para a ação hipotensora observada nos envenenamentos.

As análises da biblioteca de *B. pauloensis* revelaram a presença de uma EST (*singleton*) de VEGF que foi identificada como um *cluster* BP040 (GR955259) (Tabela 2). Este *cluster* apresenta similaridade com uma VEGF encontrada no transcriptoma de *B. insularis* (Junqueira-de-Azevedo & Ho, 2002). Alguns aminoácidos presentes na sequência svVEGF estão envolvidos na ligação com moléculas alvos, na dimerização da proteína e são altamente conservados, porém alguns destes aminoácidos não foram encontrados na sequência de VEGF gerada pela biblioteca de *B. pauloensis* mostrando que esta sequência está incompleta.

As CRISPs (proteínas secretoras ricas em cisteína) são um grupo de proteínas secretadas, com seqüências homólogas contendo 16 resíduos de

cisteína conservados os quais formam 8 pontes dissulfeto. Estas possuem cadeias simples, com massa molecular de 20-30kDa e organizadas em três domínios: o domínio PR-1 (Proteínas relacionadas a patógenos do grupo 1), o domínio semelhante a uma dobradiça e o domínio rico em cisteína (CDR) com 16 resíduos de cisteína formando oito pontes dissulfeto (Osipov *et al*, 2005).

Estas proteínas estão presentes em secreções de glândulas exócrinas de mamíferos, granulócitos e plasma humano (Udby *et al*, 2002) e em alguns organismos de outros táxons (Yamazaki & Morita, 2004) incluindo os répteis. Algumas CRISPs de espécies ofídicas têm sido descritas: CRVP (proteínas de peçonha ricas em cisteína) de *Trimeresurus mucrosquamatus* (Viperidae, Asia) (Chang *et al*, 1997), proteína 25k de *Naja kaouthia* (Elapidae, Asia) (Osipov *et al*, 2001), latisemina da serpente do mar *Laticauda semifasciata* (Hydrophidae), e tigrina de *Rhabdophis tigrinus tigrinus* (Colubridae) (Yamazaki *et al*, 2002). Recentemente, uma lista de CRISPs elápidas asiáticas foi descrita: ophanina de *Ophiophagus hannah* (Yamazaki *et al*, 2003), bucarina from *Bungarus candidus* (Accesso P81993 no SwissProt), e duas proteínas de *Naja atra*, CRVP1 e CRVP2 (Jin *et al*, 2003).

Poucas informações são conhecidas sobre a função destas proteínas no envenenamento. Até o momento apenas duas atividades foram encontradas: inibição da contração do músculo liso e bloqueio de canais iônicos (Yamazaki & Morita, 2004; Osipov *et al*, 2005).

Na biblioteca de *B. pauloensis* foram gerados dois clusters (BP012 e BP013), o primeiro apresentou 92% de identidade com a CRISP de *C. atrox* e o

segundo apresentou 89% de identidade com a proteína presente na peçonha de *Trimeresurus stejnegeri* (Tabela 2).

O perfil de expressão gênica da glândula de peçonha de *S.c.edwardsii* apresentou 6,6% de transcritos correspondentes a CRISPs (Pahari *et al*, 2007) portanto pode ser interessante estudar as propriedades e funções destas proteínas a partir desta peçonha, por apresentar uma abundância significativa nos transcritos para CRISPs quando comparado com nossos resultados que foram de 0,6% (Figura 5).

4.9- PROTEÍNAS CELULARES

As proteínas relacionadas com funções celulares compreendem 31,3% dos transcritos encontrados na biblioteca (Figura 4), os quais foram divididos em 9 categorias, de acordo com o tipo funcional (Figura 8). Os transcritos mais abundantes estão relacionados com a transcrição do DNA e a tradução do RNA (24,4%), seguido dos transcritos relacionados com metabolismo celular (22,2%) e 17,3% relacionados com função estrutural (Figura 8).

Dentre os transcritos relacionados com o metabolismo celular, identificamos um transcrito que codifica 5'nucleotidase, sugerindo que vias do metabolismo das purinas e nicotinamidas são encontradas na glândula da peçonha de *B. pauloensis*.

Entre os grupos que aparecem menos expressos, mas não menos importantes, podemos citar as proteínas dissulfeto isomerases (PDI) (5,7%), enzimas envolvidas na formação das pontes dissulfeto (Freedman *et al*, 1994).

Estas pontes são frequentemente encontradas em toxinas e são importantes para a manutenção da estrutura tridimensional das moléculas.

A cal glandulina, uma proteína ligante de cálcio foi identificada na biblioteca de *B. pauloensis*. Estas proteínas possuem motivos ligantes de Ca²⁺ e são exclusivamente expressas em glândulas de peçonhas ofídicas de várias espécies. Elas não são secretadas, porém são fundamentais no processo de secreção das toxinas (Junqueira-de-Azevedo & Ho, 2002; Junqueira-de-Azevedo et al, 2003).

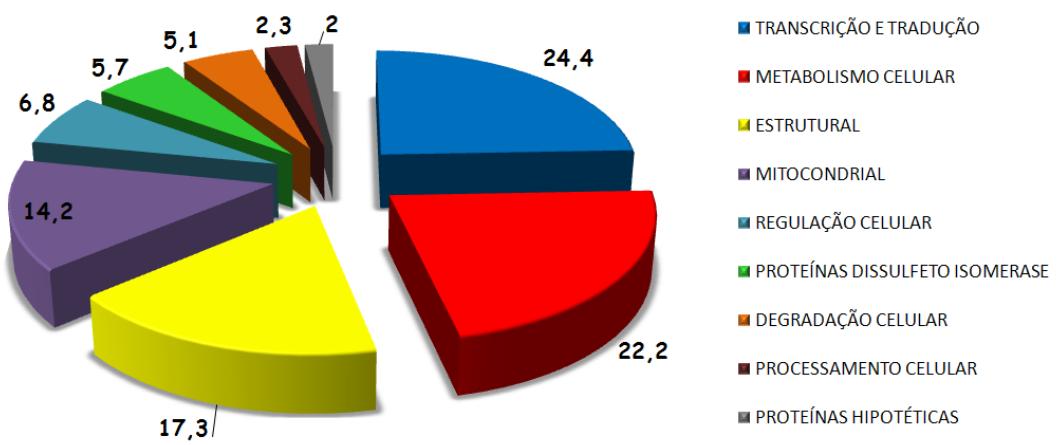


Figura 8: Proporção de proteínas celulares encontradas na glândula de peçonha de *B. pauloensis* (% do total de clones).

4.10- CLONAGEM DA *Bp-LAAO* DE *B. pauloensis*

O cluster BP028 (*GenBank* GR955247- EU870608) encontrado na biblioteca de *B. pauloensis* apresentou similaridade com LAAOs de peçonhas ofídicas encontradas no banco de dados internacional. Para a obtenção da sequência

completa deste clone, foi feita uma PCR utilizando dois pares de primers que possibilitam o sequenciamento de fragmentos de cDNA que apresentam entre 1,3 a 7 kb, dividindo sequências longas em fragmentos menores.

As sequências obtidas por produtos de PCR foram analisadas por similaridade em banco de dados existentes, resultando na identificação de transcritos que codificam LAAOs de peçonhas ofídicas. O produto de amplificação produziu um fragmento de cDNA com 1548 pb (Figura 9), que codifica uma proteína madura contendo 516 resíduos de aminoácidos (GenBank:EU870608) correspondendo a um pl teórico de 6,3 e massa molecular de 58 kDa. Vários clones com inserções de um mesmo tamanho foram sequenciados e apresentaram sequências nucleotídicas idênticas.

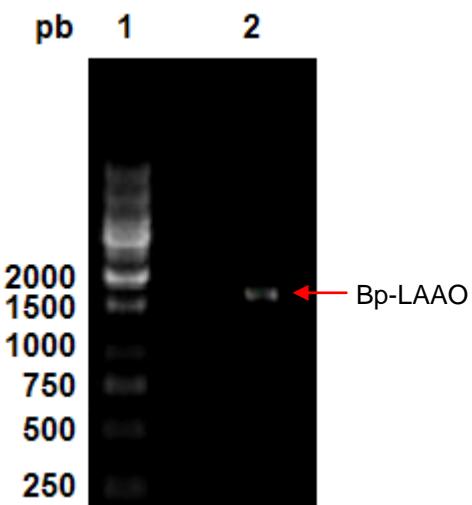


Figura 9: Análise do produto de RT-PCR em gel de agarose a 1% para DNA.

(1) Marcador (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder). (2) Produto da reação – Bp-LAAO.

A estrutura primária mostra que a Bp-LAAO é um membro da família das proteínas que possuem o FAD como cofator, o que foi confirmado por análises espectrofotométrica. Os sítios de glicosilação foram identificados pela utilização do programa NetNGly 1.0 e apresentou apenas um sítio de glicosilação para a Bp-LAAO (Figura 10).

Algumas sequências de LAAOs de serpentes da família Viperidae e Elapidae foram utilizadas nas análises filogenéticas e estão apresentadas na Tabela 4 pelo código de identificação com 4 letras. Todos os programas utilizados para as análises filogenéticas mostraram a mesma topologia e resultados estatísticos, confirmando os resultado encontrados. As LAAOs de serpentes Viperidae e Elapidae foram claramente divididas em dois grupos monofiléticos. No entanto, a LAAO da peçonha de *Ophiophagus hannah* foi agrupada em um ramo separado e reagrupada com duas LAAOs de *Gallus gallus* e *Meleagris gallopavo* respectivamente (Figura 11).

M N V F F M F S L L F L A A L G S C A D D
ATGAATGTCTCTTATGTTCTCACTGTTCTGGCTGCCTGGAGCTGTGCAGATGAC
G N P L E E C F R E T D Y E E F L E I A K
GGAAACCCCTAGAGGAATGCTCCGAGAAACTGACTATGAGGAATTCTAGAGATGCCAAA
N G L S A T S N P K H V V I V G A G M S G
ATGGTCTGAGCGCAGACATCAAACCCGAAACATGTTGTGATTGTAGGTGCAGGAATGTCCTGGG
L S A A Y V L A N A G H Q V T V L E A S K
CTTAGTGCAGCCTATGTTCTGCAAATGCTGGACATCAGTGACAGTCTTGAAGCCAGTAAA
R A G G R V R T Y R N D K E G W Y A N L G
CGTGCAGGAGGACGAGTGAGGACTTATCGAAATGACAAGAAGGCTGGTATGCCAATCTCGGG
P M R L P E K H R I V R E Y I R K F G L Q
CCCATGCGTTAACCTGAGAAACACAGGATTGTCCGGAAATATATCAGAAAGTTGGTCTGCAG
L N E F S Q E N E N A W Y F I K N I R K R
TTGAATGAATTTCTCAGGAAATGAGAATGCATGGTATTTATCAAAACATCAGGAAGAGA
V G E V N K D P G V L E Y P V K P S E V G
GTAGGGGAAGTCAATAAGACCTGGTGTGGAAATATCCGTGAAGCCTTCAGAAGTAGGC
K S A G Q L Y E E S L Q K A V E E L R R T
AAAAGTGCTGGACAGCTATATGAAGAGTCCTCCAAAAGGCTGTAGAAGAATTAAGAAGGACT

N C S

 Y M L N K Y D T Y S T K E Y L L K E
AACTGCAGCTACATGCTAAATAATGACACCTACTCAACGAAGGAGtATCTACTAAAGAA
G N L S P G A V D M I G D L L N E D S G Y
GGAAATCTGAGTCCTGGAGCTGTAGATATGATTGGAGACTTACTGAATGAAGATTCTGGCTAT
Y V S F I E S L K H D D I F A Y E K R F D
TATGTGTCTTTATTGAAAGCCTGAAACATGATGATATCTTGCTTATGAAAAAGATTGAT
E I V G G M D K L P T S M Y Q A I Q E K V
GAAATTGTTGGTGGAAATGGATAAGTTGCCTACATCCATGTATCAAGCATTAGGAAAAGGTG
R L N V R V I K I Q Q D V K E V T V T Y Q
CGTTTGAATGTCCGAGTAATCAAGATAACAGCAGGATGTCAAGGAAGTCACAGTGACATATCAA
T S A K E T L S V T A D Y V I V C T T S R
ACCTCAGCAAAGGAGACGTTATCTGTGACAGCTGATTATGTCATTGTATGCACTACGTCAAGG
A A R R I K F E P P L P P K K A H A L R S
GCCGCCCGTCGCATCAAGTTGAACCACCCCTCCGCCAAAGAAAGCGCATGCTTGCCTGCCT
V H Y R S G T K I F L T C T K K F W E D D
GTCCACTACAGAAGTGGCACCAAGATCTCCTCACTTGCACTAAGAAATTGGCTAACCAT
G I H G G K S T T D L P S R F I Y Y P N H
GGCATTCACTGGTGGGAAGTCCACAACGTGATCTCCATCCGATTCACTACTACCTAACCAT
N F P S G V G V I I A Y G I G D D A N F F
AACTTCCTAGTGGAGTTGGGTATTATAGCCTATGGCATTGGTGTGATGCCAATTCTTT
Q A L D F K D C G D I V I N D L S L I H Q
CAAGCTTGTGATTCAAGGACTGTGGTGATATTGTCATTAATGACCTTTGATCCATCAG
L P K E E I Q A F C R P S M I Q R W S L D
CTGCCCAAGGAAGAGATCCAGGCCTCTGCGTCCCTCAATGATCAAAGATGGAGCCTGGAT
K Y A M G G I T T F T P Y Q F Q H F S E A
AAGTATGCTATGGGTGGTATAACCACCTCACTCCCTACAGTTCAACATTAGCG
L T A P V D R I Y F A G E Y T A Q A H G W
CTCACTGCACCTGTAGACAGAATCTACTTGCAGGGAGTACAGCCAAAGCTCATGGTTGG
I D S T I K S G L T A A R D V N R A S E N
ATTGACAGCACAATTAAGTCAGGGCTGACAGCAGCAAGAGATGTGAATCGTCTGAGAAT
R I P G P S T A E A C M Q A F P I
CGGATCCCGGGCCCGTCACTGCAGAGGCCTGCATGCAAGCTTCCCTATA

Figura 10: Sequência de cDNA e resíduos de aminoácidos deduzidos de Bp-LAAO (GenBank EU870608). A sequência sublinhada foi diretamente sequenciada a partir da proteína (Rodrigues *et al.*, 2009) e a sequência marcada em caixa é um sítio de N-glicosilação.

Tabela 4. Seqüências homólogas a Bp-LAAO selecionadas no banco de dados (NCBI).

Sequência (código de 4 letras*)	Espécies ou Subespécies	Família	Código NCBI
L-amino acido oxida se (Bjar)	<i>Bothrops jararacussu</i>	Viperidae	gi 82127391
Bp-LAAO (Bpau)	<i>Bothrops paulensis</i>	Viperidae	gi 195927838
L-amino acido oxida se (Bm00)	<i>Bothrops mojeni</i>	Viperidae	gi 82127389
L-amino acido oxida se (Crho)	<i>Calloselasma rhodostoma</i>	Viperidae	gi 20141785
L-amino acido oxida se (Crh02)	<i>Calloselasma rhodostoma</i>	Viperidae	gi 157883389
L-amino-acido oxida se (Cada)	<i>Crotalus adamanteus</i>	Viperidae	gi 6093636
Apoxin-1 (Catr)	<i>Crotalus atrox</i>	Viperidae	gi 12410294
L-amino acido oxida se (Eoce)	<i>Echis ocellatus</i>	Viperidae	gi 205275159
L-amino-acido oxida se (Gblo)	<i>Gloydius blomhoffii</i>	Viperidae	gi 75570145
L-amino-acido oxida se (Chal)	<i>Gloydius halys</i>	Viperidae	gi 82088273
L-amino-acido oxida se (Scat)	<i>Sistrurus catenatus edwardsi</i>	Viperidae	gi 109254996
L-amino-acido oxida se (Tste)	<i>Trimersurus stejnegeri</i>	Viperidae	gi 33355627
L-amino-acido oxida se (Vste)	<i>Vipera vipera stepnegeri</i>	Viperidae	gi 82090465
L-amino-acido oxida se (Fas)	<i>Bungarus fasciatus</i>	Elapidae	gi 126035653
L-amino-acido oxida se (Bmul)	<i>Bungarus multicinctus</i>	Elapidae	gi 126035649
L-amino acido oxida se precursor (Dves)	<i>Demania vestigata</i>	Elapidae	gi 166214291
L-amino-acido oxida se (Nscu)	<i>Notechis scutatus scutatus</i>	Elapidae	gi 123913796
L-amino-acido oxida se (Ohan)	<i>Ophiophagus hannah</i>	Elapidae	gi 126035644
L-amino-acido oxida se (Oscu)	<i>Oxyuranus scutellatus</i>	Elapidae	gi 123916680
L-amino-acido oxida se (Paus)	<i>Pseudechis australis</i>	Elapidae	gi 123916679
Proteína Hipotética LOC417039 (Ggal)	<i>Gallus gallus</i>	-	gi 150247106
L-amino acido oxida se (Mgal)	<i>Meleagris gallopavo</i>	-	gi 169730353
Proteína Hipotética similar a L-amino acido oxida se 1 (Mdom)	<i>Monodelphis domestica</i>	-	gi 126330514
L-amino acido oxida se 1 (Mmus)	<i>Mus musculus</i>	-	gi 31981608

* Código de identificação utilizado nas análises filogenéticas.

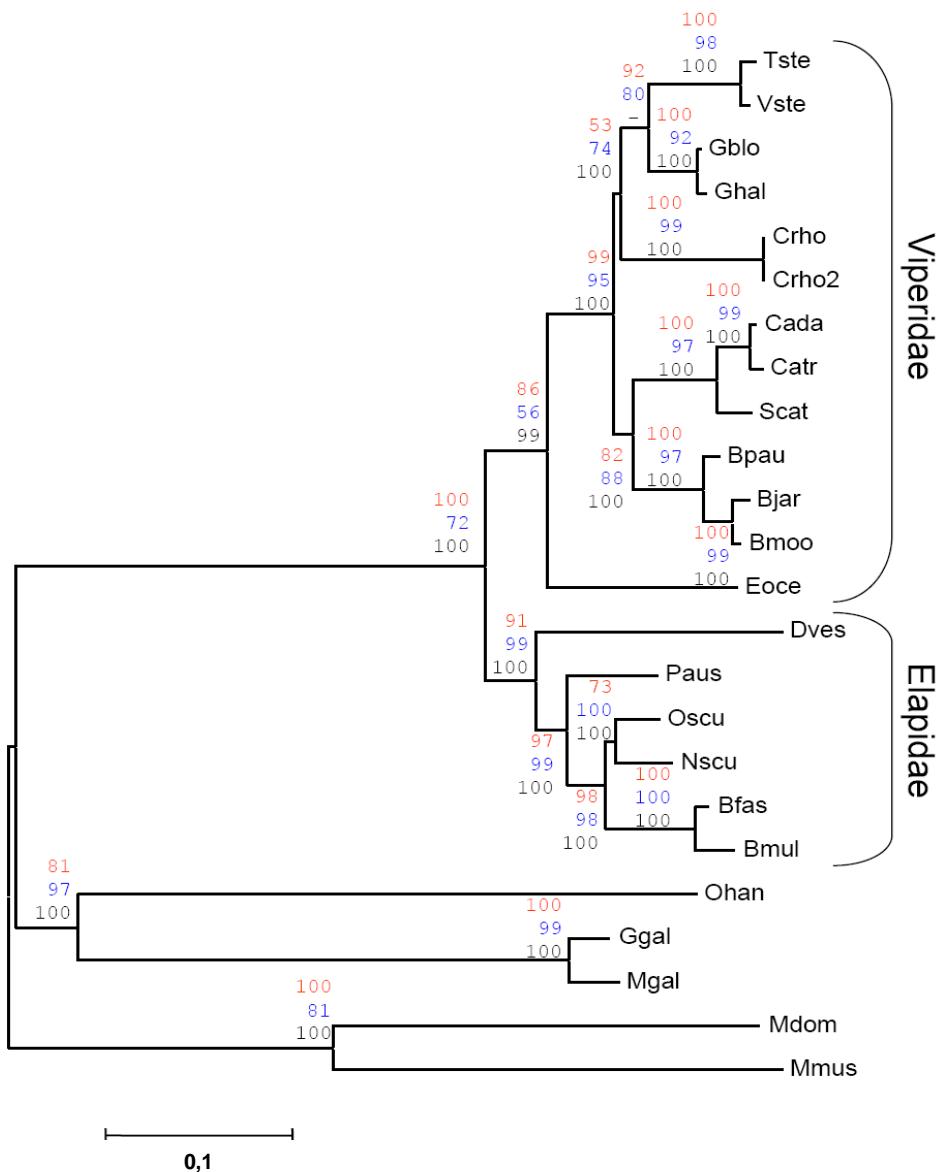


Figura 11: Relações evolutivas das LAAOs. A história evolutiva foi inferida usando o método de Neighbor-Joining. Análises filogenéticas foram conduzidas em MEGA4. As distâncias evolutivas foram calculadas utilizando JTT matrix-based. Em vermelho, azul e preto são apresentados, respectivamente, o teste de bootstrap MEGA4 (2000 repetições), TREE-PUZZLE amostragem quarteto (10000 passos) e MrBayes análise bayesiana MCMC (75.900 ciclos). As svLAAOs foram agrupadas em dois ramos monofiléticos (Viperidae e Elapidae).

Na verdade, a topologia da árvore filogenética indica que as LAAOs analisadas apresentam uma notável correlação com especiação, demonstrando que os genes correspondentes a estas sequências são ortólogos. Por outro lado, a LAAO de *O. hannah* foi agrupada com as LAAOs de *G. gallus* e *M. gallopavo* como foi descrito também por Jin *et al.* (2007). Este fato destaca que o gene que codifica a LAAO de *O. hannah* é parálogo em relação aqueles que codificam as outras LAAOs incluídas nas análises filogenéticas. Assim, é provável que este gene tenha surgido de uma duplicação de genes codificantes para LAAOs endógenas de serpentes. Esta hipótese é reforçada pela ausência de outros genes ortólogos nas LAAOs de *O. hannah* em outras espécies de serpentes. Além disso, esta LAAO pode apresentar características distintas em comparação a outras LAAOs analisadas.

O primeiro modelo teórico estrutural da Bp-LAAO calculado pelo programa Modeller 8v2 apresentou uma boa qualidade esteroquímica com 99,1% de seus resíduos de aminoácidos no núcleo, permitindo plotagem das regiões de Ramachandran. Além disso, todos os resíduos apresentam potencial de energia negativa e Z-score do modelo de -11,21.

O modelo teórico final da Bp-LAAO apresentou estabilização após uma simulação dinâmica molecular de aproximadamente 1500 ps, com um ligeiro desvio de posicionamento de átomos (~0,1nm). Similarmente ao modelo inicial, o modelo estrutural final da Bp-LAAO apresentou 97,9% de resíduos no núcleo. Da mesma forma, todos os resíduos de aminoácidos deste modelo apresentaram potencial de energia negativa e Z-score de -10,52.

Todos estes dados em conjunto indicam que o alto grau de estabilidade da estrutura após a simulação de dinâmica molecular, demonstraram que a Bp-LAAO é um modelo estrutural viável (Figura 12).

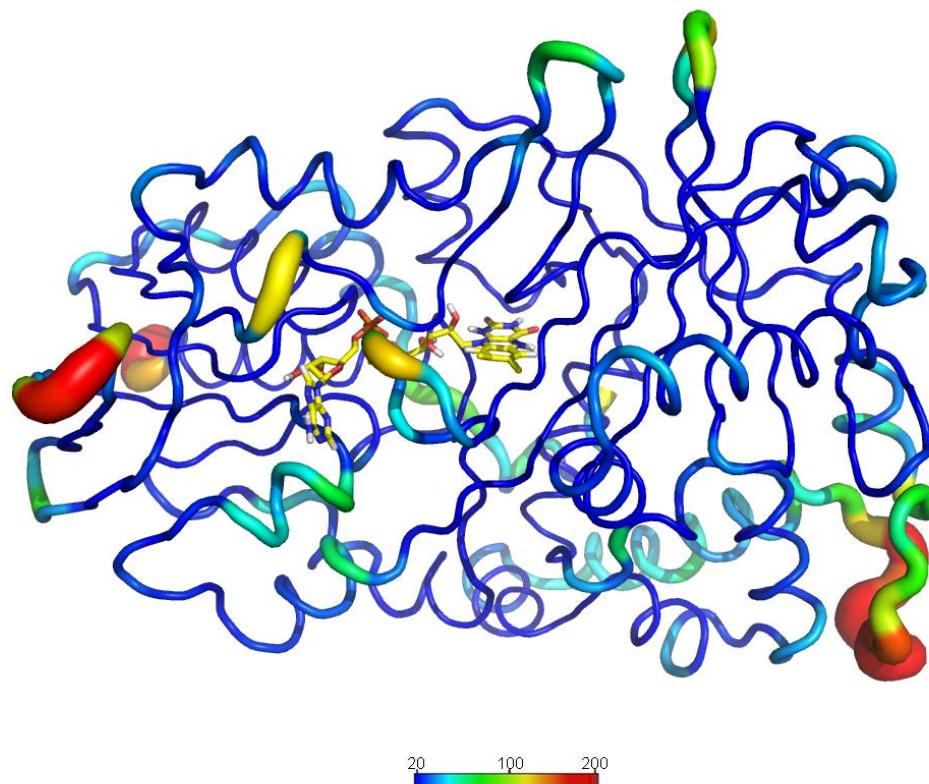


Figura 12: Diagrama do modelo estrutural teórico da Bp-LAAO de *B. pauloensis* obtido após simulação dinâmica molecular. A escala de cor a temperatura/mobilidade dos átomos do modelo final da Bp-LAAO (azul: frio = baixa temperatura = regiões estáticas e imóveis; vermelho: alta temperatura = regiões variáveis e móveis). O cofator FAD é representado pelos bastões coloridos. Ilustração gerada pelo programa PyMOL (Delano, 2002).

5- CONCLUSÃO

Os resultados apresentados no presente trabalho contribuíram para o conhecimento do perfil de expressão gênica da glândula de peçonha de *B. pauloensis*, resultando em um estudo geral dos diferentes componentes presentes na peçonha responsáveis pela fisiopatologia do envenenamento.

Além disso, Rodrigues *et al*, (2009) isolaram e clonaram uma L-aminoacido oxidase da peçonha de *B. pauloensis* (Bp-LAAO) que compartilha sequências com elevado grau de identidade e uma origem evolutiva comum com as svLAAOs da família Viperidae. Alguns estudos funcionais com a svLAAO tem demonstrado seu alto potencial biotecnológico para o desenho de agentes terapêuticos.

6- REFRÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, V. A.; DAL BELO, C. A.; HERNANDES-OLIVEIRA, S. S.; BORJA-OLIVEIRA, C. R.; HYSLOP, S.; FURTADO, M. F. D.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Neuromuscular and phospholipase activities of venoms from three subspecies of *Bothrops neuwiedi* (*B. n. goyazensis*, *B. n. paranaensis* and *B. n. diporus*). **Comp. Biochem. Physiol.** v. 148, p. 142-149, 2007.

ALVES, R. M.; ANTONUCCI, G. A.; PAIVA, H. H.; CINTRA, A. C. O.; FRANCO, J. J.; MENDONÇA-FRANQUEIRO, E. P.; DORTA, D. J.; GIGLIO, J. R.; ROSA, J. C.; FULY, A. L.; DIAS-BARUFFI, M.; SOARES, A. M.; SAMPAIO, S. V. Evidence of caspase-mediated apoptosis induced by L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops atrox* snake venom. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 151, p. 542-550, 2008.

ANDREWS, R.K.; KAMIGUTI, A.S.; BERLANGA, O.; LEDUC, M.; THEAKSTON, R.D.G.; WATSON, S.P. The use of snake venom toxins as tools to study platelet receptors for collagen and von Willebrand factor. **Haemostasis**. v. 31, p. 155–172, 2001.

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 bothrop-stoxins from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie**. v. 82, p. 755–763, 2000.

BALDO, C.; TANJONI, I.; LEÓN, I. R.; BATISTA, I. F. C.; DELLA-CASA, M. S.; CLISSA, P. B.; WEINLICH, R.; LOPES-FERREIRA, M.; LEBRUN, I.; AMARANTE-MENDES, G. P.; RODRIGUES, V. M.; PERALES, J.; VALENTE, R. H.; MOURA-DA-SILVA, A. M. BnP1, a novel P-I metalloproteinase from *Bothrops neuwiedi* venom: Biological effects benchmarking relatively to jararhagin, a P-III SVMP. **Toxicon**. v. 51, p. 54-65, 2008.

BASTOS, L. M.; OLIVEIRA JÚNIOR, R. J.; SILVA, D. A. O.; MINEO, J. R.; VIERA, C. U.; TEIXEIRA, D. N. S.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; RODRIGUES, V. M.; HAMAGUCHI, A. *Toxoplasma gondii*: Effects of neuwiedase, a metalloproteinase from *Bothrops neuwiedi* snake venom, on the invasion and replication of human fibroblasts in vitro. **Experim. Parasitol.** v. 120, p. 391-396, 2008.

BOLDRINI-FRANÇA, J.; RODRIGUES, R. S.; FONSECA, F. P. P.; MENALDO, D. L.; FERREIRA, F. B.; HENRIQUE-SILVA, F.; SOARES, A. M.; HAMAGUCHI, A.; RODRIGUES, V. M.; OTAVIANO, A. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. *Crotalus durissus collilineatus* venom gland transcriptome: Analysis of gene expression profile. **Biochimie.** v. 91, p. 586-595, 2009.

CARDOSO, R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; RODRIGUES, V. M.; SANTOS, W. B.; SOUZA, G. L. R.; PRUDENCIO, C. R.; SIQUIEROLI, A. C. S.; GOULART, L. R. Peptide mimicking antigenic and immunogenic epitope of neuwiedase from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Toxicon.** v. 53, p. 254-261, 2009.

CASTRO, H. C.; FERNANDES, M.; ZINGALI, L. B. Identification of bothrojaracin-like proteins in snake venoms from *Bothrops* species and *Lachesis muta*. **Toxicon.** v. 37, p. 1403-1416, 1999.

CHANG, T. Y.; MAO, S. H.; GUO, Y. W. Cloning and expression of a cysteine-rich venom protein from *Trimeresurus mucrosquamatus* (Taiwan Habu). **Toxicon.** v. 35, p. 879-888, 1997.

CHING, A. T. C., ROCHA, M. T.; LEME, A. F. P., PIMENTA, D. C.; FURTADO, M. F. D.; SERRANO, S. M. T.; HO, P. L.; JUNQUEIRA-de-AZEVEDO, I. L. M. Some aspects of the venom proteome of the *Colubridae* snake *Philodryas olfersii* revealed from a Duvernoy's (venom) gland transcriptome. **FEBS Letters,** v. 580, p. 4417-4422, 2006.

CIDADE, D. A. P.; SIMÃO, T. A.; DÁVILA, A. M. R.; WAGNER, G.; JUNQUEIRA-de-AZEVEDO, I. L. M., HO, P. L.; BON, C. ZINGALI, R. B.; ALBAO, R. M. *Bothrops jararaca* venom gland transcriptome: Analysis of the gene expression pattern. **Toxicon**. v. 48, p. 437, 461, 2006.

COSTA, F. L. S.; RODRIGUES, R. S.; IZIDORO, L. F. M.; MENALDO, D. L.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; FULY, A. L.; SOARES, S. G.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; BARRAVIERA, B.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Biochemical and functional properties of a thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**. v. 54, p. 725-735, 2009.

CSOKA, A.B.; SCHERER, S.W.; STERN, R. Expression analysis of six paralogous human hyaluronidase genes clustered on chromosomes 3p21 and 7q31. **Genomics**. v. 60, p. 356–361, 1999.

DeLANO, W.L. The PyMOL molecular graphics system, DeLano Scientific, **San Carlos**, 2002.

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

FERREIRA, L. A. F.; GALLE, A.; RAIDA, M.; SCHRADER, M.; LEBRUN, I.; HABERMEHL, G. Isolation: Analysis and properties of three bradykinin-potentiating peptides (BP-II, BPP-III and BP-V) from *Bothrops neuwiedi* venom. **J. Protein Chem.** v. 17, p. 285-289, 1998.

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

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

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

FRY, B. G.; VIDAL, N.; NORMAN, J. A.; VONK, F. J.; SCHEIB, H.; RAMJAN, S. F.; KURUPPU, S.; FUNG, K.; HEDGES, S. B.; RICHARDSON, M. K. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. **Nature.** v. 439, p. 584-588, 2006.

GIRISH, K. S.; KEMPARAJU, K. Inhibition of *Naja naja* venom hyaluronidase: Role in the management of poisonous bite. **Life Sciences.** v.78, p. 1433-1440, 2006.

GIRISH, K. S. ; JAGADEESHA, D. K. ; RAJEEV, K. B. ; KEMPARAJU, K. Snake venom hialuronidase: An evidence for isoforms and extracellular matrix degradation. **Mol. Cell. Biochem.** v. 240, p. 105-110, 2002.

GOVERS-RIEMSLAG, J. W. P.; KNAPEN, M. J. H.; TANS, G.; ZWAAL, R. F. A.; ROSING, J. Structural and fuctional characterization of a prothrombin activator from the venom of *Bothrops neuwiedi*. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 916, p. 388-401, 1987.

GUIMARÃES-GOMES, V.; OLIVEIRA-CARVALHO, A. L.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; 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, p. 1-11, 2004.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Local pathological effects induced by *Bothrops* snake venoms. **Mem. Inst. Butantan.** v. 33, p. 1405-1474, 1995.

HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; QUEIROZ,L.S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; GIGLIO, J.R.. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon.** v. 26, p. 615–627, 1998.

HUELSENBECK, J.P.; RONQUIST, F. MrBayes: bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics.** v. 17, p. 754-755, 2001.

IZIDORO, L.F.; RIBEIRO, M.C.; SOUZA, G.R.; SANT'ANA, C.D.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; GOULART, L.R.; BELEBONI, R.O.; NOMIZO, A.; SAMPAIO, S.V.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M. Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. **Bioorg. Med. Chem.** v. 14, p. 7034–7043, 2006.

JIN, Y.; LU, Q.; ZHOU, X.; ZHU, S.; LI, R.; WANG, W.; XIONG, Y. Purification and cloning of cysteine-rich proteins from *Trimeresurus jerdonii* and *Naja atra* venoms. **Toxicon.** v. 42, p. 539-547, 2003.

JIN, Y.; LEE, W. H.; ZENG, L.; ZHANG, Y. Molecular characterization of L-amino acid oxidase from king cobra venom. **Toxicon.** v. 50, p. 479-489, 2007.

JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; PERTINHEZ, T.; SPISNI, A.; CARREÑO, F. R.; FARAH, C. S.; HO, P. L. Cloning and expression of cal glandulin, a new EF-hand protein from the venom glands of *Bothrops insularis* snake in *E. coli*. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1648, p. 90-98, 2003.

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.** v. 299, p. 279-292, 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.** v. 276, p. 39836–39842, 2001.

KASHIMA, S.; ROBERTO, P. G.; SOARES, A. M.; ASTOLFI-FILHO, S., PEREIRA, J. O.; GIULIATI, S.; FARIA-JUNIOR, M.; XAVIER, M. A. S., FONTES, M. R. M.; GIGLIO, J. R.; FRANÇA, S. C. Analysis of *Bothrops jararacussu* venomous gland transcriptome focusing on structural aspects: I-gene expression profile of highly expressed phospholipases A₂. **Biochimie.** v. 86, p. 221-219, 2004.

KASHIMA, S.; SOARES, A. M.; ROBERTO, P. G.; PEREIRA, J. O.; ASTOLFI-FILHO, S.; CINTRA, A. O.; FONTES, M. R.; GIGLIO, J. R.; DE CASTRO FRANÇA, S. cDNA sequence and molecular modeling of a nerve growth factor from *Bothrops jararacussu* venomous gland. **Biochimie.** v. 84. n. 7. p. 675-680, 2002.

LOPES, D. S.; BALDO, C.; OLIVEIRA, C. F.; ALCÂNTARA, T. M.; OLIVEIRA, J. D. D.; GOULART, L. R.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; CLISSA, P. B.; RODRIGUES, V. M. Characterization of inflammatory reaction induced by neuwiedase, a P-I metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* venom. **Toxicon.** v. 54, p. 42-49, 2009.

MANDELBAUM, F. R.; ASSAKURA, M. T. Antigenic relationship of hemorrhagic factors and proteases isolated from the venoms of three species of *Bothrops* snakes. **Toxicon.** v. 26, p. 379-385, 1988.

MANDELBAUM, F. R.; ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P. Characterization of two hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops neuwiedi* (jararaca pintada). **Toxicon**. v. 22, p. 193-206, 1984.

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

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

MENZEL, E.J.; FARR, C. Hyaluronidase and its substrate: biochemistry, biological activities and therapeutic uses. **Cancer Letters**. v. 131, p. 3-11, 1998.

NATHAN, I.; DVILANSKY, A.; YIRMIYAHU, T.; AHARON, M.; LIVNE, A. Impairment of platelet aggregation by *Echis colorata* venom mediated by L-amino acid oxidase or H₂O₂. **Thromb. Haemost.** v. 48, p. 277-282, 1982.

NEIVA, M.; ARRAES, F. B. M.; SOUZA, J. V.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; PRIETO DA SILVA, A. R. B.; WALTER, M. E. M. T.; BRIGIDO, M. M.; YAMANE, T.; LÓPEZ-LOZANO, J. L.; ASTOLFI-FILHO, S. Transcriptome analysis of the Amazonian viper *Bothrops atrox* venom gland using expressed sequence tags (ESTs). **Toxicon**. v. 53, p. 427-436, 2009.

OSIPOV, A.V.; LEVASHOV, M.Y.; TSETLIN, V.I.; UTKIN, Y.N. Cobra venom contains a pool of cysteine-rich secretory proteins. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 328. p. 177–182, 2005.

OLIVEIRA, C. F.; LOPES, D. S.; MENDES, M. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; HAMAGUCHI, A.; ALCÂNTARA, T. M.; CLISSA, P. B.; RODRIGUES, V. M. Insights of local tissue damage and regeneration induced by BnSP-7, a myotoxin

isolated from *Bothrops (neuwiedi) pauloensis* snake venom. **Toxicon.** v. 53, p. 560-569, 2009.

PAHARI, S.; MACKESSY, S. P.; LINI, M. R. The venom gland transcriptome of Desert Massasauga rattlesnake (*Sistrurus caternatus edwardsii*) towards an understanding of venom composition among advanced snakes (superfamily *Coluboidea*). **BMC Mol. Biol.** v. 8, n.1. p. 115, 2007.

PEREIRA, M.F.; NOVELLO, J.C.; CINTRA, A.C.; GIGLIO,J.R.; LANDUCCI,E.T.; OLIVEIRA,B.; MARANGONI,S. The amino acid sequence of bothropstoxin-II, an Asp-49 myotoxin from *Bothrops jararacussu* (Jararacuçu)venom with low phospholipaseA2 activity. **J. Protein Chem.** v. 17, p. 381–386, 1998.

PUNG, Y. F.; KUMAR, S. V.; RAHAGOPALAN, N.; FRY, B.G.; PRAKASH, P.; KUMAR, R.; KINI, M. Ohanin, a novel protein from king cobra venom: Its cDNA and genomic organization. **Gene.** v. 371, p. 246-256, 2006.

QINGHUA, L.; XIAOWEI, Z.; WEI, Y.; CHENJI, L.; YIJUN, H.; PENGXIN, Q.; XINGWEN, S.; SONGNIAN, H.; GUANGMEI, Y. A catalog for transcripts in the venom gland of the *Akistrodon acutus*: identification of the toxins potentially involved in coagulopathy. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 341, p. 522-531, 2006.

QUEIROZ, L. S.; SANTOS NETO, H.; ASSAKURA, M. T.; REICHL, A. P.; MANDELBAUM, F. R. Muscular lesions induced by a hemorrhagic factor from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v.18, p. 337-340, 1985.

RANDAZZO-MOURA, P.; PONCE-SOTO, L. A.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; MARANGONI, L. Structural characterization and neuromuscular activity of a new Lys49 phospholipase A(2) homologous (Bp-12) isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Protein. J.** v. 27, p. 355-362, 2008.

RODRIGUES, R. S.; SILVA, J. F.; BOLDRINI-FRANÇA, J.; FONSECA, F. P. P.; OTAVIANNO, A. R.; HENRIQUE-SILVA, F.; HAMAGUCHI, A.; MAGRO, A. J.; BRAZ, A. S. K.; DOS SANTOS, J.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; FONTES, M. R. M.; FULY, A.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Structural and functional properties of Bp-LAAO, a new l-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Biochimie.** v. 91, p. 490-501, 2009.

RODRIGUES, R. S.; IZIDORO, L. F. M.; TEIXEIRA, S. S.; SILVEIRA, L. B.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; GIGLIO, J. R.; FULY, A. L.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A₂ from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon.** v. 50, p. 153-165, 2007.

RODRIGUES, V. M.; MARCUSSI, S.; CAMBRAIA, R. S.; ARAÚJO, A. L.; MALTA-NETO, N. R.; HAMAGUCHI, A.; FERRO, E. A. V.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R.; SOARES, A. M. Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipase A₂ from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom. **Toxicon.** v. 44, p. 305-314, 2004.

RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; FRANCESCHI, A. M.; RUCAVADO, A.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Pathological alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Biochimie.** v. 83, p. 471-479, 2001.

RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; GUERRA-SÁ, R.; RODRIGUES, V.; FONTES, M.R.; GIGLIO, J.R. Structural and functional characterization of neuwiedase, a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 15, p. 213-224, 2000.

RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; MANCIN, A. C.; FONTES, M. R. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R. Geographic variations in the

composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venoms: biochemical characterization and biological activity. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 121, p. 215-222, 1998.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning - A Laboratory Manual**, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2 ed. 1989, p. 1 – 25.

SAMEL, M.; VIJA, H.; RÖNNHOLM, G.; SIIGUR, J.; KALKKINEN, N.; SIIGUR, 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.

SCHMIDT, H. A.; STRIMMER, K.; VINGRON, M.; VON HAESELER, A. TREEPUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing. **Bioinformatics**. v. 18, p. 502-504, 2002.

SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteases: sequence homology vs. Substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**. v. 45, p. 1115-1132, 2005.

SHASHIDHARAMURTHY, R.; JAGADEESHA, D.K.; GIRISH, K.S., KEMPARAJU, K. Variations in biochemical and pharmacological properties of Indian cobra (*Naja naja naja*) venom due to geographical distribution. **Mol. Cell. Biochem.** v. 229, p. 93-101, 2002.

SILVA, V.X. Revisão sistemática do complexo (Serpentes, Viperidae, Crotalinae). **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de São Paulo, 134pp. 2000.

SOARES, A. M.; GUERRA-SÁ, R.; BORJA-OLIVEIRA, C.R.; RODRIGUES,V.M.; L. RODRIGUES-SIMIONI, FONTES, M.R.M.; GIGLIO, J.R. Structural and

functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipaseA2 homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 378, p. 201–209, 2000.

STÁBELI, R.G.; MARCUSSI, S.; CARLOS, G.B.; PIETRO, R.C.L.R.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; GIGLIO, J.R.; OLIVEIRA, E.B.; SOARES, A.M. Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom, **Bioorg. Med. Chem.** v. 12, p. 2881–2886, 2004.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol. Biol. Evol.** v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TEMPONE, A.G.; ANDRADE JR, H.F.; SPENCER, P.J.; LOURENÇO, C.O.; ROGERO, J.R.; NASCIMENTO, N. *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.

TORRES, A. F. C.; DANTAS, R. T.; TOYAMA, M. H.; FILHO, E. D.; ZARA, F. J.; QUEIROZ, M. G. R.; NOGUEIRA, N. A. P.; OLIVEIRA, M. R.; TOYAMA, D. O.; MONTEIRO, H. S. A.; MARTINS, M. V. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: Phospholipase A₂ and I-amino acid oxidase. **Toxicon**. v. 55, p. 795-804, 2010.

TOYAMA, M.H.; TOYAMA, D.O.; PASSERO, L.F.D.; LAURENTI, M.D.; CORBETT, C.E.; TOMOKANE, T.Y.; FONSECA, F.V.; ANTUNES, E.; JOAZEIRO, P.P.; BERIAM, L.O.S.; MARTINS, M.A.C.; MONTEIRO, H.S.A.; FONTELES, M.C. Isolation of a new I-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom, **Toxicon**. v. 47, p. 47–57, 2006.

UDBY, L. ; COWLAND, J.B.; JOHNSEN, A.H.; SORENSEN, O.E.; BORREGAARD, N.; KJELDSEN, L. 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.

VALE, L. H.; MENDES, M. M.; HAMAGUCHI, A.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I. Neutralization of pharmacological and toxic activities of *Bothrops* snake venoms by *Schizolobium parahyba* (Fabaceae) aqueous extract and its fractions. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.** v. 103, p. 104-107, 2008.

WAGSTAFF, S. C. & HARRISON, R. A. Venom gland EST analysis of the saw-scaled viper, *Echis ocelatus*, reveals novel $\alpha_9\beta_1$ integrin-binding motifs in venom metaloproteases and a new group of putative toxins, rennin-like aspartic proteases. **GENE.** v. 377, p. 21-32, 2006.

XU, Q.; WU, X.F.; XIA, Q.C.; WANG, K.Y. Cloning of a galactose-binding lectin from the venom of *Trimeresurus stejnegeri*. **Biochem. J.** v. 341, p. 733–737. 1999.

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

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

YAMAZAKI, Y.; TAKANI, K.; ATODA, H.; MORITA, T. Snake venom vascular endothelial growth factors (VEGFs) exhibit potent activity through their specific recognition of KDR (VEGF Receptor 2). **J. Biol. Chem.** v. 278, p. 51985-51988, 2003.

ZAMUNER, S.R.; CRUZ-HOFING, M.A.; CORRADO, A.P.; HYSLOP, S.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian *Bothrops* venoms and their neutralization by commercial antivenom. **Toxicon**. v. 44, p. 259–271, 2004.