



Universidade Federal de Uberlândia  
Instituto de Genética e Bioquímica  
Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

**Transcriptoma da Glândula de Peçonha de  
*Crotalus durissus collilineatus*: Análise do Perfil  
de Expressão Gênica**

*Johara Boldrini França*

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Inês Homsí Brandeburgo

Uberlândia-MG

2008



Universidade Federal de Uberlândia  
Instituto de Genética e Bioquímica  
Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

**Transcriptoma da Glândula de Peçonha de  
*Crotalus durissus collilineatus*: Análise do Perfil  
de Expressão Gênica**

*Johara Boldrini França*

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Inês Homsí Brandeburgo

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Genética e Bioquímica (Área Bioquímica).

Uberlândia-MG

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

---

B687t Boldrini-França, Johara, 1983-  
Transcriptoma da glândula de peçonha de *Crotalus durissus collilineatus* : análise do perfil de expressão gênica / Johara Boldrini-França. - 2008.  
66 f. : il.

Orientador: Maria Inês Homsí Brandeburgo.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.  
Inclui bibliografia.

I. Biologia molecular - Teses. I. Brandeburgo, Maria Inês Homsí.  
II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação  
em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 577.2

---



Universidade Federal de Uberlândia  
Instituto de Genética e Bioquímica  
Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

Transcriptoma da Glândula de Peçonha de *Crotalus durissus*  
*collilineatus*. Análise do Perfil de Expressão Gênica

*Johara Boldriní França*

Comissão Examinadora:

Presidente: \_\_\_\_\_

Dr<sup>a</sup>. Maria Inês Homsí Brandeburgo

Examinadores: \_\_\_\_\_

Dr<sup>a</sup>. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo

\_\_\_\_\_  
Dr. Marcos Roberto de Mattos Fontes

Data da defesa: 27/02/2008

As sugestões da comissão examinadora e as normas PGGB para o formato da dissertação foram contempladas

\_\_\_\_\_  
Dr<sup>a</sup>. Maria Inês Homsí Brandeburgo

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

*Isaac Newton*

## *Dedicatória*

*Dedico este trabalho com todo amor aos meus Pais: Marlene Boldrini França e Gilberto França que são meu alicerce e toda minha fonte de inspiração.*

*Devo tudo que sou hoje a vocês!*

*Obrigada!*

## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder a vida. Obrigada Deus por todos os momentos bons, e principalmente pelas dificuldades que encontro no caminho, pois atribuo a estas as oportunidades de amadurecimento e aprendizado.*

*À professora Dr<sup>ca</sup>. Maria Inês Homsí Bradeburgo por ter me concedido o privilégio desta orientação e por todo o comprometimento com a qualidade deste trabalho. Obrigada por acreditar em mim e por estimular sempre meu crescimento!*

*À professora Dr<sup>ca</sup>. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila, sempre disposta a ajudar a todos e tão dedicada à formação científica e pessoal de seus alunos. Professora, pessoas como você são estrelas e sempre brilharão na vida de quem cruza seu caminho!*

*À professora Dr<sup>ca</sup>. Amélia, pela importante contribuição ao desenvolvimento das pesquisas no laboratório.*

*A professora Dr<sup>ca</sup>. Hérica Santos Lima que foi responsável por grandes realizações em nosso grupo de pesquisa, além de ser uma grande amiga para todos os momentos.*

*Ao professor Dr. Antônio Roberto Otaviano que só acrescentou ao nosso laboratório. Acrescentou em sabedoria, conhecimento, organização e alegria! Sua presença foi imprescindível para o desenvolvimento da Biologia Molecular dentre nossas linhas de pesquisa. Você é muito mais que um professor! É um amigo que vou guardar no coração para vida toda!*

*À Professora Dr<sup>ca</sup>. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo por nos ajudar no momento mais crítico deste trabalho. Obrigada por toda a compreensão!*

*Ao Professor Dr. Flávio Henrique Silva. Professor, obrigada por me conceder a oportunidade do estágio em São Carlos que tanto contribuiu para a realização deste trabalho e para meu aprendizado! Foi uma honra trabalhar com seu grupo, que é repleto de pessoas maravilhosas!*

*Ao Professor Dr. Luiz Ricardo Goulart filho, por toda a contribuição, não só a este trabalho, como a várias pesquisas do Instituto de Genética e Bioquímica.*

*À amiga Renata Santos Rodrigues, por estar em todos os momentos ao meu lado. Não tenho palavras para descrever o tanto que sua amizade é importante para mim, mas sei dizer que é para toda a vida!*

*Ao colega Fernando Fonseca por toda a ajuda prestada. Desejo-lhe todo o sucesso do mundo!*

*A colega Carmem que me recebeu de braços abertos em São Carlos!*

*As amigas Paula Cristina e Andréia. Adoro vocês!*

*Aos colegas de laboratório que se tornaram grandes amigos: Luis Henrique, Luis Fernando, Fábio Lucas e Luciana.*

*Aos colegas da genética Carlos e Flávia, pessoas brilhantes que estão sempre dispostas a compartilhar seus conhecimentos com o próximo!*

*Aos colegas Carolina, Leonardo, Mirian, Luis Carlos, Leticia, Malson, Jordano, Sâmela, Daiana e Débora.*

*Aos "antigos" do INGEB: Carla Menezes, Cristiani Baldo, Rodrigo Magrin, Marília, Cynara, Luciana (xuxu), Daiana, Daniela Beraldo e Camila Takeno.*

*Aos Amigos do Laboratório de Biologia Molecular: Fausto, Sílvia, Juliana, Ana Paula, Guilherme e Roni.*

*Aos funcionários do Instituto: Tianinha, Nenzinha, Marlene, Gerson, Cleuber e Rosa.*

*À Janaina e Rodrigo, que sempre acreditaram em mim. Amo vocês!*

*À minha irmã Jaciara e meu cunhado Geraldo que me receberam em Uberlândia com todo o carinho e dedicação. Agradeço acima de tudo por me darem sobrinhos tão lindos: Nathalia e João Mattheus.*



*À minha avó Elza que tanto contribuiu na minha criação e aprendizado!  
Obrigada pelo seu enorme carinho e amor!*

*Às “irmãs Ravasi”. Fabiana, Kátia e Karina: carregarei vocês sempre em meu coração!*

*À amiga Flávia Costa Alcova, sempre tão alegre, compreensiva e inteligente.*

*À amiga Flávia Lebre, que compartilhou os principais momentos da minha vida, tornando-os sempre especiais.*

*A todos meus amigos que tornam minha vida muito mais leve e prazerosa!*

*A CAPES e CNPq pelo apoio financeiro*

*A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.*

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Química de Proteínas e Produtos Naturais do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia sob orientação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Inês Homsí Brandeburgo.

A construção e sequenciamento da biblioteca de cDNA da glândula de *Crotalus durissus collilineatus* foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos.

Todos os capítulos deste trabalho foram redigidos de acordo com as normas da ABNT e do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica de Universidade Federal de Uberlândia (Anexo I)

# Sumário

<b>Apresentação</b> .....	1
<b>Capítulo 1. Fundamentação Teórica</b> .....	4
1.1    Fundamentação Teórica.....	5
1.1.1. Serpentes.....	5
1.1.2. Ofidismo.....	7
1.1.3. Peçonha crotálica: aspectos evolutivos, composição e variabilidade.....	8
1.1.4. Técnicas da biologia molecular e bioinformática no estudo da peçonha ofídica.....	20
1.2.    Referências Bibliográficas.....	23
<b>Capítulo 2. Transcriptoma da Glândula de peçonha de <i>Crotalus durissis collilineatus</i>:</b> <b>Análise do perfil de expressão gênica</b> .....	32
2.1. Introduction.....	36
2.2 Material and methods.....	38
2.2.1. cDNA library construction and sequencing.....	38
2.2.2. Cluster assemble and identification.....	39
2.2.3. Phylogenetic analysis.....	39
2.3. Results.....	39
2.3.1. ESTs sequencing and clusing.....	39
2.3.2. Cluster identification.....	40
2.3.3. Crotoxin.....	41
2.3.4. Proteases.....	42
2.3.5. Growth factors.....	43
2.3.6. Other toxins.....	43
2.4. Discussion.....	44
2.5. References.....	56
<b>Anexos</b> .....	63

# Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Serpente <i>Crotalus durissus collilineatus</i> .....	6
<b>Figura 2.</b> Ocorrência geográfica da serpente <i>C. d. collilineatus</i> .....	7
<b>Figura 3.</b> Pontos de clivagem de diferentes classes de fosfolipases.....	12
<b>Figura 4.</b> Modelos de ligação da crotoxina ao receptor.....	15
<b>Figura 5.</b> Esquema das diferentes classes de metaloproteases.....	18
<b>Figura 6.</b> Proporções relativas dos grupos de seqüências da biblioteca da glândula de peçonha de <i>C. d. collilineatus</i> .....	51
<b>Figura 7.</b> Seqüências deduzidas de cDNA e aminoácidos da crotoxina B de <i>C. d. collilineatus</i> .....	52
<b>Figura 8.</b> Alinhamento múltiplo e árvore filogenética da crotoxina B e seqüências homólogas.....	53
<b>Figura 9.</b> Seqüências deduzidas de cDNA e aminoácidos do fator de crescimento neural (NGF) de <i>C. d. collilineatus</i> .....	54
<b>Figura 10.</b> Alinhamento múltiplo e árvore filogenética do fator de crescimento neural (NGF) de <i>C. d. collilineatus</i> e seqüências homólogas.....	55

## Lista de Tabelas

- Tabela 1.** Estatísticas da clusterização de 488 seqüências da biblioteca de *C. d. collilineatus*.....49
- Tabela 2.** Catálogo das toxinas codificadas pelas seqüências da biblioteca de *C. d. collilinus*.....50

## Lista de Abreviações

BLAST	Ferramenta de alinhamento local básico e pesquisa (“ <i>Basic Local Alignment and Search Tool</i> ”)
CA	Crotoxina A
CB	Crotoxina B
cDNA	DNA complementar
CFU	Unidade formadora de colônia (“ <i>Colony-forming unit</i> ”)
EST	“ <i>Expressed sequence tag</i> ”
Flt-1	Tirosina quinase-1 semelhante à FMS (“ <i>FMS-like tyrosin kinase-1</i> ”)
GPIb	Glicoproteína Ib
KDa	Quilo Dalton
KDR	Receptor contendo domínio Quinase (“ <i>Kinase domain-containing receptor</i> ”)
NCBI	Centro Nacional de Informação Biotecnológica (“ <i>National Center for Biotechnology Information</i> ”)
NGF	Fator de crescimento neural (“ <i>Nerve growth factor</i> ”)
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	“ <i>Open reading frame</i> ”
PCR	Reação Polimerásica em Cadeia (“ <i>Polymerase chain reaction</i> ”)
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipases A <sub>2</sub> (E. C. 3. 1. 1. 4)
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
SVMP	Metaloproteases de peçonha de serpentes (“ <i>Snake venom metalloprotease</i> ”)
SVSP	Serinoproteases de peçonha de serpentes (“ <i>Snake venom serine protease</i> ”)
UTR	“ <i>Untranslated region</i> ”
VEGF	Fator de crescimento de endotélio vascular (“ <i>Vascular endothelial growth factor</i> ”)

---

## **APRESENTAÇÃO**

---



## Apresentação

As peçonhas de serpentes consistem em uma rica fonte de compostos farmacologicamente ativos, responsáveis por uma diversidade de alterações metabólicas na presa. 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. Tal variedade de isoformas encontradas na mesma peçonha deve-se a um processo evolutivo acelerado que envolve duplicação gênica com a subsequente geração de genes parálogos. Os estudos da variedade e do perfil de expressão de componentes presentes na peçonha de serpentes e a descoberta de novas toxinas são de grande importância na elaboração de novas drogas e tratamento do envenenamento, além de oferecerem ferramentas para análise de processos evolucionários relacionados à peçonha.

Os acidentes crotálicos são responsáveis pelo maior número de casos letais em acidentes ofídicos no Brasil. As serpentes do gênero *Crotalus* estão representadas no Brasil por uma única espécie (*Crotalus durissus*) com ampla distribuição geográfica, sendo que a subespécie *Crotalus durissus collilineatus* é encontrada nas regiões Sudeste e Centro-Oeste. Os principais efeitos fisiológicos da peçonha crotálica devem-se, basicamente, a quatro toxinas: Crotoxina, giroxina, convulxina e crotamina.

Este trabalho consiste na construção de uma biblioteca parcial da glândula da serpente *Crotalus durissus collilineatus*, tendo como principais objetivos a caracterização do padrão de expressão das toxinas e a busca por compostos menos expressos na glândula, que são dificilmente identificados por métodos tradicionais de purificação de proteínas.

A apresentação deste trabalho foi elaborada segundo as normas do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (Anexo I), e foi redigida em capítulos. O capítulo 1 consiste em uma fundamentação teórica sobre aspectos epidemiológicos dos acidentes ofídicos, composição da peçonha crotálica e ferramentas da biologia molecular no estudo da variabilidade da peçonha e o capítulo 2 apresenta a

análise do transcriptoma de glândula de *Crotalus durissus collilineatus* e o perfil de expressão das toxinas.

---

# **CAPÍTULO 1**

## Fundamentação Teórica

---

## 1.1 Fundamentação Teórica

### 1.1.1. Serpentes

As serpentes sempre representaram objetos de fascinação, mitos e medo ao longo da história da humanidade. Para alguns povos e crenças estes animais eram a personificação do mal. Por outro lado, as serpentes eram adoradas no Egito antigo, suas imagens eram usadas como adornos em coroas de imperadores romanos e representavam Asclépio, o Deus da Medicina na Grécia antiga, motivo pelo qual estão estampados nos símbolos médico e farmacêutico (Koh et al., 2006).

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 exhibe grande riqueza de espécies e conquistou uma enorme variedade de ambientes (Lee & Scanlon, 2002).

Juntamente com as tartarugas, jacarés e crocodilos, lagartos e anfisbêneas (popularmente conhecidas como cobra cega ou cobra de duas cabeças), as serpentes estão inseridas na classe Reptilia. Tal classe atualmente é dividida em quatro ordens (Mattison, 1995):

- *Crocodylia* - composta por 23 espécies. É representada por crocodilos, gaviais e jacarés;

- *Rhynchocephalia* - compreende 2 espécies representadas por Tuataras da Nova Zelândia;

- Squamata - consiste na maior ordem e compreende aproximadamente 7.600 espécies entre serpentes e lagartos;

- Testudinata - aproximadamente 300 espécies entre tartarugas, cágados e jabutis.

Estima-se que existam hoje cerca de 2930 espécies de serpentes em todo o planeta, distribuídas em 465 gêneros e 19 famílias, sendo que no Brasil, somente duas famílias são consideradas peçonhentas (famílias *Elapidae* e *Viperidae*), pois

possuem glândulas especializadas na produção de toxinas e aparelho inoculador de peçonha (Cardoso, 2003).

Esta classificação, porém, possui 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).

No Brasil, a família *Viperidae* compreende três gêneros: *Crotalus*, representado pelas serpentes conhecidas popularmente por cascavéis; *Bothrops*, correspondendo às jararacas e *Lachesis*, correspondendo às surucucus.

O gênero *Crotalus* engloba 26 espécies de serpentes de hábitos terrestres, robustas e pouco ágeis, sendo que sua característica mais destacada é a presença de guizo ou chocalho na extremidade da cauda. Este gênero está



**Figura 1.** Serpente *Crotalus durissus collilineatus*. Fonte: <http://big-snake.org>, acesso em 28/12/2007.

representado no Brasil por uma única espécie, *Crotalus durissus*, com ampla distribuição geográfica, habitando os cerrados do Brasil central, as regiões áridas e semi-áridas do nordeste e os campos e áreas abertas do Sul, Sudeste e Norte.

São reconhecidas cinco formas geográficas dessa espécie, três das quais com ampla distribuição: a forma do sul, denominada *Crotalus durissus terrificus*; a forma nordestina representada pela *Crotalus durissus cascavella* e *Crotalus durissus collilineatus* (Fig. 1) encontrada nos estados de São Paulo, Mato grosso, Minas Gerais, Goiás e Distrito Federal (Fig. 2) (Cardoso, 2003).



**Figura 2.** Ocorrência geográfica da serpente *Crotalus durissus collilineatus*. Fonte: [www.toxinology.com](http://www.toxinology.com), acesso em 28/12/2007

### 1.1.2 Ofidismo

O ofidismo representa um problema de saúde nacional desde o Brasil colônia. Nesta época os acidentes causados por picadas de serpentes eram considerados como uma das grandes pragas existentes, sendo responsáveis por um número significativo de óbitos. Somente no final do século XIX, o desenvolvimento da Microbiologia e da Imunologia impulsionou pesquisas que culminaram com o desenvolvimento de soros hiperimunes, resultando em uma diminuição da letalidade causada por este tipo de acidente.

No Brasil, o primeiro soro anti-ofídico se deu com a criação do Instituto Soroterápico do Estado de São Paulo em 1901, atual Instituto Butantan. Pela primeira vez, Vital Brazil demonstrou que os soros produzidos contra cascavéis e jararacas apresentavam propriedades distintas, comprovando a especificidade dos soros, e que estes estavam relacionados com o gênero da serpente envolvida no acidente (Ministério da Saúde, 2007).

A OMS (Organização Mundial de Saúde) calcula que ocorram no mundo entre 1.250.000 e 1.665.000 acidentes envolvendo serpentes peçonhentas por ano, com 30.000 a 40.000 mortes. No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, ocorrem entre 19 mil a 22 mil acidentes ofídicos anualmente, com índice

de letalidade de 0.4%. A maioria destes acidentes deve-se a serpentes do gênero *Bothrops* e *Crotalus*, sendo raros os causados por *Lachesis* e *Micrurus* (Pinho & Pereira, 2001). Os acidentes responsáveis pelo maior número de casos fatais são os relacionados a serpentes do gênero *Crotalus*, seguido dos acidentes com serpentes do gênero *Lachesis*, *Micrurus* e *Bothrops* respectivamente. A maioria dos acidentes é registrada nas regiões Sudeste e Sul, locais que contam com eficiente sistema de saúde e de informação. Acredita-se que haja subnotificações nas regiões Norte e Nordeste, tendo em vista as dificuldades de acesso ao serviço de saúde. (Cardoso, 2003).

A epidemiologia dos acidentes ofídicos aponta para um perfil de vítimas preferencialmente do sexo masculino, trabalhadores rurais, na faixa etária de 15 a 49 anos, atingindo, sobretudo os membros inferiores. Os acidentes também apresentam sazonalidade marcante, ocorrendo com maior frequência no início e no final do ano (Bochner & Struchiner, 2003).

### **1.1.3 Peçonha Crotálica: Aspectos Evolutivos, Composição e Variabilidade**

A glândula responsável pela produção de peçonha nas serpentes provavelmente evoluiu de glândulas labiais encontradas em lagartos e anfisbênias. Porém, no primeiro grupo de animais, tais glândulas são encontradas somente na porção mandibular, diferentemente das anfisbênias que possuem glândulas tanto mandibulares quanto maxilares, sendo que algumas destas glândulas possuem aberturas próximas aos dentes, podendo ser consideradas como as precursoras das glândulas de peçonha altamente especializada nas serpentes. Em razão destas observações, alguns taxonomistas classificam as anfisbênias como os animais mais próximos evolutivamente das serpentes, enquanto outros defendem algum tipo de evolução paralela.

A evolução das glândulas de peçonha levou ao aparecimento de substâncias biologicamente ativas que, desde o início, conferiu vantagens às serpentes na captura e digestão de presas de grande porte, que provavelmente eram subjugadas por processos mecânicos antes do aparecimento deste aparato. As primeiras substâncias ativas eram provavelmente enzimas que, juntamente com

algumas funções digestivas, tinham a função de enfraquecer a presa, tornando a captura mais fácil e segura (Kochva, 1986).

O aparelho inoculador de peçonha nas serpentes da família *Viperidae* é composto pelas glândulas, ligadas por um ducto às presas maxilares caniculadas. A dentição é denominada solenóglifa e caracterizada pela presença de grandes presas curvadas para dentro. Já as serpentes da família *Elapidae* possuem dentição proteróglifas, por apresentar um par de pequenas presas sulcadas e fixadas na porção anterior da boca (Jackson, 2007).

A peçonha consiste em uma complexa mistura de proteínas, peptídeos, lipídios, polissacarídeos e substâncias químicas inorgânicas. Polipeptídeos e proteínas estão presentes em maiores proporções, chegando a compor de 90-95% do seu peso seco. Esta combinação confere um arranjo eficiente de propriedades tóxicas ao veneno capaz de desencadear severas desordens metabólicas na presa. Dentre estes efeitos, pode-se destacar neurotoxicidade, cardiotoxicidade, edematogenicidade, miotoxicidade, ações coagulantes, hemostáticas, hemorrágicas, nefrotóxicas e hepatóxicas (Chippaux et al., 1991; Gutierrez & Lomonte, 1995; Markland, 1998). Tal diversidade de atividades encontradas na peçonha de uma mesma espécie deve-se a um processo evolucionário acelerado, envolvendo, muitas vezes, duplicação gênica, e a subsequente geração de genes parálogos (Junqueira-de-Azevedo & Ho, 2002).

A peçonha crotálica é considerada uma das peçonhas mais tóxica entre as serpentes brasileira, com relatos de letalidade de até 72% em casos não tratados. Esta alta toxicidade deve-se a presença de diversas toxinas como: crotoxina, crotamina, giroxina, convulxina, serinoproteases, entre outras (Oxima-Franco et al., 1999).

A crotoxina consiste no mais abundante componente tóxico da peçonha crotálica, representando até 70% do total de proteínas e é a principal responsável pelo efeito nefrotóxico (Amora et al., 2006) e parada respiratória de origem periférica (Hawgood, 1990) nas presas acometidas. A crotoxina de *Crotalus durissus terrificus* foi a primeira toxina de peçonha animal a ser isolada e cristalizada (Slotta & Fraenkel-Conrat, 1938 apud Aird et al., 1986), e foi caracterizada como uma potente neurotoxina pré-sináptica, acabando com o dogma de que somente as serpentes das famílias *Elapidae* e *Hydrophiidae*



possuíam componentes neurotóxicos (Aird et al., 1985). Somente após 18 anos, Fraenkel-Conrat & Singer (1956) determinaram a estrutura heterodimérica desta toxina, sendo que a primeira seqüência parcial de suas subunidades só foi elucidada mais de 40 anos após sua descoberta (Fraenkel-Conrat et al., 1980).

A estrutura da crotoxina compreende duas subunidades polipeptídicas ligadas não-covalentemente: uma fosfolipase  $A_2$  básica e tóxica denominada crotoxina B (CB) e um componente ácido, não tóxico e livre de atividade enzimática, denominado crotapotina ou crotoxina A (CA) (Bon et al., 1989).

A crotapotina consiste em três cadeias polipeptídicas dissimilares interconectadas por sete pontes dissulfeto. Tais subunidades são produtos de clivagens pós-traducionais de uma única molécula precursora, homóloga à fosfolipase  $A_2$ . As três cadeias formadoras da crotapotina são denominadas cadeias A, B e C, e possuem alta similaridade com as fosfolipases  $A_2$  de peçonhas animais (Bouchier et al., 1991; Faure et al., 1991).

Aird e colaboradores (1985) sequenciaram pela primeira vez as cadeias da crotapotina de *Crotalus durissus terrificus*. Este estudo demonstrou que a cadeia A apresenta tanto o segmento Tyr-Gly-Cys-Tyr-Cys-Gly-(Trp)-Gly-Gly (posições 24 a 32), que é comum a todas fosfolipases  $A_2$  de peçonha de serpentes, quanto o segmento Asp-Arg-Cys-Cys-Phe-(Val)-His-Asp-Cys-Cys-Tyr-(Gly) (posições 41 a 52), invariante nas fosfolipases  $A_2$  de serpentes crotálicas e viperídeas, que contém o sítio ativo destas enzimas e o resíduo Asp-48, envolvido na ligação do íon  $Ca^{2+}$ . A homologia da cadeia B com segmentos de fosfolipase  $A_2$  também é alta, sendo que a posição de cinco cisteínas é conservada nestas moléculas, duas das quais se encontram no segmento altamente conservado Cys-Asp-Lys-Ala-Ala-Ala-Ile-Cys-Phe-Arg (posições 90 a 99). A Cadeia C é o menor dos três polipeptídeos, compreendendo apenas 14 resíduos de aminoácidos. Este segmento possui homologia com a extremidade carboxi-terminal das fosfolipases  $A_2$  de serpentes crotálicas e viperídeas, mantendo duas cisteínas correspondentes às posições 118 e 125 da enzima.

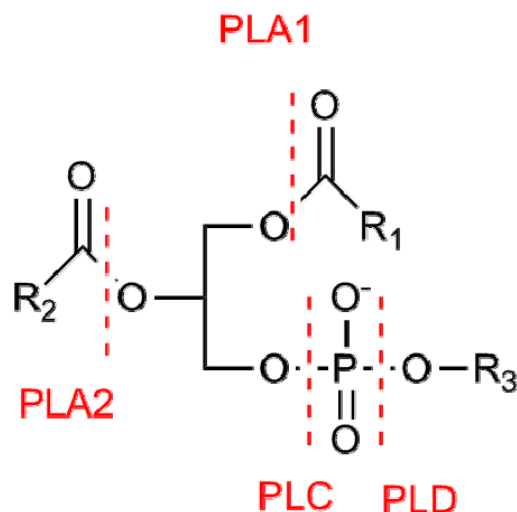
A molécula precursora da crotapotina retém todos resíduos de aminoácidos envolvidos na ligação do substrato e no mecanismo catalítico da fosfolipase  $A_2$ , com exceção do resíduo de metionina na posição 9. É interessante observar que a região correspondente ao sítio catalítico é preservada após o processo de

maturação da molécula. Em contrapartida, a hélice presente na região N-terminal do precursor é ausente na crotapotina madura, mais especificamente os resíduos Leu-2, Phe-5, Met-9, e Tyr-22 responsáveis pela interação hidrofóbica com a cadeia acil dos fosfolípidios, o que explica a ausência de atividade catalítica na subunidade ácida da crotoxina (Bouchier et al., 1991).

Aird e colaboradores (1985) ainda demonstraram que as três subunidades da crotapotina, quando juntas, apresentam maior similaridade com outras fosfolipases  $A_2$  homodiméricas e não-tóxicas, do que com a subunidade básica desta toxina. Estes resultados sugerem que as subunidades ácida e básica foram originadas independentemente de um ancestral comum não-tóxico.

Estas moléculas apresentam alta homologia na região 5'-UTR, o que pode indicar também, que as subunidades da crotoxina resultam de um "splicing" alternativo de um único gene. As regiões 5'-UTR dos componentes ácido e básico são relativamente extensas, compreendendo 198 pares de bases, sugerindo que tais regiões podem exercer função regulatória na co-síntese destes componentes, ou podem estar relacionadas à alta expressão da crotoxina na peçonha crotálica (Bouchier et al., 1991).

A fosfolipase  $A_2$  básica da crotoxina consiste em uma única cadeia polipeptídica de 122 resíduos de aminoácidos, estabilizada por sete pontes dissulfeto e possui comportamento típico de fosfolipase  $A_2$ , que hidrolisa 3-sn-fosfolípidios especificamente na ligação 2-acil éster, liberando ácidos graxos livres e lisofosfatídeos (Fig. 3) (Waite, 1987). As fosfolipases  $A_2$  são abundantemente secretadas no pâncreas de mamíferos, peçonhas animais entre outros tecidos e foram primeiramente identificadas como enzimas digestivas.



**Figura 3.** Pontos de clivagem das diferentes classes de fosfolipases na molécula de fosfolípido. As fosfolipases que possuem tanto atividade de PLA<sub>2</sub> quanto de PLA<sub>1</sub> são denominadas PLB. Fonte: <http://en.wikipedia.org>, acesso em 30/12/2007.

De acordo com a estrutura primária, as fosfolipases A<sub>2</sub>s secretórias foram classificadas em 14 grupos (I a XIV) (Balsinde et al., 2002). As fosfolipases A<sub>2</sub> de peçonha de serpentes estão todas agrupadas nas classes I e II, e são enzimas relativamente pequenas, compreendendo de 119 a 143 resíduos de aminoácidos com massa molecular variando de 13.000 a 18.000 Da. As fosfolipases A<sub>2</sub> do grupo I são encontradas nas serpentes das famílias *Hydrophiidae* e *Elapidae*, e o grupo II é representado por fosfolipases A<sub>2</sub> não pancreáticas de mamíferos e de peçonhas de serpentes da família *Viperidae* (Choumet et al., 1993; Ward et al., 2001).

A crotapotina, quando associada à fosfolipase A<sub>2</sub> da crotoxina, aumenta em cerca de 10 vezes a letalidade desta enzima (Chang & Su, 1981) ao mesmo tempo em que inibe sua atividade enzimática. Os mecanismos pelos quais a crotapotina inibe a atividade fosfolipásica do componente B da crotoxina ainda não foram completamente elucidados, porém, sabe-se que a subunidade ácida possui função de chaperona, assegurando o endereçamento da fosfolipase A<sub>2</sub> básica à junção pré-sináptica por prevenir ligações inespecíficas desta enzima.

Na formação do complexo crotoxina, o sítio ativo do componente B permanece livre e acessível, mantendo sua função catalítica (Canziane et al., 1982). Porém, quando associada à crotapotina, esta molécula interage muito mais

seletivamente com fosfolipídios negativamente carregados, diferentemente de quando este componente age isoladamente interagindo com todos os tipos de fosfolipídios e, conseqüentemente, com diversos tipos de membranas biológicas. Isso explica o fato de o complexo crotoxina não apresentar atividades farmacológicas típicas das fosfolipases  $A_2$ , como indução da agregação plaquetária e inibição da coagulação sanguínea, pois os fosfolipídios negativamente carregados estão localizados preferencialmente na face interna da membrana de eritrócitos e plaquetas, impossibilitando a interação com a crotoxina (Radvanyi et al., 1989).

A fosfolipase  $A_2$  da crotoxina possui ao menos três diferentes locais de ligação: junção motora, músculo e sítios não-específicos. A razão da alta atividade miotóxica, em detrimento da ação neurotóxica da fosfolipase  $A_2$  dissociada da crotapotina, deve-se à maior exposição do sarcolema em relação à região terminal do nervo motor, que compreende somente uma pequena porção dos sítios de ligação encontrados em condições fisiológicas (Chang & Su, 1981).

Chang & Su (1978), realizaram estudos de estabilidade da molécula da crotoxina e CB isoladamente. Neste estudo, observou-se que a fosfolipase  $A_2$  da crotoxina perdia rapidamente sua atividade pré-sináptica em solução salina fisiológica, a  $37^\circ\text{C}$  e 95% de  $\text{O}_2$ , devido a sua instabilidade e ligação inespecífica, sendo que essa instabilidade era potencializada na presença de tecido muscular estriado. Para atingir a porção terminal do nervo motor, a toxina percorre uma porção muscular, onde geralmente é inoculada, ou atinge a corrente sanguínea. Desta forma, a crotapotina exerce uma função protetora e estabilizadora da molécula de CB, assegurando que esta consiga atingir a junção motora e realizar sua atividade tóxica (Chang & Su, 1981).

A crotoxina existe na peçonha em diversas isoformas, resultantes da combinação ao acaso de variantes de cada subunidade. Estas isoformas são agrupadas em duas classes. A classe I consiste nas isoformas mais tóxicas e menos enzimaticamente ativas, e a classe II é caracterizada por toxinas de menor toxicidade, porém mais ativas enzimaticamente. Faure e colaboradores (1993) analisaram 16 diferentes complexos da crotoxina e concluíram que a estabilidade do complexo está diretamente relacionada à toxicidade da molécula. Os complexos que apresentaram maior constante de afin

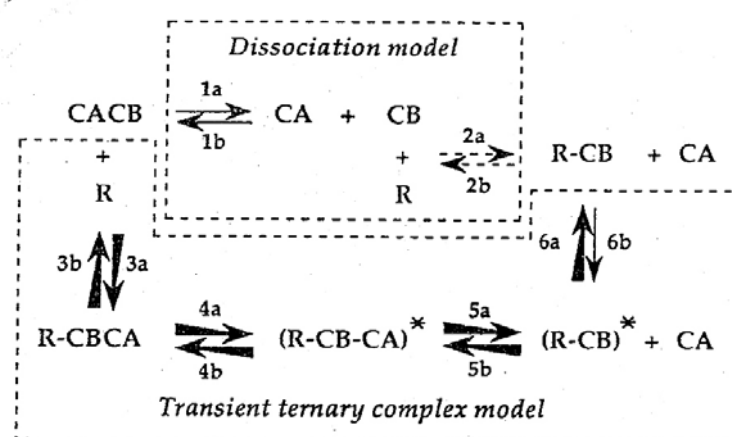
idade entre as subunidades A e B e menores constantes de dissociação correspondiam aos complexos mais tóxicos e letais.

A crotoxina é classificada dentro das  $\beta$ -neurotoxinas, juntamente com outras neurotoxinas de peçonha de serpentes como agkistrodotoxina,  $\beta$ -bulgarotoxina, notexina, ammodytoxina A, vipoxina, entre outras, diferindo entre si em estrutura e especificidade de ligação. Todas as  $\beta$ -neurotoxinas exibem o mesmo mecanismo de modulação trifásico de liberação de neurotransmissores em preparação neuromuscular, que corresponde à depressão sucessiva, facilitação e bloqueio final (Choumet, et al., 1993).

A estrutura das  $\beta$ -neurotoxinas e seus efeitos na sinapse neuromuscular têm sido estudados extensivamente. No entanto, o mecanismo de reconhecimento de seus aceptores neurais ainda permanece pouco explorado. Somente para  $\beta$ -bungarotoxina, foi determinado o sítio exato de ligação na membrana neural, que consiste em uma proteína multimérica com propriedades de canal de  $K^+$  (Dèlot & Bon, 1993). Experimentos eletrofisiológicos mostram que a crotoxina pode interagir também com canais de  $K^+$ , apesar de muitos experimentos indicarem que crotoxina e  $\beta$ -bungarotoxina ligam-se a diferentes aceptores (Dèlot & Bon, 1993; Faure et al., 1993).

Sabe-se que somente a subunidade B da crotoxina liga-se ao receptor na junção motora, enquanto a subunidade A é liberada, permanecendo em solução. Porém ainda não foi esclarecido se a dissociação das subunidades desta toxina ocorre antes ou após a ligação ao sítio. Dèlot & Bon (1993) propuseram dois diferentes modelos de ligação: o modelo dissociativo e do complexo ternário transitório (Fig. 4). Porém, algumas evidências como a rápida ligação da toxina ao sítio e o fato de a subunidade B não ser capaz de competir com a crotoxina indicam que a primeira hipótese consiste em um evento improvável.

Lennon & Kaiser (1990) isolaram pela primeira vez a crotoxina da peçonha de *C. d. collilineatus* e determinaram alta similaridade desta toxina quando comparada com a crotoxina de *C. d. terrificus*. Posteriormente Ponce-Soto e colaboradores (2002) isolaram e caracterizaram parcialmente duas isoformas da PLA<sub>2</sub> e quatro isoformas de CA da crotoxina desta peçonha, e em 2007, Ponce-Soto e colaboradores isolaram mais uma isoforma da PLA<sub>2</sub> da crotoxina de *C. d. collilineatus*.



**Figura 4.** Modelos dissociativo e do complexo ternário transitório. Os dois possíveis mecanismos de ligação da crotoxina ao seu receptor na junção motora. Modelo dissociativo: CA e CB se dissociam antes da ligação de CB ao receptor. Modelo do complexo ternário transitório: A crotoxina liga ao receptor antes da dissociação de CA. R corresponde ao receptor de membrana da crotoxina, setas tracejadas correspondem a vias não observadas durante o experimento, setas finas e sólidas indicam eventos lentos e setas robustas indicam reações rápidas. (\*) forma estrutural intermediária do complexo ternário (Délot & Bon, 1993).

Além da crotoxina, Gonçalves & Ponson (1947) isolaram da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* uma toxina extremamente básica, capaz de gerar espasmos e paralisia nas patas traseiras de camundongos, denominada crotamina. A crotamina é composta por 42 resíduos de aminoácidos, e contém 11 resíduos básicos (9 lisinas e 2 argininas), além de seis cisteínas envolvidas em três pontes dissulfeto (Kerkis et al., 2004). Esta toxina apresenta alta identidade com toxinas indutoras de mionecrose como peptídeo C (Maeda et al., 1978), miotoxinas I e II (Bieber et al., 1987) e miotoxina a (Fox et al., 1979).

Estudos farmacológicos evidenciaram que a crotamina induz a despolarização de células de músculo esquelético e o influxo de íons  $Na^+$ , provavelmente por agir diretamente nos canais de  $Na^+$  da membrana plasmática destas células (Oguiura et al., 2005). Outras ações farmacológicas relacionadas a esta toxina incluem o aumento da liberação basal de acetilcolina e dopamina no tecido estriado de ratos (Camillo et al., 2001) e o aumento da secreção de insulina nas ilhotas pancreáticas (Toyama et al., 2000).

A primeira seqüência completa da crotamina foi obtida por Smith & Shimidt (1990), e este estudo demonstrou que o RNAm desta enzima codifica uma molécula precursora da crotoxina de 65 resíduos de aminoácidos, que compreende um peptídeo sinal de 22 resíduos de aminoácidos, a proteína madura de 42 resíduos de aminoácidos e uma extremidade carboxi-terminal composta por resíduos de lisina, que é eliminada por modificações pós-traducionais da molécula. O gene que codifica a crotamina, denominado *Crt-p1*, foi mapeado na porção final do braço longo do cromossomo 2. As serpentes crotálicas são classificadas como crotamina-positivas ou crotamina-negativas, de acordo com a presença ou ausência deste gene respectivamente (Oguiura et al., 2005). Porém, Rádis-Baptista e colaboradores (2004) identificaram um gene parálogo da crotamina (*Crt-p2*) encontrado tanto nas serpentes crotamina-positivas quanto negativas, que codifica uma toxina que assume conformação de  $\beta$ -defensina, assim como a crotamina.

As enzimas semelhantes à trombina (“trombin-like”) de peçonhas de serpentes (SVSP), pertencem a uma classe das serinoproteases que causa coagulação sanguínea *in vitro*, um efeito comumente encontrado nas peçonhas de diversas serpentes das famílias *Viperidae* e *Colubridae*. Porém, *in vivo*, as “trombin-like” tornam o sangue incoagulável por clivarem os fibrinopeptídeos A e/ou B do fibrinogênio circulante, depletando os níveis de fibrinogênio plasmático (Serrano & Maroum, 2005).

As serinoproteases “trombin-like” de peçonhas de serpentes são geralmente moléculas de cadeia única, com exceção da toxina de *Cerastes cerastes*, que consiste em duas cadeias idênticas ligadas por pontes dissulfeto. Algumas são glicoproteínas, possuem de 26 a 33 KDa e compartilham um alto grau de similaridade entre si (cerca de 67%), porém estas enzimas apresentam menos de 40% de homologia com a trombina humana (Kini, 2005).

A giroxina consiste em uma enzima semelhante à trombina que, quando injetada em camundongos por via intravenosa ou intracerebroventricular, é capaz de provocar episódios temporários de rotação do animal ao redor de seu eixo longitudinal (Alexander et al., 1988). Este efeito é denominado síndrome da giroxina e foi primeiramente descrito por Barrio (1961). Porém, somente em 1975, Cohn & Cohn introduziram este conceito na neurociência. Outros peptídeos como

arginina-vasopressina (Kruse et al., 1977) e endotelina-3 (Kannan et al., 1994) também são capazes de induzir este efeito.

O mecanismo pelo qual a giroxina induz esta síndrome neurológica ainda não foi elucidado, porém pode ser atribuída a lesões no labirinto ou outros efeitos indiretos no sistema nervoso central, relacionados à atividade enzimática desta toxina (Camilo et al., 2001).

Lectinas são proteínas ligantes de carboidrato encontradas em uma grande variedade de organismos, e apresentam função de reconhecimento de moléculas em interações célula-célula e célula-matriz. Baseado na estrutura primária destas moléculas, as lectinas foram divididas em dois grupos principais: As lectinas dependentes de  $\text{Ca}^+$ , denominadas lectinas tipo-C, e as metal-independentes, ligantes de  $\beta$ -galactosidase, denominadas galectinas (Lu et al., 2005).

As proteínas semelhantes à lectinas tipo-C de peçonhas de serpente desempenham diversos efeitos biológicos como atividade anticoagulante e ativação da agregação plaquetária, e, diferentemente das lectinas tipo-C verdadeiras, não desempenham atividade hemoaglutinante (Morita, 2005).

Convulxina, uma proteína semelhante à lectina tipo-C isolada de *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavela* e *Crotalus durissus collilineatus*, consiste em um potente ativador plaquetário. É formada por duas cadeias polipeptídicas ( $\text{Cvx}\alpha$  e  $\text{Cvx}\beta$ ) covalentemente associadas em uma estrutura trimérica  $(\alpha\beta)_3$ . A indução plaquetária provocada por esta toxina consiste em uma reação dependente de  $\text{Ca}^+$ , iniciada pela ligação da convulxina à glicoproteína Ib (GPIb) (Polgar et al., 1997; Jandrot-Perrus, 1997, Kanaji et al., 2003).

Leduc e Bon (1998), clonaram e sequenciaram as duas cadeias da convulxina de *Crotalus durissus terrificus*. Neste estudo, observou-se uma alta similaridade entre as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ , com uma média de porcentagem de identidade de 74%. O sequenciamento das subunidades resultou em cadeias compreendendo 158 e 148 resíduos de aminoácidos para  $\text{Cvx}\alpha$  e  $\text{Cvx}\beta$ , respectivamente e um peptídeo sinal de 23 resíduos de aminoácidos idênticos para as duas subunidades. Toyama e colaboradores (2001) isolaram e caracterizaram uma proteína semelhante à convulxina da peçonha de *C. d. collilineatus* com alta similaridade em relação à convulxina de *C. d. terrificus*.

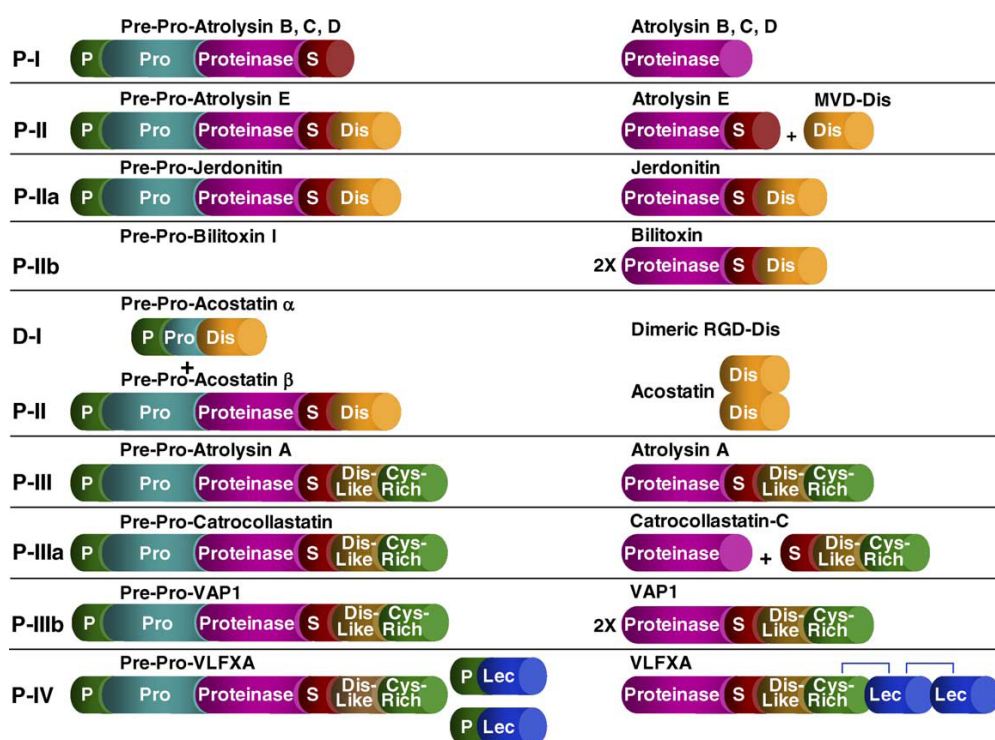


As metaloproteases de peçonhas de serpentes (SVMP) são bastante estudadas para as peçonhas de serpentes crotálicas norte-americanas, porém, pouco se conhece a respeito da presença e ação destas enzimas na peçonha de *Crotalus durissus*. As metaloproteases dependentes de zinco (metzincinas) são as responsáveis pela forte hemorragia característica de acidentes envolvendo a serpente norte-americana *Crotalus atrox*. A clonagem e sequenciamento de toxinas hemorrágicas (atrolisinas) da serpente de *Crotalus atrox*, entre outras serpentes crotálicas, indicam que as metaloproteases de peçonhas ofídicas são sintetizadas na forma de um precursor multidomínio. As metaloproteinases da classe PI possuem domínio pré, pro e proteinase, enquanto as formas maiores desta enzima (Classe PII, PIII e PIV) apresentam de um a três domínios carboxi adicionais (Shimokawa et al., 1996).

As SVMP são divididas em quatro classes baseadas nas diferenças estruturais destas moléculas. A classe PI compreende SVMPs contendo somente o domínio metaloprotease; a classe PII é representada por enzimas que apresentam, além do domínio metaloprotease, um domínio desintegrina; a classe PIII por SVMPs que apresentam, além dos domínios anteriormente citados, um domínio rico em cisteína e a classe PIV apresenta estrutura de SVMPs da classe PIII, com um domínio adicional semelhante à lectina (Fig. 5) (Fox & Serrano, 2005). Análises do sequenciamento do cDNA das SVMPs indicam que estas toxinas são sintetizadas na forma de um precursor latente pro-proteinase, que é posteriormente processado resultando em uma metaloprotease ativa (Shimokawa et al, 1997; Hite et al, 1992).

Fox & Serrano (2005) propuseram subclassificações para as metaloproteases da classe PII e PIII que refletem o potencial de processamento proteolítico, assim como a formação de estruturas diméricas. As enzimas da classe PII são divididas em três subclasses. A primeira subclasse compreende três toxinas, Bilitoxina-1 (PIIb), Agkistina e Jerdonitina (PIIa) que, aparentemente, não apresentam a dissociação dos domínios desintegrina e metaloprotease, e possuem duas cisteínas nas posições 222 e 241, as quais não são encontradas nas demais metaloproteases da classe PII. O segundo grupo compreende as enzimas Controtrostatina, Acostatina-B e Lebetase caracterizadas por não apresentarem cisteínas nas posições 233 e 235. A terceira subclasse é

representada pelas enzimas Trigramina, Flavoridina, TJM-1 e HR2a que apresentam uma cisteína nas posições 168, e não apresentam este aminoácido na posição 164. Além destas subclasses, já foram identificados cDNAs que codificam somente o domínio desintegrina, como por exemplo a desintegrina dimérica Acostatina (Francischetti et al, 2004). Já a classificação das enzimas da classe PIII apresenta duas subdivisões. As metaloproteases da classe PIIIa (Jararagina, Bothropasina, Acurhagina e Catrocolastatina) apresentam uma cisteína na posição 195 e são caracterizadas por sofrer proteólise durante a secreção, resultando em um produto biologicamente ativo formado pelos domínios semelhante a desintegrina e rico em cisteína. A subclasse PIIIb é representada pelas enzimas VAP1 e HV1 que apresentam conformação de dímero em sua forma nativa. Além disso, as enzimas desta subclasse apresentam uma cisteína na posição 181 (Masuda et al, 2001).



**Figura 5.** Esquema das diferentes classes de metaloproteases (Fox e Serrano, 2005). P (domínio pré); Pro (domínio pro); Proteinase (domínio metaloprotease); S (domínio espaçador); Dis (domínio desintegrina); Dis-like (domínio semelhante à desintegrina); Cys-rich (domínio rico em cisteína); Lec (domínio semelhante à lectina).

As metaloproteases são as principais responsáveis pela intensa ação hemorrágica observada na peçonha de muitas serpentes da família *Viperidae*, porém nem todas SVMPs são classificadas como hemorrágicas. As metaloproteases de peçonha de serpentes da classe PIII possuem a mais potente atividade hemorrágica, em contraste das enzimas da classe PI, que em sua maioria não induzem hemorragias ou apresentam atividade fraca em relação às enzimas da classe PIII. O mecanismo da ação hemorrágica dessas toxinas tem sido investigado em vários sentidos, e há um consenso no fato da hidrólise de componentes da membrana basal nos capilares e microvasos ser um passo chave neste processo (Gutiérrez et al., 2005).

Há ainda diversos outros princípios ativos nas peçonhas ofídicas, que são pouco estudados nas serpentes da família *Viperidae* devido à baixa expressão destes componentes em relação às toxinas predominantes. Dentre estes, podemos citar os fatores de crescimento neural e endotelial e cardiotoxinas.

A cardiotoxina consiste em uma neuromiotoxina citotóxica que induz diferentes tipos de danos às estruturas neuromusculares por mecanismos de ação distintos (Vagnaud et al., 2007). Somente as cardiotoxinas de serpentes da família *Elapidae* são bem caracterizadas, e consistem em polipeptídeos básicos, ricos em folhas  $\beta$ -pregueadas, com uma estrutura característica de “volta três dedos” (Wang & Wu, 2005).

O fator de crescimento neural (NGF) foi o primeiro fator neurotrópico a ser identificado como um polipeptídeo responsável pela manutenção e sobrevivência neuronal (Cohen et al., 1954). Os NGFs exercem essa função sobre neurônios derivados de neurônios embrionários sensoriais, células neurais do nervo simpático periférico de vertebrados e populações de neurônios colinérgicos, além de desempenhar importantes funções na ontogênese (Loughlin et al., 1993; Kostiza et al., 1996). Além destas funções, os NGFs de peçonhas ofídicas desempenham efeitos farmacológicos não relacionados aos neurônios, como indução do extravasamento plasmático e liberação de histamina em células sanguíneas (Kostiza et al., 1995). Uma diversidade de NGFs já foram isolados e caracterizados de várias serpentes das famílias *Elapidae* e *Viperidae*, porém estudos relacionados a estes fatores presentes nas peçonhas de serpentes ainda são bastante negligenciados.

Os fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF) consistem na chave regulatória da vasculogênese e angiogênese embrionária, agindo também em condições patológicas. As proteínas homólogas aos VEGFs na peçonha de serpente desempenham diversas atividades biológicas, como indução da mitose em células endoteliais e aumento da permeabilidade capilar (Tokunaga et al., 2005). Apesar de este fator ter sido isolado, caracterizado ou clonado de diversas serpentes da família *Viperidae*, como *Vipera aspis aspis* (Komori et al., 1999), *Bothrops insularis* e *Bothrops jararaca* (Junqueira-de-azevedo et al., 2001) e *Microvipera lebetina* (Gasmi et al., 2002), ainda permanece incerto o número de serpentes que expressam este componente na peçonha.

#### **1.1.4 Técnicas da Biologia Molecular e Bioinformática no Estudo da Peçonha Ofídica.**

A peçonha de cada espécie de serpente consiste em um coquetel único de centenas de diferentes peptídeos e proteínas, muitos destes com potencial farmacológico. Diversos peptídeos e toxinas já foram isolados e caracterizados, porém muitos princípios na peçonha permanecem pouco explorados ou até mesmo desconhecidos em razão da dificuldade em purificar componentes menos expressos em quantidades suficientes para caracterização.

Os avanços nos campo da biologia molecular, biotecnologia e bioinformática permitiram não só a caracterização estrutural destas enzimas, mas como a clonagem de toxinas, o desenvolvimento de enzimas recombinantes, o estudo do padrão de expressão gênica (transcriptoma) pela glândula de peçonha e análises filogenéticas, auxiliando na compreensão dos processos evolutivos relacionados à peçonha ofídica.

O termo “transcriptoma” refere-se ao conjunto completo de transcritos (RNAs mensageiros) de um dado organismo, órgão, tecido ou linhagem celular. (<http://pt.wikipedia.org>), representando um reflexo direto da expressão dos genes. O perfil do transcriptoma pode variar de acordo com diversos fatores, como ciclo celular, estado fisiológico, estímulos físicos, químicos e biológicos, alimentação, patologias, entre outros.

Este estudo apresenta algumas vantagens importantes em relação às bibliotecas gênicas ou genoma (Selistre-de-Araujo & Souza, 2007):

i. Na maioria das vezes, os insertos de cDNA constituem cópias da extensão total do RNAm dos quais derivam;

ii. Os cDNAs obtidos dos RNAm são amplos o bastante para reunirem representantes de todas as sequências de interesse, inclusive as menos abundantes ou raras;

iii. Não possuem íntrons, o que permite a determinação direta das sequências de nucleotídeos e tradução para sequências de aminoácidos.

O transcriptoma da glândula de serpentes consiste em uma valiosa ferramenta para o estudo da complexidade e variabilidade de toxinas presentes na peçonha e para análise da expressão gênica neste tecido. Muitos estudos transcricionais de glândulas de peçonha já foram realizados envolvendo diversas espécies de serpentes como *Bothrops insularis* (Junqueira-de-Azevedo & Ho, 2002), *Bothrops jararacussu* (Kashima et al, 2004), *Bothrops jararaca* (Cidade et al, 2006), *Bitis gabonica gabonica* (Calvete et al, 2007), *Deinagkistrodon acutus* (Zhang et al, 2006), *Philodryas olfersii* (Ching, et al, 2006), *Echis ocelatus* (Wagstaff & Harrison, 2006) e *Sistrurus catenatus edwardsii* (Pehari et al, 2007), porém, não há registros na literatura de análises transcricionais da glândula de peçonha de serpentes crotálicas.

Por outro lado, muitos cDNAs da glândula de peçonha de *Crotalus atrox* já foram clonados e caracterizados, como duas proteínas indutoras de apoptose vascular: VAP1 (Masuda et al, 2000) e VAP2 (Masuda et al, 2007), uma catrocolastatina (Zhou et al, 1995), uma fibrinogenase não hemorrágica (atroxase) (Baker et al, 1995) e cinco metaloproteases (Hite et al, 1992; 1994). Existem também trabalhos envolvendo a clonagem molecular de toxinas de *Crotalus durissus terrificus*, como a clonagem das subunidades da convulxina (Leduc & Bon, 1998), a análise de três transcritos que codificam as duas subunidades da crotoxina (Bouchier et al, 1991) e a clonagem molecular de isoformas da crotamina (Rádis-Baptista et al, 1999; Smith e Schmidt, 1990).

Em razão do acúmulo crescente de informação sobre seqüências de DNA, RNA e proteínas, na década de 70 surgiu a Bioinformática, englobando diversas áreas do conhecimento como ciências da computação, matemática, estatística e

biologia molecular. A criação de bancos de dados universais de acesso livre aos pesquisadores impulsionou a produtividade científica na área da biotecnologia.

Em 1972 foi criado o banco de dados de estruturas de proteínas (Protein Database Bank) e posteriormente acelerou a criação de diversos programas ou softwares destinados à análise, organização e depósito de dados científicos como o Multialin (disponível em: <http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>), que desenvolve multialinhamento de seqüências, assim como cálculo de matriz de distância e construção de árvores filogenéticas, BLAST (disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>), site de pesquisa de homologia por alinhamento, a partir do banco de dados de seqüências, Clustal W (disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) que realiza multialinhamento de seqüências, assim como cladogramas e filogramas, o GenBank, maior banco de dados de nucleotídeos, entre muitos outros programas disponíveis na internet ou para compra.

O servidor da internet ExPasy Proteomic Server (<http://expasy.org>) oferece um catálogo de diversos programas destinados à análise de seqüência e estrutura de proteínas. Entre estes podemos citar o Prosite que procura motivos estruturais e funcionais e o ProtParam que calcula propriedades físico-químicas nas seqüências analisadas.

Os avanços na biotecnologia aplicada à toxilogia culminaram na criação do projeto Venômica, que espera abrir novos horizontes, incluindo o conhecimento da função e evolução das peçonhas e venenos nos diversos filós, a descoberta de suas relações genéticas e novos desenvolvimentos nos campos da farmacologia e do tratamento dos envenenamentos (Ménez et al., 2006).

## Referências Bibliográficas

AIRD, S. D.; KAISER, I. I.; LEWIS, R. V.; KRUGGEL, W. G. Rattlesnake presynaptic neurotoxins: primary structure and evolutionary origin of the acid subunit. **Biochemistry**. V. 24, p. 7054-7058, 1985.

ALEXANDER, G.; GROTHUSEN, J.; ZEPEDA, H.; SCHWARTZMAN, R. J. Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme. **Toxicon**. v. 26, n.10 p. 953-960. 1988.

AMORA, D. N.; SOUZA, T. S.; MARTINS, A. M. C., BARBOSA, P. S. F.; MAGALHÃES, M. R.; TOYAMA, M. H., FONTELES, M. F.; MENEZES, D. B.; MONTEIRO, H. S. A. Effects of *Crotalus durissus collilineatus* venom in the isolated rat kidney. **Toxicon**. v. 47, p. 260-264, 2006.

BAKER, B.J.; WONGVIBULSIN, S.; NYBORG, J.; TU, A.T. Nucleotide sequence encoding the snake venom fibrinolytic enzyme atroxase obtained from a *Crotalus atrox* venom gland cDNA library. **Arch Biochem Biophys**. v. 10 n.317 (2) p. 357-64, 1995.

BALSINDE, J.; WINSTEAD, M. V.; DENNIS E. A.; Phospholipase A(2) regulation of arachidonic acid mobilization. **FEBS Letters**, v. 531, p. 2-6, 2002.

BARRIO, A. Gyroxin, a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venom, **Acta Physiol. Latinoamer**. V. 11, p. 224, 1961.

BIERBER, A. L.; TU, T.; TU, T. A. Studies of an acid cardiotoxin isolated from the venom of Mojave rattlesnake (*Crotalus scutelatus*). **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 400, p. 178-188. 1975.

BOUCHIER, C.; BOULAIN, J. C.; BON, C.; MÉNEZ, A. Analysis of cDNA encoding the two subunits of crotoxin, a phospholipase A2 neurotoxin from rattlesnake venom: the acid non enzymatic subunit derives from a phospholipase A2-like precursor. **Biochimica and Biophysica Acta**. v. 1088, p. 401-408, 1991.

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão. **Cad. de Saúde Pública**, v.19, n.1, p.7-16, 2003.

BON, C.; BOUCHIER, C.; CHOUMET, V.; FAURE, G.; JIANG, M. S; LAMBEZAT, M. P.; RADVANYI, F.; SALIOU, B. Crotoxin, half-century of investigations on a phospholipase A<sub>2</sub> neurotoxin. **Act. Physiol. Pharmacol. Latinoam.** v. 39, p. 439-448, 1989.

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

CAMILLO, M. A. P.; PAES, P. C. A.; TRONCONE, L. R. P.; ROGERO, J. R. Gyroxin fails to modify in vitro release of labeled dopamine and acetylcholine from rat and mouse striatal tissue. **Toxicon.** v. 39, p. 843-853, 2001.

CANZIANE, G.; SIKI, C.; VIDAL, J. C. The mechanism of inhibition of phospholipase activity of crotoxin B by crotoxin A. **Toxicon.** v. 21, n. 5, p. 663-674, 1983.

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

CHANG, C. C. & SU, M. J. A study on the interaction of crotopotina with crotoxina phospholipase A<sub>2</sub> notexin and other presynaptic neurotoxins. **Br. J. Pharmac.** v. 73, p. 495-503. 1981.

CHANG, C. C. & SU, M. J. The mechanism of potentiation of the presynaptic effect of phospholipase A<sub>2</sub> by crotopotin components of the crotoxin complex. **Toxicon**, v.16, p. 402-405, 1978.

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.

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

CHOUMET, V.; SALIOU, B.; FEDERLER, L.; CHEN, Y. C.; GUBENSEK, F.; BO, C. DELOT, E. Snake venom phospholipase A<sub>2</sub> neurotoxins. **Eur. J. Biochem.** v. 211, p. 57-62, 1993.

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.

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

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

COHN, M. I.; COHN, M. Barrel rotation induced by somatostatin in the non-lesioned rat. **Brain Res.** v. 96, p. 139-141, 1975.

DÉLOT, E. & BON, C. Model for the interaction of crotoxin, a phospholipase A<sub>2</sub> neurotoxin, with presynaptic membranes. **Biochemistry**. v. 32, p. 10708-10713, 1993.

FAURE, G., HARVEY, A. L.; THOMSON, E.; SALIOU, B.; RADVANYI, F.; BON, C. Comparison of crotoxin isoforms reveals that stability of the complex plays a major role on its pharmacological action. **Eur. J. Biochem.** v. 214, p. 491-496, 1993.

FAURE, G.; GUILLAUME, J. L.; CAMOIN, L.; SALIOU, B.; BON, C. Multiplicity of acidic subunit isoforms of crotoxin, the phospholipase A<sub>2</sub> neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom, results from posttranslational modifications. **Biochemistry**. v. 30, n. 32, p. 8074-83, 1991.

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

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.

FRAENKEL-CONRAT, H. & SINGER, B. Fractionation and composition of crotoxin. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 60, n. 1, p. 64-73, 1956.

FRAENKEL-CONRAT, H.; JENG, T. W.; HSIANG, M.; Biological activity of crotoxin and amino acid sequence of crotoxin B, in **Natural Toxins**. Oxford: Pergamon press 1980. p. 561-567

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

GASMI, A.; BOURCIER, C.; ALOUI, Z.; SRAIRI, N.; MARCHETTI, S.; GIMOND, C. WEDGE, S. R.; HENNEQUIN, L.; POUYSSÉGUR, J. Complete structure of an increasing capillary permeability protein (ICPP) purified from *Vipera lebetina* venom. ICPP is angiogenic via vascular endothelial growth factor receptor signaling. **J. Biol. Chem.** v. 277, n. 33, p. 29992-29998, 2002.

GONÇALVES, J. M. & POLSON, A. The electrophoretic analysis of snake venom. **Arch. Biochem.** v. 13, p. 253-259, 1947.

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

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.

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.

HITE, L.A.; SHANNON, J.D.; BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. Sequence of a cDNA clone encoding the zinc metalloproteinase hemorrhagic toxin e from *Crotalus atrox*: evidence for signal, zymogen, and disintegrin-like structures. **Biochemistry**. v. 14 n.31(27) p. 6203-11, 1992.

HOWGOOD, B. J. Crotoxin, the phospholipase A<sub>2</sub> neurotoxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Mem. Inst. Butantan**. v. 52, p. 21-22. 1990.

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

JANDROT-PERRUS, M.; LAGRUE, A. H.; OKUMA, M.; BON C. Adhesion and activation of human platelets induced by convulxin involves glycoprotein VI and integrin alpha2beta1. **J. Biol. Chem**. V. 272, n. 43, p. 27035-27041, 1997.

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.

KANAJI, S.; KANAJI, T.; FURIHATA, K.; KATO, K.; WARE, J. L.; KUNICLI, T. J. Convulxin binds to native, human glycoprotein IB $\alpha$ . **The Journal of Biological Chemistry**. V. 278, n. 41, p. 39452-39460, 2003.

KANNAN, H.; TANAKA, H.; UEDA, Y.; HAYASHIDA, Y.; KUNITAKE, T.; YAMASHITA, H. Effects of centrally administered endothelin-3 on renal sympathetic nerve activity and renal blood flow in conscious rats. **J. Autonomic Nervous Sys**. V. 49, p. 105-113, 1994.

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<sup>1</sup>: l-gene expression profile of highly expressed phospholipases A<sub>2</sub>. **Biochimie**. v. 86, p. 221-219, 2004.

KERKIS, A.; KERKIS, I.; RÁDIS-BAPTISTA, G. OLIVEIRA, E. B.; VIANNA-MORGANTE, A. M.; PEREIRA, L. V.; YAMANE, T. Crotonamine is a novel cell-penetrating protein from the venom of rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **FASEB J.** v. 18, p. 1407-1409, 2004.

KINI, R. M.; Serine proteases affecting blood coagulation and fibrinolysis from snake venoms. **Pathophys. Haemost. Thromb.** V. 34, p. 200-204, 2005.

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.

KOMORI, Y.; NIKAI, T.; TANIGUCHI, K.; MASUDA, K.; SUGIHARA, H. Vascular endothelial growth factor VEGF-like heparin-binding protein from the venom of *Vipera aspis aspis* (Aspic viper). **Biochemistry**. v. 38, n. 36, p. 11796-11803, 1999.

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

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

KRUSE, H.; GREIDANUS, V. W. Tj. B.; DE WIED, D. Barrel rotation induced by vasopressin and related peptides in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v. 7, p. 311-313, 1977.

LEDUC, M. & BON, C. Cloning of subunits of convulxin, a collagen-like platelet-aggregating protein from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Biochem, J.** v. 333, p. 389-393, 1998.

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

LENNON, B.W.; KAISER, I.I. Isolation of a crotoxin-like protein from the venom of a South American rattlesnake (*Crotalus durissus collilineatus*). **Comp Biochem Physiol B.** v. 97 n. 4 p. 695-9, 1990.

LOUGHLIN, S. E.; FALLON, J. H. **Neurotrophic Factors.** San Diego, California: Academic press Inc. 1993.

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

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

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

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

MASUDA, S.; MAEDA, H.; MIAO, J.Y.; HAYASHI, H.; ARAKI, S. cDNA cloning and some additional peptide characterization of a single-chain vascular apoptosis-inducing protein, VAP2. **Endothelium.** v. 14 n.2 p. 89-96, 2007.

MASUDA, S.; OHTA, T.; KAJI, K.; FOX, J.W.; HAYASHI, H.; ARAKI, S. cDNA cloning and characterization of vascular apoptosis-inducing protein 1. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 11 n. 278(1) p.197-204, 2000.

MATTISON, C. **The encyclopedia of snakes.** Londres/UK: Hardcover, 1995. 288 p.

MINISTERIO DA SAÚDE – Histórico do ofidismo. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/historico\\_ofidismo.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/historico_ofidismo.pdf)>. Acesso em 01 dez 2007.

MÉNEZ, A. 'Venomics' or: The venomous systems genome project. **Toxicon.** v. 47, p. 255-259, 2006.

MORITA, T. Structure and functions of snake venom CLPs (C-type lectin-like proteins) with anticoagulant-, procoagulant-, and platelet-modulating activities. **Toxicon.** v. 45, p. 1099-1114, 2005.

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

OSHIMA-FRANCO, Y.; HYSLOP, S.; PRADO, J. F.; CRUZ M. A. H.; RODRIGUEZ L. S. Neutralizing capacity of antisera raised in horses and rabbits against *Crotalus durissus terrificus* (South-American rattlesnake) venom and its main toxin, crotoxin. **Toxicon.** v. 37, p. 1341-57, 1999.

PAHARI, S.; MACKESSY, S. P.; LINI, M. R. The venom gland transcriptome of Desert Massasauga rattlesnake (*Sistrurus catenatus edwardsii*) towards an understanding of venom composition among advanced snakes (superfamily *Colubroidea*). **BMC Mol. Biol.** v. 8, n.1. 2007. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2199/8/115>>. Acesso em: 15 dez 2007.

PINHO, F. M. & PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Rev. Ass. Méd. Brás.** v. 47, n.1, p. 24-29, 2001.

PONCE-SOTO, L. A.; LOMONTE, B.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S. Biological and structural characterization of crotoxin and new isoform of crotoxin B PLA(2) (F6a) from *Crotalus durissus collilineatus* snake venom. **Protein J.** v. 26 n. 4, p. 221-30, 2007.

PONCE-SOTO, L.A.; TOYAMA, M.H.; HYSLOP, S.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S. Isolation and preliminary enzymatic characterization of a novel PLA2 from *Crotalus durissus collilineatus* venom. **J Protein Chem.** v. 21 n. 3 p.131-6, 2002.

POLGÁR, J.; CLEMETSON, J. M.; KEHREL, B. E.; WIEDEMANN, M.; MAGNENAT, E. M.; WELLS, T. N.; CLEMETSON, H. J. Platelet activation and signal trans by convulxin, a C-type lectin from *Crotalus durissus terrificus* (tropical rattlesnake) venom via the p62/GPVI collagen receptor. **J. Biol. Chem.** v. 272, n. 21, p. 13576-13583, 1997.

RÁDIS-BAPTISTA, G.; KUBO, T.; OGUIURA, N.; SILVA, A. R. P. da; HAYASHI, M. A. F.; OLIVEIRA, E. B.; YAMANE, T. Identification of crotasin, a crotamine-related gene of *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, v.43, p. 751-759, 2004.

RÁDIS-BAPTISTA, G.; OGUIURA, N.; HAYASHI, M.A.; CAMARGO, M.E.; GREGO, K.F.; OLIVEIRA, E.B.; YAMANE, T. Nucleotide sequence of crotamine isoform precursors from a single South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). **Toxicon**. v. 37 n. 7 p. 973-84, 1999.

RADVANYI, F.; SALIOU, B.; LAMBEZAT, M. P.; BON, C. Binding of crotoxin, a presynaptic phospholipase A<sub>2</sub> neurotoxin, to negatively charged phospholipids vesicles. **Journal of Neurochemistry.** V. 53, n. 4, p. 1254-1260, 1989.

SELISTRE-de-ARAÚJO, H., S.; SOUZA, D. H. F. **Métodos em toxinologia: toxinas de serpentes.** São Carlos-SP: Edufscar, 2007. 258 p.

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.

SHIMOKAWA, K.; JIA, L. G.; WANG, X. M.; FOX, J. W. Expression, activation, and processing of the recombinant snake venom metalloproteinase, pro-atrolysin E. **Arch Biochem Biophys**. v. 335, n. 2, p. 283-294, 1996.

SHIMOKAWA, K.; SHANNON, J. D.; JIA, L. G.; FOX, J. W. Sequence and biological activity of catrocollastatin-C: a disintegrinlike/cysteine-rich two-domain protein from *Crotalus atrox* venom. **Arch. Biochem. Biophys**. v. 343, p. 35–43, 1997.

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

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

TOYAMA, M.H.; CARNEIRO, E.M.; MARANGONI, S.; AMARAL, M.E.C.; VELLOSO, L.A.; BOSCHERO, A.C. Isolation and characterization of a convulxin-like protein from *Crotalus durissus collilineatus* venom. **J Protein Chem**. v. 20 n. 7 p. 585-91, 2001.

TOYAMA, M. H.; CARNEIRO, E. M., MARANGONI, S.; BARBOSA, R. L.; CORSO, G.; BOSCHERO, A. C. Biochemical characterization of two crotamine isoforms isolates by single step RP-HPLC from *Crotalus durissus terrificus* (south American rattlesnake) venom and their action on insulin secretion by pancreatic islet.

**Biochim. Biophys. Acta**, v. 1474, p. 56-60, 2000.

VAGNAUD, A.; HOURDE C.; BUTLER-BROWNE G.; FERRY, A. Differential recovery of neuromuscular function after nerve/muscle injury induced by crude venom from *Notechis scutatus*, cardiotoxin from *Naja atra* and bupivacaine treatments in mice. **Neuroscience Researches**. v. 58, p. 327-323, 2007.

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 metalloproteases and a new group of putative toxins, rennin-like aspartic proteases. **GENE**. v. 377, p. 21-32, 2006.



WAITE, M. **Handbook of lipidic research**. New York: Plenum press, 1987. 332p.

WANG C. H.; WU W. Amphiphilic  $\beta$ -sheet cobra cardiotoxin targets mitochondria and disrupts its network. **FEBS Letters**. v. 579, p. 3169-3174, 2005.

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 A<sub>2</sub> homologue expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli*. **Protein. Expr Purif.** v. 21, n. 21, p. 134-140, 2001.

ZHANG, B.; LIU, Q.; YIN, W.; ZHANG, X.; HUANG, Y.; LUO, Y.; QIU, P.; SU, X.; YU, J.; HU, S.; YAN, G. Transcriptome analysis of *Deinagkistrodon acutus* venomous gland focusing on cellular structure and aspects using expressed sequence tags. **BMC genomics**. v. 7, n. 152, 2006. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pubmed&pubmedid=16776837>> Acesso em: 10 nov 2007.

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.

---

## **CAPÍTULO 2**

Transcriptoma da Glândula de Peçonha de  
*Crotalus durissus collilineatus*: Análise do  
Perfil de Expressão Gênica

---

---

## Resumo

As serpentes da espécie *Crotalus durissus* são responsáveis pela maioria dos óbitos envolvendo acidentes ofídicos no Brasil. A subespécie *Crotalus durissus collilineatus* está relacionada a um grande número de acidentes nas regiões Sudeste e Centro-Oeste, porém poucos estudos sobre a composição desta peçonha têm sido realizados. Com o objetivo de determinar o perfil transcricional da glândula de peçonha de *C. d. collilineatus*, foi gerada uma biblioteca parcial de cDNA, e as seqüências obtidas de clones selecionados ao acaso foram identificadas por pesquisas de similaridade contra bancos de dados existentes. Um total de 673 clones foi seqüenciado resultando em 489 seqüências de qualidade, compreendendo 201 seqüências únicas e 47 redundantes. Das 248 seqüências consenso geradas, 150 (60,5%) apresentaram escores significativos de alinhamento com seqüências conhecidas. Os resultados demonstraram uma predominância de ESTs (expressed sequence tags) que codificam toxinas em relação às seqüências correspondentes à proteínas relacionadas a todas as funções celulares. A toxina mais freqüente nesta biblioteca consiste na crotoxina, que compreende 88% das seqüências relacionadas com toxinas. A crotoxina B, uma fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) básica da crotoxina, apresentou maior variabilidade quando comparada com a subunidade não enzimática (crotoxina A) desta enzima, sendo que a maioria das seqüências que codifica esta molécula apresentou homologia em relação à isoforma CB1 de *Crotalus durissus terrificus*. 4% das seqüências identificadas como toxinas neste estudo representam fatores de crescimento, correspondendo a cinco seqüências de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e uma de fator de crescimento neural (NGF), que apresentou 100% de homologia com NGF de *C. d. terrificus*. Nós também identificamos dois clusters para metalloprotease da classe PII, compreendendo 3% do total de toxinas e dois clusters para serinoproteases (2,5% das toxinas). Os outros 2,5% da biblioteca consistem em singletons codificando seqüências homologas a carditoxina, convulxina, inibidor de enzima conversora de angiotensina e peptídeo natriurético tipo-C, Ohanina, crotamina e inibidor de PLA<sub>2</sub>. Estes resultados permitiram a identificação da maioria das classes de

toxinas comumente encontradas em peçonhas de serpentes, entretanto, algumas destas eram até então desconhecidas para a peçonha de *C. d. collilineatus* e até mesmo para a espécie *Crotalus durissus*, como, por exemplo, a cardiotoxina e VEGF.

*Palavras-chave:* Toxinas; peçonha de serpentes; transcriptoma; Expressão gênica; *Crotalus durissus collilineatus*.

---

## ***Crotalus durissus collilineatus* Venom Gland Transcriptome: Analysis of Gene Expression Profile**

Boldrini-França J.<sup>a</sup>, Rodrigues R.S.<sup>a</sup>, Fonseca F. P. P.<sup>b</sup>, Otaviano A.R.<sup>a</sup>, Silva F.H.<sup>b</sup>, Selistre-Araujo H.C.<sup>c</sup>, Soares A.M.<sup>d</sup>, Hamaguchi A.<sup>a</sup>, Rodrigues V.M.<sup>a</sup>,  
Homs-Brandeburgo M.I.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia – Uberlândia – MG, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos – São Carlos – SP, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos – São Carlos - SP, Brazil

<sup>d</sup> Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto – SP, Brazil

---

### **Abstract**

*Crotalus durissus* rattlesnakes are responsible for the major cases of lethality involving snakebites in Brazil. *Crotalus d. collilineatus* subspecies is related to a great number of accidents in Southeast and Central west regions, but few studies on its venom composition have been carried out. As an attempt to describe the transcriptional profile of the *C. d. collilineatus* venom gland, we generated a cDNA library and sequences obtained of random selected clones could be identified by similarity searches on existing databases. A total of 489 out of 673 ESTs produced readable sequences comprising 201 singletons and 47 clusters of two or more ESTs. From 248 contiguous sequences, 150 (60.5%) produced significant hits to known sequences. The results showed a predominance of toxin-coding expressed sequence tags (ESTs) instead of transcripts coding for proteins involved in all cellular functions. The most frequent toxin for this library was crotoxin, comprising 88% of toxin-coding sequences. The crotoxin B, a basic phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) subunit of crotoxin, was represented in more variable forms comparing to the non-enzymatic subunit (crotoxin A), and the most of sequences coding this molecule were identified as CB1 isoform from *Crotalus durissus terrificus* venom. 4% of toxin-related sequences in this study were identified as Growth Factors,

comprising five sequences for vascular endothelial growth factor (VEGF) and one for nerve growth factor (NGF) that showed 100% of identity with *C. d. terrificus* NGF. We also identified two clusters for metalloprotease from PII class comprising 3% of toxins, and two for serine proteases, including gyroxin (2.5%). The remaining 2.5% of toxin-coding ESTs represent singletons identified as homologue sequences to cardiotoxin, convulxin, angiotensin converting enzyme inhibitor and C-type natriuretic peptide, Ohanin, crotoamin and PLA<sub>2</sub> inhibitor. These results allowed the identifications of the most common classes of snake venom toxins, however some of them were unknown for *C. durissus collilineatus* subspecies, and even for *Crotalus durissus* species, such as cardiotoxins and VEGF.

*Key words:* Toxins; Snake venom; transcriptome; Gene expression; *Crotalus durissus collilineatus*.

---

## 2.1. Introduction

Snake venoms are individual sources of a great number of potential pharmacologic agents, including peptides, proteins and non-proteic compounds, which causes a diverse spectrum of metabolic disorders in the prey (Schmidt et al., 1973; Chippaux et al., 1991). The enzymatic and non-enzymatic proteins may exhibit multiple structure-related forms in the same venom, some times with distinct activities and binding sites. The mechanism of variability generation consists in an accelerated evolution process involving amino acid substitution in mature protein-coding regions, followed by natural selection (Nakashima et al., 1993; Deshimaru et al., 1996; Nobuhisa et al., 1996). In phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), these mutations appear to occur preferentially in exposed than buried residues (Kini, 2003).

The venom of South American rattlesnakes presents some intra and interspecific variabilities in their composition and biological effects (Santoro et al., 1999; Francischetti et al., 2000; Saravia et al., 2002; Rangel-Santos et al., 2004) and are essentially composed by four toxins: crotoxin, crotoamine, gyroxin and convulxin (Barravieira, 1995). Crotoxin is the major toxin, compounding proximally

70% (Aird et al., 1986) of venom dry weight, and is the main responsible for neurotoxic (Hawgood, 1990) and nephrotoxic (Amora et al., 2006) effects, that characterize crotalic envenomation. This enzyme belongs to a class of snake venoms toxins,  $\beta$ -neurotoxins, that acts at the presynaptic level blocking neuromuscular transmission by reduction of acetylcholine release (Bon et al., 1989). The crotoxin structure consists of two different subunits: an acid, non enzymatic subunit (crotoxin A or crotapotin) and a basic PLA<sub>2</sub> (crotoxin B) (Breithaupt et al., 1971; Fraenkel-Conrat, 1971). Crotoxin A is composed of three polypeptides chain linked by disulfide bonds, originated from pos-traductional modifications of an unique PLA<sub>2</sub>-like molecule (Aird et al., 1985). Crotoxin A exhibit chaperone function by addressing crotoxin B to presynaptic junction and preventing its non-specific binding, enhancing its lethality in around ten-fold while inhibits its catalytic activity (Chang & Su, 1981). Crotoxin B is a single chain polypeptide containing 122 amino acid residues and catalyzes the hydrolysis of glycerophospholipids at the sn-2 position releasing free fatty acid and lysophospholipides (Bouchier et al, 1991). PLA<sub>2</sub> have been classified in several groups according to their origin, primary structure and presence of disulfide bonds. The PLA<sub>2</sub> from snake venoms is a Ca<sup>2+</sup>-dependent enzyme that belongs to group II of enzymes (Ward et al., 2001).

*Crotalus* genus is represented in Brazil by one single specie, *Crotalus durissus*, that is responsible for the most of deaths involving snakebites (Oxima-Franco et al., 1999; Cardoso, 2003). The *Crotalus durissus collilineatus* (*C. d. collilineatus*) subspecie is widely distributed in brazilian Southeast and Center West regions. Studies on the pattern of toxin expression and identification of less abundant toxins from *Crotalus durissus* subspecies have been in general neglected. Moreover, a growing number of snake venoms toxins is being identified and well characterized, but the knowledge about *C. d. collilineatus* venom variability is quite poor. Genomic, proteomic and transcriptomic analysis provide valuable informations for the study of toxin diversity in animal venoms.

There are two methods for transcriptome commonly used in order to analyze venom composition. Some researchers adopt an extensive generation of thousands of clones to produce a complete set of sequences and identify even extremely rare transcripts. In other cases, generation of hundreds to thousands of

sequences, create a partial and representative set of ESTs, allowing the identification of putative transcripts. This last method appears to be adequate to initial characterization of poorly studied organisms (Junqueira-de-Azevedo & Ho, 2002).

In this work, we generated and analyzed a partial cDNA library of *C. d. collilineatus* venom gland focusing on a highly expressed PLA<sub>2</sub> isoform from crotoxin and on a nerve growth factor (NGF). This study will be important to the management of envenomation and some mammalian physiological process studies, design of drugs and analysis of toxin evolution.

## **2.2. Material and Methods**

### **2.2.1. cDNA library construction and sequencing**

Venom gland from *Crotalus durissus collilineatus* adult snake was dissected 3 days after venom extraction, when transcription is most stimulated. The pair of venom glands was homogenized under liquid nitrogen and total RNA was extracted by the Trizol method. From this total RNA, it was purified mRNA using magnetic separation kit (Promega, USA) and 3 µ of mRNA was used in CloneMiner cDNA Library Construction Kit (Invitrogen, UK). First and second cDNA strands were synthesized as described in manufacturer's protocols, and size fractioning of cDNA was carried through in 1 mL column previously packed with Sephacryl S-500 resin and eluted fraction were pooled until 300 ng of cDNA was obtained. A hundred and five ng of cDNA were used to construct a directional plasmid cDNA library and a total of  $6.9 \times 10^6$  CFU/mL was obtained in CloneMiner cDNA Library Construction Kit (Invitrogen, UK). The colonies was plated and individually picked into a 96 wells permanent culture plate, and growed overnight in LB medium (50 ug/mL kanamicin) to perform the DNA extraction by alkaline lysis (Sambook et al, 1989). After quantification, 300 ng of template DNA, corresponding to a single colony, were used as template in the sequencing reaction using DYEnamic ET Dye Terminator kit (GE Healthcare, UK) and universal M13 forward primer, according to the manufacturer's protocol. The



amplified products were sequenced on MEGA-BACE 1000 automated DNA sequencer (GE Healthcare, UK).

### **2.2.2 Clusters assemble and identification**

The eletropherograms were analyzed by the Base Caller Cimarron 3.12 software in order to remove low quality sequences. Nucleotide sequences were also subjected to vector, adaptor and short ESTs (<100 bp) removal. ESTs were then assembled in clusters of contiguous sequences using CAP3 program, set to join only sequences with at least 90% of base identity and 50% of minimal overlap stringency. Each cluster was searched against GenBank NCBI databasis using BLASTN and BLASTX algorithms to identify similar products with an e-value cutoff <  $10^{-10}$ . The best 20 hits sequences were listed and examined and a final annotation table in Microsoft Excel format was generated containing the relevant informations about clusters.

### **2.2.3. Phylogenetic analysis**

Predicted sequence of the basic PLA<sub>2</sub> from crotoxin and other snake venom PLA<sub>2</sub>s were aligned by ClustalW program (available in <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) and human pancreatic PLA<sub>2</sub> was employed as the outgroup. The phylogenetic analysis was performed using MEGA 4 software by NEIGHBOR-JOINING (NJ) method. The reliability of NJ trees was evaluated analyzing 1000 bootstraps replicates.

## **2.3. Results**

### **2.3.1. ESTs sequencing and clustering**

Four hundred and eighty-nine out of 673 ESTs produced readable sequences. Size fractioning of cDNA was performed in chromatography to avoid contaminating the library with short and partial length 3'-end cDNA and adapter sequences. To ensure the cloning of high molecular weight transcripts, DNA

isolated from 14 random colonies were submitted to restriction digestion and the sizes of inserts were visualized by agarose gel (data not shown), resulting in a distribution between 300 and 4,000 base pairs. Subsequently, all ESTs were assembled in unique sequences by CAP3 program, and only sequences showing high identity (> 90%) on the overlap regions were considered as unigene, although some of them could still represent different segments of the same gene. The sequences clustering resulted in 248 contiguous sequences comprising 201 singletons and 47 clusters of two or more ESTs.

### 2.3.2. Cluster identification

Contiguous sequences were used to identify the expressed messages by comparing against GenBank (BLASTX and BLASTN). All EST sequences were submitted to GenBank dbEST under accession numbers FE905316, FE905317, and FE002734 - FE002761. From 248 clusters, 150 (60.5%) produced significant hits ( $e$  value <  $10^{-10}$ ) to known sequences, corresponding to 370 clones (75.6%). The remaining 98 clusters (39.5%), from which 86 were singletons comprising 119 ESTs (24.4%), represent unknown genes. The identified sequences were separated in two general functions expected for snake venom gland transcripts: toxic function (toxins) and proteins involved in all cellular functions (non-toxins). Table 1 shows a general overview of the relative abundance of these groups of clusters and Fig. 1A represent the percentage of the three kinds of hits over the total library. Toxins comprise the majority of ESTs, representing 40.5% of all messages and 53.5% of identified messages, consisting in 198 sequences grouped in 12 clusters and 18 singletons, followed by non-toxins that represent 35.2% of all ESTs and 46.5% of identified ESTs (172 reads distributed in 26 clusters and 97 singletons). However, non-toxins are about four times more diverse than toxin groups. A list of the putative identification of toxin related clusters are provided in Table 2. The toxin clusters were grouped according to the structural and functional type of protein: crotoxin A, crotoxin B, metalloproteases, serine proteases, growth factors and others. Fig. 1B shows the proportion of each group of toxins over a total number of toxin-coding sequences. ESTs homologues to the two subunits of crotoxin was the major classes of cDNA found in the library,

comprising 46% and 42% for crotoxin A and crotoxin B respectively, representing together 88% of all toxin ESTs, more than the expected percentage. These sequences represent the toxin responsible for most dramatic effects of crotalic envenomation. Growth factors correspond to 4% of the sequences identified as toxins and comprise both vascular endothelial and nerve growth factors. Metalloproteases and serineproteases represent 3% and 2.5% of toxin sequences respectively, while other classes comprises only singletons and represent the remaining 2.5% of this kind of ESTs.

### 2.3.3. Crotoxin

The ESTs encoding the two subunits of crotoxin, witch is the most frequent and representative toxin found in South-American rattlesnake venom, performed 88% (173 reads) of ESTs toxin-encoding sequences from the library. 91 sequences, grouped in seven clusters, showed high homology to precursor chain for crotoxin A from *Crotalus durissus terrificus* (*C. d. terrificus*). The consensus sequence from cluster CDCP011 contains 5' UTR and complete ORF that encloses pré-pro peptides and all three chains from crotapotin (A, B and C chain). Other two clusters encoding crotoxin A-like toxins (CDCP012 and CDCP013) also contain the complete ORF but aligned to 3'UTR. CDCP014 and CDCP015 contain only 5' UTR and CDCP016 comprises only part of signal peptide and A chain.

Sequences encoding crotoxin B-like toxins correspond to 42% all toxin-related ESTs (82 reads grouped in ten clusters, of witch six are singletons and fours are clusters containing two or more sequences). Consensus sequence from cluster CDCP001 contains complete signal peptide and mature protein from crotoxin B subunit (Fig. 7) and was the most expressed isoform from this toxin (62 clones). This sequence showed 99% of identity with *C. d. terrificus* crotoxin B and presented the amino acid substitution of proline to arginine at 82 position. Comparative analysis of the deduced primary sequence from this cluster and PLA<sub>2</sub> CB1 precursor from *C. d. terrificus* (acess number: P62022) indicated a single amino acid residue substitution in each one. On the other hand, when aligned with the most abundant isoform codifying crotoxin A-like from this library (cluster CDCP011), these sequences showed lower identity percentage (97%). Multiple

alignment among amino acid sequences of this crotoxin B isoform and the 10 most similar PLA<sub>2</sub> from BLASTX analysis was carried through (Fig. 8A). It's possible to notice highly conserved residues in signal peptides rather than in mature protein coding region, however, all sequences showed homologue active site, presenting active Histidine and calcium binding Aspartate in the same location (positions 47 and 48 respectively).

Phylogenetic trees were built from multiple alignment of this basic PLA<sub>2</sub>, 20 best hits from BLASTX and one homologue PLA<sub>2</sub> from Human pancreas (Fig 8B). The resulting data clearly demonstrated the main branches suggesting evolutive proximity of each protein. The tree shows the clustering of all N-6 PLA<sub>2</sub>s separated from the G-6 PLA<sub>2</sub>s, and the existence of two types of N-6 PLA<sub>2</sub>s, denoted as F24 and S24 PLA<sub>2</sub>s.

Beyond this cluster, other two sequences showed similarity with isoform CB1 from *C. d. terrificus* venom, and three was identified as isoform CB2 from this source, but represent lower expression profile comparing to CB1 isoform clusters. The remaining clusters presented similarity to neurotoxic PLA<sub>2</sub>s from other snake venoms.

#### 2.3.4. Proteases

The library sequencing resulted in six metalloproteases and five serineproteases ESTs. The sequences corresponding to metalloproteases generated two clusters (CDCM018 and CDCM019) both belonging to PII class, however, the singleton contains only the complete 3'UTR and showed higher similarity (91%) to hemorrhagic Atrolysin *e* from *Crotalus atrox* than to *C. d. terrificus* PII metalloproteases. Cluster CDCM018 presented conserved central region that contains five of the cysteines (C-X(2)-G-X-C(2)-X-[NQRS]-C-X-[FM]-X(6)-C-[RK] involved in disulfide bonds of desintegrin domain, beyond the ECD motif involved in  $\alpha_2\beta_1$  integrin binding.

Serineproteases ESTs were separated in one cluster containing four sequences and one singleton. CDCS020 was identified as Gyroxin-like, a trombin-like serineprotease that induces mouse rotation around its long axis. This sequence maintains signal-peptide, pro-protein and the His<sup>50</sup> active residue, but it

was not completely sequenced, so it lacks Asp<sup>94</sup> and Ser<sup>191</sup> active residues. The singleton CDCS021 contains only 5'UTR and aligned with more homology to *Macrovipera lebetina* serine  $\alpha$ -fibrinogenase (92% of identity) than to serine proteases from North American rattlesnakes, evidencing that this region is more conserved between this two different genus of snakes.

### 2.3.5. Growth Factors

There were found in *C. d. collilineatus* both vascular endothelial growth factors (VEGF) and nerve growth factor (NGF). The VEGFs are enzymes present in some snake venoms and are far from be well characterized from this source. It increases vascular permeability and has important role during the early stages of envenomation. Seven ESTs was identified as VEGF and grouped in one cluster of six sequences and one singleton. The cluster CDCGF022 is a full length sequence and is high similar to *Bothrops insularis* VEGF-like toxin (91% of identity). The amino acids involved in substrate binding (RSVC<sup>36-39</sup>, C<sup>73</sup>, DESL<sup>75-78</sup>, RVDP<sup>93-96</sup>) from this enzyme are conserved, but there are two substitution in RSVC and DESL for HSVC and EESL, however, amino acids involved in this mutations present similar properties. There are also two conserved cysteines involved in dimerization interface (C<sup>63</sup>, C<sup>72</sup>). We also sequenced a singleton (CDCGF023) that consists only in 3'UTR, and was similar to *Protobothrops mucrosquamatus* VEGF.

The NGF is represented in this cDNA library as a singleton. This cDNA of 723 nucleotides and 241 amino acids presents signal peptide, pro-peptide and mature protein (Fig. 9) and showed 100% of identity for *C. d. terrificus* NGF, maintaining the three conserved disulfide bonds that stabilize this molecule. However, analysis on BLASTN algorithms evidenciated one synonymous nucleotide substitution on position 378.

The sequence of *C. d. collilineatus* encoding NGF has a high degree of similarity between not only snakes from *Viperidae* (around 90%) family, but also with *Elapidae* venom (around 80%) as can be seen in multi alignment of the most homologous snake venoms NGFs (Fig. 10A). Comparing to human NGF, this identity is lower (71%) and is evolutionary separated from snake venoms NGF in phylogram (Fig. 10B).

### 2.3.6. Other toxins

Other six singletons were also determined for *C. d. collilineatus* cDNA library representing the less expressed toxins in this venom gland. We also determined the presence of sequences homologues to some toxins previously studied from *C. d. terrificus*, such as crotamine (89% of identity), convulxin alfa-chain (99%) and angiotensin converting enzyme inhibitor and C-type natriuretic peptide (93%). The remaining three singletons correspond to ESTs similar to *Agkistrodon blomhoffii siniticus* phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor (88%), *Ophiophagus hannah* ohanin (70%) and *Naja naja* cardiotoxin-4 (79%).

## 2.4. Discussion

The venom producing apparatus in snakes consists in modified exocrine glands which produce many different biologically active proteins and peptides. These toxins are usually present in the venom in multiples structure-related forms that may exhibit diverse biological and enzymatic activities, that are probably results of paralogue genes (Kochva, 1986; Nobuhisa et al., 1996). The variability in venom composition is well known and is being continually documented as more and more snake venoms are analyzed. However, the venom analysis by traditional biochemical methods of purification may neglect informations about toxins expression patterns and extremely little expressed compounds. Molecular biology offers some important tools for venom composition studies as proteome, genome and transcriptome analysis (Ménez et al., 2006). Several venom glands from *Viperidae*, *Colubridae* and *Elapidae* snake families has already been investigated by both proteome and transcriptome methods (Junqueira-de-Azevedo & Ho, 2002; Kashima et al., 2004; Wagstaff & Harrison, 2006; Cidade et al., 2006; Ching et al., 2006; Zhang et al., 2006; Calvete, et al., 2007; Pahari et al., 2007; Kulkeaw et al., 2007) however there is just studies involving analysis of isolated transcripts from *Crotalus* genus venom gland (Masuda et al, 2000; Masuda et al, 2007; Zhou et al, 1995; Baker et al, 1995, Hite et al, 1992; Hite et al, 1994; Leduc & Bon, 1998; Bouchier et al, 1991; Rádis-Baptista et al, 1999; Smith e Schmidt, 1990) but not any study about general toxin expression for this genus of snakes.

In this work, we constructed a venom gland cDNA library from *C. d. collilineatus*, a high lethal Brazilian rattlesnake (Saches et al., 1992; Lennon & Kaiser et al., 1992), to identify putative genes and toxin expression profile, supplying observations for functional toxinological studies. All expressed ESTs were classified according to its primary structure homology for known molecules. Sequences encoding toxins comprises over 50% of total identified sequences, representing the highest expression rate in this tissue. The same pattern of toxin expression was already described for *Bothrops jararaca* (77,6%) (Cidade, et al., 2006), *Deinagkistrodon acutus* (50,2%) (Zhang et al., 2006), *Echis ocellatus* (57%) (Wagstaff & Harrison, 2006), *Bothrops insularis* (67%) (Junqueira-de-Azevedo & Ho, 2002), *Bothrops jararacussu* (71%) (Kashima et al., 2004) and *Sistrurus catenatus edwardsii* (77%) (Pahari et al., 2007), that correspond to truly venomous snakes (Viperidae family). On the other hand, snakes that present primitive glands (Colubridae family), called Duvernoy's gland, showed less expression of toxins corresponding to 45,8% of total identified sequences in the library (Ching et al., 2006), indicating that Viperidae venom gland should be steps ahead on evolutionary development. Thus, venom gland from truly venomous snake family may be one of the most specialized studied tissues, even more than tissues from plant leaf, usually considered as the most specialized ones, that encodes proximally 33% of photosynthesis-related molecules (Ablett et al., 2000).

The most expressive toxin in *C. d. collilineatus* venom, as expected, is crotoxin, a  $\beta$ -neurotoxin present in *Crotalus durissus* subspecies venoms, composed by two subunits: crotoxin A and crotoxin B. The sequences codifying the components of crotoxin correspond to 88% of the transcripts. Lennon & Kaiser (1990) determined a similar proportion for this toxin, relating that nearly 80% of whole venom represented crotoxin-like material.

We have found 173 ESTs encoding the crotoxin subunits with a homogenous distributions of reads for each one (91 reads for crotoxin A and 82 for crotoxin B), suggesting that these sequences are equally expressed. Probably there is a mechanism of gene expression regulation for similar amounts of these subunits production. Bouchier et al. (1991) suggested that the relatively large 5' and 3' UTRs from crotoxin cDNA may play a role, not only on the regulation of co-synthesis of these subunits, but also can be related to the high content of this toxin

in South American snake venoms. This hypothesis is supported by the observation that UTRs of cDNA encoding monomeric neurotoxic PLA<sub>2</sub> from other snake venoms are shorter and show no significant homology to those of crotoxin cDNA.

Snake venoms, in general, are rich source of PLA<sub>2</sub> enzymes and often contain a large number of isozymes (Kochva, 1986). For this library, it was identified ten clusters for crotoxin B and seven for crotoxin A, characterizing PLA<sub>2</sub> isozyme genes as a multigene family. However, we can not affirm that these numbers correspond to the real variability of crotoxin, since some sequences contain only UTRs and may consist in a different portion of other sequences from this library. Actually, crotoxin A may exhibit much more variability as reported in this paper, because we could identify only the precursor molecule, omitting some post-translational modifications, such as different cleavage sites in the same precursor chain, resulting in various isozymes (Bouchier et al., 1991; Faure et al., 1991). Two isoforms of crotoxin B were previously identified for *C. d. terrificus* venom: CB1 and CB2. cDNA for CB1 is proposed to encode another form for CB by post-translational modifications, called CBc . The CBc isoform associates with high affinity to any form of CA, becoming the crotoxin complex more toxic than less stable complexes (Faure et al., 1994). It was sequenced 71 ESTs codifying CB1, of which 62 are grouped in CDCP001 cluster, against seven reads for CB2. These observations may justify the higher toxicity of *C. d. collilineatus* venom, comparing to those from others *C. durissus* subspecies, related by Sanchez et al. (1992) and Lennon & Kaiser (1990). Santoro also demonstrated a lower PLA<sub>2</sub> *in vitro* and myotoxic activity for this venom, supporting the hypothesis that the major isoform of crotoxin from *C. d. collilineatus* presents higher stability, that enhances its lethality while inhibits the non-specific activities.

An accelerated evolution for PLA<sub>2</sub> in snake venoms has already been reported (Nakashima et al., 1995; Chijiwa et al., 2003; Chen et al., 2004) and it is assumed to be universal for all Crotalinae venom gland PLA<sub>2</sub> isozyme genes. Protein-encoding regions have been involved at much higher mutation rate than the non-coding regions, including UTRs and introns. In ORFs, highly accelerate substitutions have occurred only in mature protein-coding regions and not in signal domain, thus resulting in Darwinian evolutions to produce new physiological activities. This represents a strong selective advantage to overwhelm the prey and



defense against predators. Consensus sequence from CDCP001, the most expressive cluster of PLA<sub>2</sub>, showed one amino acid substitutions in the mature protein coding region and none on signal peptide portion, when compared to *C. d. terrificus* CB1 isoform and seven substitutions in the same region comparing to CB2 isoform, as can be seen in Fig 8A. Considering that these subspecies diverged not long time ago in the evolution, these observations corroborate with the accelerate evolution involving these toxins.

All snake venoms contain toxins related to phospholipases A<sub>2</sub>. These enzymes seem to be on the basis of the evolutionary scheme and may be the most primitive toxic or pre-toxic compound, together perhaps with some protease-based toxins. The snake venom glands and mammal's salivary glands are relatively new structures that probably evolved from another much older exocrine gland, i. e. the pancreas (Kochva, 1986). The hypothesis that PLA<sub>2</sub> and many related toxins should have evolved from pancreatic PLA<sub>2</sub> is supported by the comparison of pancreatic and salivary gland PLA<sub>2</sub> from the same animal specie, that share around 90% of identity. There are few informations about snake pancreatic PLA<sub>2</sub>, but we observed a relative high identity (48%) between human pancreatic enzymes and the CDCP001 cluster codifying PLA<sub>2</sub> from this library. Evaluations of the phylogenetic tree built with the major CB cluster (Fig. 8B), shows that all snake venom PLA<sub>2</sub>s may diverged from one common ancestral. Beyond this, the phylogram clarifies a closer kinship for South American rattlesnake (*C. durissus* subspecies) PLA<sub>2</sub> and agkistrodotoxin from Asian *Gloydius* genus. A similar phylogenetic tree was already reported for Chen et al. (2004), and it takes us to speculate that ancient pit viper related to the present-day *Gloydius* and *Protobothrops* snakes have migrated to the New World originating rattlesnakes.

Phylogenetic analysis has classified snake venom PLA<sub>2</sub>s into five clusters. N-6 PLA<sub>2</sub>s comprises two separated groups: F24 and S24, and two other clusters correspond to G-6 PLA<sub>2</sub>, witch one corresponds to *B. jararacussu* PLA<sub>2</sub> alone. The remaining group is also represented by a single sequence: R-6 PLA<sub>2</sub> from *T. flavoviridis*.

The N-6 PLA<sub>2</sub>s exhibit neuro-myotoxicity and rather high lipolytic activity (Tsai et al, 1995; Chen et al, 2004). The cladogram showed some evolutionary

aspects of the two lineages of N-6 PLA<sub>2</sub>s (F-24 and S-24 PLA<sub>2</sub>s). All crotalid species seems to present only one of the subtypes, except *S. c. tergeminus*, that express both F-24 and S-24 PLA<sub>2</sub>s (Chen et al, 2004). It's also interesting to note that distinct species of snakes from *Crotalus* genus present different subtypes of N-6 PLA<sub>2</sub>s, in spite of the fact that F-24 PLA<sub>2</sub>s seems to be expressed in South-American rattlesnakes while S-24 is apparently found in the North-American ones. These results indicated that subtypes of N-6 PLA<sub>2</sub>s diverged possibly before the speciation of rattlesnakes.

Surprisingly, growth factors demonstrated a relative expressive number of sequences in this library (five ESTs). Vascular endothelial growth factors (VEGFs) displays multiple effects, such as promoting endothelial growth, vascular permeability and hypotension, by activation of two distinct endothelial receptor tyrosine Kinases: *flt-1* (*fms*-like tyrosine kinase-1) and KDR (Kinase domain-containing receptor) (Yamazaki & Morita, 2006). Several VEGFs were identified from both Viperinae and Crotalinae snake venoms, however Viperinae VEGFs presents more specificity to KDR receptor (Yamazaki et al., 2003), while Crotalinae enzymes seems to binds preferentially to *flt-1* (Takahashi et al., 2004). Tokunaga et al. (2005) tested several Viperidae snake venoms for VEGF detection by imuno-reactive assay and related no reactivity for *C. d. terrificus* and *C. atrox* venoms, suggesting the lack of these enzymes on *Crotalus* genus. However, in the present work, we proved the existence of this growth factor on rattlesnake venom. Nerve growth factors (NGFs) belong to the neurotrophic factors family and are responsible to support maintenance, differentiation and survival of sympathetic and embryonic sensory neurons of the peripheral nervous system of vertebrates (Loughlin et al., 1993). Beside these actions, snake venoms and humam NGFs may induce some non-neuronal effects, such as inducing of plasma extravasations and histamine release from blood cells (Kostiza & Meier. 1996). NGF is known to occur in low abundance in snake venoms, showing a maximal yield of 0.5% from whole venom for *Naja naja* (Kostiza, 1995). The cluster codifying this factor is represented in this transcriptome study as a singleton, confirming this low expression rate. By other side, NGFs are very promissory molecules, because they have been involved in etiopathogenesis of some neurodegenerative disorders and some of them may represent a potential treatment for these diseases (Moris &

Vega, 2003). NGF from *C. d. collilineatus* is identical to the sequenced factor from *C. d. terrificus*. Primary structural analysis of the predicted translated sequence showed conserved Lys<sup>121</sup> and Arg<sup>122</sup> (Fig. 10A), which are supposed to function as proteolytic site, Asn<sup>23</sup> that is a possible *N*-glycosilation site in NGF from *B. jararacussu* and *A. h. pallas* venoms (Kashima et al, 2002). The NGF from Viperidae snakes share more than 90% of similarity, however, when comparing to Elapidae source, this degree falls to less than 80%. These results indicated a highly conserved sequential homology among NGF from Viperidae family, which was proved by the phylogenetic tree that determined a divergent evolution among the NGFs from this snake family and from Elapidae and Hydrophiidae families (Fig. 10B). Mammalian NGF is distinguishable in this phylogram from those of snake venoms. Kashima et al. (2002) also reported similar results.

Other interesting finds were also reported in this paper, such as the determination of metalloproteases from PII class, containing conserved ECD motif, that may be related to effects on platelet aggregation together to convulxin. This effect was previously observed for this venom by Santoro et al. (1999), however the role of metalloproteases in South American snake venoms is not yet elucidated. Many others toxins related to diverse systemic effects were also found. Among those, we could stand out angiotensin-converting enzyme inhibitor (BPPs), and C-type natriuretic peptide precursor, gyroxin, crostamine and cardiotoxin, that was first identified for *Crotalus durissus* venom in this paper.

*C. d. collilineatus* snake venom was reported in this study as a rich source of specialized active compound that causes multiple and severe systemic alterations. However, the results obtained here is just an initial approach to the find of promissory pharmacological agents and identification of toxins not yet studied and characterized. The generation of a more extensive sequence data will become possible a more confident overview of the toxins expression profile.

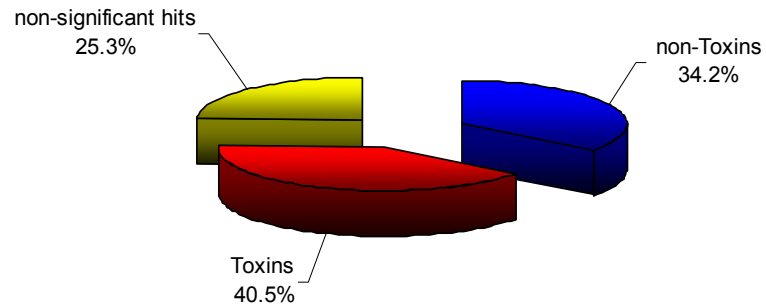
**Table 1.** Summary statistics after clustering of 488 EST sequences

	N° of clusters	N° of ESTs	Percentage over total ESTs	Percentage over identified ESTs
Total n° of clusters (reads >1)	47	288	58.90	68.92
- Identified as toxins	12	180	36.81	48.65
- Identified as non-toxins	23	75	15.34	20.27
- Unidentified	12	33	6.75	-
Total n° of singletons	201	201	41.10	31.08
- Identified as toxins	-	18	3.68	4.86
- Identified as non-toxins	-	97	19.83	26.22
- Unidentified	-	86	17.59	-
Total	248	489	100	100

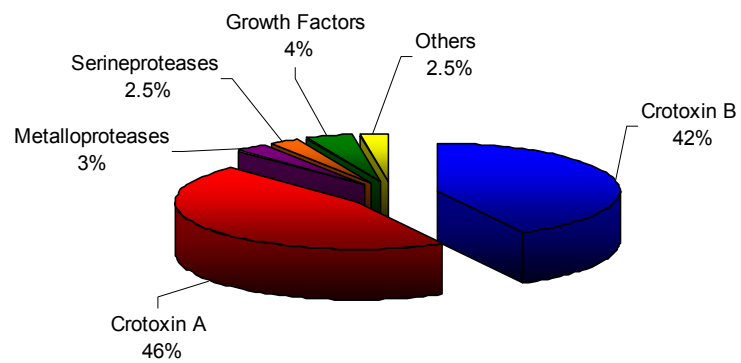
**Table 2.** Catalogue of toxins encoding transcripts from *C. d. collilineatus* cDNA Library

Cluster	N° of ESTs	Bit score (E-value)	BLAST Annotation
Crotoxin B			
CDCP001	62	273 (3e-72)	<a href="#">spP62022/PA2B_CRODU</a> Phospholipase A2 CB1 precursor (Crotoxin basic chain 1)(Phosphatidylcholine 2-acylhydrolase)
CDCP002	3	118 (3e-35)	<a href="#">spP24027/PA2C_CRODU</a> Phospholipase A2 CB2 precursor (Crotoxin basic chain 2)(Phosphatidylcholine 2-acylhydrolase)
CDCP003	8	130 (9e-29)	<a href="#">spP62022/PA2B_CRODU</a> Phospholipase A2 CB1 precursor (Crotoxin basic chain 1)(Phosphatidylcholine 2-acylhydrolase)
CDCP004	1	212 (5-52)	<a href="#">X12603.1</a> Crotalus durissus terrificus RNA for crotoxin B
CDCP005	1	178 (1e-41)	<a href="#">X16100.1</a> Crotalus durissus terrificus mRNA for crotoxin, CB subunit, isoform CB2
CDCP006	3	109 (2e-21)	<a href="#">X16100.1</a> Crotalus durissus terrificus mRNA for crotoxin, CB subunit, isoform CB2
CDCP007	1	95.5 (7e-39)	<a href="#">spO90W39/PA2A_TRIMU</a> Phospholipase A2 trimucrotoxin precursor (Phosphatidylcholine 2-acylhydrolase)
CDCP008	1	71.6 (7e-20)	<a href="#">spQ8JIG0/PA2Q_TRIFL</a> Phospholipase A2 isozyme cPLA-B'(A) precursor (Phosphatidylcholine 2-acylhydrolase)
CDCP009	1	899 (0.0)	<a href="#">U01027.1</a> Crotalus scutulatus scutulatus Mojave Toxin prebasic subunit gene, complete cds
CDCP010	1	125 (5e-26)	<a href="#">U01027.1</a> Crotalus scutulatus scutulatus Mojave Toxin prebasic subunit gene, complete cds
Total ESTs	82		
Crotoxin A (crotopotin)			
CDCP011	73	202 (2e-50)	<a href="#">spP08878/PA2A_CRODU</a> Crotoxin acid chain precursor (CA) (Crotopotin) [Contains: Crotoxin chain A; Crotoxin chain B; Crotoxin chain C]
CDCP012	7	154 (6e-36)	<a href="#">spP08878/PA2A_CRODU</a> Crotoxin acid chain precursor (CA) (Crotopotin) [Contains: Crotoxin chain A; Crotoxin chain B; Crotoxin chain C]
CDCP013	4	66.6 (3e-11)	<a href="#">spP08878/PA2A_CRODU</a> Crotoxin acid chain precursor (CA) (Crotopotin) [Contains: Crotoxin chain A; Crotoxin chain B; Crotoxin chain C]
CDCP014	3	326 (6e-86)	<a href="#">X12606.1</a> Crotalus durissus terrificus mRNA for crotoxin A
CDCP015	2	156 (5e-35)	<a href="#">X12606.1</a> Crotalus durissus terrificus mRNA for crotoxin A
CDCP016	1	188 (5e-45)	<a href="#">X12606.1</a> Crotalus durissus terrificus mRNA for crotoxin A
CDCP017	1	172 (3e-40)	<a href="#">X12606.1</a> Crotalus durissus terrificus mRNA for crotoxin A
Total ESTs	91		
Metalloproteases			
CDCM018	5	645 (0.0)	<a href="#">gb ABA42116.1</a> Metalloproteinase P-II [Crotalus durissus durissus]
CDCM019	1	681 (0.0)	<a href="#">M89784.1</a> Western diamondback rattlesnake preprometalloproteinase;hemorrhagic toxin e; atrolysin e; mRNA, complete cds
Total ESTs	6		
Serineproteases			
CDCS020	4	191 (2e-65)	<a href="#">spQ58G94/VSPB2_CRODU</a> Gyroxin-like B2.1.
CDCS021	1	239 (6e-60)	<a href="#">AF528193.1</a> Macrovipera lebetina serine alpha-fibrinogenase precursor, mRNA, complete cds
Total ESTs	5		
Growth factors			
CDCGF022	6	194 (1e-47)	<a href="#">spQ90X24/TXVE_BOTIN</a> Vascular endothelial growth factor toxin precursor (svVEGF).
CDCGF023	1	253 (2e-64)	<a href="#">AY442328.1</a> Protobothrops mucrosquamatus TM-VEGF precursor mRNA, complete cds
CDCGF024	1	258 (2e-70)	<a href="#">spQ9DEZ9/NGEV_CRODU</a> Venom nerve growth factor precursor (vNGF) .
Total ESTs	8		
Others			
CDCPI025	1	143 (5e-51)	<a href="#">spQ93233/PLIB_AGKBL</a> Phospholipase A2 inhibitor subunit B precursor (PLI-B)
CDC026	1	172 (1e-39)	<a href="#">AF223946.1</a> Crotalus durissus terrificus isolate 9705 crotamine (CRT-P1) gene, complete cds
CDCV027	1	306 (5e-82)	<a href="#">spO93426/CVXA_CRODU</a> Convulxin alpha precursor (CVX alpha)
CDC028	1	231 (9e-36)	<a href="#">AJ238737.1</a> Naja naja atra ctx-4N gene, exons 1-3 for cardiotoxin
CDC029	1	161 (2e-36)	<a href="#">DQ103590.1</a> Ophiophagus hannah Ohanin precursor, gene, complete cds
CDCBP030	1	452 (7e-124)	<a href="#">AB246364</a> Crotalus durissus collilineatus mRNA for angiotensin converting enzyme inhibitor and C-type natriuretic peptide precursor isoform 1, complete cds, clone:CdcBC1.
Total ESTs	6		

A



B



**Figure 6.** The annotated *C. d. collilinetatus* venom gland transcriptome. (A) Relative proportions of toxin encoding, non-toxin encoding and non-significant hits ESTs. (B) Relative proportions of each group of toxin over the total of toxin transcripts.

```

M R A L W I V A V L L V G V E
ATGAGGGCTCTCTGGATAGTGGCCGTGTTGCTGGTGGGCGTCGAG
G H L L Q F N K M I K F E T R
GGGCACCTGCTGCAATTCAACAAGATGATCAAGTTTGAGACAAGG
K N A I P F Y A F Y G C Y C G
AAAAACGCTATTCCCTTCTATGCCTTTTACGGCTGCTACTGTGGC
W G G R G R P K D A T D R C C
TGGGGGGCCGAGGCCGCAAGGACGCCACTGACCGCTGCTGC
F V H D C C Y G K L A K C N T
TTTGTGCATGACTGCTGTTACGGAAAAGTGGCCAAGTGCAACACC
K W D I Y R Y S L K S G Y I T
AAATGGGACATCTATCGCTACAGCTTGAAGAGTGGGTATATCACC
C G K G T W C E E Q I C E C D
TGCGGAAAGGGCACCTGGTGCGAGGAACAGATTTGTGAGTGCGAC
R V A A E C L R R S L S T Y K
AGGGTCGCGGCAGAATGCCTCAGAAGGAGTCTGAGCACGTACAAG
Y G Y M F Y P D S R C R G P S
TATGGATATATGTTTTACCCGACTCTCGTTGCAGGGGGCCTTCA
E T C
GAGACATGC

```

**Figure 7.** cDNA and deduced amino acid sequences of crotoxin B, isoform CDCP001. Underlined residues consists in signal peptide.

A

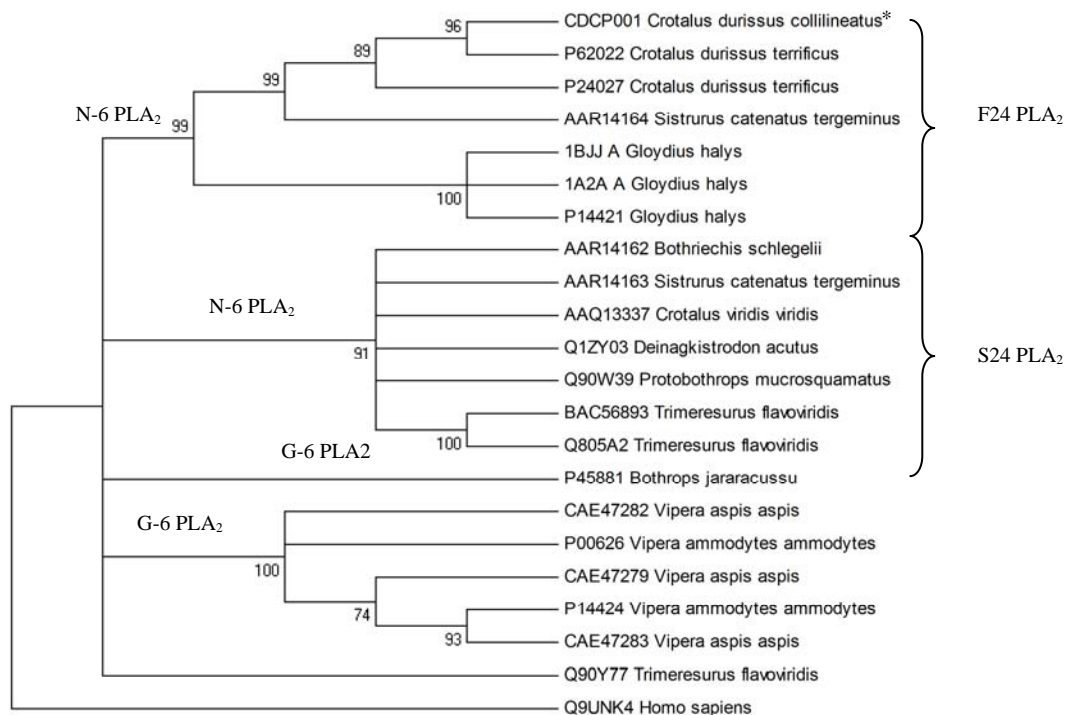
```

CDCP001_Cr      MRALWIVAVL LVGVEGHLLO FNKMIKFETR KNAIPFYAFY GCYCGWGGRG RPKDATDRSCC FVHDCCYGKL AKCNTKWDIY RYSLKSGVIT
2022_Cro       .....S.....V.....Q.....P.....
P24027_Cro     .....S.....V.....Q.....P.....
AAR14164_S     .....N.....N.....N.....PN.D.....S.....F.....
Q90W39_Pro     ..T.....L.....N.....IM.K.....SS.....Q.....K.....TD.SP.S.....S.....W.T.I.I
Q1ZY03_Dei     ..T.....S.....N.....IM.....F.....TS.....W.....S.....Q.....TG.SP.....P.....W.T.V.I
AAR14162_B     ..T.....N.....N.....IM.....G.....Y.SS.....Q.....L.....E.....TD.SP.T.....S.....W.....V.I
1A2A_A_Glo     -----N.....E.....G.....G.....N.....K.....G.....R.....VN.....S.....S.....E.....
P14421_Glo     -----N.....E.....G.....G.....Q.....K.....G.....R.....VN.....S.....S.....E.....
1BJJ_A_Glo     -----N.....E.....G.....G.....Q.....K.....G.....R.....VN.....S.....S.....E.....
AAQ13337_C     ..TF...L.....N.....MM.K.....F.....TS.....E.....TN.SP.T.....S.....W.R.V.I

CGKGTWCBEQ ICECDRVAEE CLRRSLSTYK YGYMFYPDSR CRGPSETC
.....K.....NE.....E.....
.....L.....K.....Q.....
..E..E..KK.....A..V..GHN.R...KR.....FL.TD...K.
..E..P..KE.....A..V..GEN.R...TK.....FL.KK...KQ.
..E..P..K.....V..FGAN.G...KS.....FL.TE...K.
.....N.....F..N.D..N.N...R..K.TET..E.
.....N.....F..N.D..N.N...R..K.TET..E.
.....N.....F..N.D..N.N...R..K.TET..E.
.....P..K.....A..V..F.EN.P...KR.....L.FL.TD...K.

```

B



**Figure 8.** (A) Multiple alignment of deduced amino acid sequence from *C. d. collilineatus* crotoxin B (\*isoform CDCP001) and ten most similar PLA<sub>2</sub> sequences (by BLASTX) from other snake venoms, using ClustalW 2.0 program. Underlined amino acids by continuous trace compound signal peptide and residues matched in black color corresponds to active site (B) Molecular phylogenetic analysis of deduced amino acid sequence from *C. d. collilineatus* crotoxin B, similar PLA<sub>2</sub> sequences (BLASTX) from other snake venoms and human PLA<sub>2</sub> by Neighbor-joining method, using MEGA 4 program. The bootstrap values on branches represent the percentage of trees for which the sequences at one end of the branch form a monophyletic group.



M S M L C Y T L I I A F L I G I W A A P K S E  
 ATGTCCATGCTGTGCTACACTCTGATTATAGCATTTCTGATTGGCATATGGGCAGCACCAAAATCTGAA  
 D N V P L G S P A T S D L S D T S C A K T H E  
 GATAATGTCCCTCTGGGGTCCCCTGCAACATCTGACCTTTCTGACACCAGCTGTGCTAAAACCTCATGAA  
 A L K T S R N I D Q H Y P A P K K A E D Q E F  
 GCTCTGAAAAATCTCGAAAATATAGATCAGCACTATCCTGCTCCTAAAAAGGCAGAGGATCAAGAATTT  
 G S A A N I I V D P K L F Q K R R F Q S P R V  
 GGGTCAGCAGCAAACATCATTGTGGATCCAAAGCTTTTTTCAGAAAAGACGGTTCAGTCCGCTCGTGT  
 L F S T Q P P P L S R D E Q S V D N A N S L N  
 TTGTTCAAGCACTCAGCCCCACCATTTGTCAAGAGATGAGCAAAGTGTGGACAATGCAAACCTCTCTAAT  
 R N I R A K R E D H P V H K R G E Y S V C D S  
 AGGAATATCCGGGCCAAACGTGAAGATCATCCTGTGCATAAACGAGGAGAATATTCTGTGTGTGACAGT  
 V N V W V A N K T T A T D I R G N L V T V M V  
 GTCAATGTCTGGGTTGCCAACAAAACCACAGCAACGGACATCAGAGGCAATCTGGTGACTGTGATGGTG  
 D V N I N N N V Y K Q Y F F E T K C R N P N P  
 GATGTAAACATTAATAACAATGTCTACAAGCAGTACTTTTTTTGAGACCAAGTGCAGAAATCCAAACCCA  
 V P T G C R G I D A R H W N S Y C T T T N T F  
 GTACCAACTGGGTGCAGGGGCATTGATGCCAGGCATTGGAATTCGTATTGCACCACAACACTAACACATTT  
 V K A L T M E G N Q A S W R F I R I D S A C V  
 GTCAAGGCATTAACCATGGAAGGCAATCAGGCATCCTGGCGCTTCATTCCGATTGACAGTGCCTGTGTG  
 C V I S R K N E N F G  
 TGTGTAATCAGTAGAAAAAATGAGAACTTTGGA

**Figure 9.** cDNA and deduced amino acid sequences NGF from *C. d. collilineatus* (CDCGF024). Underlined residues consists in signal peptide.

A

```

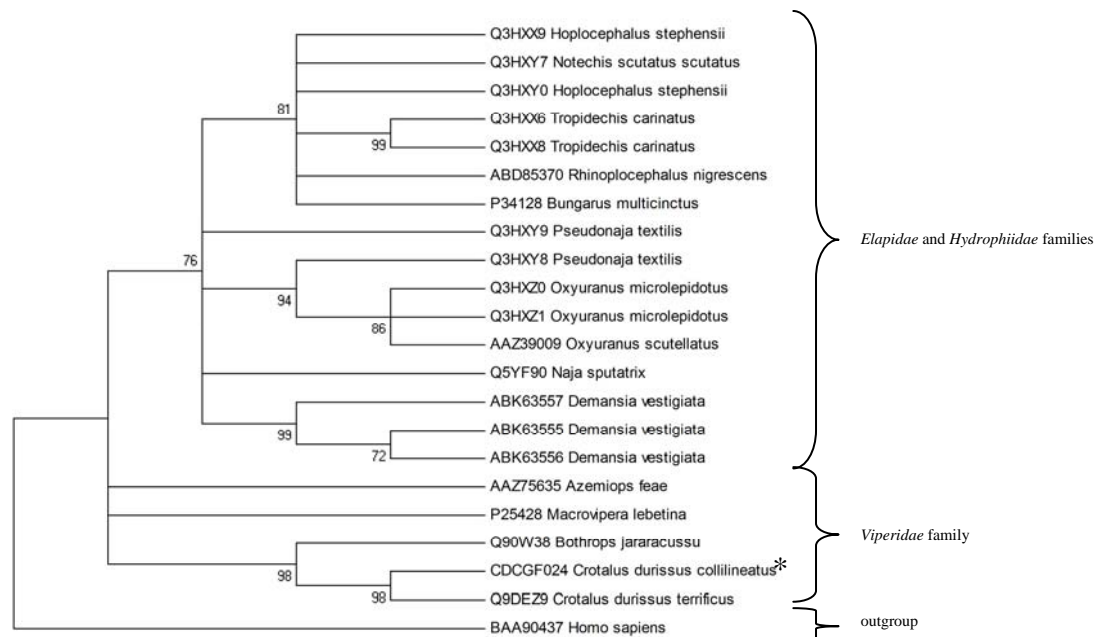
CDCGF024_C  MSMLCYTLII AFLIGIWAAP KSEDNVPLGS PATSDLSDTS CAKTHEALKT SRNIDQHYPY PKKAEDQFEG SAANIIVDPK LFKRRRFQSP RVLFTSQPPP
Q9DEZ9_Cro  .....
Q90W38_Bot  ..... TL.....V.....T.....T.....E.....
P25428_Mac  .....S.....P.....T.....
Q3HXY9_Pse  .....Q..G..T..RH..L.....
Q3HXZ0_Oxy  .....Q..G..T..H.....L.....
Q3HXY0_Hop  .....Q..G..T..RH..L.....N.....
Q3HXZ1_Oxy  .....Q..G..T..RH..L.....
Q3HXX6_Tro  .....V.....Q..G..T..RH..L.....V.....S.....
AAZ39009_O  .....V.....Q..G..T..RH..L.....
Q3HXY8_Pse  .....Q..G..T..RH..L.....LA.....

LSRDEQS---VDNANSLNR NIRAEDH PVHKRGEYSV CDSVNVVWAN KTTATDIRGN LVTVMVDVNI NNNVYKQYFF ETKCRNPNPVTGCRGID
.....
.....D.....N.....V.....
.....VEF-L..D.....AT.....N..F.....S.....V.....KL.....R.....K..S..SS.....
.....VEF-L..EDT.....T.....N.....IS.....K.M..K.K P.....L..H.....S.....
.....VEF-L..EDT.....T.....NL.....IS.....K.M..K.K P.....L..H.F.....S.....
.....VEF-L..EDA.....N.....N..H.....IS..T.....K..K..M.....L..E.....S.....T.....
.....VEF-L..EDT.....T.....NL.....IS.....K.M..K.K P.....L..H.F.....S.....
.....VEF-L..EDA.....T.....N..H.....IS.....N..K..M.....L..E.....S.....
.....VEF-L..EDT.....T.....NL.....IS.....E.M..K.K P.....L..H.F.....S.....
.....VEF-L..EDT.....T.....N.....IS.....K.M..K.K P.....L..H.....Y.....S.....

ARHWSYCTT  TNTFVKALTM EGNQASWRFI RIDSACVCVI SRKNENPFG
.....
.....K.....D.....R.....T.....D.....
.....S.....H.....R.....T.....T.....
.....SG.....Q.....R.....T.....T.....
.....S.....Q.....R.....R.....T.....I..TD..
.....SG.....Q.....R.....T.....T.....
.....S.....QAY.R.....R.....T.....I..TD..
.....SG.....Q.....R.....T.....T.....
.....SG.....Q.....Y.R.....A.....T.....

```

B



**Figure 10.** (A) Multiple alignment of deduced amino acid sequence from *C. d. collilineatus* NGF (CDCGF024\*) and ten most similar NGF sequences (by BLASTX) from other snake venoms, using ClustalW 2.0 program. Underlined amino acids by continuous trace compound signal peptide and residues matched in black color consists in a possible active site (B) Molecular phylogenetic analysis of deduced amino acid sequence from *C. d. collilinetus* NGF, similar NGF sequences (BLASTX) from other snake venoms and human NGF by Neighbor-joining method, using MEGA 4 program. The bootstrap values on branches represent the percentage of trees for witch the sequences at one end of the branch form a monophyletic group.

## 2.5. References

ABLETT, E.; SCOTT, G.; SHELTON, D.; GRAHAN, M. W.; BAVERSTOK, P.; LEE, L. S.; HENRY, R. Analysis of grape ESTs: global gene expression patterns in leaf and berry. **Plant Sci.** v. 159, p. 87-95. 2000.

AIRD, S. D.; KAISER, I. I.; LEWIS, R. V.; KRUGGEL, W. G. Rattlesnake presynaptic neurotoxins: primary structure and evolutionary origin of the acid subunit. **Biochemistry.** V. 24, p. 7054-7058, 1985.

AIRD, S. D.; KAISER, I. I.; LEWIS, V. R.; KRUGGEL, W. G. A complete amino acid sequence for the Basic Subunit of Crotoxin. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 249, n. 2, p. 296-300, 1986.

AMORA, D. N.; SAOUZA, T. S.; MATINS, A. M. C., BARBOSA, P. S. F.; MAGALHÃES, M. R.; TOYAMA, M. H., FONTELES, M. F.; MENEZES, D. B.; MONTEIRO, H. S. A. Effects of *Crotalus durissus collilineatus* venom in the isolated rat kidney. **Toxicon.** v. 47, p. 260-264, 2006.

BAKER, B.J.; WONGVIBULSIN, S.; NYBORG, J.; TU, A.T. Nucleotide sequence encoding the snake venom fibrinolytic enzyme atroxase obtained from a *Crotalus atrox* venom gland cDNA library. **Arch Biochem Biophys.** v. 10 n.317 (2) p. 357-64, 1995.

BARRAVIEIRA B. **Venenos animais: uma visão integrada.** Rio de Janeiro: Editora de Publicações Científicas, 1995. 411p.

BON, C.; BOUCHIER, C.; CHOUMET, V.; FAURE, G.; JIANG, M. S; LAMBEZAT, M. P.; RADVANYI, F.; SALIOU, B. Crotoxin, half-century of investigations on a phospholipase A<sub>2</sub> neurotoxin. **Act. Physiol. Pharmacol. Latinoam.** v. 39, p. 439-448, 1989.

BOUCHIER, C.; BOULAIN, J. C.; BON, C.; MÉNEZ, A. Analysis of cDNA encoding the two subunits of crotoxin, a phospholipase A<sub>2</sub> neurotoxin from rattlesnake

venom: the acid non enzymatic subunit derives from a phospholipase A<sub>2</sub>-like precursor. **Biochimica and Biophysica Acta**. v. 1088, p. 401-408, 1991.

BREITHHAUPT, H., Enzymatic characteristics of *Crotalus* phospholipase A<sub>2</sub> and the crotoxin complex. **Toxicon**, v.14, p.221-233, 1976.

CALVETE, J. J.; MARCINKIEWICZ, C.; SANZ, L. Snake venomomics of *Bitis gabonica gabonica*. Protein family composition, subunit organization of venom toxins and characterization of dimeric disintegrins bitisgabonin-1 and bitisgabonin-2. **Journal of Proteome Research**. 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.

CHANG, C. C. & SU, M. J. A study on the interaction of crotapotina with crotoxin phospholipase A<sub>2</sub> notexin and other presynaptic neurotoxins. **Br. J. Pharmac.** V. 73, p. 495-503. 1981.

CHEN, Y. H.; WANG, Y. M.; HSEU, M. J. HSEU, M. J.; TSAI, I. H. Molecular evolution and structure-activity relationships of crotoxin-B like asparagin 6 phospholipase A<sub>2</sub> in pit viper venoms. **Biochem. J.** v. 381, p. 61-73, 2004.

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.

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

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.

DESHIMARU, M.; OGAWA, T.; NAKASHIMA, K.; NOBUHISA, I.; CHIJIWA, T.; SHIMOHIGASHI, Y.; FUKUMAKI, Y.; NIWA, M.; YAMASHINA, I.; HATTORI, S.; OHNO, M.; Accelerated evolution of *Crotalinae* snake venom gland serine proteases. **FEBS Lett.** v. 397 n. 1, p. 83-8, 1996.

FAURE, G.; CHOUMET, V.; BOUCHIER, C.; CAMOIN, L.; GUILLAUME, J.; MONEGIER, B.; VUILHORGNE, M.; BON, C. The origin of diversity of crotoxin isoforms in the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **FEBS.** V. 223, p. 161-164, 1994.

FAURE, G.; GUILLAUME, J. L.; CAMOIN, L.; SALIOU, B.; BON, C. Multiplicity of acidic subunit isoforms of crotoxin, the phospholipase A2 neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom, results from posttranslational modifications. **Biochemistry.** v. 30, n. 32, p. 8074-83, 1991.

FRANCISCHETTI, I. M.; GOMBAROVITS, M. E.; VALENZUELA, J. G.; CARLINI, C. R.; GUIMARÃES, J. A. Intraspecific variation in the venoms of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.** v.127, n. 1, p. 23-36, 2000.

HENDON, R. A. & FRANENKEL-CONRAT, H. Biological role of the two components of crotoxin. **Proc. Natn. Acad. Sci. USA.**, v. 68, p. 1560-1563, 1971.

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.

HITE, L.A.; SHANNON, J.D.; BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. Sequence of a cDNA clone encoding the zinc metalloproteinase hemorrhagic toxin e from *Crotalus atrox*: evidence for signal, zymogen, and disintegrin-like structures. **Biochemistry.** v. 14 n.31(27) p. 6203-11, 1992.

HOWGOOD, B. J. Crotoxin, the phospholipase A2 neurotoxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Mem. Inst. Butantan.** v. 52, p. 21-22. 1990.

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.

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<sup>1</sup>: l-gene expression profile of highly expressed phospholipases A<sub>2</sub>. **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.

KINI, R. M. Review: Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. **Toxicon**. v. 42, n. 8, 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.

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

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.

KULKEAW, K.; CHAICUMPA, W.; SAKOLVAREE, Y.; TONGTAWE, P.; TAPCHAISRI, P. Proteome and immunome of the venom of the Thai cobra, *Naja kaouthia*. **Toxicon**. v. 49, n. 7, p. 1026-41, 2007.

LEDUC, M. & BON, C. Cloning of subunits of convulxin, a collagen-like platelet-aggregating protein from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Biochem, J.** v. 333, p. 389-393, 1998.

LENNON, B. W. & KAISER, I. I. Isolation of a crotoxin-like protein from the venom of a South-American rattlesnake (*Crotalus durissus collilineatus*) **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 97B, n. 4, p.695-699, 1990.

LOUGHLIN, S. E.; FALLON, J. H. **Neurotrophic Factors**, San Diego: Academic Press, 1993.

MASUDA, S.; MAEDA, H.; MIAO, J.Y.; HAYASHI, H.; ARAKI, S. cDNA cloning and some additional peptide characterization of a single-chain vascular apoptosis-inducing protein, VAP2. **Endothelium.** v. 14 n.2 p. 89-96, 2007.

MASUDA, S.; OHTA, T.; KAJI, K.; FOX, J.W.; HAYASHI, H.; ARAKI, S. cDNA cloning and characterization of vascular apoptosis-inducing protein 1. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 11 n. 278(1) p.197-204, 2000.

MÉNEZ, A. 'Venomics' or: The venomous systems genome project. **Toxicon.** v. 47, p. 255-259, 2006.

MORÍS, G. & VEGA, J. A. Neurotrophic factors: basis for their clinical application. **Neurologia.** v. 18, n. 1, p. 18-28, 2003.

NAKASHIMA, K.; NOBUHISA, I.; DESHIMARU, M.; NAKAI, M. OGAWA, T.; SHIMOHIGASHI, Y.; FUKUMAKI, Y.; HATTORI, M.; SAKAKI, Y.; HATTORI, S.; OHNO, M. Accelerates evolution in the protein-coding regions is universal in *Crotalinae* snake venom gland phospholipase A<sub>2</sub> isozyme genes. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 92, p. 5606-5609, 1995.

NOBUHISA, I.; NAKASHIMA, K.; DESHIMARU, M.; OGAWA, T.; SHIMOHIGASHI, Y.; FUKUMAKI, Y.; SAKAKI, Y.; HATTORI, S.; KIHARA, H.; OHNO, M. Accelerated evolution of *Trimeresurus okinavensis* venom gland phospholipase A<sub>2</sub> isozyme-encoding genes. **Gene.** v. 172, n. 2, p. 267-72, 1996.

OSHIMA-FRANCO, Y.; HYSLOP, S.; PRADO, J. F.; CRUZ M. A. H.; RODRIGUEZ L. S. Neutralizing capacity of antisera raised in horses and rabbits against *Crotalus durissus terrificus* (South-American rattlesnake) venom and its main toxin, crotoxina. **Toxicon**. v. 37, p. 1341-57, 1999.

PAHARI, S.; MACKESSY, S. P.; LINI, M. R. The venom gland transcriptome of Desert Massasauga rattlesnake (*Sistrurus catenatus edwardsii*) towards an understanding of venom composition among advanced snakes (superfamily *Colubroidea*). **BMC Mol. Biol.** v. 8, n.1. 2007. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2199/8/115>>. Acesso em: 15 dez 2007.

RÁDIS-BAPTISTA, G.; OGUIURA, N.; HAYASHI, M.A.; CAMARGO, M.E.; GREGO, K.F.; OLIVEIRA, E.B.; YAMANE, T. Nucleotide sequence of crotoxin isoform precursors from a single South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). **Toxicon**. v. 37 n. 7 p. 973-84, 1999.

RANGEL-SANTOS, A.; DOS-SANTOS, E. C.; LOPES-FERREIRA, M.; LIMA, C.; CARDOSO, D. F.; MOTA, I. A. Comparative study of biological activities of crotoxin and CB fraction of venoms from *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus*. **Toxicon**. v. 43, n. 7, p. 801-10, 2004.

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.

SANCHEZ, E. F.; FREITAS, T. V.; FERREIRA-ALVES, D. L.; VELARDE, D. T.; DINIZ, M. R.; CORDEIRO, M. N.; AGOSTINI-COTTA, G.; DINIZ, C. R. Biological activities of venoms from South American snakes. **Toxicon**. v. 30, n. 1, p. 95-103, 1992.

SANTORO, M. L.; SOUSA-e-SILVA, M. C. C.; GONÇALVES, L. R. C.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; CARDOSO, D. F.; LAPORTA-FERREIRO, L. I.; SAIKI, M.; PERES, C. A.; SANO-MARTINS, I. S. Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of South-American rattlesnake (*Crotalus durissus*



*terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collilineatus*) **Comp. Biochem. Physiol.** v. 122C, p. 61-73, 1999.

SARAVIA, P.; ROJAS, E.; ARCE, V.; GUEVARA, C.; LÓPEZ, J. C.; CHAVES, E.; VELÁSQUEZ, R.; ROJAS, G.; GUTIÉRREZ, J. M. Geographic and ontogenic variability in the venom of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus*: pathophysiological and therapeutic implications. **Rev. Biol. Trop.** v. 50, n. 1, p. 337-346, 2002.

SCHMIDT, M. E.; ABDELBAKI, Y. Z.; TU, A. T. Nephrotoxic action of rattlesnake and sea snake venoms: an electron-microscopic study. **J. Path.** v. 118, p. 49-53, 1976.

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

TAKAHASHI, H.; HATTORI, S.; IWAMATSU, A.; TAKIZAWA, H. A novel snake venom vascular endothelial growth factor (VEGF) predominantly induces vascular permeability through preferential signaling via VEGF receptor-1. **The J. Biol. Chem.** v. 279, n.44, p. 46304-46314, 2004.

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

TSAI, L. H.; LU, P. J.; WANG, Y. M.; HO, C. L.; LIAW, L. L. Molecular cloning and characterization of a neurotoxic phospholipase A<sub>2</sub> from the venom of Taiwan Habu (*T. mucrosquamatus*). **Biochem. J.** v. 311, p. 895-900, 1995.

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 metalloproteases and a new group of putative toxins, rennin-like aspartic proteases. **GENE.** v. 377, p. 21-32, 2006.

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 A<sub>2</sub> homologue expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli*. **Protein. Expr Purif.** v. 21, n. 21, p. 134-140, 2001.

YAMAZAKI, Y. & MORITA, T. Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors. **Mol. Diversity.** v. 10, p. 515-527, 2006.

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), **The J. Biol. Chem.** v. 278, n. 52, p. 51985-51988, 2003.

ZHANG, B.; LIU, Q.; YIN, W.; ZHANG, X.; HUANG, Y.; LUO, Y.; QIU, P.; SU, X.; YU, J.; HU, S.; YAN, G. Transcriptome analysis of *Deinagkistrodon acutus* venomous gland focusing on cellular structure and aspects using expressed sequence tags. **BMC genomics.** v. 7, n. 152, 2006. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pubmed&pubmedid=16776837>> Acesso em: 10 nov 2007.

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.

---

## **ANEXOS**

---

## Anexo I

### Normas para Confecção da Versão Final da Dissertação de Mestrado

Disponível em: [www.cogeb.ufu.br](http://www.cogeb.ufu.br)

#### I. Capa

Deve constar:

- Universidade Federal de Uberlândia
- Instituto de Genética e Bioquímica
- Pós-graduação em Genética e Bioquímica
- Título da dissertação
- Nome do aluno
- Uberlândia-MG
- Ano da defesa

#### II. Papel: Tamanho A4

Margens

Superior	3,0 cm
Inferior	2,5 cm
Esquerda	3,0 cm
Direita	2,5 cm

Fonte: Arial 12, espaço 1,5

#### III. Ordenação do conteúdo

O mestrado e doutorado serão escritos sob a forma de capítulos. Tanto o boneco quanto a versão final deverão ter a seguinte forma:

- 1 capa
- 1 contra capa identificando: Curso, título, aluno, orientador, informes sobre a titulação, cidade e ano

- Ficha catalográfica: deve ser colocada nas costas da contra capa. A ficha catalográfica será elaborada pela Biblioteca do Sta. Mônica
- Palavras-chave: Devem ser colocadas abaixo da Ficha catalográfica na contra capa
- Folha de rosto com: Curso, título, aluno, comissão examinadora, cidade e data
- Dedicatória
- Agradecimentos
- Índice/sumário
- Apresentação:
  - Deverá ser uma síntese do tema pesquisado, situando-o no contexto geral sobre o conhecimento atual do assunto
  - Não deverá trazer citações bibliográficas
  - Será finalizada com a apresentação dos capítulos com enfoque nos objetivos destes
- Capítulo I: Este capítulo é composto pela fundamentação teórica e suas referências bibliográficas
- Capítulo(s)
  - Título
  - Resumo (com palavras chaves) e abstract (com key words) referentes ao capítulo
  - Se o capítulo foi publicado, pode ser apresentado tanto na forma de separata quanto na forma do texto original do editor de texto, se foi ou está para ser submetido, constar a revista
  - Cada capítulo deverá ser escrito em português ou Inglês
- Opcional
  - Anexar ao final da dissertação os protocolos utilizados em metodologias para desenvolvimento da pesquisa
  - Fazer um capítulo com resultados complementares - para resultados que ainda serão complementados para fins de publicação, mas que são relevantes e merecem uma “short communication”.