

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução

Análise do transcriptoma da glândula venenífera de
Rhinocerophis alternatus (Bothrops alternatus)

Identificação de metaloproteases e desintegrinas

Silvia Naomi Soida Hirayama

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo

São Carlos – 2011

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução

Análise do transcriptoma da glândula venenífera de
Rhinocerophis alternatus (Bothrops alternatus)

Identificação de metaloproteases e desintegrinas

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Genética
e Evolução como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Genética
e Evolução.

Silvia Naomi Soida Hirayama

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo

São Carlos – 2011

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

H668at

Hirayama, Silvia Naomi Soida.

Análise do transcriptoma da glândula venenífera de *Rhinocerothis alternatus* (*Bothrops alternatus*): identificação de metaloproteases e desintegrinas / Silvia Naomi Soida Hirayama. -- São Carlos : UFSCar, 2011. 66 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. DNA recombinante. 2. Biblioteca de cDNA. 3. Metaloprotease. 4. Alternagina-C. 5. *Rhinocerothis alternatus*. I. Título.

CDD: 574.873282 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA DA GLÂNDULA
VENENÍFERA DE *RHINOCEROPHIS ALTERNATUS*
(*BOTHROPS ALTERNATUS*). IDENTIFICAÇÃO DE
METALOPROTEASES E DESINTEGRINAS.**

Dissertação de Mestrado de **Silvia Naomi Soida Hirayama**

Banca Examinadora

Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo



Prof. Dr. Otávio Henrique Thiemann



Profa. Dra. Nancy Oguiura



Há três coisas na vida que nunca voltam atrás: a flecha lançada, a palavra pronunciada e a oportunidade perdida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu namorado Willian por todo amor, dedicação e por estar sempre ao meu lado. Agradeço também á minha querida sogra Lucia pelas grandes lições que vou levar pela vida toda. Muito obrigada por me deixarem fazer parte de suas vidas.

Agradeço ao meu pai por me mostrar como ser uma pessoa de caráter, a minha querida mãe que mesmo do outro lado do mundo me apoiou como ninguém mais o faria e as minhas queridas irmãs, Carina e Suzana, por me acompanharem em todas as etapas de minha vida. Muito obrigada pelo apoio e confiança que depositaram em mim. Amo todos vocês!

As minhas companheiras da República Normais que mais do que amigas se tornaram irmãs pra mim nesses dois anos. Vocês significam muito pra mim Fe, Mari, Taci, Bru e a nossa itinerante Fabi muito obrigada pelos momentos de diversão pelas conversas e conselhos. Vocês são a minha segunda família. Obrigada por tudo!

Aos meus colegas do LBBM. Em especial a Carmen pelos vários puxões de orelha saiba que você será pra sempre um exemplo de força e determinação tenho muito orgulho de dizer que sou sua amiga, a Juliana que também me acompanhou nessa caminhada gostaria de agradecer pelo ombro amigo e bons conselhos, a Kelli sempre doce e meiga, pronta pra ajudar a todos, mas que por dentro é uma guerreira, a Ana e a Sabrina que já seguiram por outros caminhos e fazem muita falta obrigada pelos momentos de descontração e amizade, lhes desejo toda sorte; a Verônica e a Patty minhas amiguinhas, ex-ICs, sei da capacidade de vocês fico muito feliz em ter podido acompanhar vocês nessa caminhada. A Grazielle, você é um pessoa muito especial, fico muito feliz de por ter cruzado meu caminho. A Beth Irene a bisavó mais jovem que eu conheço, tanto por dentro quanto por fora, continue sempre assim feliz e sorridente. Agradeço também à Carol, Dani, Cyntia, e Lívia pelos momentos de descontração e pelas conversas enriquecedoras.

A todos do Laboratório de Biologia Molecular (LBM) de DGE por todo apoio. Sou grata principalmente ao Fernando sem o qual este trabalho não seria realidade, a Adelita, Danny, Danilo, Darlan e ao Wesley, pelo auxílio nos experimentos e pelas conversas nos longos intervalos dos procedimentos e ao Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva por ter me recebido em seu laboratório de portas abertas. Muito obrigada!

A minha querida e eterna chefinha Mônica que me ensinou os caminhos da pesquisa e me contagiou com a sua paixão pelo saber. Muito obrigada você será para sempre um exemplo de vida como pesquisadora e, acima de tudo, como mulher.

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Heloisa por sua confiança, paciência e dedicação, por acreditar em meu potencial.

Agradeço ao CNPq e ao CAPES pela bolsa de pesquisa.

RESUMO

As desintegrinas são polipeptídeos sem atividade enzimática, ricos em cisteína, geralmente encontrados no veneno de serpentes, possuidoras de um motivo adesivo reconhecedor de integrinas antagonizando ou agonizando a atividade das mesmas. Diversos grupos de pesquisa vêm estudando desintegrinas de venenos de serpentes com o foco em aplicação farmacológica nos processos de progressão e proliferação tumoral, angiogênese, coagulação sanguínea, e osteoporose. Este trabalho apresenta os resultados da construção da biblioteca de cDNA da glândula venenífera de *Rinocerophis alternatus* e a clonagem e expressão da ALT-C, uma tipo desintegrina, em sistema bacteriano. A biblioteca foi composta por 812 sequências que foram classificadas em: (i) codificantes para proteínas hipotéticas ou sem equivalência nos bancos de dados (*unknown*) correspondendo a 20,94%; (ii) transcritos para produtos celulares 17,86%; e (iii) transcritos codificantes para proteínas tóxicas 61,21%. Dentre as proteínas tóxicas as SVMPS foram os transcritos mais abundantes com 58,59% dos compostos tóxicos do tecido. Os demais transcritos tóxicos encontrados foram as lectinas do tipo-C (15,56%), peptídeos potenciadores de bradicinina (11,8%), serinoproteases (5,18%), proteínas secretórias ricas em cisteína (2,28%), fatores de crescimento endotelial vascular (2,28%), L-aminoácido oxidases (1,86%) e fosfolipases A2 (1,45%). As percentagens encontradas correspondem aos efeitos do veneno dessa serpente, que possui baixa atividade enzimática e predominate ação hemorrágica e de alteração na coagulação sanguínea derivada da ação das SVMPS, lectinas do tipo-C e serinoproteases. Um dos *contigs* para SVMPS foi eleito pela similaridade com a ALT-C. A sequência determinada por esse *contig* foi denominada ALT-C-h (homóloga da ALT-C) por apresentar 4 substituições conservativas da sequência determinada anteriormente. A sequência foi utilizada em PCR para inclusão de sítio de restrição para *Bam*HI e *Eco*RI, clonado em pGEX4T-1 e transformados em *E. coli* AD494(DE3) para ensaios de expressão. O cultivo foi crescido até a fase *log* e a indução expressão realizada com IPTG por 3 horas, a identidade da proteína expressa foi confirmada por *western blotting* utilizando anticorpo policlonal anti-ALT-C. A construção da biblioteca de cDNA da glândula venenífera de *R. alternatus* fornece uma fonte de estudo interessante de biomoléculas ativas nos venenos como, por exemplo, as desintegrinas visando aplicações farmacológicas para patologias envolvendo integrinas como angiogênese, progressão e metástase tumoral.

ABSTRACT

The desintegrinas are cys-rich polypeptides without enzymatic activity, some found in snake venoms with an adhesive motif to integrin, unleashing distinct responses. Several research groups have been studying snake venom disintegrins with focus in pharmacological applications in tumor progression and proliferation, angiogenesis, blood clotting, and osteoporosis. This work shows the results of the construction of cDNA library of *Rhinocerophis alternatus* venom gland, cloning and expression of ALT-C, a disintegrina-like protein, in bacterial system. The library was comprised of 812 sequences that were classified into: (i) coding for hypothetical protein or mismatched in databases (unknown) corresponding to 20.94%; (ii) transcripts for cellular process 17.86%; and (iii) transcripts coding for toxic protein with 61.21%. Among toxic proteins the SVMs were the most abundant transcripts 58.59%. Other toxic transcripts were C-type lectins (15.56%), bradykinin potentiating peptides (11.8%), serineproteases (5.18%), cys-rich secretory proteins (2.28%), vascular endothelial growth factors (2.28%), L-amino acid oxidases (1.86%) and phospholipases A2 (1.45%). The percentages correspond to this snake venom effects, low enzymatic activity and hemorrhagic and clotting activity as main action, derived from the SVMs, C-type lectin and serineproteases. One of the SVMs *contigs* were chosen based on the similarity with ALT-C, the defined sequence was called ALT-C-h (ALT-C homologue) since there has 4 conservative substitutions compared to the previously determined sequence. The ALT-C-h sequence was used in PCR to inclusion the restriction site for *Bam*HI and *Eco*RI, cloned in pGEX4T-1 and transformed into *E. coli* AD494 (DE3) for expression. The cell culture was grown until the log fase and induced with IPTG for 3 hours, the expressed protein's identity was confirmed by Western Blotting using Polyclonal antibody Anti-ALT-C. The construction of the *R. alternatus* venom gland cDNA library provides a source of interesting active biomolecules, such as desintegrinas, to pharmacological applications in pathologies involving integrins like angiogenesis, tumor progression and metastasis.

LISTA DE ABREVIACÕES

3-FTx	Proteína tóxica de três dedos (<i>three-finger toxin</i>)
ACE	Enzima conversora de Angiotensina I (<i>Angiotensin Converting Enzyme</i>)
ADAM	Proteína multimodular que apresenta os domínios metaloprotease e similar a desintegrina (<i>A Disintegrin And Metalloprotease</i>)
ALT-C	Alternagina-C
AP	Fosfatase alcalina (<i>Alkaline Phosphatase</i>)
BCIP	5-Bromo-4-Choro-3'-Indolil fosfato p-Toluidina
BLAST	Programa computacional para busca de homologias locais entre sequências de ácidos nucléicos e proteínas (<i>Basic Local Aligment Search Tool</i>)
BPP	Peptídeo potenciador de bradicinina (<i>Bradykinin Potentiating Peptide</i>)
bFGF	Fator de crescimento de fibroblastos (<i>basic fibroblast growth factor</i>)
cDNA	Fita de DNA complementar a um mRNA
CRISP	Proteína secretória rica em cisteína (<i>Cys-rich secretory protein</i>)
Da	Dalton, unidade de massa molecular
DC	Domínios Desintegrina e Rico em cisteína
dCAS	<i>Pipeline</i> utilizado para processamento dos dados derivados de sequenciamento (<i>Desktop cDNA Annotation System</i>)
DDBJ	Banco de dados de sequências de DNA do Japão (<i>DNA Data Bank of Japan</i>)
ddA	Dideoxiadenosina
ddC	Dideoxicitosina
ddG	Dideoxiguanosina
ddT	Dideoxitimina
DEPC	Dietil pirocarbonato
DisBa-01	Desintegrina de <i>Bothrops alternatus</i>
DNA	Ácido desoxiribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfatados
DOx	Densidade óptica em comprimento de onda x em nm

EBI	Instituto europeu de bioinformática (<i>European Bioinformatics Institute</i>)
EBML	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
ECM	Matriz Extracelular (E xtracellular M atrix)
EDTA	Ácido etileno diaminotetra acético (<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
EST	<i>Expressed Sequence Tags</i>
FAK	Quinase de Adesão focal (<i>Focal Adhesion Kinase</i>)
GST	Glutathiona S -Transferase
GTE	Solução tamponada de Tris, EDTA e Glicose
GO	<i>Gene Ontology</i>
H	Alpha hélice
HCR	Região Hiperconservada (<i>Highly Conserved Region</i>)
HVR	Região Hipervariável (<i>Hyper Variable Region</i>)
HUVEC	Célula Endotelial Vascular Humana (<i>Human Vascular Endothelial Cell</i>)
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular-1 (<i>Inter-Cellular Adhesion Molecule-1</i>)
KOG	Banco de dados para identificação de sequências parálogas ou ortólogas (<i>Eukaryotic Orthologous Groups</i>)
LAO	L-aminoácido oxidase
LB	Meio de cultivo para bactérias (<i>Luria Bertani</i>)
MCS	Sítio múltiplo de clonagem (<i>Multiple Cloning Site</i>)
MM	Marcador m olecular
MMP	Metaloprotease de matriz (<i>Matrix metalloprotease</i>)
mRNA	R NA mensageiro
NAD	N icotinamida a denina d inucleotideo
nm	Nanômetro
NBT	<i>Nitro-Blue Tetrazolium Chloride</i>
NCBI	Centro de Informações Biotecnológica dos Estados Unidos (<i>National Center for Biothecnology Information</i>)
OMS	O rganização M undial da S aúde
ORF	Fase aberta de leitura (<i>Open Reading Frame</i>)

pb	P ares de b ases
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
Pfam	Banco de dados de famílias proteicas (<i>Protein family sequence database</i>)
PLA2	Fosfolipase A2 (<i>Phospholipase A2</i>)
PDB	Banco de dados com informações sobre proteínas (<i>Protein Data Bank</i>)
PDI	(<i>Protein Disulphide Isomerase</i>)
poli-dA	Oligonucleotídeo composto por poli-desoxiadeninas
poli-dT	Oligonucleotídeo composto por poli-desoxitimas
qsp	Q uantidade suficiente p ara
RefSeq	Banco de dados do NCBI com seqüências curadas (<i>Reference Sequence</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
rpm	R otações p or m inuto
rRNA	RNA ribossomal
RRNA	Banco de dados com seqüências de RNA ribossomal (<i>Ribosomal RNA Database</i>)
S	Folha beta pregueada (<i>Sheet</i>)
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio (<i>Sodium Duodecyl Sulfate</i>)
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
SMART	<i>Simple Modular Architecture Research Tool</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polimorfism</i>
SVMP	Metaloprotease de veneno de serpente (<i>Snake Venom Metalloprotease</i>)
TBS	Solução tamponada com Tris e NaCl
TBST	Solução tamponada com Tris, NaCl e <i>Tween 20</i>
TE	Solução Tamponada com Tris e EDTA
UFC	U nidades F ormadoras de C olônia
VCAM-1	Molécula de adesão célula vascular-1 (<i>Vascular cell adhesion Molecule-1</i>)
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)
VEGFR	Receptor de fator de crescimento vascular endotelial (<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>)

MOTIVOS ADESIVOS (DESINTEGRINAS)

ECD	Ácido glutâmico – Cisteína - Ácido aspártico
KGD	Lisina – Glicina - Ácido aspártico
KTS	Lisina – Treonina - Serina
RGD	Arginina - Glicina - Ácido aspártico
MGD	Metionina - Glicina - Ácido aspártico
MLD	Metionina – Leucina - Ácido aspártico
MVD	Metionina - Valina - Ácido aspártico
RTS	Arginina - Treonina - Serina
VGD	Valina - Glicina - Ácido aspártico
WGD	Triptofano - Glicina - Ácido aspártico

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Classificação das Desintegrinas.....	17
Tabela 2 – Motivos adesivos das desintegrinas e suas afinidades.	18
Tabela 3- Linhagens bacterianas utilizadas nesse estudo.	25
Tabela 4 - Plasmídeos utilizado nesse estudo.	25
Tabela 5 - Incremento de ESTs nos transcritos tóxicos das bibliotecas de cDNA das glândulas veneníferas de <i>R. alternatus</i> e <i>B. insularis</i> . (A) <i>R. alternatus</i> (este trabalho); (B) <i>R.alternatus</i> (Cardoso <i>et al.</i> , 2010); (C) <i>B. insularis</i> (Junqueira-De-Azevedo <i>et al.</i> , 2002); (D) <i>B.insularis</i> (Valente <i>et al.</i> , 2009).	52
Tabela 6 - Comparação entre as percentagens dos principais compostos tóxicos das bibliotecas de cDNA da glândula venenifera e do proteoma do veneno de <i>R. alternatus</i> . (A) Biblioteca de cDNA de <i>R. alternatus</i> (Este trabalho). (B) Biblioteca de cDNA de <i>R. alternatus</i> (Cardoso <i>et al.</i> , 2010). (C) Proteoma do veneno de <i>R. alternatus</i> (Ohler <i>et al.</i> , 2010).	53

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Aparelho inoculador da serpentes *Daboia sp* membro da família Viperidae, com dentição solenóglifa. (A) Espécime dissecado. (B) Diagrama do espécime dissecado. (Retirado de Warrel, 2010). 2
- Figura 2** – Acidente botrópico de nível grave. Pode-se notar o edema local intenso com a formação de bolhas e hemorragia local. (Retirado de Cobras Brasileiras. Disponível em < <http://www.cobrasbrasileiras.com.br/tratamento-acidente-bothrops.html>> Acesso em: Dezembro - 2010). 4
- Figura 3** – Filograma derivado das análises de caracteres morfológicos e moleculares empregado na reclassificação das serpentes do antigo gênero *Bothrops*. As letras indicam as linhagens principais: **A** – *Bothrocophias* – *Bothrocophias*, **B** – *Bothrops alternatus* - *Rhinocerophis*, **C** – *Bothrops jararaca* – *Bothropoides*, **D** – *Bothriopsis* – *Bothriopsis* e **E** – *Bothrops atrox* – *Bothrops* (Fenwick et al., 2009). 5
- Figura 4** - *Rhinocerophis alternatus* e sua distribuição (Retirado e modificado de Cobras Brasileiras – Disponível em < http://www.cobrasbrasileiras.com.br/bothrops_alternatus.html > Acesso em: Novembro - 2010). 6
- Figura 5** – Sistema de controle da pressão arterial Renina/Angiotensina. (1) Quando há queda na pressão sanguínea células do epitélio renal liberam Renina, (2) a Renina converte o Angiotensinogênio em Angiotensina I que por sua vez, (3) é convertido em Angiotensina II pela enzima conversora de Angiotensina I (ACE). (4) A Angiotensina II age sobre a glândula supra-renal liberando Aldosterona que nos rins aumenta a retenção de sal e assim leva ao aumento da pressão sanguínea. Os peptídeos potenciadores de bradicinina (BPPs) agem inibindo a atividade da ACE bloqueando essa via. (Retirado e Modificado de Manual Merk de Saúde para família). Disponível em <http://www.msdlatinamerica.com/assets/hcp/publicaciones/mmerck_hogar/seccion_03/seccion_03_025.html> Acesso: Novembro-2010). 11
- Figura 6** - Esquema de classificação das SVMs. Os pontos de interrogação (?) na Figura indicam que o produto processado ainda não foi identificado no veneno (retirado de Fox & Serrano, 2008). 13
- Figura 7** – Alinhamento das SVMs nos grupos PIII-HCR (*Hyper Conserved Region*) e PIII-HVR (*Highly Variable Region*). (a) Alinhamento dos domínios DC da botropasina com outros homólogos. Os domínios altamente conservados de ligação ao Ca⁺² II e III e a região hiper conservada estão

- destacados em verde, laranja e azul respectivamente, compondo o agrupamento PIII-HCR.(b) O alinhamento dos domínios DC de outras SVMPs mostrando a ausência de conservação das P-III HVR comparada com outras proteínas do mesmo grupo. Os domínios altamente conservados de ligação ao Ca^{+2} II e III e a região hiper variável estão destacados em verde, laranja e azul respectivamente, compondo o agrupamento PIII-HVR (Retirado de Muniz *et al.*, 2008). 14
- Figura 8** - Estrutura tridimensional da botropasina em complexo com o inibidor POL647. O domínio metaloprotease (M em azul claro), o domínio tipo-desintegrina (D em amarelo) e o domínio rico em cisteína (C em rosa) A esfera em vermelho representa o íon Zn^{2+} e as esferas azuis os íons Ca^{2+} . (Retirado e modificado de Muniz, et. al., 2008). 16
- Figura 9** - As integrinas e suas especificidades. As integrinas podem ser divididas em quatro grupos de acordo com a sua afinidade por seus ligantes em: receptores RGD, receptores para colágeno, receptores para laminina e receptores específicos para leucócito (Retirado e modificado de Hynes, 2002). 19
- Figura 10** - Clusterização de integrinas, suas moléculas sinalizadoras e respostas celulares (Retirado e modificado de Berrier, A. L. *et al.* 2007). 20
- Figura 11** – Esquema do Vetor pDORNTM222 utilizado na construção da biblioteca de cDNA da glândula venenífera de *R. alternatus*. Extraído de CloneMinerTM cDNA Library Construction Kit, Versão B (Invitrogen). 27
- Figura 12** – Ciclo de amplificação utilizado nas reações de sequenciamento dos clones da biblioteca de cDNA da glândula venenífera de *R. alternatus*. 31
- Figura 13** – Mapa do vetor pGEX4T-1 em fusão com GST (glutathione S-transferase) utilizado na subclonagem do gene da Alt-C. (Retirado de: *GST Fusion System Handbook* - GE HealthCare). ... 33
- Figura 14** - Programa utilizado para amplificação da sequência codificante para ALT-C. 34
- Figura 15** – Digestão de 24 clones escolhidos aleatoriamente com a enzima *BrsGI* para caracterização da tamanho dos fragmentos clonados na biblioteca de cDNA da glândula venenífera de *R. alternatus*. *GeneRuler*TM 1 kb DNA Ladder (Fermentas). 37
- Figura 16** – Distribuição dos clones da biblioteca de cDNA em números brutos. (A) Padrão de expressão da glândula venenífera de *R. alternatus* nos seus três grupos principais: transcritos celulares, transcritos tóxicos e transcritos de função desconhecida ou sem correspondência nos bancos de dados (unknown). (B) Distribuição dos clones das bibliotecas de cDNA das glândulas veneníferas de

serpentes do grupo. *B. atrox* (Neiva *et al.*, 2009), *R. alternatus* (este trabalho), *B. jararaca* (Cidade *et al.*, 2006) e *B. insularis* (Junqueira-De-Azevedo *et al.*, 2002). 38

Figura 17 – Distribuição dos transcritos relacionados a maquinaria celular da biblioteca de cDNA nas suas seis subcategorias: metabolismo, transcrição e tradução, processamento, estrutura, homeostase e degradação. (A) Glândula venenífera de *R. alternatus*. (B) Glândula venenífera de serpentes mesmo grupo: *B. jararaca* (Cidade *et al.*, 2006), *B. insularis* (Junqueira-De-Azevedo *et al.*, 2002), *B. atrox* (Neiva *et al.*, 2009) e *R. alternatus* (este trabalho)..... 40

Figura 18 – Distribuição dos transcritos relacionados a toxinas presentes na biblioteca de cDNA nas suas oito subcategorias: metaloprotease, serinoprotease, lectina do tipo-C, PPB - peptídeo potenciador de bradicinina, PLA2 fosfolipase A2, CRISP - proteína secretória rica em cisteína, VEGF - fator de crescimento vascular endotelial e LAO, L-aminoácido oxidase. (A) Biblioteca de cDNA da glândula venenífera de *R. alternatus*; (B) Glândula venenífera de outras serpentes do mesmo grupo: *B. jararaca* (Cidade *et al.*, 2006), *B. insularis* (Junqueira-De-Azevedo *et al.*, 2002), *B. atrox* (Neiva *et al.*, 2009) e *R. alternatus* (este trabalho). 42

Figura 19 – Alinhamento das seqüência protéica da PLA2 hipotensiva de *B. jararacussu* (gi|25140377|), *R. alternatus* Asp49 (gi|292630845|) e Lys49 (gi|292630846|) com a tradução do consenso determinado pelo *contig110* da biblioteca de cDNA da glândula venenífera de *R. alternatus*. Em destaque os resíduos funcionais Asp (D) ou Lys (K) presentes nessa molécula. ("*" significa que os resíduos de aminoácido nas colunas são idênticos em todas as seqüências do alinhamento; ":" significa uma substituição conservativa foi encontrada; e "." significa que uma substituição semi-conservativa foi encontrada). 44

Figura 20 - Alinhamento das seqüências protéicas de uma lectina do tipo-C de *B. jararaca* (gi|28972959|) com a tradução da seqüência consenso determinada pelo *contig5* da biblioteca de cDNA de *R. alternatus*. ("*" significa que os resíduos de aminoácido nas colunas são idênticos em todas as seqüências do alinhamento; ":" significa uma substituição conservativa foi encontrada; e "." significa que uma substituição semi-conservativa foi encontrada)..... 45

Figura 21 - Alinhamento das seqüências protéicas de CRISP. Psivorina de *Agkistrodon piscivorus piscivorus* (gi|28972957|) e Catrina de *Crotalus atrox* (gi|28972959|) com a tradução da seqüência consenso determinado pelo *contig102* para CRISP na biblioteca de cDNA de *R. alternatus*. ("*" significa que os resíduos de aminoácido nas colunas são idênticos em todas as seqüências do alinhamento; ":"

- significa uma substituição conservativa foi encontrada; e "." significa que uma substituição semi-conservativa foi encontrada)..... 45
- Figura 22** - Alinhamento das sequências protéicas de uma BPP de *B. jararaca* (gi|1580720|) com a tradução da sequência consenso determinada pelos *contig43* e *44* da biblioteca de cDNA de *R. alternatus*. ("*" significa que os resíduos de aminoácido nas colunas são idênticos em todas as sequências do alinhamento; ":" significa uma substituição conservativa foi encontrada; e "." significa que uma substituição semi-conservativa foi encontrada)..... 46
- Figura 23** - Alinhamento das sequências protéicas de uma LAO de *Crotallus atrox* (gi|124106294|) com a tradução sequência consenso determinada pelo *contig40* da biblioteca de cDNA de *R. alternatus*. ("*" significa que os resíduos de aminoácido nas colunas são idênticos em todas as sequências do alinhamento; ":" significa uma substituição conservativa foi encontrada; e "." significa que uma substituição semi-conservativa foi encontrada)..... 47
- Figura 24** - Alinhamento da sequência protéica de uma serinoprotease de *B. jararacussu* (gi|32396014|) com a sequência consenso determinada pelo *contig64* da biblioteca de cDNA de *R. alternatus*. ("*" significa que os resíduos de aminoácido nas colunas são idênticos em todas as sequências do alinhamento; ":" significa uma substituição conservativa foi encontrada; e "." significa que uma substituição semi-conservativa foi encontrada)..... 48
- Figura 25**– Distribuição das metaloproteases presentes na biblioteca de cDNA da glândula venenífera de *R. alternatus* nos 3 grupos principais P-I, P-II e P-III. 49
- Figura 29** - Comparação entre os três grupos principais das bibliotecas de cDNA de *R. alternatus*. (A) Este trabalho. (B) Cardoso *et al.* . (2010)..... 51
- Figura 26** – Alinhamento dos peptídeos internos da ALT-C determinados por sequenciamento através do método de degradação de Edman por Souza *et al.*, (2000) e a sequência determinada na biblioteca de cDNA (ALT-C-h – homóloga da ALT-C). As substituições semiconservativas estão destacadas. ("*" significa que os resíduos de aminoácido nas colunas são idênticos em todas as sequências do alinhamento; ":" significa uma substituição conservativa foi encontrada; e "." significa que uma substituição semi-conservativa foi encontrada)..... 55
- Figura 27** - Alinhamento de SVMPs P-III HCR incluindo a sequência da ALT-C-h determinada neste trabalho. Botropasina de *B. jararaca* (gi|82190823|); jararagina de *B. jararaca* (gi|231997|); mppprecur (precursor de metaloprotease) de *B. insularis* (gi|82214993|); mpCduris, *metaloprotease*

de *Crotallus durissus durissus* (gi|123895841); mpGhalys, metaloprotease de *Gloydius halys* (gi|190358877); acuragina de *Deinagkistrodon acutus* (gi|45331367|), *acutol-E*, acutolisina-E de *Deinagkistrodon acutus* (gi|4689408|), ALT-C-h (alternagina-C) de *R. alternatus* e VAP2A (Vap2 cadeia A) de *Crotallus atrox* (gi|152148998|). 56

Figura 28 - Tradução do mRNA codificante para Alternagina-h. Os domínios desintegrina e rico em cisteína estão destacados em cinza claro e o domínio conservado para ligação do zinco em cinza escuro. ... 57

Figura 30 – PCR do clone 4 com os *primers* utilizados para clonagem da ALT-C-h. MM – Marcador Molecular (*Low DNA Mass Ladder* - Invitrogen), 1 – Banda correspondente a Alt-C-h de aproximadamente 636pb). Gel de agarose 1%. 58

Figura 31 – Ensaio de expressão da ALT-C em fusão com GST em *E.coli* AD494(DE3). (A) – Ensaio de expressão em SDS-PAGE 12% a seta indica a ALT-C em fusão com a GST com massa estimada de 49 kDa (GST – 26 kDa e ALT-C – 23 kDa). (B) *Western Blotting* com anticorpo policlonal Anti-ALT-C (1:500), revelado com fosfatase alcalina. (MM- Marcador Molecular, To - alíquota da cultura antes da indução com IPTG; T3 - alíquota depois de 3 horas de indução com 0,5mM de IPTG). 59

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO.....	1
1.1 - SERPENTES	1
1.2 – VENENO.....	6
1.2.1 - <i>L-aminoácido oxidases (LAO)</i>	8
1.2.2 - <i>Fosfolipases A2 (PLA2)</i>	9
1.2.3 – <i>Proteínas secretórias ricas em cisteína (CRISP)</i>	9
1.2.4 – <i>Lectinas do tipo C</i>	10
1.2.5 – <i>Serinoproteases</i>	10
1.2.6 – <i>Peptídeos Potenciadores de Bradicicina (BPP)</i>	11
1.2.7 - <i>SVMPs (snake venom metalloprotease)</i>	12
1.2.8 - <i>Desintegrinas</i>	16
1.3 - INTEGRINAS.....	18
1.4 - DESINTEGRINAS DE <i>RHINOCEROPHIS ALTERNATUS</i>	21
2 – OBJETIVOS	24
3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1 - LINHAGENS BACTERIANAS E PLASMÍDEOS	25
3.2 - OBTENÇÃO DA GLÂNDULA VENÍFERA.....	25
3.3 - EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL E ISOLAMENTO DO MRNA.....	26
3.4 - CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE CDNA	26
3.5 – CULTURA PERMANENTE E EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL.....	29
3.6 - SEQUENCIAMENTO AUTOMÁTICO.....	30
3.7 - ANÁLISE DA BIBLIOTECA DE CDNA	31
3.8 - SUBCLONAGEM EM VETOR DE EXPRESSÃO	33
3.8.1- <i>Amplificação, Digestão e ligação</i>	33
3.8.2 - <i>Preparação de células competentes</i>	34
3.8.3 – <i>Transformação por choque térmico</i>	35
3.9 – EXPRESSÃO HETERÓLOGA.....	35
3.10 - WESTERN BLOTTING	36
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 - ANÁLISE DOS TRANSCRITOS DA BIBLIOTECA DE CDNA	37
4.1.1 - <i>PLA2</i>	43
4.1.2 - <i>Lectinas do tipo C</i>	44
4.1.2 - <i>CRISP</i>	45

4.1.4 - BPP.....	46
4.1.5 - LAO	47
4.1.6 - Serinoproteases	48
4.1.7 - Análise das SVMPS.....	48
4.2 – TRANSCRIPTOMA X PROTEOMA.....	49
4.3 – ALTERNAGINA / ALT-C.....	54
4.4 - SUBCLONAGEM, EXPRESSÃO E WESTERN BLOTTING	58
5 - CONCLUSÃO	60
6 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - SERPENTES

As serpentes são répteis pecilotérmicos sem patas, pertencentes à ordem Squamata, sub-ordem Serpentes e está distribuída em seis superfamílias: Acrochordoidea, Uropeltoidea, Pythonoidea, Booidae, Colubroidea e Typhlopoidea (Uetz *et al.*, 2011). A sub-ordem Serpente possui mais de 2.700 representantes que habitam todos os continentes e cobrindo o hemisfério oeste entre as latitudes 50°N e 50°S e no hemisfério leste as latitudes 65°N e 50°S. Serpentes do mar são encontradas no oceano Índico e Pacífico entre as latitudes 30°N e 30°S. Em terra, são encontradas ao nível do mar até altitudes maiores que 4.000 metros; as marinhas podem mergulhar em profundidades maiores do que 100 metros (Fry, 2005; Warrell, 2010).

Todas as serpentes são carnívoras, sua dieta é composta por ovos e pequenos animais como mamíferos, aves, insetos, lagartos e até mesmo outras serpentes. Seus sentidos são adaptados a sua função de caça, detecção e captura de suas presas. Apesar da visão não ser particularmente notória sendo suficiente para detectar movimento, algumas serpentes podem apresentar receptores infravermelhos sensíveis em sulcos profundos entre a narina e o olho, chamados de fossetas loreais, que lhes permite sentir o calor emitido pelos corpos. Como as serpentes não têm orelhas externas, elas conseguem apenas detectar vibrações, no entanto, este sentido está extremamente bem desenvolvido. Uma serpente usa sua língua bifurcada para captar partículas de odor no ar e enviá-las ao chamado órgão de Jacobson, situado na sua boca, para examiná-las. A bifurcação da língua dá à serpente algum sentido direcional do cheiro (Cobras Brasileiras, 2010).

As serpentes podem apresentar quatro tipos de dentição. As áglifas possuem dentes maciços, não havendo aparelho inoculador de veneno, essas serpentes atacam por

constrição. Nas opistóglifas os dentes inoculadores de veneno se encontram na parte posterior do maxilar superior apresentando perigo reduzido para o homem, tal dentição é característica de alguns membros da família Colubridae. A dentição proteróglifa é característica da família Elapidae, com dois dentes inoculadores de veneno na parte anterior do maxilar superior não-retráteis. Nas solenóglifas, característica da família Viperidae, há dois dentes inoculadores retráteis na parte anterior do maxilar (Figura 1). As serpentes peçonhentas possuem glândulas maxilares altamente desenvolvidas não compartimentalizadas responsáveis pela síntese do veneno (Fry *et al.*, 2009).

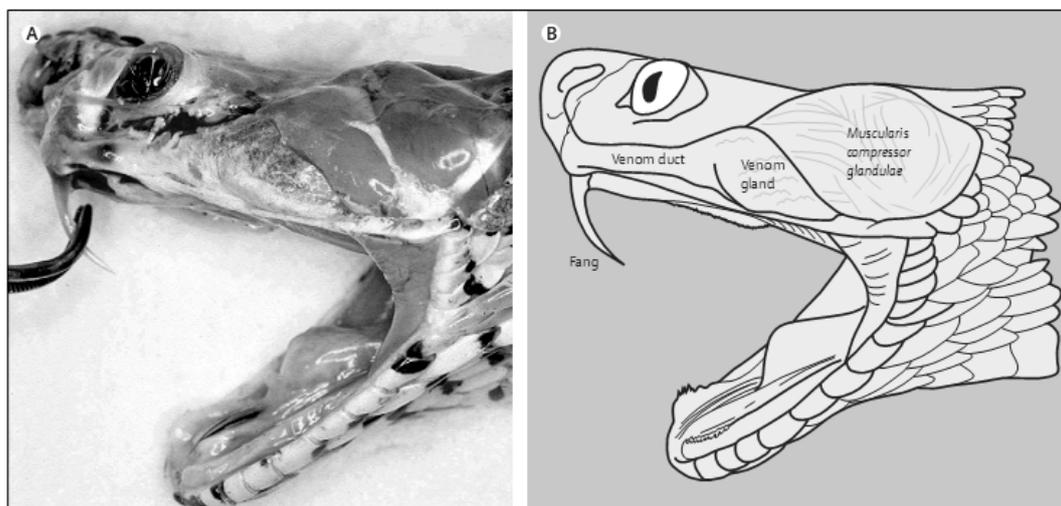


Figura 1 - Aparelho inoculador da serpente *Daboia sp* membro da família Viperidae, com dentição solenóglifa. (A) Espécime dissecado. (B) Diagrama do espécime dissecado. (Retirado de Warrel, 2010).

As serpentes não costumam atacar seres humanos, apesar de existirem algumas espécies particularmente agressivas, a maioria não atacará seres humanos, a menos que sejam assustadas ou molestadas, preferindo evitar este contato (Fry *et al.*, 2009). A OMS (Organização Mundial da Saúde) em estimativa recente revela que pelo menos 421mil envenenamentos ocorreram em todo o mundo no ano de 2010, resultando num total de 20mil mortes, acredita-se, entretanto, que esta seja uma subestimativa sendo os verdadeiros

valores para acidentes e mortes de 1.841mil e 94mil respectivamente. Os acidentes ofídicos são particularmente importantes problemas de saúde em áreas rurais de países tropicais e subtropicais, na Ásia, África, Oceania e América Latina (Organização-Mundial-Da-Saúde, 2010).

Segundo estimativas do Ministério da Saúde, no Brasil, em 2008, foram registrados cerca de 19mil acidentes ofídicos distribuídos de forma assimétrica nas diferentes regiões do país; a região Norte é a campeã com 5.980 casos, seguido pela região Nordeste com 5.128 e a região Sudeste com 4.928 casos registrados. As regiões com menor índice de ocorrência foram à região Sul e Centro-Oeste com 2.053 e 1.719, respectivamente. No Brasil, as serpentes peçonhentas são representadas por quatro gêneros: *Bothrops* (jararaca, jararacuçu, urutu, caíçaca, combóia) responsável por 90% dos acidentes ofídicos, *Crotalus* (cascavel) por 7,7%, *Lachesis* (surucucu-pico-de-jaca) por 1,4% e *Micrurus* (coral verdadeira) responsável por 0,4%. Apesar de sua predominância em número de acidentes a taxa de letalidade do gênero *Bothrops* é baixa correspondendo a 0,31% (Ministério-Da-Saúde, 2011).

O envenenamento botrópico causa intensas manifestações locais, como perturbação no sistema de coagulação sanguínea, hemorragia, dor, edema e necrose, assim como manifestações sistêmicas tais como coagulopatias e hemorragia sistêmica, choque circulatório e nos casos mais graves falha no sistema renal levando a morte do indivíduo (Gay *et al.*, 2009; Mello *et al.*, 2009). Com base nas manifestações clínicas e visando orientar a terapêutica a ser empregada, os acidentes botrópicos são classificados em (i) leve: forma mais comum do envenenamento, caracterizada por dor e edema local pouco intenso ou ausente, manifestações hemorrágicas discretas ou ausentes, com ou sem alteração do tempo de coagulação, (ii) moderado: caracterizado por dor e edema evidente que ultrapassa o segmento anatômico picado, acompanhados ou não de alterações hemorrágicas locais ou

sistêmicas como gengivorragia, epistaxe e hermatúria e (iii) grave: caracterizado por edema local intenso e extenso, podendo atingir todo o membro picado, geralmente acompanhado de dor intensa e, eventualmente com presença de bolhas (Figura 2). Em decorrência do edema, podem aparecer sinais de isquemia local devido à compressão dos feixes vâsculo-nervosos (Ministério-Da-Saúde, 2001).



Figura 2 – Acidente botrópico de nível grave. Pode-se notar o edema local intenso com a formação de bolhas e hemorragia local. (Retirado de Cobras Brasileiras. Disponível em < <http://www.cobrasbrasileiras.com.br/tratamento-acidente-bothrops.html>> Acesso em: Dezembro - 2010).

Fenwick *et al.* (2009) revisaram as relações filogenéticas de 47 serpentes da América Latina do gêneros *Bothrops* considerando o caráter parafilético do grupo. Para a reclassificação utilizou-se caracteres morfológicos (tamanho, coloração e estrutura do crânio) e marcadores moleculares (sequências de rRNA 12S, 16S e de DNA mitocondrial). A nova classificação divide as serpentes nos gêneros *Bothropoides*, que inclui dentre outros, os antigamente classificados como *Bothrops insularis* e *Bothrops jararaca*; *Rhinocerothis* que inclui *Bothrops alternatus*, *Bothrops cotiara* e *Bothrops fonsecai* e *Bothrops* que manteve como representantes *B. asper*, *B. atrox*, e *B. jararacussu* (Fenwick *et al.*, 2009). Na figura 3 o filograma com as divisões das espécies pertencentes ao antigo gênero *Bothrops*.

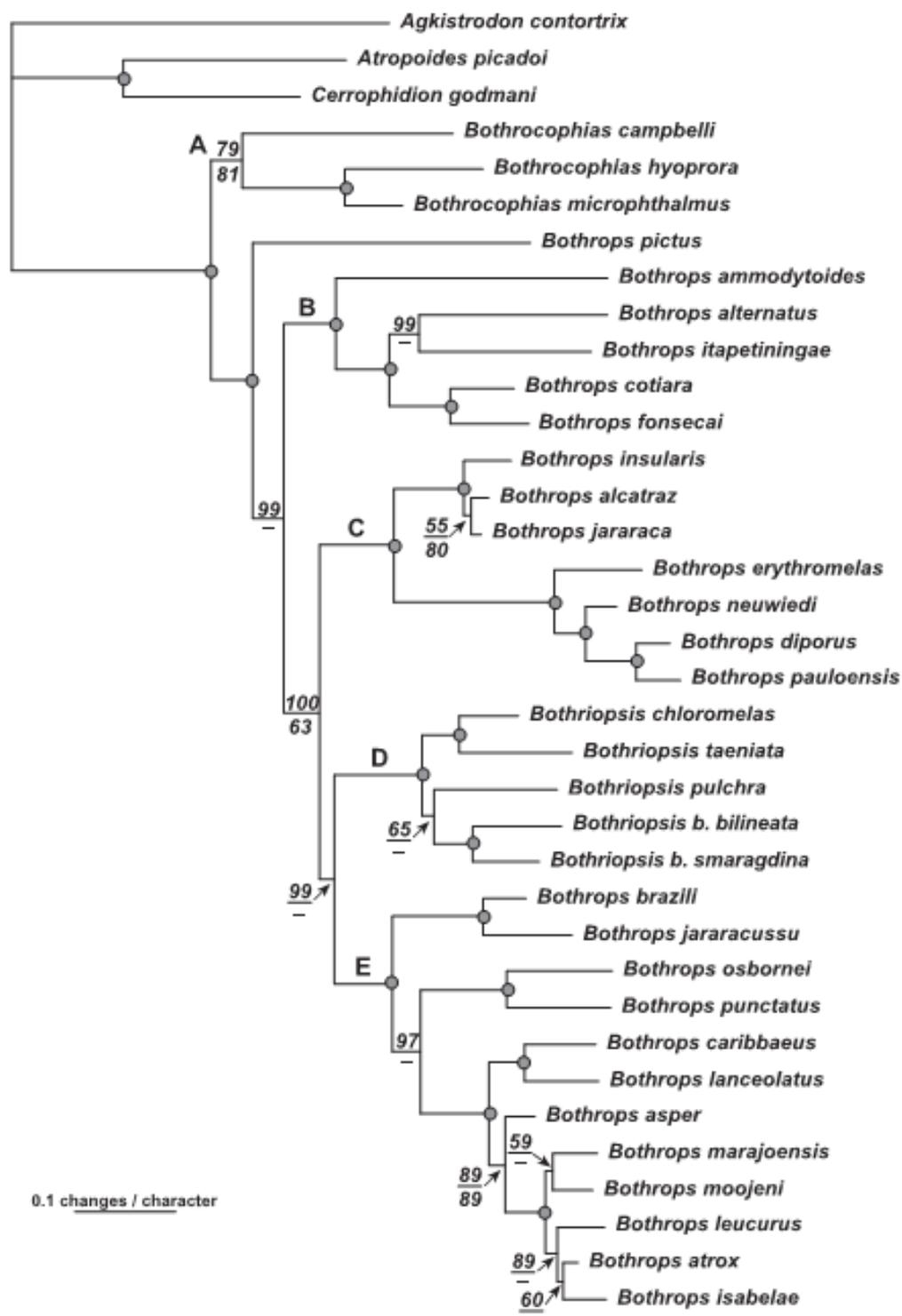


Figura 3 – Filograma derivado das análises de caracteres morfológicos e moleculares empregado na reclassificação das serpentes do antigo gênero *Bothrops*. As letras indicam as linhagens principais: **A** – *Bothrocophias* – *Bothrocophias*, **B** – *Bothrops alternatus* - *Rhinocerophis*, **C** – *Bothrops jararaca* – *Bothropoides*, **D** – *Bothriopsis* – *Bothriopsis* e **E** – *Bothrops atrox* – *Bothrops* (Fenwick et al., 2009).

A espécie de estudo neste trabalho, *Rhincerophis alternatus* (do Latim *Rhinoceros* ‘nariz-chifre’), conhecida popularmente como urutu ou cruzeira é encontrada na região Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, no Paraguai, no Uruguai e na Argentina. Esta espécie habita áreas abertas de forma bastante generalista, sendo uma espécie típica de interflúvio, ocupando áreas ripárias próximas a matas de galeria e áreas de campos mais secas, como campo limpo, campo sujo e campo úmido (Rocha *et al.*, 2005). Esta espécie possui como característica a presença de um padrão semelhante à ferradura pela extensão de seu corpo (Figura 4).

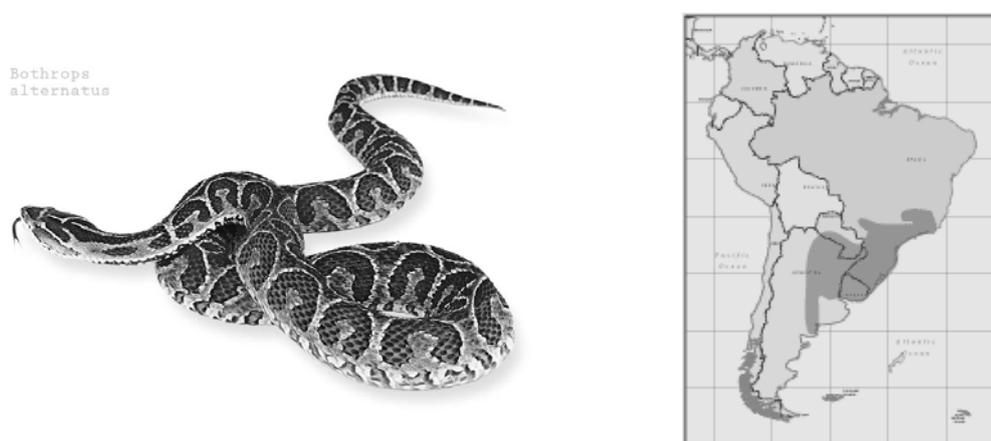


Figura 4 - *Rhincerophis alternatus* e sua distribuição (Retirado e modificado de Cobras Brasileiras – Disponível em < http://www.cobrasbrasileiras.com.br/bothrops_alternatus.html > Acesso em: Novembro - 2010).

1.2 – VENENO

O veneno de *R. alternatus* é pouco ativo quanto às propriedades enzimáticas, sem atividade amidolítica, baixa atividade caseinolítica e fibrinolítica, além disso, atua moderadamente sobre o plasma total, fibrinogênio, Fator X e II. Apresenta baixa atividade hemorrágica e necrosante e não apresenta componentes miotóxicos específicos. A coagulação sanguínea é um dos efeitos mais importantes, pois esta ação pode desencadear

uma coagulação vascular maciça ou ainda tornar o sangue incoagulável devido ao consumo do fibrinogênio (Rocha *et al.*, 2005).

Os venenos das serpentes são bastante complexos, compostos em média por 100 diferentes moléculas dentre proteínas, peptídeos, carboidratos, lipídios, aminas, íons inorgânicos e outras moléculas (Ramos *et al.*, 2006; Warrell, 2010).

Os genes codificantes para toxinas surgiram através de modelo evolutivo de nascimento e morte de genes aliados a eventos de mutação. Uma família multigênica surge da duplicação, conversão de uma das cópias em pseudogenes ou em genes não funcionais unidos a eventos de mutação que exercem um papel importante na geração da diversidade nas toxinas de veneno dentro de suas famílias multigênicas. Essas famílias multigênicas têm por característica preservarem o cerne protéico de seus ancestrais, mas modificam resíduos funcionais como aqueles presentes em alças estruturais adquirindo uma miríade de novas funções. Outras mutações podem incluir uma expressão seletiva de um domínio particular como a expressão do domínio desintegrina nas SVMPs (*Snake Venom Metalloprotease*) derivadas das ADAMs (*A Disintegrin and Metalloprotease*) proteínas transmembrana encontradas nos metazoários com funções que incluem adesão celular, o auxílio no *foldings* de proteínas e cascatas de sinalização (Seals *et al.*, 2003; Fry, 2005; Fry *et al.*, 2008).

Uma vez recrutada como arsenal do veneno a evolução adaptativa das toxinas comumente é reforçada por extensas duplicações gênicas. As duplicações gênicas seriam favorecidas por aumentar a expressão gênica na glândula e assim seu rápido preenchimento. As duplicações *in tandem* das cópias gênicas favorecem a ocorrência de *crossing-over* desigual e conversão gênica o que leva a criação de famílias multigênicas com mutações parálogas permitindo diferentes níveis de potência, e a presença de funções complementares às especificidades da presa. Existe uma convergência entre os tipos

proteicos recrutados no veneno e isso sugere fortemente a existência de certos *constraints* estruturais e/ou funcionais. Uma das principais características das proteínas de veneno é a riqueza de pontes dissulfeto, que confere estabilidade ao cerne protéico. Proteínas globulares, cuja estrutura é mantida por interações mais fracas, estão menos sujeita a se manterem estáveis com alguma troca, adição ou perda de aminoácidos (Fry *et al.*, 2009).

Os principais grupos de moléculas de encontradas no veneno das serpentes da família Viperidae são: L-aminoácido oxidases (LAO), fosfolipases A2 (PLA2), metaloproteases de veneno de serpente (SVMPs), fosfodiesterase, fosfomonoesterase, acetilcolinesterase, serinoproteases, miotoxinas, neurotoxinas, fatores de coagulação, enzimas proteolíticas, hialuronidase e NAD nucleosidase. Porém, essa variedade não se limita as proteínas citadas, além das enzimas existem ainda os peptídeos como: toxinas pré e pós-sinápticas, bloqueadores de canais de potássio, citotoxinas, miotoxinas cardiotoxinas e inibidores da agregação plaquetária (Junqueira-De-Azevedo *et al.*, 2002; Kashima *et al.*, 2004; Cidade *et al.*, 2006; Valente *et al.*, 2009). As mais abundantes serão descritas a seguir.

1.2.1 - L-aminoácido oxidases (LAO)

As L-aminoácido oxidases (LAO) são flavoenzimas, homodiméricas, que catalisam a deaminação oxidativa estereoespecífica de L-aminoácidos para α -ceto ácidos com a produção de amônia e peróxido de hidrogênio. Possuem massa molecular entre 50-70kDa estimada por SDS-PAGE em condições (não)desnaturantes e são altamente glicosilada. Seus efeitos tóxicos se devem a produção de peróxido de hidrogênio, espécies reativas de oxigênio que são capazes de causar danos mitocondriais alterando sua ultraestrutura. São conhecidas por causar apoptose em diversos tipos celulares e tem aplicação em terapia anti-leishmania e anti-tripanosossoma (Tempone *et al.*, 2001; Deolindo *et al.*, 2010).

1.2.2 - Fosfolipases A2 (PLA2)

As fosfolipases A2 (PLA2) compõem uma superfamília de enzimas que catalisam a hidrólise da ligação éster sn-2 dos fosfolipídeos liberando ácidos graxos livres e lisofosfolipídeos. Um dos ácidos graxos liberados na reação é o ácido araquidônico, importante sinalizador da cadeia inflamatória. Os lisofosfolipídeos por sua vez atuam como sinalizadores celulares da remodelagem da membrana citoplasmática. As PLA2 podem ser divididas em 15 grupos G-I a G-XV, sendo que apenas os grupos G-IA, G-IIA, G-IIB, G-III, G-IX, e G-XII são os encontrados nos venenos. As PLA2 encontradas nas serpentes do gênero *Bothrops* podem ser de dois tipos principais as D49, com um resíduo de ácido aspártico na posição 49, com alta atividade catalítica para substratos artificiais e a K49, com um resíduo de lisina neste mesmo sítio, com baixa atividade catalítica, ambos bioativos. A PLA2 de *R. alternatus* está envolvida no metabolismo dos lipídeos estruturais da membrana citoplasmática, mas também na inflamação e formação de edema no envenenamento (Garcia Denegri *et al.*, 2010). No veneno, as PLA2 possuem funções neurotóxicas, miotóxicas e de inibição da agregação plaquetária. A atividade neurotóxica das PLA2 de veneno depende de sua habilidade de se ligar a proteínas-alvo específicas que agem como receptores/aceptores nos órgãos e tecidos específicos (Fry *et al.*, 2009).

1.2.3 – Proteínas secretórias ricas em cisteína (CRISP)

As proteínas secretórias ricas em cisteína (CRISP) são as proteínas predominantes no veneno das serpentes da família Colubridae acreditando-se serem as principais responsáveis pelos efeitos tóxicos dessas serpentes. Possuem entre 20 e 30kDa e são altamente conservadas nas linhagens de répteis possuindo, sem exceção, 16 resíduos de cisteína que formam 8 pontes dissulfeto. Por esse motivo vem sendo utilizados como marcadores filogenéticos (Yamazaki *et al.*, 2004). A natrina uma CRISP isolada do veneno bruto de *Naja atra* demonstrou ter efeitos pró-inflamatórios ao induzir a adesão de

monócitos á HUVECs pela superexpressão ICAM-1 (*Inter-Cellular Adhesion Molecule 1*), VCAM-1 (*Vascular cell adhesion protein*), e selectina-E (Wang *et al.*, 2010).

1.2.4 – Lectinas do tipo C

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas com capacidade de aglutinar eritrócitos e outras células, precipitar polissacarídeos e outras glicoproteínas. Isto porque, possuem um (ou mais) centro de ligação, específico e reversível, a carboidratos. As lectinas podem ser encontradas em animais, vegetais e microrganismos. Como exemplo pode-se citar a BMooL, uma lectina purificada do veneno da serpente *B. moojeni*, possui especificidade para galactosídeos. Esta proteína é um homodímero com subunidades de 14kDa (Kassan, 1999).

1.2.5 – Serinoproteases

As serinoproteases são enzimas encontradas no veneno das serpentes que, juntamente com as metaloproteases são responsáveis pelos efeitos hemorrágicos decorrentes do envenenamento botrópico por consumir elementos da cascata de coagulação. Apesar da maioria das serinoproteases ser tanto fibrinolítica como fibrinogenolítica, algumas delas não são capazes de clivar o fibrinogênio (Markland, F. S., Jr., 1998).

A balternina uma serinoprotease isolada do veneno bruto as serpente *Rhinocerophis alternatus* apresenta massa molecular de 27kDa em condições desnaturantes. Esta serinoprotease possui similaridade de aproximadamente 70% com outras serinoproteases de veneno de serpentes. É capaz de clivar o fibrinogênio e albumina além de causar alterações morfológicas no coração, pulmão, fígado e músculos de ratos. A balternina causa defibrinogénólise *in vivo* quando aplicado intraperitonalmente em ratos, fato que sugere seu potencial na terapia antitrombótica (Costa *et al.*, 2010).

1.2.6 – Peptídeos Potenciadores de Bradicina (BPP)

A atividade do peptídeo potenciador de bradicinina (BPP) é causar choque na circulação sanguínea de pequenas presas, incluindo mamíferos. A farmacologia e aspectos moleculares dessa reação têm como foco a inibição da atividade da enzima conversora de Angiotensina I (ACE). Detalhes da Via Renina-Angiotensina podem ser vistos na Figura 5. O BPP foi essencial na descoberta do primeiro inibidor comercial da enzima conversora de angiotensina (ACE) o Captopril, um medicamento baseado na estrutura de um BPP de *Bothrops jararaca*, utilizado mundialmente no tratamento da hipertensão arterial (Fernandez *et al.*, 2004).

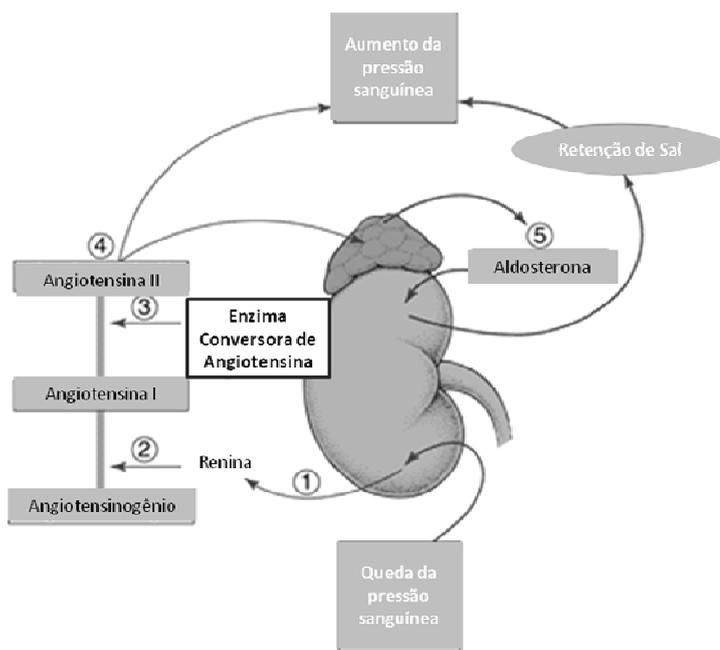
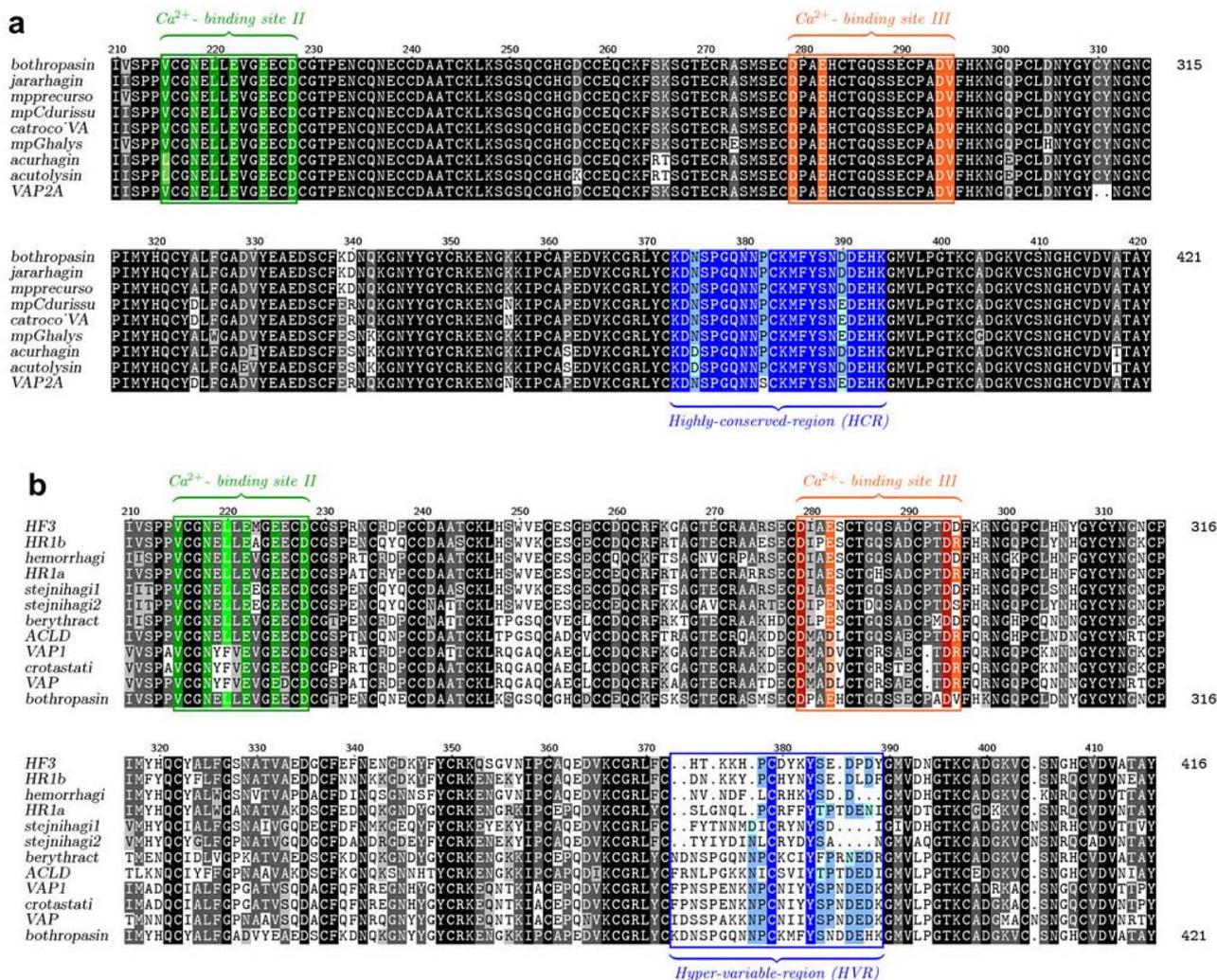


Figura 5 – Sistema de controle da pressão arterial Renina/Angiotensina. (1) Quando há queda na pressão sanguínea células do epitélio renal liberam Renina, (2) a Renina converte o Angiotensinogênio em Angiotensina I que por sua vez, (3) é convertido em Angiotensina II pela enzima conversora de Angiotensina I (ACE). (4) A Angiotensina II age sobre a glândula supra-renal liberando Aldosterona que nos rins aumenta a retenção de sal e assim leva ao aumento da pressão sanguínea. Os peptídeos potenciadores de bradicinina (BPPs) agem inibindo a atividade da ACE bloqueando essa via. (Retirado e Modificado de Manual Merck de Saúde para família). Disponível em <http://www.msdlatinamerica.com/assets/hcp/publicaciones/mmerck_hogar/seccion_03/seccion_03_02_5.html> Acesso: Novembro-2010).

1.2.7 - SVMPs (*snake venom metalloprotease*)

As metaloproteases de veneno de serpente (SVMPs) são o componente mais abundante do veneno das serpentes da família Viperidae (Junqueira-De-Azevedo *et al.*, 2002; Kashima *et al.*, 2004; Cidade *et al.*, 2006; Neiva *et al.*, 2009). As SVMPs são proteínas multimodulares com atividade endopeptidase, com um domínio conservado para ligação ao zinco (HEXXHXXGXXH) e sua atividade é inibida pela presença de quelantes desse metal, e por isso também chamadas de zinco-metaloproteases (Fox *et al.*, 2008). A primeira classificação dessas moléculas as dividiu em quatro classes (P-I à P-IV) de acordo com a presença ou ausência de domínios adicionais ao metaloprotease; as pertencentes à classe P-I possuem apenas o domínio metaloprotease; as P-II o domínio protease e um domínio desintegrina; as P-III o domínio o protease, o tipo-desintegrina, e um domínio rico em cisteína, e as P-IV com todos os domínio da classe P-III e um domínio lectina adicional (Bjarnason *et al.*, 1994). Posteriormente a classe PII foi subdivididas em 5 subclasses e as PIII em 4 de acordo com o processamento sofrido por essas moléculas (Fox *et al.*, 2005) e, mais recentemente, Fox e Serrano, (2008) incorporaram a classe PIV à classe PIII, acreditando que tratar-se de mais uma modificação pós-traducional da estrutura clássica das PIII (Figura 6).



Em geral, os mRNAs das SVMPs codificam um sinalizador, composto de 18 resíduos de aminoácidos, que funciona como um marcador para secreção; um pró-domínio, modulador da atividade enzimática, com aproximadamente 200 resíduos de aminoácidos, altamente conservado, possuindo uma sequência tiol (PKMCGV) que inibe a ligação do

zinco bloqueando a atividade do domínio catalítico; o domínio metaloprotease (~215 resíduos de aminoácidos) que apresenta uma seqüência menos conservada que a do prodomínio, responsável por sua atividade catalítica; um espaçador possuindo de 13-15 resíduos de aminoácido, sem atividade descrita, porém em alguns casos pode fornecer um resíduo de cisteína adicional na formação de uma ponte dissulfeto nas desintegrinas longas. O domínio desintegrina ou tipo-desintegrina pode variar em tamanho (41 a 100 resíduos de aminoácidos) e no número de pontes dissulfeto (4 a 8). O domínio rico em cisteína possui por volta de 112 resíduos, para ambos os domínios foram descritos atividades decorrentes de sua interação com as integrinas, receptores de adesão celular (Fox *et al.*, 2005; Serrano *et al.*, 2005; Ramos *et al.*, 2006; Fox *et al.*, 2008; Muniz *et al.*, 2008).

A estrutura tridimensional da botropasina, uma SVMP da classe P-IIIc isolada do veneno bruto da serpente *Bothrops jararaca* foi resolvida revelando detalhes da conformação espacial dessa molécula. O domínio metaloprotease pode ser dividido em um subdomínio principal, com cinco folhas beta pregueadas paralelas (S1, S2, S3, S4 e S6), uma antiparalela (S5) e quatro alfa hélices (H1, H2, H3 e H4), e um subdomínio menor composto por uma hélice (H5) e alças. As seqüências conservadas de ligação ao zinco (HEXXHXXGXXH) e o *Met-turn*, domínios altamente conservados estão no subdomínio principal. O domínio desintegrina não apresenta estrutura secundária definida e sua conformação é mantida por pontes dissulfeto; este domínio apresenta os sítios II e III de ligação ao cálcio além de uma alça que protunde o tripeptídeo adesivo ECD, estrutura bastante similar às encontradas nas desintegrinas RGD. O domínio rico em cisteína é formado por duas pequenas hélices (H5 e H6) e quatro pequenas estruturas em folha beta (S7, S8, S9 e S10) e alças. Ambos os domínios desintegrina e rico em cisteína têm suas estruturas mantidas pelas pontes dissulfeto (Muniz *et al.*, 2008).

Na Figura 8 a estrutura tridimensional da botropasina mostra os três diferentes domínios que a compõem, assim como detalhes de sua estrutura secundária, organização de alfa hélices, folhas beta pregueadas e os íons bivalentes presentes na molécula necessários a manutenção de sua estrutura e função.

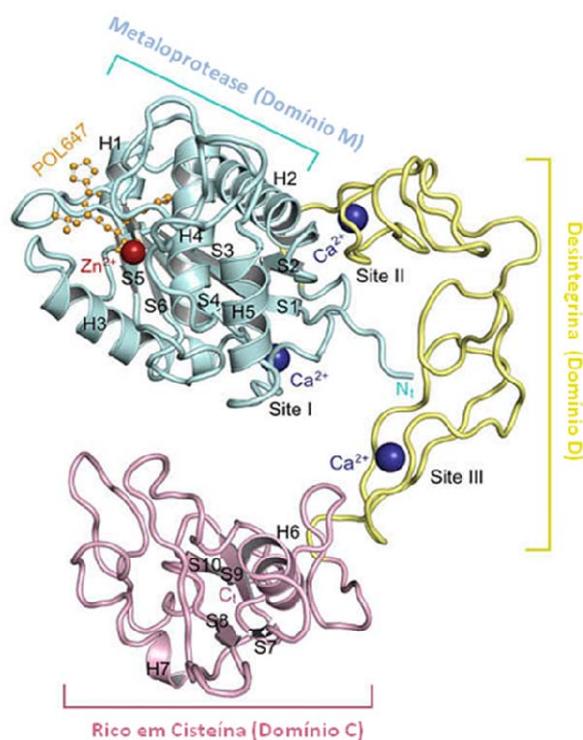


Figura 8 - Estrutura tridimensional da botropasina em complexo com o inibidor POL647. O domínio metaloprotease (M em azul claro), o domínio tipo-desintegrina (D em amarelo) e o domínio rico em cisteína (C em rosa) A esfera em vermelho representa o íon Zn^{2+} e as esferas azuis os íons Ca^{2+} . (Retirado e modificado de Muniz, et. al., 2008).

1.2.8 - Desintegrinas

As desintegrinas compõem uma família de peptídeos sem atividade enzimática, ricos em cisteína e estrutura terciária bastante conservada. Estas moléculas podem ser classificadas em 5 grupos de acordo com seu tamanho e número de pontes dissulfeto em: desintegrinas pequenas (49 - 51 resíduos de aminoácidos e 4 pontes dissulfeto), médias (~70 resíduos de aminoácidos e 6 pontes dissulfeto), grandes (84 resíduos de aminoácidos

e 7 pontes dissulfeto), tipo-desintegrina (derivadas das P-III - DC) e as desintegrinas homo e heterodiméricas, como mostra a tabela 1 (Gould *et al.*, 1990; Calvete *et al.*, 2003).

Tabela 1- Classificação das Desintegrinas.

Desintegrina	Comprimento (aa)	Pontes dissulfeto
Pequenas	49 – 51	4
Médias	~ 70	6
Longas	~ 84	7
DC (PIII)	~ 100	8
Diméricas	~ 67	4 intra e 2 intercadeia

Fonte: Retirado de Calvete *et al.*,(2005).

As desintegrinas apresentam em sua estrutura uma alça saliente na porção C-terminal que expõe o tripeptídeo, motivo adesivo reconhecido das integrinas. De maneira geral, as desintegrinas com o motivo RGD são capazes de bloquear a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ e assim inibir a agregação plaquetária, conduzindo ao efeito anti-hemorrágico (Gould *et al.*, 1990). A conformação adquirida pela alça, resíduos flanqueadores e o motivo adesivo, bem como a porção C-terminal, em alguns casos, conferem diferentes graus de afinidade e seletividade para as diferentes integrinas (Marcinkiewicz *et al.*, 1997; Wierzbicka-Patynowski *et al.*, 1999). As desintegrinas derivadas das PIII, ou tipo-desintegrinas, por sua vez, apresentam em sua alça o motivo XCD (comumente D/ECD) capaz de reconhecer a integrina $\alpha_2\beta_1$, ligante de colágeno (Ramos *et al.*, 2006). A jerdostatina uma desintegrina RTS da serpente *Trimeresurus jerdonii*, possui afinidade pela integrina $\alpha_1\beta_1$ e a propriedade de inibir a adesão de células K562 ao colágeno tipo IV (Sanz *et al.*, 2005).

O domínio rico em cisteína apresenta também afinidade pelas integrinas como demonstrado para o domínio rico em cisteína da atrolisina-A, uma SVMP da classe P-III isolada de *Crotallus atrox*. Esse domínio possui a propriedade de se ligar a integrina $\alpha_1\beta_1$ e

ao fator de *Von Willebrand*, mimetizando a ligação do colágeno tipo I (Serrano *et al.*, 2005).

Dependendo do motivo adesivo, as desintegrinas apresentam afinidades distintas por diferentes integrinas, e dessa forma desencadeando repostas distintas, antagonizando ou agonizando a atividade das mesmas. Além dos exemplos dados existem outros motivos adesivos como KGD, VGD, MGD, WGD, MLD e KTS (McLane *et al.*, 2004; Vija *et al.*, 2009). Na tabela 2 os principais motivos adesivos encontrados nas desintegrinas, suas respectivas afinidades e alguns exemplos de desintegrinas já estudadas.

Tabela 2 – Motivos adesivos das desintegrinas e suas afinidades.

Motivo	Alvos	Exemplos – Fontes
RGD	$\alpha_{IIb}\beta_3$ $\alpha_8\beta_1$ $\alpha_V\beta_3$ $\alpha_V\beta_5$ $\alpha_5\beta_1$	Trigamina (<i>Trimeresurus gramineus</i>)
KGD	$\alpha_{IIb}\beta_3$	Barbuorina (<i>Sistrurus m. barbouri</i>)
MVD	Inibidor da agregação plaquetária	Atrolisina E/D (<i>Crotalus artrox</i>)
MGD	$\alpha_5\beta_1$	EMF 10 (<i>Eristocophis macmahoni</i>)
WGD	$\alpha_5\beta_1$ $\alpha_V\beta_3$ $\alpha_{IIb}\beta_3$	CC8 (<i>Ceraste cersaste</i>)
MLD	$\alpha_4\beta_1$ $\alpha_4\beta_7$ $\alpha_9\beta_1$ $\alpha_5\beta_1$ $\alpha_{IIb}\beta_3$	EC5 (<i>Echis carinatus sochureki</i>)
KTS	$\alpha_1\beta_1$	Obstustatina (<i>Vipera lebetina obtusa</i>)
RTS	$\alpha_1\beta_1$	Jerdostatina (<i>Trimeresurus jerdonii</i>)

Fonte: Retirado e modificado de Koh *et al.*, 2006.

1.3 - INTEGRINAS

A ação das desintegrinas tem por base a sua interação com as integrinas, receptores de adesão celular presentes nas células de todos os metazoários. Para uma melhor compreensão desses processos mediados por essa interação, a seguir será feita uma breve revisão sobre esta classe de receptores de adesão celular.

As integrinas são receptores transmembrana heterodiméricos, encontradas nas células de todos os metazoários e têm como função interconectar à ECM (*Extracellular Matrix*) com o ambiente intracelular. Nos vertebrados são hoje conhecidas 8 subunidades β

e 18 subunidades α compondo 24 diferentes integrinas, cada qual com funções não redundantes relacionadas a distintas afinidades e a diferentes ligantes como: colágeno, laminina, leucócitos e aquelas com a seqüência de reconhecimento do tripeptídeo RGD como exemplificado na Figura 9 (Hynes, 2002).

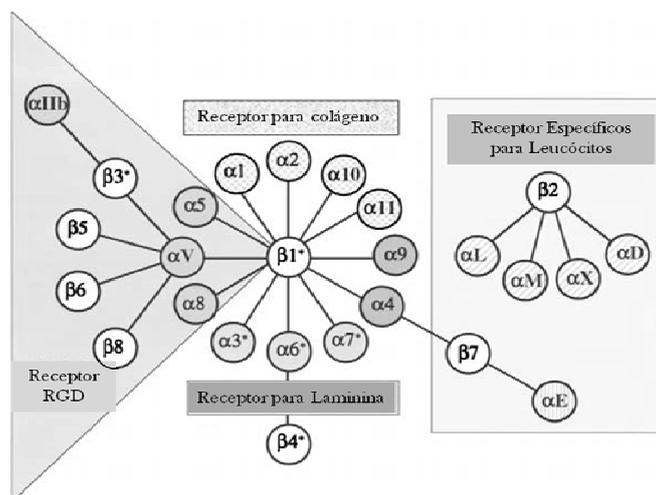


Figura 9 - As integrinas e suas especificidades. As integrinas podem ser divididas em quatro grupos de acordo com a sua afinidade por seus ligantes em: receptores RGD, receptores para colágeno, receptores para laminina e receptores específicos para leucócito (Retirado e modificado de Hynes, 2002).

As integrinas são responsáveis por cascatas de sinalização bidirecional transduzindo sinais de dentro para fora (*inside-out*), como de fora para dentro da célula (*outside-in*), funcionando como um mecanismo celular de percepção do ambiente. A ligação de moléculas intracelulares á cauda citoplasmática das integrinas leva ao aumento de sua afinidade por seus ligantes externos, tal mecanismo se faz importante nos processos de motilidade celular. A ligação de receptores extracelulares, por sua vez, leva á *clusterização* das integrinas e ao desencadeamento de cascatas intracelulares envolvendo pequenas moléculas como: FAK (*Focal Adhesion Kinase*), talina, actina, viniculina, paxilina e tensina. Essas cascatas têm conseqüências na morfologia celular, na polaridade, na organização interna, e nos padrões de expressão gênica. Dessa forma as integrinas exercem importantes funções nos processos de diferenciação celular, migração e apoptose

(Figura 10). As integrinas também participam de processos patológicos como trombose, inflamação, e nas etapas de invasão e metástase tumoral (Gumbiner, 1996; Hynes, 2002; Schwartz *et al.*, 2002; Stupack *et al.*, 2002; Berrier *et al.*, 2007).

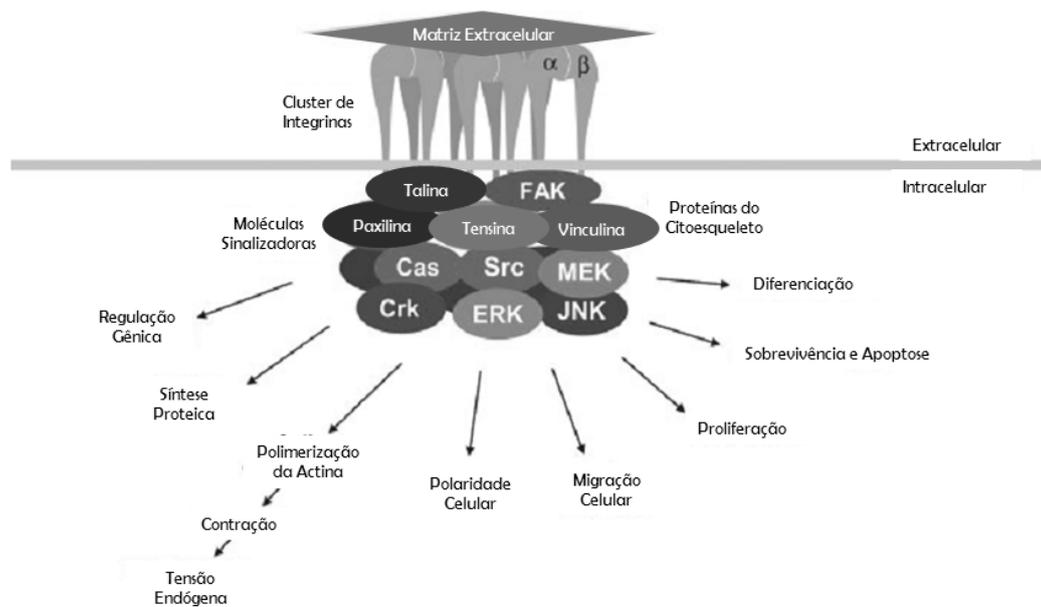


Figura 10 - Clusterização de integrinas, suas moléculas sinalizadoras e respostas celulares (Retirado e modificado de Berrier, A. L. *et al.* 2007).

Uma das propriedades chave das integrinas é a capacidade de moldar a sua afinidade por diferentes ligantes num processo denominado ativação. Muitas integrinas não se apresentam constitutivamente ativas nas células, tal fato tem íntima relação com o seu papel biológico. Pode-se exemplificar esse fato no sistema inume, a migração dos leucócitos aos sítios de infecção requer inúmeros eventos coordenados de adesão celular: reconhecimento do tecido afetado, interação com o endotélio e migração, de modo a alcançar o sítio da infecção. Tais eventos envolvem a ativação de integrinas específicas de modo a promover uma resposta rápida e eficiente (Kerr, 1999; Hynes, 2002).

Dada a sua relevância na manutenção da homeostase dos organismos bem como a sua participação em muitos processos patológicos, as integrinas têm sido extensivamente

estudadas com diferentes abordagens, como nos processos tumorais (Felding-Habermann *et al.*, 1992; Hoffmann *et al.*, 2005), metastáticos (Brakebusch *et al.*, 2005), na angiogênese (Eliceiri *et al.*, 1998), desenvolvimento embrionário (Srinivasan *et al.*, 2009) e doenças genéticas (Mcdowall *et al.*, 2003).

O entendimento dos mecanismos de ligação das células com a ECM mediadas por integrinas têm um papel essencial no desenvolvimento de novas drogas para processos patológicos (Hynes, 2002; 2009). Muitas drogas terapêuticas têm sido desenhadas baseadas na estrutura das integrinas humanas tendo como foco trombose, hemorragia, arteriosclerose, inflamação, osteoporose, câncer e muitas doenças infecciosas (Hynes, 2002). As desintegrinas se mostram um importante aliado no combate a esses males por sua atividade antagonistas ou agonistas de integrinas.

1.4 - DESINTEGRINAS DE *Rhinocerothis alternatus*

Diversos grupos de pesquisa vêm estudando desintegrinas de venenos de serpentes com o foco em aplicação farmacológica nos processos de progressão e proliferação tumoral, angiogênese, coagulação sanguínea e osteoporose. Nosso grupo de pesquisa vem se dedicando há alguns anos ao estudo de desintegrinas de *R. alternatus*, duas delas com resultados bastante promissores a DisBa-01, uma desintegrina RGD recombinante e a ALT-C (Alternagina-C), uma desintegrina ECD purificada do veneno bruto.

A DisBa-01 é uma desintegrina recombinante monomérica com motivo adesivo RGD, massa molecular aproximada de 12kDa, possuindo 77 resíduos de aminoácidos e 6 pontes dissulfeto em sua estrutura. Possui a propriedade de inibir a agregação plaquetária e a adesão de células de melanoma murino (B16F10) e células endoteliais humanas (HMEC-1) via a integrina $\alpha_v\beta_3$, a vitronectina ($IC_{50} = 225nM$ e $555nM$, respectivamente). Não afeta linhagens de célula tumoral de mama (MDA-MB-231) que não expressam a integrina $\alpha_v\beta_3$,

uma vez que essa desintegrina possui afinidade pela subunidade β_3 das integrinas. A DisBa-01 possui ainda a capacidade de diminuir a angiogênese induzida por bFGF (*basic fibroblast growth factor*) de forma dose dependente e em ensaio de matrigel em ratos atímicos ($IC_{50} = 83nM$), e quando injetado por via intravenosa em ratos C57BL/6 juntamente com a linhagem B16F10, a DisBa-01 apresenta a capacidade de inibir a metástase para os pulmões de forma tempo e dose dependentes (Ramos *et al.*, 2008).

Outra proteína estudada por nosso grupo de pesquisa é a alternagina-C (ALT-C) uma tipo-desintegrina, isolada do veneno bruto da serpente *R. alternatus* com a sequência adesiva ECD, descrita inicialmente por Souza *et al.*, (2000). ALT-C tem a propriedade de se ligar à integrina $\alpha_2\beta_1$, receptor de colágeno em diversos tipos celulares. Nos neutrófilos humanos induz a migração mediada pela ligação de seu tripeptídeo ECD as integrinas *in vitro* e ainda induz a polimerização da actina, fato crucial para as etapas de migração celular (Mariano-Oliveira *et al.*, 2003). Quando imobilizada em poços, a ALT-C sustenta a adesão de fibroblastos, bem como de células endoteliais vasculares de cordão umbilical humano (HUVEC) e não desadere células previamente aderidas ao colágeno tipo I. Além disso, ALT-C é uma forte indutora da proliferação de HUVEC *in vitro*, induzindo a superexpressão de diversos fatores de crescimento como o VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) tal como de seus receptores VEGFR 2 (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2*) (Cominetti *et al.*, 2004). Ramos *et al.* . (2007) demonstraram pela primeira vez a angiogênese *in vivo* induzida por baixas concentrações de uma tipo-desintegrina, resultados corroborados por Santana *et al.* . (2008). Estes efeitos são opostos àqueles observados para a maioria das desintegrinas RGD, as quais inibem a angiogênese e induzem a apoptose (Cominetti *et al.*, 2004; Selistre-De-Araujo *et al.*, 2005).

Algumas proteínas derivadas do veneno das serpentes têm sido utilizadas clinicamente como anticoagulantes e outras usadas em estudos pré-clínicos para possíveis

novas aplicações, como por exemplo, as desintegrinas, que bloqueiam importante receptor de adesão celular, as integrinas (Markland, F. S., 1998). O estudo das desintegrinas tem mostrado grande importância para o aprofundamento na compreensão dos processos intermediados pelas integrinas, envolvidas tanto em situações fisiológicas normais como em patológicas. Estudos envolvendo diversos peptídeos sintéticos que mimetizam o motivo RGD vêm sendo realizados nos últimos anos (Belvisi *et al.*, 2006; Del Gatto *et al.*, 2006). Entretanto as desintegrinas de veneno de serpente vêm despontando devido a sua elevada afinidade pelas integrinas, por outro lado, as desintegrinas estão presentes em pequenas quantidades nos venenos, exigindo processos demorados e sofisticados para o seu completo isolamento.

A construção de uma biblioteca de cDNA da glândula venenífera de *R. alternatus*, permite a caracterização do transcriptoma e é fomento para clonagem de diferentes genes, o que permite um estudo mais aprofundado dos compostos bioativos presentes no veneno que demonstram inúmeras aplicações farmacológicas como as desintegrinas.

2 – OBJETIVOS

I - Construção de uma biblioteca de cDNA da glândula venenífera de *R. alternatus*, a fim de caracterizar o transcriptoma da glândula venenífera desta espécie.

II - Detecção de desintegrinas já evidenciadas como importantes nos processos mediados pelas integrinas.

III - Clonagem e a produção da ALT-C de forma recombinante em sistema bacteriano, possibilitando a obtenção de um maior montante de proteína e assim viabilizar a sua caracterização e purificação para a realização de mais ensaios de atividade *in vivo* e *in vitro* a fim de desvendar seus mecanismos de ação e usufruir de seu enorme potencial de uso clínico no tratamento de doenças que envolvam integrinas.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - LINHAGENS BACTERIANAS E PLASMÍDEOS

Todas as linhagens bacterianas e assim como os plasmídeos utilizados apresentam-se listados nas tabelas 3 e 4, respectivamente.

Tabela 3- Linhagens bacterianas utilizadas nesse estudo.

Linhagem	Referência
<i>Escherichia coli</i> BH10 T1	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> AD494(DE3)	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> DH5a	Invitrogen

Tabela 4 - Plasmídeos utilizado nesse estudo.

Plasmídeo	Breve descrição	Referência
pDORN222	M13 <i>Forward</i> (-20) Sítio de restrição para <i>Bsr</i> G I Gene <i>ccdB</i> M13 <i>Reverse</i> Gene de resistência a canamicina	Invitrogen
pGEX 4T-1	Glutathion S-transferase Sítio de clivagem para trombina MCS	GE Healthcare

3.2 - OBTENÇÃO DA GLÂNDULA VENÍFERA

O espécime macho de *Rhinocerophis alternatus* (família Viperidae, subfamília Crotalinae) utilizado neste trabalho foi coletado na região de Rio Claro (22°24'39"S; 47°33'39"O) em agosto de 2008 e gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Augusto Shinya Abe (UNESP – Rio Claro). Para tanto, três dias antes, o veneno foi coletado a fim de aumentar a síntese de mRNA neste tecido. O espécime foi anestesiado com Tiopental Sódico

(*Northia*) até letargia e as glândulas retiradas cirurgicamente, congeladas em nitrogênio líquido em reagente Trizol® (Invitrogen) e armazenadas em ultrafreezer (-80°C).

3.3 - EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL E ISOLAMENTO DO mRNA

A extração do RNA total foi realizada a partir de 468mg do tecido. O protocolo constituía-se de cinco etapas, conforme método modificado do proposto por Chomczynski & Sacchi (1987). O procedimento constituía das seguintes etapas: (1) homogeneização do tecido em Trizol® (Invitrogen), (2) adição de clorofórmio para separação das fases seguida de centrifugação; (3) precipitação do RNA da fase aquosa pela adição de isopropanol; (4) lavagem com etanol 75% e (5) dissolução em água livre de RNase. O RNA total obtido foi quantificado através de leitura em espectrofotômetro e seu grau de pureza foi estimado pela razão $A_{260/280nm}$. A integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose-formaldeído 1%.

O mRNA foi isolado a partir do RNA total pela tecnologia *MagneSphere*® através do uso do kit *PolyAtract*® mRNA *Isolation Systems* (Promega). O sistema utiliza oligonucleotídeos biotinizados poli-dT para hibridização específica com a cauda de poli-dA presente na maioria dos mRNA eucarióticos maduros. Os híbridos são capturados por esferas paramagnéticas conjugadas a estreptavidina, que por sua vez são atraídas magneticamente. O mRNA capturado é lavado e então eluído através da dissociação do híbrido.

3.4 - CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE cDNA

A biblioteca de cDNA foi construída utilizando-se o *CloneMiner*™ cDNA *Library Construction Kit* (Invitrogen), o qual combina a enzima *SuperScript*™ II *Reverse Transcriptase* com o sistema *Gateway*®, baseado no sistema utilizado pelo fago λ na integração de seu material genético no DNA genômico de *E. coli* não necessitando

utilização de enzimas de restrição e métodos de clonagem nem de PCR o que reduz o viés gerado por essas etapas.

Para síntese do cDNA foi utilizado aproximadamente 5µg do mRNA ao qual foram adicionados adaptadores *attB1* e 2 em cada uma das extremidades. O cDNA flanqueado pelos adaptadores foi extraído com fenol/clorofórmio de modo a remover os excessos de adaptador e outros contaminantes, seco em *Seepd Vac*, ressuspensão em água tratada com DEPC (Dietil pirocarbonato) e armazenado em gelo. Em seguida o cDNA foi fracionado por tamanho através de processo cromatográfico a fim de purificar o cDNA obtido de possíveis adaptadores residuais e/ou pequenos cDNAs (<500pb). A heterogeneidade em relação ao tamanho dos fragmentos foi analisada através de eletroforese em gel de agarose 1%. Frações com diferentes tamanhos de fragmentos foram reunidas em um *pool* para sua inserção no plasmídeo de clonagem pDONRTM222 (Figura 11).

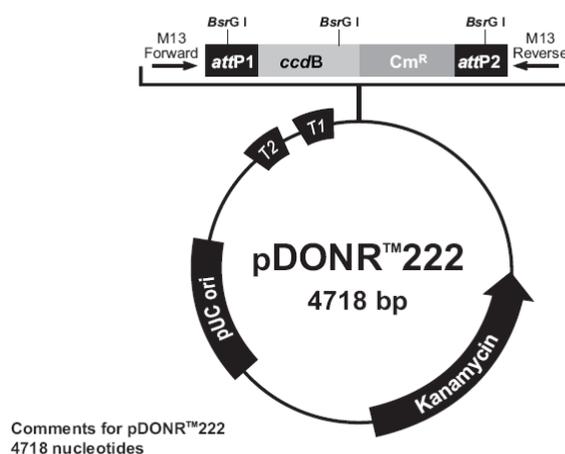


Figura 11 – Esquema do Vetor pDORNTM222 utilizado na construção da biblioteca de cDNA da glândula venenífera de *R. alternatus*. Extraído de CloneMinerTM cDNA Library Construction Kit, Versão B (Invitrogen).

O vetor pDONRTM222, fornecido pelo kit, possui sítios *attP1* e 2 que permite a recombinação com o cDNA portador do adaptador *attB*; sítios de restrição para enzima *BsrGI* que permite a detecção do tamanho dos fragmentos clonados; pUC *origin* que

permite a manutenção de um elevado número de cópias em *E. coli*; o gene *ccdB* que atua como um selecionador negativo por interferir com a *E. coli* DNA *gyrase* inibindo o crescimento da maioria das linhagens de *E. coli*, e o gene de resistência á canamicina como selecionador positivo, além de seqüências M13 *forward* e *reverse* que permitem o seqüenciamento senso e anti-senso, respectivamente.

Para a ligação dos cDNAs no vetor foi preparada a seguinte reação em um tubo estéril: 3µL do cDNA flanqueado, 1µL do vetor pDONR.TM222 (250 ng.µL⁻¹), 2µL do Tampão da reação da Clonase BP (5X), 7µL qsp de tampão TE (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 8) e por fim a enzima *Clonase* BP. Incubou-se a 25°C por 20 horas, período no qual ocorreu a recombinação sítio específica dos insertos. Para interromper a reação, adicionou-se 2µL de *proteinase K* (2µg. µL⁻¹) seguido de incubação a 37°C por 10min. Esta etapa foi seguida de precipitação com etanol, lavagem do *pellet* com etanol 70%, e secagem em *SeepVac* por 3min e ressuspensão em 9µL do tampão TE.

Para a transformação foram separadas alíquotas de 1,5µL em seis tubos de 1,5mL ao qual foi adicionado 50µL de células competentes *E. coli* ElectroMAX DH10B *TI* (Invitrogen) que foram transferidas para cubetas de eletroporação (0,1cm). Para a transformação, foi utilizado o eletroporador Gene Pulser® II (Bio Rad) com voltagem de 2kV, resistência de 200Ω e capacitância de 25µF. Após o choque, foi adicionado 1mL de meio LB, e a mistura transferida para tubos de 15mL e incubados por 1 hora a 37°C, sob agitação de 250rpm, para permitir a expressão do marcador de seleção. As células foram transferidas para meio de congelamento (60% meio LB, 40% glicerol) e armazenadas em ultrafreezer (-80°C).

Para contagem do número de UFC, foi realizada uma diluição para 10⁻⁴ e desta uma alíquota de 100µL foi semeada em placas de Petri de 15cm de diâmetro contendo LB

ágar-canamicina ($50\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) incubadas *overnight* em estufa a 37°C . A fórmula utilizada para a contagem das UFCs foi:

$$\text{cfu/mL} = \frac{\text{colônias} \times \text{fator de diluição}}{\text{volume plaqueado (mL)}}$$

3.5 – CULTURA PERMANENTE E EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL

Para o preparo da cultura permanente, as colônias selecionadas nas placas de LB ágar foram repicadas em 20 placas de 96 poços fundos com 1mL de meio LB-canamicina ($50\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) somando um total de 1.920. As colônias foram crescidas por 24 horas, repicadas em placa de fundo U contendo LB-glicerol 10% e canamicina ($50\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), deixadas em estufa por outras 24 horas e armazenadas em ultrafreezer (-80°C).

A extração do DNA plasmidial foi realizada a partir de uma modificação do método de lise alcalina (Sambrook *et al.*, 2001). As linhagens celulares foram cultivadas em placas de poço fundo por 24 horas, centrifugadas (5min, 3800g), o sobrenadante descartado, o *pellet* celular ressuspensionado em 240 μL de GTE (Glicose - 50mM, Tris, - 25mM, EDTA – 10mM) e centrifugado novamente (5min, 3800g), por fim o *pellet* foi ressuspensionado em 80 μL de GTE. O Tris presente no tampão é o agente tamponante, a glicose atua como um regulador da osmolaridade impedindo a lise prematura das células e assim a mistura do DNA genômico ao plasmidial e o EDTA por sua vez quelata íons bivalentes enfraquecendo a parede celular bacteriana.

Em uma placa de fundo U foram adicionados 5 μL de RNase ($100\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 60 μL da suspensão celular e 60 μL da Solução de Lise (NaOH/SDS 0,2M), misturou-se por inversão e aguardou-se 15min. O SDS lisa a parede celular bacteriana expondo o conteúdo intracelular; a presença do álcali (NaOH) precipita as proteínas e a parede celular e desfaz

as pontes de hidrogênio da estrutura do DNA. Após este período adicionou-se 60µL da Solução de Neutralização (KOHAc 3M) gelado, misturadas por inversão e, após 10min, aquecidas a 95°C por 30min, resfriadas no gelo por 5min e centrifugadas (10min, 3800g). A adição de KOHAc neutraliza novamente o pH do meio e as fitas do DNA plasmidial se renaturam e ficam em solução, enquanto os restos celulares e o DNA genômico são decantados pela centrifugação.

Em uma placa de fundo V com um filtro (0,22µm) acoplado, foram adicionados 90µL do lisado celular. A placa foi centrifugada por 6min a 3800g, em seguida adicionou-se 110µL de isopropanol gelado centrifugado por mais 45min a 4.000rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 80µL de etanol 70%. Finalmente as placas foram levadas em estufa a 50°C e depois de secas ressuspensas em 80µL de água Mili-Q autoclavada. O DNA precipita na presença de álcool por ser insolúvel nesse meio, as lavagens realizadas com isopropanol e etanol 70% removem o sal adicionado nas etapas anteriores.

3.6 - SEQUENCIAMENTO AUTOMÁTICO

O sequenciamento e a construção da biblioteca foram realizados com o auxílio do doutorando Fernando Fonseca Pereira de Paula no Laboratório de Biologia Molecular (LBM) do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos (DGE - UFSCar) sob responsabilidade do Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva.

Para as reações de sequenciamento foi utilizado o *DYEnamic™ ET Dye Terminator Kit* (GE Healthcare) que é uma modificação da reação de terminação de cadeia dideoxi (Sanger *et al.*, 1977). Cada um dos dideoxiterminadores - ddG, ddA, ddT e ddC – são marcados com dois corantes a fluoresceína e um dos quatro diferentes corantes de rodoamina. A fluoresceína absorve a energia luminosa do laser e a transfere para a

rodoamina sendo que cada uma das diferentes rodoaminas emite luz com um comprimento de onda característico que permite identificar o nucleotídeo terminal da cadeia de DNA. A enzima utilizada é a *Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase*, uma enzima termoestável desenvolvida especialmente para ciclos de seqüenciamento. A enzima aceita prontamente os dideoxynucleotídeos terminadores gerando bandas com intensidade uniforme.

Para cada um dos clones foi preparada a seguinte reação: 300ng de DNA molde, 5pmol do *primer M13 Forward* (-20) (3'-GTAAAACGACGGCCAG-5'), 4µL do pré-mix fornecido pelo kit e qsp 10µL de água mili-Q autoclavada. As placas foram acondicionadas em termocicladores com programa de 25 ciclos como descrito na Figura 12. As amostras foram seqüenciadas em seqüenciador automático MegaBACE™ DNA Analysis System (GE Healthcare).

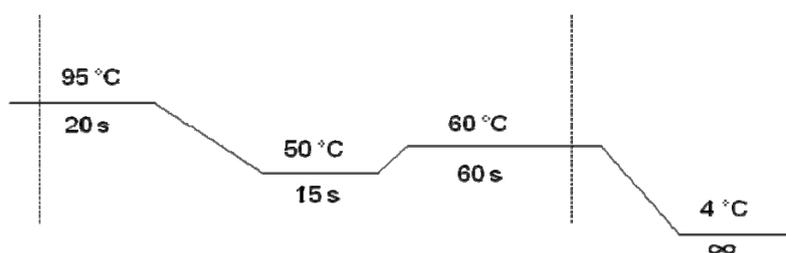


Figura 12 – Ciclo de amplificação utilizado nas reações de seqüenciamento dos clones da biblioteca de cDNA da glândula venenifera de *R. alternatus*.

3.7 - ANÁLISE DA BIBLIOTECA DE cDNA

Para o tratamento e análise das seqüências geradas pelo seqüenciador foi utilizado o *pipeline* dCAS - *Desktop cDNA Annotation System* (Guo *et al.*, 2009). Este *pipeline* integra ferramentas de bioinformática em uma plataforma de simples acesso mesmo para aqueles com pouca familiaridade com linguagem de programação, mas que necessitam utilizar ferramentas de bioinformática para o tratamento e análise de seus dados biológicos.

Em uma primeira etapa, o *pipeline* realiza o processamento dos arquivos brutos saídos do seqüenciador removendo seqüências de baixa qualidade usando *Phred* (Ewing *et*

al., 1998) e os contaminantes por sequências de vetor utilizando o banco de dados UniVec disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/UniVec.html>. As sequências tratadas são submetidas à clusterização e a geração de uma sequência consenso utilizando Cap3 (Huang *et al.*, 1999). Por último, as sequências são confrontadas com diferentes bancos de dados com auxílio da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul *et al.*, 1990) e no final é gerada uma planilha no qual os resultados das buscas estão em *hyperlinks* para facilitar a anotação manual.

Os bancos de dados utilizados para confronto com as sequências da biblioteca foram: (1) **NR** (*Non-Redundant database*) - inclui todas as sequências do RefSeq (*Reference Sequence*). O RefSeq é um banco de dados curado que possui uma coleção de sequências de DNA, RNA e proteína. Sua característica principal é possuir apenas um exemplar de cada molécula biológica natural de cada organismo. Para cada organismo o RefSeq fornece *links* separados para sequências do genoma, do transcrito, e para a proteína resultante; (2) **EBML-EBI** (*European Molecular Biology Laboratory*) do *European Bioinformatics Institute*; (3) **DDBJ** (*DNA Data Bank of Japan*); (4) **PDB** (*Protein Data Bank*). Estes quatro bancos de dados são os principais bancos de dados de sequências moleculares, as sequências depositadas são atualizadas periodicamente entre eles, entretanto pelo intervalo de atualização esses bancos de dados podem apresentar diferentes conteúdos. Bancos de dados mais específicos também foram consultados: (5) **GO** (*Gene Ontology*) um banco de dados cujo objetivo é unificar as nomenclaturas facilitando a classificação das biomoléculas; é mantido pelo *GO Consortium*. (6) **Mit-pla**, banco de dados de mitocôndrias e plasmídeos do NCBI. (7) **RRNA**, banco de dados de RNA ribossomal do NCBI. (8) **Pfam** (*Protein family sequence database*) que possui um banco de dados com domínios protéicos mantido pelo HMM (*Howard Hughes Medical Institute*). (9) **SMART** (*Simple Modular Architecture Research Tool*), um banco de dados de famílias

de domínios protéicos. (10) **KOG** (*Eukaryotic Orthologous Groups*), um banco de dados usado na identificação de proteínas parálogas ou ortólogas.

3.8 - SUBCLONAGEM EM VETOR DE EXPRESSÃO

Para a subclonagem da sequência de DNA correspondente à ALT-C foram desenhados *primers* com os sítios de restrição para *EcoRI* e *BamHI* para o vetor de expressão pGEX-4T -1. Este vetor possui como peculiaridade um *tag* de GST (glutathione S-Transferase) de *Schistosoma japonicum* com elevada afinidade pela glutathione, permitindo sua purificação em coluna de afinidade e um sítio de clivagem para trombina que permite a separação desse *tag*. Um exemplo bem sucedido de expressão heteróloga utilizando desse vetor foi o domínio D da ADAM9 humana mostrando-se ativa após processo de purificação (Cominetti *et al.*, 2009).

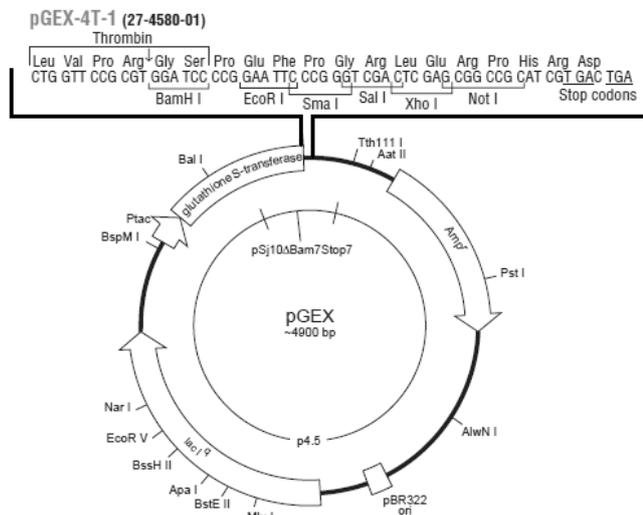


Figura 13 – Mapa do vetor pGEX4T-1 em fusão com GST (glutathione S-transferase) utilizado na subclonagem do gene da Alt-C. (Retirado de: *GST Fusion System Handbook* - GE HealthCare).

3.8.1- Amplificação, Digestão e ligação

A partir de um *contig* derivado da biblioteca de cDNA eleito por similaridade com a sequência da ALT-C determinada por Souza *et al.*, (2000) foi realizada uma PCR com

primers para inclusão de sítios de restrição para *EcoRI* e *BamHI*. O programa utilizado está representado na Figura 14.

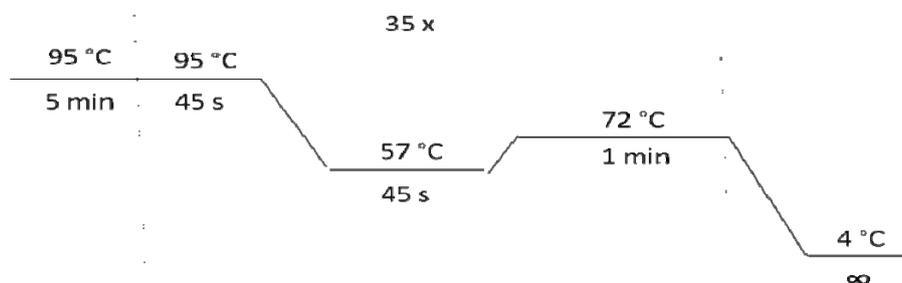


Figura 14 - Programa utilizado para amplificação da sequência codificante para ALT-C.

O DNA plasmidial e o produto de PCR puro foram submetidos à reação de restrição enzimática com as enzimas *EcoRI* e *BamHI* por 4 horas a 37°C separadamente. Após o tratamento enzimático, alíquotas foram analisadas em gel de agarose 1%, os fragmentos de DNA extraídos e purificados com o kit de purificação de DNA *QIAquick PCR Purification Kit*, (Qiagen) conforme as especificações do fabricante.

O DNA plasmidial e o inserto foram ligados (proporção molar de 1:3, respectivamente) e mantida a 25°C por cerca de 2 horas, utilizando 1U da enzima T4 DNA *Ligase* (Promega). O inserto foi colocado em excesso de modo a obter uma maior eficiência da reação.

3.8.2 - Preparação de células competentes

Para obtenção de células quimiocompetentes foi realizado um inóculo a partir de um estoque de glicerol de *E. coli* DH5α de 5mL crescido *overnight* em incubadora refrigerada a 37°C a 250rpm. Foi realizada uma diluição de 1:100 até que a cultura atingisse uma DO₆₀₀ entre 0,6 e 0,8. As células foram aliqüotadas em 4 tubos de 1,5mL cada e centrifugadas (2.835g; 5min, 4°C). O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas, gentilmente, em 500µL de uma Solução de CaCl₂ (50mM) e incubadas no

gelo por 30min. Sofreram então, uma nova centrifugação (2.835g; 10min; 4°C) e foram ressuspendidas em 200µL da mesma solução de CaCl₂ e utilizadas após 24 horas de incubação a 4 °C.

3.8.3 – Transformação por choque térmico

Para transformação das células foram utilizados 50µL de células quimiocompetentes, misturadas à reação de ligação em tubo estéril e incubadas no gelo por 30min. Após este período foi dado o choque térmico de 2min a 42°C, seguido de 2min no gelo e posterior adição de 1mL de meio LB. Em seguida, as células foram levadas para incubadora a 37°C sob leve agitação por cerca de 1 hora para permitir a expressão do marcador de seleção. Uma alíquota de 200µL do volume total da reação foi plaqueada em meio seletivo e incubada *overnight* a 37°C.

A confirmação dos clones positivos foi realizada pela extração de seu DNA plasmidial sua utilização do DNA plasmidial como molde em PCR com os *primers* utilizados para clonagem. Os clones foram então transformados em *E. coli* AD494(DE3) em ensaio piloto de expressão.

3.9 – EXPRESSÃO HETERÓLOGA

Linhagens de *E. coli* AD494(DE3) recombinante foram cultivadas *overnight* a 37°C sob agitação (250rpm) em meio contendo antibiótico adequado e , no dia seguinte diluídas (1:100) até a fase *log* de crescimento ($DO_{600} = 0,4 - 0,6$). A expressão da proteína recombinante foi induzida pela adição de 0,5mM IPTG (isopropil β-D-1-tiogalactopiranosideo) por 4 horas a 37°C sob agitação de 250rpm. O acompanhamento da expressão foi realizado com a retirada de amostras no tempo zero e 3 horas após de indução. Cada uma das alíquotas de 1mL foi centrifugada (11.863g; 1min) e ressuspendida em H₂O Mili-Q e Tampão de amostra (Tris 125mM, SDS 4%, Glicerol 20%, azul de

bromofenol 0,02% e 0,1M de β -mercaptoetanol) a uma razão de 2:1. As amostras foram analisadas em SDS-PAGE 12% sob condições desnaturantes (Laemmli *et al.*, 1970) a 80V por aproximadamente 3 horas em Mini-PROTEAN Tetra cell (BioRad). Após a corrida os géis foram corados com Solução Corante (*Comassie Brilliant Blue R* 0,25%, ácido acético 10%, Metanol 50%) e descorados com Solução Descorante (ácido acético 10% e metanol 10%).

3.10 - WESTERN BLOTTING

Para confirmação da identidade da proteína expressa foi realizado um ensaio de detecção com uso de anticorpos. Para tanto, alíquotas provenientes da expressão piloto foram corridas em SDS-PAGE 12% em condições desnaturantes (Laemmli *et al.*, 1970) e transferidas para membranas de nitrocelulose através de aparato de transferência úmida Mini-PROTEAN Tetra cell (BioRad) submetido a uma corrente constante de 300mA por uma hora e meia em tampão de transferência (Glicina 39mM, Tris 48mM, SDS 0,03%, Metanol 20%). Após a transferência a membrana foi corada com Ponceau 0,2% em ácido acético 1% para verificar a eficiência da transferência. A membrana foi então lavada com TBST (Tris 50 mM, NaCl 150 mM e 10% de Tween 20) por 2 vezes de 10min cada, bloqueada com solução de bloqueio (5% de leite desnatado em TBST) por 4 horas, lavada por mais duas vezes com TBST e incubada *overnight* com anticorpo policlonal Anti-Alt-C (1:500) produzido em camundongo. No dia seguinte a membrana foi lavada por duas vezes com TBST, incubado com anticorpo Ig-G anti-camundongo conjugado com fosfatase alcalina por duas horas. A membrana foi novamente lavada da mesma forma e revelada com 10mL de Tampão AP (Tris 0,1M, NaCl 0,1M, MgCl 5mM pH 9,5), 33 μ L de BCIP e 330 μ L de NBT no escuro.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - ANÁLISE DOS TRANSCRITOS DA BIBLIOTECA DE cDNA

A biblioteca de cDNA da glândula venenífera de *R. alternatus* possui um título de 10^7 unidades formadoras de colônia. Foram sequenciados 1920 clones dos quais 812 (42,3%) foram utilizados após análise de qualidade. As sequências com *Phred* menor que 15 e com comprimento menor que 80pb foram excluídas. Os DNAs plasmidiais foram clivados aleatoriamente com a enzima *Bsr*GI para determinação do tamanho médio dos fragmentos (Figura 15). O tamanho médio dos insertos clonados determinados pelo dCAS foi de 487pb, sendo que o menor e maior valor foram 101 e 2.313pb, respectivamente, o que corresponde aproximadamente ao resultado da digestão dos plasmídeos.

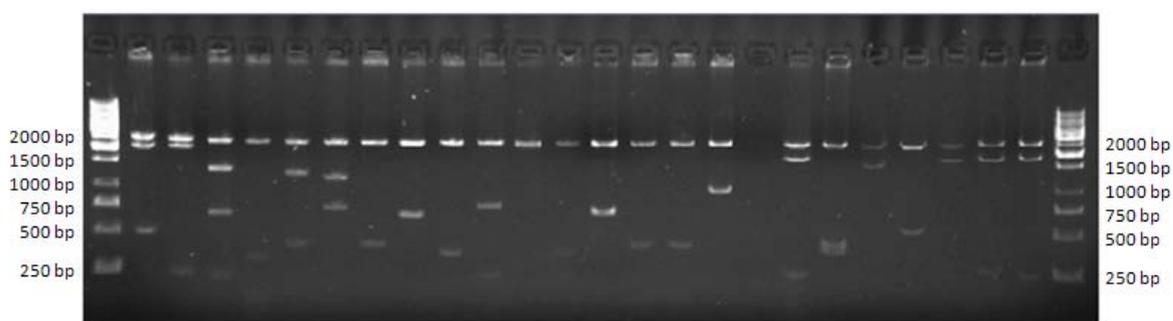


Figura 15 – Digestão de 24 clones escolhidos aleatoriamente com a enzima *Bsr*GI para caracterização da tamanho dos fragmentos clonados na biblioteca de cDNA da glândula venenífera de *R. alternatus*. *GeneRuler*TM 1 kb DNA Ladder (Fermentas).

O total de sequências *singlets* foram 268 (33%) e 544 (67%) que formaram 57 *contigs* com dois ou mais transcritos. Os *contigs* e os *singlets* foram classificados em 3 grupos principais: (i) os codificantes para proteínas hipotéticas ou sem correspondência nos bancos de dados (*unknown*) correspondendo a 20,94% (176 clones, 130 *singlets* e 9 *contigs*); (ii) transcritos para produtos celulares 17,86% (145 clones, 98 *singlets* e 17 *contigs*); e (iii) transcritos codificantes para proteínas tóxicas 61,21% (497 clones, 34

singlets e 31 *contigs*) como mostra a Figura 16A. Um fato interessante é que a maior parte dos transcritos *unknown* são *singlets*, reflexo do limitado conhecimento que se tem ainda sobre os transcritos menos expressos.

Os transcritos tóxicos foram os predominantes nas bibliotecas de *B. jararaca* (Cidade *et al.*, 2006), *B. insularis* (Junqueira-De-Azevedo *et al.*, 2002) e de *R. alternatus* (este trabalho) (Figura 16B). Apenas a serpente *B. atrox* (Neiva *et al.*, 2009) apresentou mais transcritos *unknown*, (41.5%) o que pode ser uma representação das variações regionais, endemismo, uma vez que apenas a *B. atrox* habita a região amazônica, enquanto as demais habitam o região Sul, Sudeste e Centro-Oeste. Neiva *et al.* (2009) afirmam que a inexistência de soro específico para esta espécie é causa da ineficiência do tratamento realizado com soro anti-botrópico para acidentes com esta serpente. Isto se deve a não inibição do principal efeito do envenenamento por esta serpente, o miotóxico, o que representa uma das diferenças significativas entre *B. atrox* e outras serpentes do mesmo gênero.

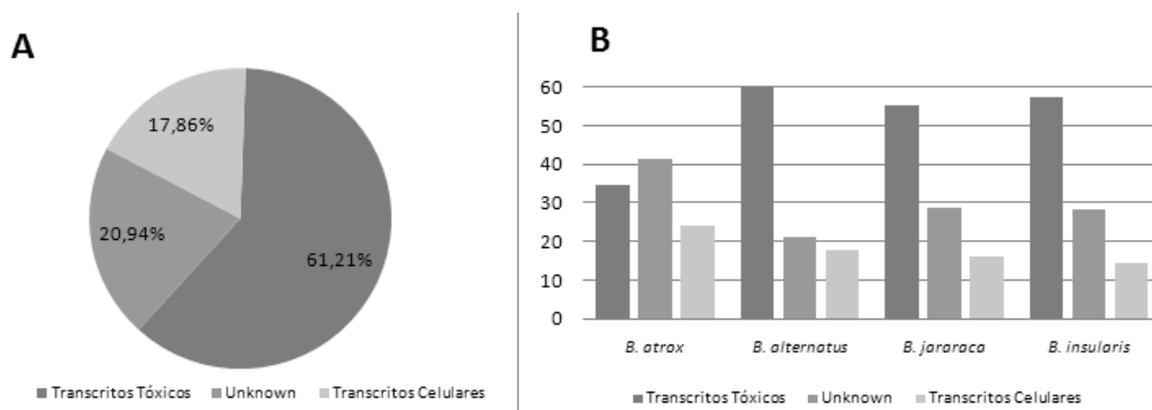


Figura 16 – Distribuição dos clones da biblioteca de cDNA em números brutos. (A) Padrão de expressão da glândula venenifera de *R. alternatus* nos seus três grupos principais: transcritos celulares, transcritos tóxicos e transcritos de função desconhecida ou sem correspondência nos bancos de dados (*unknown*). (B) Distribuição dos clones das bibliotecas de cDNA das glândulas veneníferas de serpentes do grupo. *B. atrox* (Neiva *et al.*, 2009), *R. alternatus* (este trabalho), *B. jararaca* (Cidade *et al.*, 2006) e *B. insularis* (Junqueira-De-Azevedo *et al.*, 2002).

Os transcritos celulares foram divididos em 6 subcategorias: (i) metabolismo, aqueles transcritos relacionados ao anabolismo e catabolismo de nutrientes para as células de forma a lhes prover energia; (ii) transcrição e tradução, componentes relacionados aos processos de transcrição e tradução como fatores que se ligam a DNA, RNA e enzimas; (iii) processamento, transcritos relacionados a modificações pós-traducionais; (iv) homeostase, que inclui os transcritos relacionados à regulação celular; (v) degradação, aqueles relacionados à quebra de polipeptídeos; e finalmente, (vi) transcritos de função estrutural (Figura 17A). As subcategorias mais expressas foram aquelas relacionadas ao metabolismo (39%), transcrição e tradução (27%), e processamento (17%). Os transcritos relacionados às maquinarias de transcrição, tradução e processamento somam 44% dos transcritos celulares da glândula, este fato é esperado em um tecido altamente ativo e especializado na síntese e secreção de compostos tóxicos. Dentro do grupo processamento destacam-se duas proteínas, as chaperonas importantes no *fold*ing das proteínas e as PDI (*Protein Disulphide Isomerase*) que auxiliam na montagem das pontes dissulfeto, bastante presente na estrutura das toxinas. Foram encontradas 10 sequências codificantes para chaperonas, 8 delas são *singlets* e apenas 1 *contig* formado por duas sequências; e para PDI 8 sequências, 3 *singlets* e 2 *contigs* nenhuma delas entretanto com sequência completa.

No grupo metabolismo os valores encontrados para os gêneros foram bastante similares com exceção de *B. jararaca* (14,5%) que apresentou uma menor porcentagem de transcritos nesse grupo. No agrupamento transcrição e tradução os valores foram equivalentes em todos os grupos *B. insularis* (26,9%) *R. alternatus* (26,9%), *B. atrox* (26,8%) e *B. jararaca* (28,3%). Os transcritos relacionados ao processamento de biomoléculas apresentaram valores idênticos para *B. insularis* e *R. alternatus* (17,24%), menor porcentagem para *B. atrox* (6,76%) e maior para *B. jararaca* (27,76%). Os transcritos relacionados à homeostase dividem-se em dois grupos: o primeiro com baixa

representatividade *B. insularis* (7,59%) e *R. alternatus* (6,21%) e o segundo com uma maior representatividade *B. atrox* (24,88%) e *B. jararaca* (20,49%). Os agrupamentos menos abundantes foram os relacionados a degradação de compostos e estrutura celular que apresentaram menor nível de variação se comparado aos demais grupos (Junqueira-De-Azevedo *et al.*, 2002; Cidade *et al.*, 2006; Neiva *et al.*, 2009). No geral, o padrão de expressão para proteínas celulares foi bastante similar ao encontrado para as demais serpentes do mesmo grupo (Figura 17B).

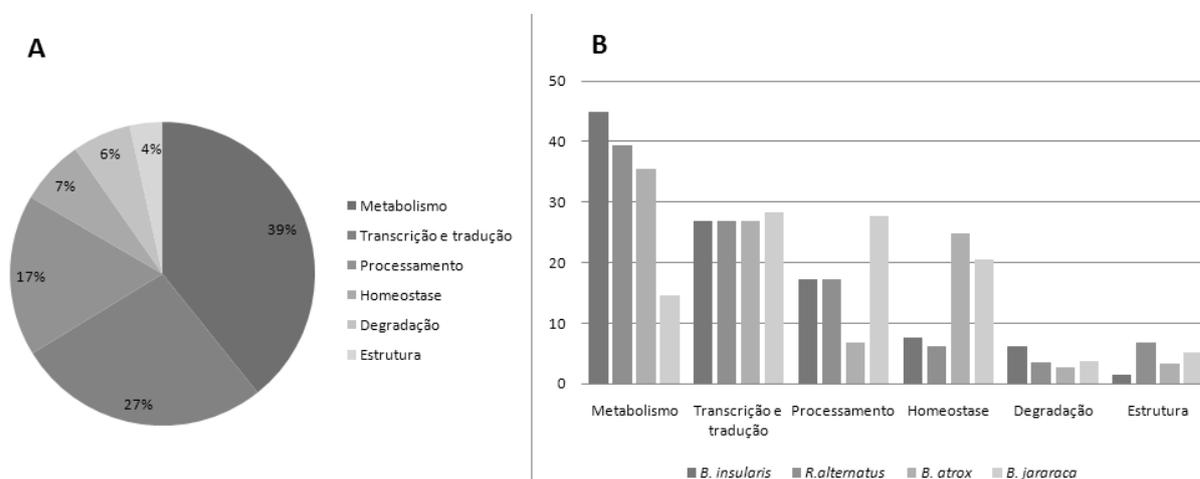
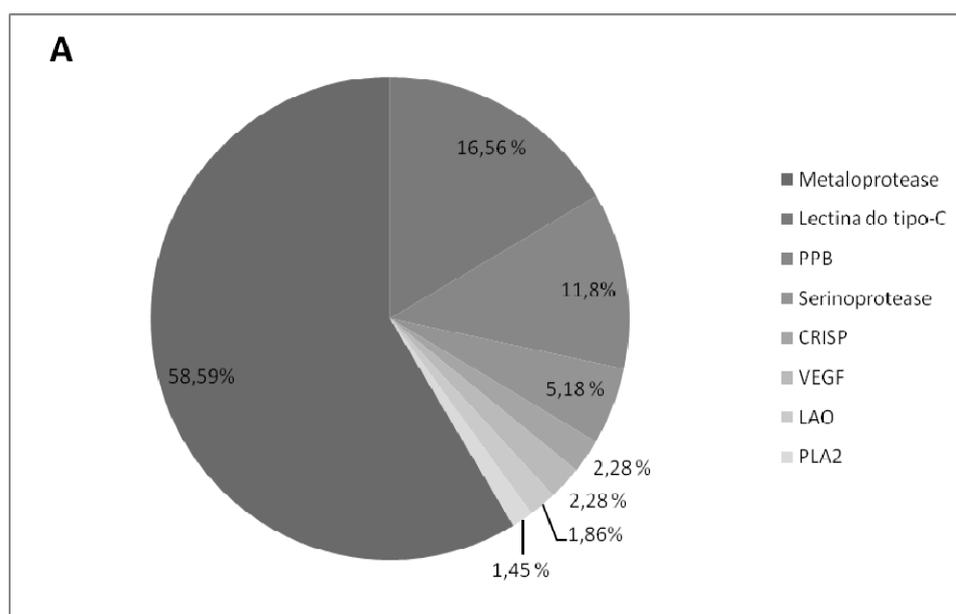


Figura 17 – Distribuição dos transcritos relacionados a maquinaria celular da biblioteca de cDNA nas suas seis subcategorias: metabolismo, transcrição e tradução, processamento, estrutura, homeostase e degradação. (A) Glândula venenifera de *R. alternatus*. (B) Glândula venenifera de serpentes mesmo grupo: *B. jararaca* (Cidade *et al.*, 2006), *B. insularis* (Junqueira-De-Azevedo *et al.*, 2002), *B. atrox* (Neiva *et al.*, 2009) e *R. alternatus* (este trabalho).

Os transcritos tóxicos foram divididos em 8 subcategorias: as metaloproteases, lectinas do tipo-C, peptídeos potenciadores de bradicinina, serinoproteases, proteínas secretórias ricas em cisteína, fatores de crescimento vascular endotelial, L-aminoácido oxidase e as fosfolipases A2. A maior parte dos transcritos foram os direcionados para metaloproteases *R. alternatus* (58,59%), corroborando com o encontrado nas demais bibliotecas de cDNA geradas com serpentes do mesmo grupo: *B. atrox* (61,6%), *B. jararaca* (53,08%) e *B. insularis* (41,86%).

A serpente *B. jararaca* apresentou maior porcentagem de serinoproteases (28,53%) comparada às demais serpentes, cujos valores foram 8,5% em *B. atrox*, 5,18% em *R. alternatus* e 9,59% em *B. insularis*. Quanto às lectinas do tipo-C, *R. alternatus* foi a que apresentou o maior percentual com 16,56% dos transcritos, seguido de *B. insularis* (14,53%) e com os menores percentuais em *B. jararaca* (8,26%) e *B. atrox* (4,8%). Os peptídeos potenciadores de bradicinina foram mais expressos em *B. insularis* (19,77%) e minoritariamente nas demais bibliotecas *R. alternatus* (11,8%), *B. jararaca* (6,24%) e *B. atrox* (7,1%). As CRISP foram mais expressas em *R. alternatus* (2,28%) seguida de *B. jararaca* (1,56%), *B. insularis* (0,58%) e *B. atrox* (0,5%). As PLA2 foram mais expressas em *B. atrox* (14,6%) e minoritariamente em *R. alternatus* (1,45%), *B. insularis* (6,69%) e *B. jararaca* (0,7%). As LAO foram mais expressas em *B. insularis* (2,65%), seguido de *R. alternatus* (1,86%), *B. atrox* (1,4%) e *B. jararaca* (0,55%) (Junqueira-De-Azevedo *et al.*, 2002; Cidade *et al.*, 2006; Neiva *et al.*, 2009). Os diferentes percentuais de expressão dos compostos tóxicos de *R. alternatus* e sua comparação com serpentes do mesmo grupo pode ser vista na Figura 18A e B.



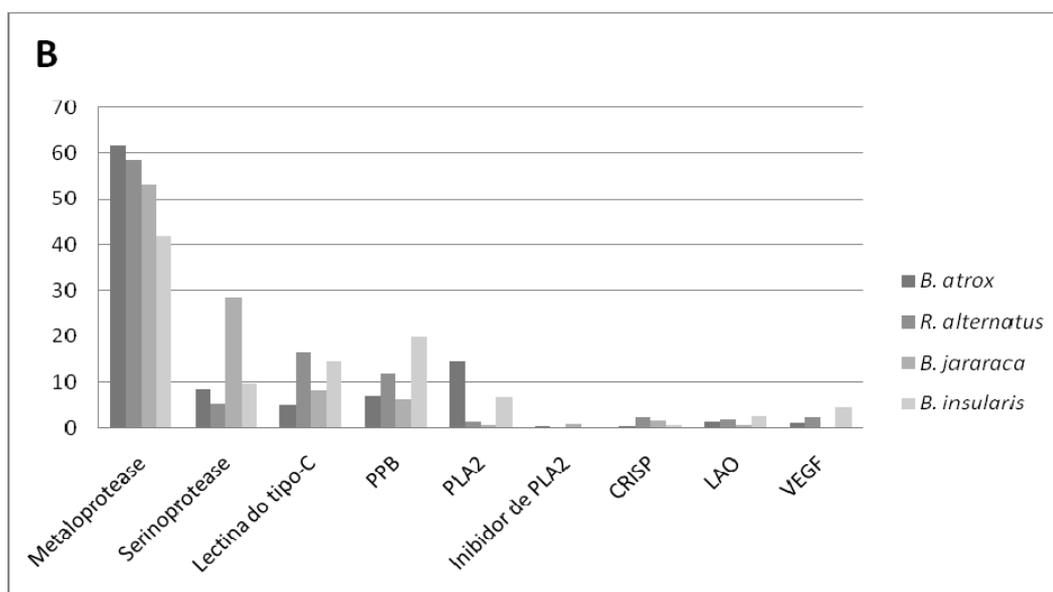


Figura 18 – Distribuição dos transcritos relacionados a toxinas presentes na biblioteca de cDNA nas suas oito subcategorias: metaloprotease, serinoprotease, lectina do tipo-C, PPB - peptídeo potenciador de bradicinina, PLA2 fosfolipase A2, CRISP - proteína secretória rica em cisteína, VEGF - fator de crescimento vascular endotelial e LAO, L-aminoácido oxidase. (A) Biblioteca de cDNA da glândula venenífera de *R. alternatus*; (B) Glândula venenífera de outras serpentes do mesmo grupo: *B. jararaca* (Cidade *et al.*, 2006), *B. insularis* (Junqueira-De-Azevedo *et al.*, 2002), *B. atrox* (Neiva *et al.*, 2009) e *R. alternatus* (este trabalho).

A variabilidade existente entre indivíduos da espécie *Bothrops jararaca* e *Rhinocerothis alternatus* foi estudada por Moura-da-Silva *et al.* (2003) e Rocha *et al.* (2005), respectivamente, evidenciando a existência de diferenças dentro de indivíduos da mesma espécie. Acredita-se que tal variação possa ser derivada de fatores genéticos, ambientais e/ou de processamentos pós-traducionais sofridos por essas moléculas.

As serpentes anteriormente classificadas no gênero *Bothrops* formavam um agrupamento parafilético, a nova classificação subdividiu esse gênero em três outros, *Bothropoides*, *Rhinocerothis* e *Bothrops*, ratificando as grandes diferenças existentes entre serpentes do antigo gênero *Bothrops* (Fenwick *et al.*, 2009).

Outro fator que contribui com as diferenças encontradas é o viés causado pela diferenças no número de sequências analisadas. Neste trabalho foram analisadas 812 sequências, enquanto que na biblioteca de *B. jararaca* foram analisadas 2.318, na de *B.*

insularis 610 e na de *B. atrox* 1.056 sequências (Junqueira-De-Azevedo *et al.*, 2002; Cidade *et al.*, 2006; Neiva *et al.*, 2009).

Assim brevemente pode-se inferir que os diferentes padrões de expressão encontrados nas bibliotecas ocorrem devido aos diferentes gênero/espécie, à sazonalidade, à alimentação e até mesmo à idade dos animais (Chippaux *et al.*, 1991; Fenwick *et al.*, 2009; Antunes *et al.*, 2010).

Nas próximas seções serão detalhadas sequências encontradas para os principais grupos protéicos que compõem o veneno de *R. alternatus*. Todos os alinhamentos foram realizados utilizando a ferramenta *ClustalW2* do EBI (*European Bioinformatics Institute*) (Disponível em <<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>>).

4.1.1 - PLA2

As PLA2 perfazem apenas 1,45% dos transcritos tóxicos da biblioteca e são as principais responsáveis pelo edema no envenenamento botrópico. A pequena porcentagem dessa molécula no veneno corresponde aos efeitos no envenenamento, somente evidente nos casos mais graves. Foram identificados 7 clones codificando para PLA2, 5 delas formando um único *contig* e as outras 2 *singlets*. Foi realizado um alinhamento com tradução da sequência consenso determinada pelo *contig110*, a PLA2 hipotensiva de *B. jararacussu* (gi|25140377|) e duas PLA2 de *R. alternatus* uma Asp49 (gi|292630845|) e outra Lys49 (gi|292630846|) como mostra a Figura 19. A PLA2 determinada pelo *contig110* apresentou o resíduo de ácido aspártico na posição 49 (Asp49) de baixa atividade para substratos artificiais.

```

jararacussu      SLWQFGKMINYVMGESGVLQYLSYGCYCGGLGGQGQPTDATDRCCFVHDCCYGKVTGCDPK 60
contig110        DLWQFGRMINYVMGESGVLQYFSYGCYCGWGGGGQPRDITDRCCFVHDCCYGKVTGCDPK 60
asp              NLVQFKTLIMKLAGRSVVYKYF-YGCYCGWGGIGQPRDATDRCCFVHDCCYGKVTNCNPK 59
lys              SLFELGKMILQETGKNPAKSYGAYCYCGWGGQGQPKDATDRCCYVHDCCYKKLTGCNPK 60
                .* :: :*      *.. . .* * ***** ** *** *:*****:* ** ***:**:*
                *:*: ::  :*

jararacussu      IDSITYSKKNGDVVCGGDDPCKKQICECDRVATTTCFRDNKDTYDIKYWFYGAKNCOEKSE 120
contig110        MDRYTYSEENGDVV----- 74
asp              TATYSYTEENGALVCGGDDPCKKQVCECDRVAAMCFRDNKDTYDNKYWFLEPPKNCOEDSE 119
lys              KDRYSYSWKDKTIVCGENNSCLKELCECDRAVAICLRENLTNTYMKYRYLYLKLPLCK-RAD 119
                *:*: ::  :*

jararacussu      PC 122
contig110        --
asp              PC 121
lys              AC 121

```

Figura 19 – Alinhamento das sequências proteicas da PLA2 hipotensiva de *B. jararacussu* (gi|25140377|), *R. alternatus* Asp49 (gi|292630845|) e Lys49 (gi|292630846|) com a tradução do consenso determinado pelo *contig110* da biblioteca de cDNA da glândula venenífera de *R. alternatus*. Em destaque os resíduos funcionais Asp (D) ou Lys (K) presentes nessa molécula. ("*" significa que os resíduos de aminoácido nas colunas são idênticos em todas as sequências do alinhamento; ":" significa uma substituição conservativa foi encontrada; e "." significa que uma substituição semi-conservativa foi encontrada).

4.1.2 - Lectinas do tipo C

As lectinas do tipo-C são responsáveis pela aglutinação dos eritrócitos, contribuindo para o quadro de hemorragia, principal efeito de envenenamento por essa serpente, ao consumir elementos sanguíneos (15,56%). Na biblioteca foram encontrados 80 sequências que se agruparam em 1 *singlet* e 6 *contig*, dois deles compostos por quatro sequências, um deles por cinco, outro com 6 e ainda outro com 23 sequências. O *contig* mais abundante apresentou 37 sequências com uma ORF de 151pb e uma proteína com massa estimada de 17kDa. Essa sequência apresenta uma similaridade de 93% com lectina de *B. jararaca* (Figura 20).

("*" significa que os resíduos de aminoácido nas colunas são idênticos em todas as sequências do alinhamento; ":" significa uma substituição conservativa foi encontrada; e "." significa que uma substituição semi-conservativa foi encontrada).

4.1.4 - BPP

Os peptídeos potenciadores de bradicinina são os responsáveis pelo quadro de hipotensão, contribuindo com 11,8% das toxinas presentes na biblioteca. Foram encontradas 57 sequências codificando para BPP que se agruparam em 3 *contigs*. O *contig* 43 possui 26 sequências e o *contig* 44 é composto por 22 sequências. As duas com similaridade de 72% e 63% com BPP de *B. jararaca* (gi|28972959|) respectivamente (Figura 22).

```

jararaca      MVL SRLAASGLLLLALLALSVDGKPVQQAQGGWPRPGPEIPPLKVQQAQGGWPRPGPE 60
contig43      MVL SRLAASGLLLLALLALSVDGKPVQQAQ8-WP--GNIPPELLVQQAQR-WP-SGPP 55
contig44      MVL SRLAASGLLLLALLALSVDGKPVQQAQ8-WP--GNIPPELLVQQAQR-WP-SGPP 55
*****
                **  **  **:* *  *****  **  .**

jararaca      IPPLTVQQAQNWPHFQIPPLTVQQAQWGRPPGPIIPPLTVQQAQARPPHPPIPPAPL 120
contig43      IPPLTVQQAQNWASEKVPPLTVQQAQ-GRSEHPPMPPAPLQDWA-----PQDWAPL 107
contig44      IPPLTVQQAQ-----GRSEHPPKPPAPLQDWA-----PQDWAPL 90
*****
                **.* ** ** .:*:**      *   ***

jararaca      QKWAPVQKWAPLLQPHESPASGTTALREELSLGPEAASGVPSAGAEVGRSGSKAPAAPHR 180
contig43      QDWAPLQDWAP--QPHE-----123
contig44      QDWAPLQDWAP--QPHESPAG-----109
*.*.*:*.*.* *.*.*

jararaca      LSKSKGAAATSAASREMRDLRDPGKQARQNWGRMVHHDHAAVGGGGGGGGGARRLKGL 240
contig43      -----
contig44      -----

jararaca      AKKGAAGKCFGLKVDRIQTMSGLGC 265
contig43      -----
contig44      -----

```

Figura 22 - Alinhamento das sequências protéicas de uma BPP de *B. jararaca* (gi|1580720|) com a tradução da sequência consenso determinada pelos *contig43* e *44* da biblioteca de cDNA de *R. alternatus*. ("*" significa que os resíduos de aminoácido nas colunas são idênticos em todas as sequências do alinhamento; ":" significa uma substituição conservativa foi encontrada; e "." significa que uma substituição semi-conservativa foi encontrada).

4.1.5 - LAO

As LAO perfazem um pequeno percentual entre os compostos tóxicos da biblioteca com 1,84% dos transcritos. Na biblioteca foram encontradas 9 seqüências codificantes para LAO que se dividiram em 2 *contigs* contendo 2 e 7 seqüências e similaridade com LAO de *Crotalus atrox* (gi|124106294|) e *Gloydus blomhoffi* (gi|75570145|). A Figura 23 mostra o alinhamento realizado com a seqüência protéica da LAO de *Crotallus atrox* e a tradução das seqüências consenso determinada pelos *contigs*40 e 193 da biblioteca.

```

Atrox      MNVFFMFSLLFLAALGSCAHDRNPLEECFRETDYEEFLEIAKNGLTATSNPKRVVIVGAG 60
contig40   MNVFFTFSLFLAALGSCADDRNPLEECFRETDYEEFLEIAKNGLKATSNPKRVVIVGAG 60
          *****

Atrox      MAGLSAAYVLAGAGHQVTVLEASERVGGRRVRTYR--KKDWYANLGPMLRPTKHRIVREYI 118
contig40   MSGLSAAYVLAAGAGHQVTVLEASGRAGGRVRTYRNDKEGWYANLGPMLRPEKHRIVREYI 120
          *;***** *;***** *;***** *;*****

Atrox      KKFDLKLNESQENENAWYFIKNIRKRVREVKNNPGLLEYPVKPSEEGKSAAQLYVESLR 178
contig40   RKFGQLNENESQENENAWYFIKNIRKRVGEVKNKDPGILKYPVKPSEEGKSAGQLYVEESLQ 180
          **:;*;***** **;:*;*****;*** **;

Atrox      KVKELKRTNCKYILDKYDITYSTKEYLLKEGNLSPGAVDMIGDLLNEDSGYYVVSFIESLK 238
contig40   KAVEELKRTNCSYMLNKYDITYSTKEYL----- 207
          *;*****;*;*;*****

Atrox      HDDIFGYEKRFDEIVGGMDQLPFSMYEAIKERVQVHFNARVIEIQONDREATVTYQTSAN 298
contig40   -----

Atrox      EMSSVTADYVIVCTTSRAARRIKFEPPLPPKKAHALRSVHYRSGTKIFLTCKKFWEDDG 358
contig40   -----

Atrox      IRGGKSTTDLPSRFIYYPNHFTSGVGVIIAYGIGDDANFFQALDFKDCADIVINDLSLI 418
contig40   -----

Atrox      HQLPKEDIQTFCRPSMIQRWMLDKYAMGGITTFPTYQFQHFSEALTAPFKRIYFAGEYTA 478
contig40   -----

Atrox      QFHGWIDSTIKSGLTAARDVNRASENPSGIHLSNDNEF 516
contig40   -----

```

Figura 23 - Alinhamento das seqüências protéicas de uma LAO de *Crotallus atrox* (gi|124106294|) com a tradução seqüência consenso determinada pelo *contig*40 da biblioteca de cDNA de *R. alternatus*. ("*" significa que os resíduos de aminoácido nas colunas são idênticos em todas as seqüências do alinhamento; ":" significa uma substituição conservativa foi encontrada; e "." significa que uma substituição semi-conservativa foi encontrada).

desintegrina este era classificado como pertencente à classe P-II (7%) e por fim quando além do domínio catalítico o *contig* continha um domínio desintegrina e um domínio rico em cisteína antes do STOP códon este era classificado como pertencente à classe P-III (89%) (Figura 25).

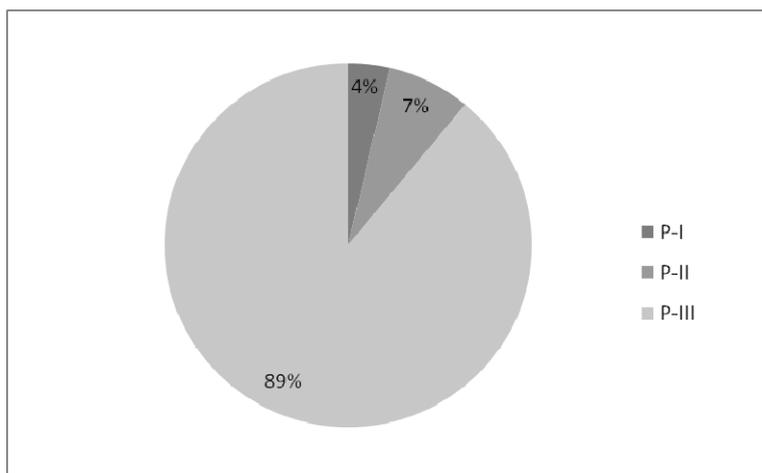


Figura 25– Distribuição das metaloproteases presentes na biblioteca de cDNA da glândula venenífera de *R. alternatus* nos 3 grupos principais P-I, P-II e P-III.

As porcentagens de produtos tóxicos encontradas no transcriptoma correspondem aos efeitos do veneno por essa serpente, baixa atividade enzimática e com alterações na coagulação sanguínea, como principal efeito, fato que é evidenciado pela predominância de metaloproteases, lectinas do tipo-C e serinoproteases que foram o primeiro, segundo e quarto tipo mais expresso com 58,59%, 16,56% e 5,18% dos transcritos tóxicos da biblioteca.

4.2 – TRANSCRIPTOMA X PROTEOMA

Cardoso *et al.* (2010) realizaram estudos recentes de uma biblioteca de cDNA da glândula venenífera da mesma serpente, *R. alternatus*. Esta biblioteca foi constituída de três sub-bibliotecas denominadas *Ba1*, *Ba2* e *Ba3* construídas independentemente, utilizando glândulas veneníferas de três serpentes adultas distintas para estudos de

polimorfismos inviáveis no estudo de um único indivíduo. Os autores encontraram 132 SNP (*Single Nucleotide Polimorfism*) na biblioteca de *R. alternatus*, dentre os quais 31 estavam localizadas dentro de ORFs (16 não-sinônima e 15 sinônima), 27 deles encontrados em proteínas tóxicas, uma para PLA2, outra para CRISP e 25 para SVMPS (Cardoso *et al.*, 2010).

Os pesquisadores seqüenciaram no total 12.479 clones (somando as 3 bibliotecas construídas) que após análise de qualidade resultaram em 7.871 (63%) sequências (*Ba1* – 312, *Ba2* – 978 e *Ba3* – 6.581), agrupadas em 838 *contigs* e 4512 *singletons*. Os autores afirmam neste trabalho que o grande número de sequências foi gerado com o fim de obter informações sobre novos genes para o gênero/espécie. Uma proteína inédita descrita por esses autores é a Ohanina, isolada anteriormente somente em serpentes da família Elapidae que apresenta atividade inflamatória e de hiperalgesia (Pung *et al.*, 2005); outra é a 3-FTx (*three-finger toxin*), uma neurotoxina característica das serpentes da Família Elapide (Fry *et al.*, 2003). Dentro dos transcritos não tóxicos destacam-se a Dusp6 que participa na embriogênese, importante no desenvolvimento do epitélio da glândula e da tioredoxina que atua na síntese de DNA e degradação de H₂O₂ (Jeffrey *et al.*, 2007).

Ao comparar as duas bibliotecas em números brutos quanto aos seus grupos principais: (i) *unknown*, (ii) transcritos celulares e (iii) transcritos tóxicos pode-se notar a maior prevalência de transcritos desconhecidos ou sem correspondência nos bancos de dados (70%) se comparada a biblioteca produzida neste trabalho (20,94%) como se pode ver na Figura 29.

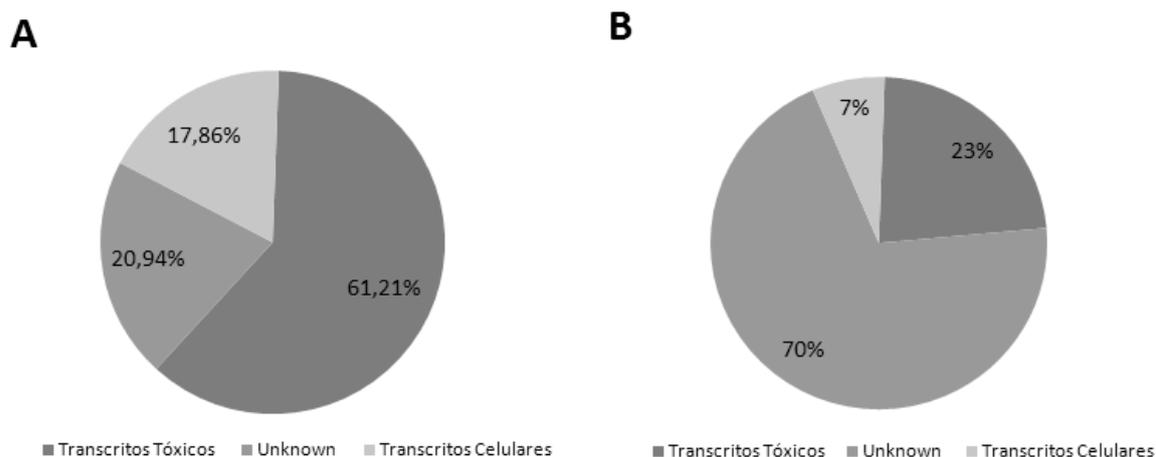


Figura 26 - Comparação entre os três grupos principais das bibliotecas de cDNA da glândula venenífera de *R. alternatus*. (A) Este trabalho. (B) Cardoso *et al.* . (2010).

Para verificar se as diferenças encontradas nas bibliotecas de cDNA de *R. alternatus* produzida neste trabalho e na de Cardoso *et al.* (2010) se devem apenas ao incremento no tamanho no número de sequências da biblioteca, foi realizada uma comparação com o incremento da biblioteca de cDNA de *B. insularis* realizadas por esse mesmo grupo de pesquisa (Junqueira-De-Azevedo *et al.*, 2002; Valente *et al.*, 2009). As percentagens dos principais grupos de proteínas tóxicas encontrados nas bibliotecas foram agrupadas, comparadas e a diferença percentual calculada (Tabela 5). O incremento da biblioteca de *B. insularis* apresentou diferença percentual mínima e máxima de -4,5% e 1,5%, enquanto que a diferença encontrada na de *R. alternatus* foi de -15,12% e 22,81%, correspondente ao grupo das lectinas do tipo-C e as metaloproteases, respectivamente. As diferenças percentuais encontradas entre as bibliotecas de *R. alternatus* não podem ser justificadas unicamente pelo incremento da biblioteca, uma vez que ultrapassa muitas vezes os limites encontrados para o incremento de *B. insularis*. Outros fatores que podem colaborar com essas diferenças são a sazonalidade, regionalidade, a idade e o sexo dos indivíduos utilizados, uma vez que esses autores não relatam o local e data da coleta da glândula desses animais e nem o sexo desses indivíduos.

Tabela 5 - Incremento de ESTs nos transcritos tóxicos das bibliotecas de cDNA das glândulas veneníferas de *R. alternatus* e *B. insularis*. (A) *R. alternatus* (este trabalho); (B) *R. alternatus* (Cardoso *et al.*, 2010); (C) *B. insularis* (Junqueira-De-Azevedo *et al.*, 2002); (D) *B. insularis* (Valente *et al.*, 2009).

	A	B	B-A	C	D	D-C
Metaloprotease	58,59%	81,40%	+22,81%	41,7%	43,2%	+1,5%
Lectina do tipo-C	16,56%	1,44%	-15,12%	14,6%	14,2%	-0,4%
BPP	11,80%	8,33%	-3,42%	19,7%	15,8%	-3,9%
Serinoprotease	5,18%	1,92%	-3,26%	-	-	-
CRISP	2,28%	0,40%	-1,88%	6%	1,5%	-4,5%
VEGF	2,28%	-	-	-	-	-
LAO	1,86%	0,60%	-1,26%	2,6%	3,5%	+0,9%
PLA2	1,45%	5,5%	+4,05%	-	-	-
3 – FTx	-	2,4%	-	-	-	-
Outros	-	0,4%	+0,4%	-	-	-
Total	812	7.871	~970%	610	2042	~80%

Em complemento às abordagens transcriptômicas, estudos proteômicos aliando SDS-PAGE bidimensional à tecnologia de espectrometria de massa, têm sido realizados para *Bothrops asper* (Alape-Giron *et al.*, 2008), *B. atrox* (Nunez *et al.*, 2009), *B. insularis* (Valente *et al.*, 2009), *B. fonsecai* e *B. cotiara* (Tashima *et al.*, 2008). A serpente *R. alternatus* não foge a esta tendência tendo seu proteoma estudado por Ohler *et al.* (2010) mostrando resultados interessantes. O proteoma do veneno de *R. alternatus* apresentou proteínas ácidas melhor visualizadas em faixa de pH 4 – 7. Os autores isolaram e identificaram 100 diferentes proteínas dos *spots* do gel bidimensional, essas proteínas possuíam massas moleculares que variaram de 10-100kDa (Ohler *et al.*, 2010). A comparação dos dados obtidos para os transcriptoma e proteoma de *R. alternatus* estão representados na tabela 6.

Tabela 6 - Comparação entre as percentagens dos principais compostos tóxicos das bibliotecas de cDNA da glândula venenífera e do proteoma do veneno de *R. alternatus*. (A) Biblioteca de cDNA de *R. alternatus* (Este trabalho). (B) Biblioteca de cDNA de *R. alternatus* (Cardoso *et al.*, 2010). (C) Proteoma do veneno de *R. alternatus* (Ohler *et al.*, 2010).

	A %	B %	C %
Metaloprotease	58,56	81,4	45,7
Lectina do tipo-C	16,56	1,44	1,7
BPP	11,8	8,33	-
Serino protease	5,18	1,92	24,1
CRISP	2,28	0,4	-
VEGF	2,28	-	-
LAO	1,86	0,6	6,9
PLA2	1,45	5,5	7,8
Outros	-	2,8	-
Não identificado	-	-	13,8

O grupo das metaloproteases foi o mais abundante tanto no transcriptoma quanto no proteoma. Um fato que chama a atenção é a presença exclusiva de SVMPs da classe PIII revelada no proteoma o que contrasta com o encontrado neste trabalho. Tal discrepância pode ser apenas uma subestimativa, uma vez que os dados do transcriptoma revelam que 89% das SVMPs transcritas são para a classe P-III. Outras toxinas diferentemente das SVMPs apresentam resultados bastante discrepantes entre o transcriptoma e o proteoma. Os BPP, VEGF e CRISP não foram relatados no proteoma apesar de estarem presentes no transcriptoma. A percentagem de lectinas do tipo-C encontrada no proteoma (1,7%) apresentam valores próximos da biblioteca construída por Cardoso *et al.* (2010) (1,44%), mas distante da construída neste trabalho (16,56%). Enquanto que os valores encontrados para PLA2 no proteoma (7,8%) apresentam valores mais próximos na biblioteca de Cardoso *et al.* (2010) (5,5%) do que na encontrada neste trabalho (1,45%). As LAO apresentam-se mais abundantes no proteoma (6,9%) do que revelam os dados do transcriptoma (1,86% este trabalho e 0,6% a biblioteca de Cardoso *et al.*, 2010). O oposto é

observado para as serinoproteases, mais significativamente expressas no proteoma (24,1%) do que previsto em ambos os transcriptomas (5,18% este trabalho e 1,92% a biblioteca de Cardoso *et al.*, 2010).

As discrepâncias encontradas entre o proteoma e o transcriptoma são esperadas uma vez que nem todos os mRNA transcritos são expressos, alguns deles podem possuir mutações que levam à sua não tradução, outro fator é a estabilidade do mRNA que pode variar de transcrito para transcrito (Fry, 2005; Fry *et al.*, 2009).

Rocha *et al.*, (2005) estudaram a variabilidade no veneno de *R. alternatus*, para tanto foram coletados 62 exemplares em diferentes estados, Mato Grosso de Sul, Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. O perfil eletroforético dos venenos dessas serpentes apresentou-se bastante variável sem correlação com padrões geográficos. Além do padrão eletroforético foram analisadas atividades letal, coagulante, proteolítica e miotóxica. Os autores afirmam que os resultados obtidos demonstram que não há correlação entre as atividades biológicas e enzimáticas do veneno de *R. alternatus* com a distribuição geográfica. Nas análises estatísticas realizadas a variação individual prevaleceu sobre as demais variáveis demonstrando que esta espécie apresenta uma elevada variação intraespecífica (Rocha *et al.*, 2005).

4.3 – ALTERNAGINA / ALT-C

Um *contig* composto por 4 clones foi eleito baseando-se na semelhança com a sequência proteica parcial da alternagina-C (ALT-C) determinada por Souza *et al.* (2000). A sequência dos domínios tipo-desintegrina e rico em cisteína determinada neste trabalho foi similar (99.9%) com a descrita por Souza *et al.* (2000), diferindo apenas por 4 resíduos de aminoácidos. As substituições foram: uma isoleucina por uma valina (aminoácidos apolares), um resíduo de treonina por um de serina (aminoácidos polares neutros), outra de

ácido aspártico por ácido glutâmico (aminoácidos polares ácidos) e por fim lisina por arginina (aminoácidos polares básicos), sendo todas substituições semiconservativas, podendo ser atribuídas a polimorfismo ou mesmo isoformas dessa proteína (Figura 26). As substituições encontradas corroboram com as variações descritas por Cardoso *et al.*, (2010) que num estudo para SNPs apontou que dos 27 SNPs em transcritos tóxicos, 25 estavam em SVMPs evidenciando os polimorfismo desse grupo de moléculas.

```

Alt-C      IIVSPPVCGNELLEVGEEDCGTIPENCQN---DAATCKLKSGSQCGH-DCCEQCKIFTKSGT 56
Alt-C-h    IIVSPPVCGNELLEVGEEDCGSPENCQNECCDAATCKLKSGSQCGHDCCEQCKIFTKSGT 60
* :*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
Alt-C      ECRASMSECDPAEHCTGQS-----DVPFHKNGQPCLDNYGYCYNGNCPIMYHAQCYALFGA 111
Alt-C-h    ECRASMSECDPAEHCTGQSSECPADVFPFHKNGQPCLDNYGYCYNGNCPIMYHAQCYALFGA 120
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
Alt-C      DVYEAEADSCFKDNQKGNYYGYCRKEN-----DVKCGRLYCKDNSPKQNNPCKMFYS 162
Alt-C-h    DVYEAEADSCFKDNQKGNYYGYCRKENGKKIPCAPEDVVKCGRLYCKDNSPKQNNPCKMFYS 180
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
Alt-C      NDDEHKGNVLPGTKCE----- 178
Alt-C-h    NDDEHKGNVLPGTKCEDGKVCNNGHCVDVATAY 213
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

```

Figura 27 – Alinhamento dos peptídeos internos da ALT-C determinados por sequenciamento através do método de degradação de Edman por Souza *et al.*, (2000) e a sequência determinada na biblioteca de cDNA (ALT-C-h – homóloga da ALT-C). As substituições semiconservativas estão destacadas. ("*" significa que os resíduos de aminoácido nas colunas são idênticos em todas as sequências do alinhamento; ":" significa uma substituição conservativa foi encontrada; e "." significa que uma substituição semi-conservativa foi encontrada).

Os domínios metaloprotease, desintegrina e rico em cisteína (MDC) têm massa prevista de 45,8kDa dos quais 23kDa correspondem aos domínios desintegrina e rico em cisteína (DC). Estes valores diferem daqueles encontrados por Souza *et al.* (2000) de 55kDa e 28kDa, respectivamente. Essas discrepâncias podem ser atribuídas à modificações pós-traducionais sofridas por essa molécula, uma vez que SVMP isoladas dos venenos são altamente glicosiladas. É necessário considerar também as limitações da técnica de SDS-PAGE, utilizada por estes autores.

Quanto às informações estruturais da ALT-C pode-se ainda classificá-la no grupo das SVMPs de classe P-III HCR, por possuir a região hiper conservada, como pode ser visto no alinhamento realizado com outras P-III do grupo HCR (Figura 27).

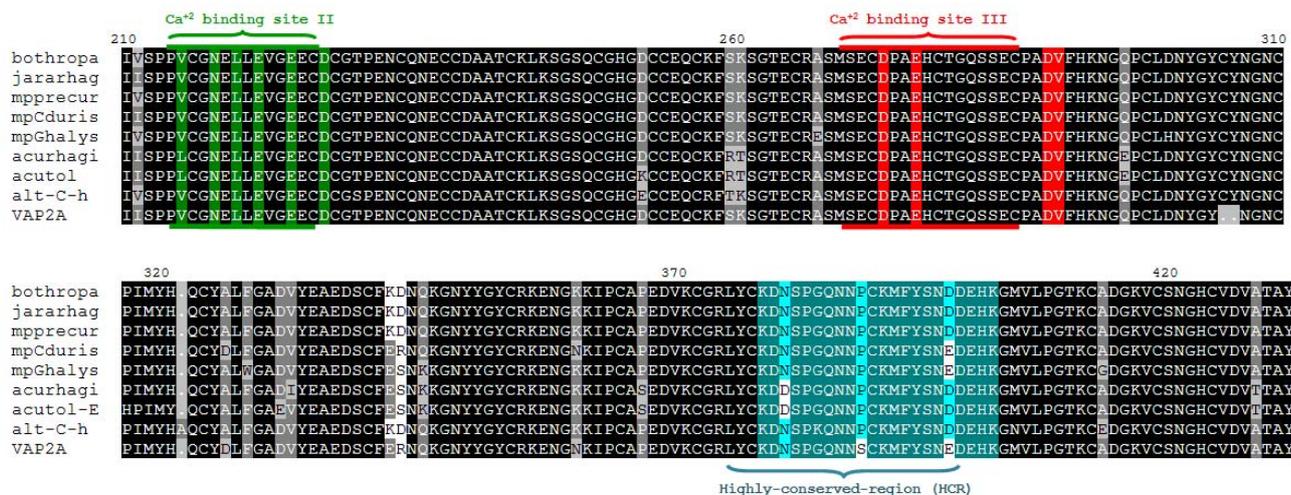


Figura 28 - Alinhamento de SVMPs P-III HCR incluindo a sequência da ALT-C-h determinada neste trabalho. Botropasina de *B. jararaca* (gi|82190823|); jararagina de *B. jararaca* (gi|231997|); mpprecur (precursor de metaloprotease) de *B. insularis* (gi|82214993|); mpCduris, metaloprotease de *Crotallus durissus durissus* (gi|123895841|); mpGhalys, metaloprotease de *Gloydus halys* (gi|190358877|); acuragina de *Deinagkistrodon acutus* (gi|45331367|), acutol-E, acutolisina-E de *Deinagkistrodon acutus* (gi|4689408|), ALT-C-h (alternagina-C) de *R. alternatus* e VAP2A (Vap2 cadeia A) de *Crotallus atrox* (gi|152148998|).

Um dos clones possui aproximadamente 2000pb, uma *ORF* de 1833bp codificando uma proteína de massa molecular estimada de 68.3 kDa (Figura 28).

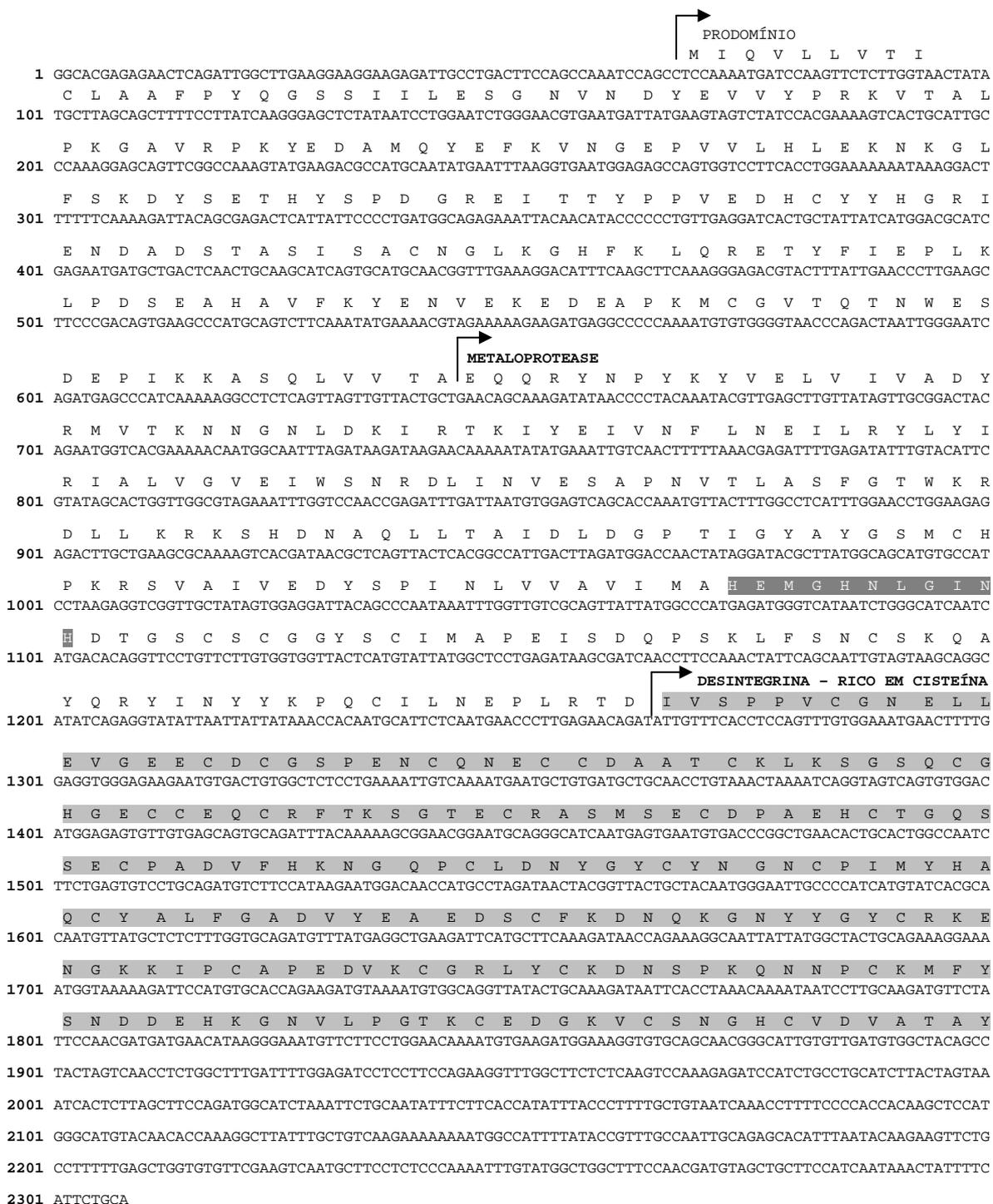


Figura 29 - Tradução do mRNA codificante para Alternagina-h. Os domínios desintegrina e rico em cisteína estão destacados em cinza claro e o domínio conservado para ligação do zinco em cinza escuro.

4.4 - SUBCLONAGEM, EXPRESSÃO E WESTERN BLOTTING

Instigados pelas interessantes propriedades farmacológicas da ALT-C e buscando a obtenção de um maior montante foi realizada a subclonagem do gene da ALT-C em vetor pGEX4T-1 e sua transformação em sistema bacteriano. Para tanto foram desenhados *primers* para inclusão de sítios de restrição para as enzimas *EcoRI* e *BamHI*.

Para confirmação da subclonagem do gene da ALT-C-h, domínios desintegrina e rico em cisteína da Alternagina no vetor de expressão, foram realizadas extrações do DNA plasmidial desses clones e sua utilização como molde em uma PCR. O clone 4 amplificou um fragmento de aproximadamente 600pb como esperado para ALT-C-h (Figura30).

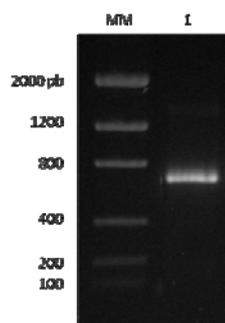


Figura 30 – PCR do clone 4 com os *primers* utilizados para clonagem da ALT-C-h. MM – Marcador Molecular (*Low DNA Mass Ladder* - Invitrogen), 1 – Banda correspondente a Alt-C-h de aproximadamente 636pb). Gel de agarose 1%.

O vetor pGEX4T-1ALT-C-h (clone 4) foi transformado em *E.coli* AD494(DE3) para ensaios preliminares de expressão da proteína recombinante e caracterização por *western blotting* (Figura 31A e B). Este ensaio de expressão revelou a expressão da ALT-C em fusão com a proteína de fusão GST (ALT-C - 23kDa + GST – 26kDa = ~49kDa).

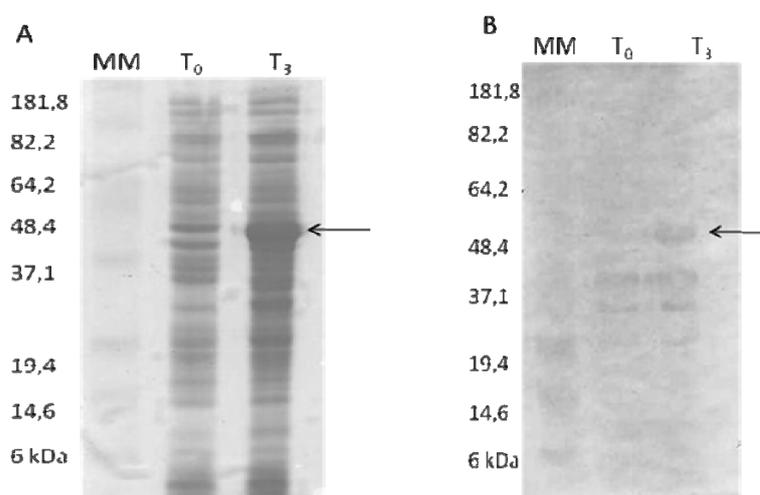


Figura 31 – Ensaio de expressão da ALT-C em fusão com GST em *E.coli* AD494(DE3). (A) – Ensaio de expressão em SDS-PAGE 12% a seta indica a ALT-C em fusão com a GST com massa estimada de 49 kDa (GST – 26 kDa e ALT-C – 23 kDa). (B) *Western Blotting* com anticorpo policlonal Anti-ALT-C (1:500), revelado com fosfatase alcalina. (MM- Marcador Molecular, T₀ - alíquota da cultura antes da indução com IPTG; T₃ - alíquota depois de 3 horas de indução com 0,5mM de IPTG).

5 - CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi construída com sucesso uma biblioteca de cDNA da glândula venenífera de *R. alternatus* possibilitando uma melhor caracterização dos transcritos dessa serpente. A grande parte dos transcritos, como esperado pelos sintomas do envenenamento foram as SVMPs também conhecidas por hemorraginas por seus efeitos no sistema de coagulação sanguínea. As SVMPs foram classificadas quantitativamente nas suas três classes principais PI, PII e PIII, descrição ainda inédita para esta espécie e gênero revelando a predominância de transcritos para SVMPs da classe PIII (89%), seguido das PII (7%) e por fim as PI (4%).

A construção da biblioteca permitiu ainda a determinação da sequência da primária da ALT-h que apresenta quatro substituições conservativas comparadas à descrição inicial da proteína realizada por Souza *et al.* (2000), e por esse motivo denominada como homóloga da ALT-C (ALT-C-h). A sequência nucleotídica dos domínios DC da ALT-C-h foi clonada em vetor pGEX4T-1 e transformada em *E.coli* AD494(DE3). O ensaio de expressão produziu uma proteína de aproximadamente 49kDa (23kDa da ALT-C-h e 26kDa ao tag de GST). A expressão foi confirmada por western blotting com anticorpo policlonal anti-ALT-C.

Como perspectivas futuras, sugere-se a otimização dos processos de expressão, purificação e o cálculo do IC₅₀ da inibição da adesão ao colágeno tipo I em células K562, expressando a integrina $\alpha 2\beta 1$ em comparação ao já determinado para ALT-C.

6 - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alape-Giron, A., L. Sanz, *et al.* Snake venomomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*: geographic, individual, and ontogenetic variations. J Proteome Res, v.7, n.8, Aug, p.3556-71. 2008.

Altschul, S. F., W. Gish, *et al.* Basic local alignment search tool. J Mol Biol, v.215, n.3, Oct 5, p.403-10. 1990.

Antunes, T. C., K. M. Yamashita, *et al.* Comparative analysis of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. Toxicon, v.56, n.8, Dec, p.1443-58. 2010.

Belvisi, L., A. Bernardi, *et al.* Targeting integrins: Insights into structure and activity of cyclic RGD pentapeptide mimics containing azabicycloalkane amino acids. Bioorganic & Medicinal Chemistr, v.14, p.169-180. 2006.

Berrier, A. L. e K. M. Yamada. Cell-matrix adhesion. J Cell Physiol, v.213, n.3, Dec, p.565-73. 2007.

Bjarnason, J. B. e J. W. Fox. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. Pharmacol Ther, v.62, n.3, p.325-72. 1994.

Brakebusch, C. e R. Fassler. β 1 integrinfunction in vivo: Adhesion, migration and more. Can Met Rev, v.24, p.403-411. 2005.

Calvete, J. J., M. P. Moreno-Murciano, *et al.* Snake venom disintegrins: novel dimeric disintegrins and structural diversification by disulphide bond engineering. Biochem J, v.372, n.Pt 3, Jun 15, p.725-34. 2003.

Cardoso, K. C., M. J. Da Silva, *et al.* A transcriptomic analysis of gene expression in the venom gland of the snake *Bothrops alternatus* (urutu). BMC Genomics, v.11, p.605. 2010.

Chippaux, J. P., V. Williams, *et al.* Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. Toxicon, v.29, n.11, p.1279-303. 1991.

Cidade, D. A., T. A. Simao, *et al.* *Bothrops jararaca* venom gland transcriptome: analysis of the gene expression pattern. Toxicon, v.48, n.4, Sep 15, p.437-61. 2006.

Cobras Brasileiras. São Paulo. 2010 2010.

Cominetti, M. R., A. C. Martin, *et al.* Inhibition of platelets and tumor cell adhesion by the disintegrin domain of human ADAM9 to collagen I under dynamic flow conditions. Biochimie, v.91, n.8, Aug, p.1045-52. 2009.

Cominetti, M. R., C. H. Terruggi, *et al.* Alternagin-C, a disintegrin-like protein, induces vascular endothelial cell growth factor (VEGF) expression and endothelial cell proliferation in vitro. J Biol Chem, v.279, n.18, Apr 30, p.18247-55. 2004.

Costa, J. O., K. C. Fonseca, *et al.* Bhalternin: Functional and structural characterization of a new thrombin-like enzyme from *Bothrops alternatus* snake venom. Toxicon, v.55, n.7, Jun 15, p.1365-77. 2010.

Del Gatto, A., L. Zaccaro, *et al.* Novel and selective $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ receptor peptide antagonist: design, synthesis, and biological behavior. J Medl Chem, v.49, n.11, p.3416-3420. 2006.

Deolindo, P., A. S. Teixeira-Ferreira, *et al.* L-amino acid oxidase activity present in fractions of *Bothrops jararaca* venom is responsible for the induction of programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*. Toxicon, v.56, n.6, Nov, p.944-55. 2010.

Eliceiri, B. P. e D. A. Cheresh. The Role of αv Integrins during Angiogenesis. J Mol Med, v.4, p.741-750. 1998.

Ewing, B. e P. Green. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. Genome Res, v.8, n.3, Mar, p.186-94. 1998.

Felding-Habermann, B., B. M. Mueller, *et al.* Involvement of Integrin αV Gene Expression in Human Melanoma Tumorigenicity. J Clin Invest, v.89, p.2018-2022. 1992.

Fenwick, A. M., R. L. Gutberlet-Jr, *et al.* Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pit vipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes:Viperidae). Zoological Journal of the Linnean Society, v.156, p.617-640. 2009.

Fernandez, J. H., G. Neshich, *et al.* Using bradykinin-potentiating peptide structures to develop new antihypertensive drugs Genet. Mol. Res., v.3 n.4, December 30, 2004, p.554-563. 2004.

Fox, J. W. e S. M. Serrano. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. Toxicon, v.45, n.8, Jun 15, p.969-85. 2005.

_____. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. FEBS J, v.275, n.12, Jun, p.3016-30. 2008.

Fry, B. G. From genome to "venome": molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. Genome Res, v.15, n.3, Mar, p.403-20. 2005.

Fry, B. G., K. Roelants, *et al.* The toxicogenomic multiverse: convergent recruitment of proteins into animal venoms. Annu Rev Genomics Hum Genet, v.10, p.483-511. 2009.

Fry, B. G., H. Scheib, *et al.* Evolution of an arsenal: structural and functional diversification of the venom system in the advanced snakes (Caenophidia). Mol Cell Proteomics, v.7, n.2, Feb, p.215-46. 2008.

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

Garcia Denegri, M. E., O. C. Acosta, *et al.* Isolation and functional characterization of a new acidic PLA(2) Ba SpII RP4 of the *Bothrops alternatus* snake venom from Argentina. Toxicon, v.56, n.1, Aug 1, p.64-74. 2010.

Gay, C. C., S. L. Marunak, *et al.* Systemic alterations induced by a *Bothrops alternatus* hemorrhagic metalloproteinase (baltergin) in mice. Toxicon, v.53, n.1, Jan, p.53-9. 2009.

Gould, R. J., M. A. Polokoff, *et al.* Disintegrins: a family of integrin inhibitory proteins from viper venoms. Proc Soc Exp Biol Med, v.195, n.2, Nov, p.168-71. 1990.

Gumbiner, B. M. The Molecular Basis of Tissue Architecture and Morphogenesis. Cell, v.84, p.345-357. 1996.

Guo, Y., J. M. Ribeiro, *et al.* dCAS: a desktop application for cDNA sequence annotation. Bioinformatics, v.25, n.9, May 1, p.1195-6. 2009.

Hoffmann, S., S. He, *et al.* A selective cyclic integrin antagonist blocks the integrin receptors $\alpha\beta3$ and $\alpha\beta5$ and inhibits retinal pigment epithelium cell attachment, migration and invasion. BMC Ophthalmology, v.5, n.9, p.1-8. 2005.

Huang, X. e A. Madan. CAP3: A DNA sequence assembly program. Genome Res, v.9, n.9, Sep, p.868-77. 1999.

Hynes, R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. Cell, v.110, n.6, Sep 20, p.673-87. 2002.

_____. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. Science, v.326, n.5957, Nov 27, p.1216-9. 2009.

Jeffrey, K. L., M. Camps, *et al.* Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune responses. Nat Rev Drug Discov, v.6, n.5, May, p.391-403. 2007.

Junqueira-De-Azevedo, I. L. e P. L. Ho. 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, n.1-2, Oct 16, p.279-91. 2002.

Kashima, S., P. G. Roberto, *et al.* Analysis of *Bothrops jararacussu* venomous gland transcriptome focusing on structural and functional aspects: I--gene expression profile of highly expressed phospholipases A2. Biochimie, v.86, n.3, Mar, p.211-9. 2004.

Kassan, B. H. Purificação e caracterização parcial de uma lectina do veneno da serpente *Bothrops moojeni*. Universidade Estadual de Campinas UNICAMP. 1999. (Dissertação de Mestrado)

Kerr, J. R. Cell adhesion molecules in the pathogenesis of and host defence against microbial infection. J Clin Pathol:Mol Pathol, v.52, p.220-230. 1999.

Laemmli, U. K., F. Beguin, *et al.* A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. J Mol Biol, v.47, n.1, Jan 14, p.69-85. 1970.

Marcinkiewicz, C., S. Vijay-Kumar, *et al.* Significance of RGD loop and C-terminal domain of echistatin for recognition of alphaIIb beta3 and alpha(v) beta3 integrins and expression of ligand-induced binding site. Blood, v.90, n.4, Aug 15, p.1565-75. 1997.

Mariano-Oliveira, A., A. L. Coelho, *et al.* Alternagin-C, a nonRGD-disintegrin, induces neutrophil migration via integrin signaling. Eur J Biochem, v.270, n.24, Dec, p.4799-808. 2003.

Markland, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. Toxicon, v.36, n.12, Dec, p.1749-800. 1998.

Markland, F. S., Jr. Snake venom fibrinogenolytic and fibrinolytic enzymes: an updated inventory. Registry of Exogenous Hemostatic Factors of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Thromb Haemost, v.79, n.3, Mar, p.668-74. 1998.

Mcdowall, A., D. Inwald, *et al.* A novel form of integrin dysfunction involving β 1, β 2, and β 3 integrins. J Clin Invest, v.111, p.51-60. 2003.

Mclane, M. A., E. E. Sanchez, *et al.* Disintegrins. Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord, v.4, n.4, Dec, p.327-55. 2004.

Mello, S. M., A. Linardi, *et al.* Renal kinetics of Bothrops alternatus (Urutu) snake venom in rats. Toxicon, v.55, n.2-3, Feb-Mar, p.470-80. 2009.

Ministério-Da-Saúde. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos. Brasília - DF 2001.

_____. Acidentes por animais peçonhentos - Serpentes. http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1539 2011.

Muniz, J. R., A. L. Ambrosio, *et al.* The three-dimensional structure of bothropasin, the main hemorrhagic factor from Bothrops jararaca venom: insights for a new classification of snake venom metalloprotease subgroups. Toxicon, v.52, n.7, Dec 1, p.807-16. 2008.

Neiva, M., F. B. Arraes, *et al.* Transcriptome analysis of the Amazonian viper Bothrops atrox venom gland using expressed sequence tags (ESTs). Toxicon, Jan 18. 2009.

Nunez, V., P. Cid, *et al.* Snake venomomics and antivenomics of Bothrops atrox venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Peru and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards paedomorphism. J Proteomics, v.73, n.1, Nov 2, p.57-78. 2009.

Ohler, M., D. Georgieva, *et al.* The venomomics of *Bothrops alternatus* is a pool of acidic proteins with predominant hemorrhagic and coagulopathic activities. J Prot Res, v.9, p.2422-2437. 2010.

Organização-Mundial-Da-Saúde. World Health Organization - Snake antivenoms. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs337/en/> 2010.

Pung, Y. F., P. T. Wong, *et al.* Ohanin, a novel protein from king cobra venom, induces hypolocomotion and hyperalgesia in mice. Biol Chem Biol, v.280, p.13137-13147. 2005.

Ramos, O. H., A. Kauskot, *et al.* A novel alpha(v)beta (3)-blocking disintegrin containing the RGD motive, DisBa-01, inhibits bFGF-induced angiogenesis and melanoma metastasis. Clin Exp Metastasis, v.25, n.1, p.53-64. 2008.

Ramos, O. H. e H. S. Selistre-De-Araujo. Snake venom metalloproteases--structure and function of catalytic and disintegrin domains. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, v.142, n.3-4, Mar-Apr, p.328-46. 2006.

Rocha, M. M. T. e F. D. Furtado. Caracterização individual do veneno de *Bothrops alternatus* Dúmeril, Bilbron & Duméril em função da distribuição geográfica no Brasil (Serpentes, Viperidae). Revista Brasileira de Biologia, v.22, n.2, Jun 2005, p.383-393. 2005.

Sambrook, J. e D. Russell. Molecular Cloning: A Laboratory Manual: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001

Sanger, F., S. Nicklen, *et al.* DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A, v.74, n.12, Dec, p.5463-7. 1977.

Sanz, L., R. Q. Chen, *et al.* cDNA cloning and functional expression of jerdostatin, a novel RTS-disintegrin from *Trimeresurus jerdonii* and a specific antagonist of the alpha1beta1 integrin. J Biol Chem, v.280, n.49, Dec 9, p.40714-22. 2005.

Schwartz, M. A. e M. H. Ginsberg. Networks and crosstalk: integrin signalling spreads. Nat Cell Biol, v.4, p.E65-E68. 2002.

Seals, D. F. e S. A. Courtneidge. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. Genes Dev, v.17, n.1, Jan 1, p.7-30. 2003.

Selistre-De-Araujo, H. S., M. R. Cominetti, *et al.* Alternagin-C, a disintegrin-like protein from the venom of *Bothrops alternatus*, modulates alpha2beta1 integrin-mediated cell adhesion, migration and proliferation. Braz J Med Biol Res, v.38, n.10, Oct, p.1505-11. 2005.

Serrano, S. M., L. G. Jia, *et al.* Function of the cysteine-rich domain of the haemorrhagic metalloproteinase atrolysin A: targeting adhesion proteins collagen I and von Willebrand factor. Biochem J, v.391, n.Pt 1, Oct 1, p.69-76. 2005.

Srinivasan, K. R., C. S. Blesson, *et al.* Expression of alphaVbeta3 integrin in rat endometrial epithelial cells and its functional role during implantation. J Gen Comp Endo, v.160, p.124-133. 2009.

Stupack, D. G. e D. A. Cheresh. Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. J Cell Sci v.115, n.19, p.3729-3738. 2002.

Tashima, A. K., L. Sanz, *et al.* Snake venomomics of the Brazilian pitvipers *Bothrops cotiara* and *Bothrops fonsecai*. Identification of taxonomy markers. J Proteomics, v.71, n.4, Oct 7, p.473-85. 2008.

Tempone, A. G., H. F. Andrade, Jr., *et al.* *Bothrops moojeni* venom kills *Leishmania* spp. with hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. Biochem Biophys Res Commun, v.280, n.3, Jan 26, p.620-4. 2001.

Uetz, P., J. Hošek, *et al.* The Reptile Database. <http://www.reptile-database.org/> 2011.

Valente, R. H., P. R. Guimaraes, *et al.* *Bothrops insularis* venomomics: a proteomic analysis supported by transcriptomic-generated sequence data. J Proteomics, v.72, n.2, Mar 6, p.241-55. 2009.

Vija, H., M. Samel, *et al.* VGD and MLD-motifs containing heterodimeric disintegrin viplebedin-2 from *Vipera lebetina* snake venom. Purification and cDNA cloning. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, v.153, n.3, Jul, p.253-60. 2009.

Wang, Y. L., J. H. Kuo, *et al.* Cobra CRISP functions as an inflammatory modulator via a novel Zn²⁺- and heparan sulfate- dependent transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules. J Biol Chem, Oct 2. 2010.

Warrell, D. A. Snake bite. Lancet, v.375, n.9708, Jan 2, p.77-88. 2010.

Wierzbicka-Patynowski, I., S. Niewiarowski, *et al.* Structural requirements of echistatin for the recognition of alpha(v)beta(3) and alpha(5)beta(1) integrins. J Biol Chem, v.274, n.53, Dec 31, p.37809-14. 1999.

Yamazaki, Y. e T. Morita. Structure and function of snake venom cysteine-rich secretory proteins. Toxicon, v.44, n.3, Sep 1, p.227-31. 2004.