

Kiara Carolina Cardoso

**“Transcriptoma da glândula venenífera da serpente
Bothrops alternatus (urutu) e caracterização molecular e
bioquímica parcial da dipeptidilpeptidase IV”**

Campinas

2011



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

**“Transcriptoma da glândula venenífera da serpente
Bothrops alternatus (urutu) e caracterização molecular e
bioquímica parcial da dipeptidilpeptidase IV”**

Kiara Carolina Cardoso

**Tese de Doutorado apresentada à Pós-
Graduação da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas –
UNICAMP para a obtenção do título de Doutor
em Farmacologia. Sob a orientação do Prof.
Dr. Stephen Hyslop.**

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

C179t Cardoso, Kiara Carolina, 1979 -
Transcriptoma da glândula venenifera da serpente
Bothrops alternatus (urutu) e caracterização molecular e
bioquímica parcial da dipeptidil peptidase IV. / Kiara
Carolina Cardoso. -- Campinas, SP : [s.n.], 2011.

Orientador : Stephen Hyslop
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Bothrops alternatus*. 2. Transcriptoma. 3.
Dipeptidil peptidase 4. 4. Toxinas. I. Hyslop, Stephen.
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Venom gland transcriptomic of the snake *Bothrops alternatus* (urutu) and partial molecular and biochemical characterization of the dipeptidyl peptidase IV

Palavra-chave em inglês:

Bothrops alternatus

Transcriptomic

Dipeptidyl peptidase IV

Toxins

Titulação: Doutor em Farmacologia

Banca examinadora:

Stephen Hyslop [Orientador]

Ana Maria Moura da Silva

Heloisa Selistre de Araujo

Marcelo Lancellotti

Marcos Tadeu Nolasco da Silva

Data da defesa: 18-11-2011

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

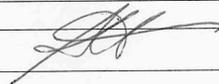
Banca Examinadora de Tese de Doutorado

Kiara Carolina Cardoso

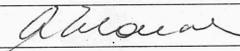
Orientador: Prof. Dr. Stephen Hyslop

Membros:

Professor Doutor Stephen Hyslop



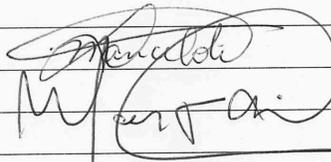
Professora Doutora Ana Maria Moura da Silva



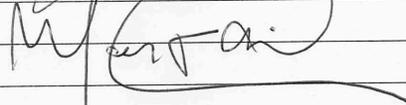
Professora Doutora Heloisa Selistre de Araujo



Professor Doutor Marcelo Lancellotti



Professor Doutor Marcos Tadeu Nolasco da Silva



Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 18/11/2011

DEDICATÓRIA

“Dedico este trabalho para minha família que tanto amo. Meus queridos pais João Rui Cardoso e Maria Alice Cardoso e aos meus irmãos Regis e Denis que são muito especiais. Sem o apoio e suporte de vocês nada disto seria possível.”

“Para o meu marido Diogo Matté Amaro com muito amor.”

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido marido Diogo Matté Amaro por ter me apoiado e aceitado ficar todos estes anos na distância física (10 anos), mas sempre perto de mim em sentimentos como amor, carinho, companheirismo e cumplicidade. Agradeço por você estar sempre ao meu lado e participar dos melhores e mais importantes momentos de minha vida. Eu te amo muito e obrigada por tudo.

Ao Prof. Dr. Stephen Hyslop por ter sido o orientador deste trabalho. Além de ser meu orientador, te considero um grande amigo com quem sempre pude ser sincera e que sempre esteve ao meu lado, tanto nos momentos fáceis e difíceis desta nossa longa caminhada. Obrigada por ser tão calmo, gentil e paciente comigo, pois isto sempre me trouxe sentimentos bons. Obrigada por ter me deixado livre para criar, buscar e me emocionar com minha pesquisa, por me apoiar nos estudos de animais tão fascinantes como as serpentes e as aranhas. Stephen o meu muito obrigada a você e sua família saiba que sempre poderão contar comigo.

Ao Dr. Márcio José da Silva do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) por ter participado da parte prática desta tese, onde tivemos “muito, muito e mais muito trabalho” para conseguirmos uma biblioteca de alta qualidade. Obrigada por ser um grande amigo, com quem pude dividir as mais diversas etapas e empreitadas. Foi uma experiência única trabalhar com você, pois sua abertura para a criatividade e inovação permitiu que fizéssemos muitos bons trabalhos juntos que foram desde animais exóticos até plantas. Obrigada por

ter aberto as portas do seu laboratório para mim, foi uma fase muito produtiva e muito divertida também.

Ao Dr. Marcelo Menossi do Instituto de Biologia (IB) pelo apoio inicial e por ter nos acompanhado no desenvolvimento deste trabalho.

A todos os co-autores do “paper” resultante desta tese. Em especial a Dra. Tatiana Torres por todo auxílio na análise dos dados deste trabalho, com certeza o trabalho ficou muito mais completo com a sua participação.

Ao Gustavo Lacerda bioinformata desta tese. Agradeço muito por toda a sua abertura para novas análises e também por toda a sua colaboração nas mais diversas fases deste trabalho.

Ao Igor Rapp Ferreira da Silva que me auxiliou nas milhares de cromatografias, nos mais diversos ensaios enzimáticos e de purificação.

A querida Thaís Rezende Silva por toda a sua disponibilidade, estímulo e carinho.

Aos meus amigos especiais Manoel, Sebá, Rafinha e Dani (Peda).

As amigas que dividiram casa comigo em especial Rafinha, Helen e Lu.

Ao pessoal da Farmacologia, Alessandra, Thomás, Lourdes, e Rafael.

A todos os técnicos, em especial José Ilton, Daniela Stancato e Eduardo Kyota.

Ao instituto Butantan pelo fornecimento das serpentes.

À FAPESP pela bolsa de doutorado e CNPq pelo auxílio projeto.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	xxi
Lista de Figuras	xxiii
Lista de Tabelas	xxvii
Resumo	xxix
Abstract	xxxv

Capítulo I

1. Introdução Geral	43
1.2. Estrutura da glândula venenífera	43
1.3. Biossíntese de peçonha	44
1.4. Controle da expressão gênica	45
1.5. Clonagem de genes	46
2. Objetivos	49

Capítulo II

Transcriptoma da glândula venenífera de *B. alternatus*

1. Introdução	55
1.1. Utilização de ESTs (expressed sequence tags)	55
1.2. Bibliotecas de cDNA de glândula de serpente	57
1.3. <i>Bothrops alternatus</i>	59
2. Objetivos	63
3. Materiais e Métodos	65
3.1. Obtenção das glândulas veneníferas	65
3.2. Extração do RNA total	65
3.3. Construção da biblioteca de cDNA	65
3.4. Validação final da biblioteca	69

3.5. Bioinformática das sequências de EST.....	70
3.6. Anotação da biblioteca de <i>B. alternatus</i>	71
3.7. Análise de peptídeo sinal	72
3.8. Alinhamento das sequências	72
3.9. Análise de nucleotídeos de base única.....	72
3.10. Identificação repetições simples	73
3.11. Análise comparativa da biblioteca de ESTs.....	74
4. Resultados.....	75
4.1. Extração do RNA total	75
4.2. Construção da biblioteca de ESTs	75
4.3. Validação final da biblioteca	77
4.4. Bioinformática das sequências de ESTs	78
4.5. Anotação da biblioteca de <i>B. alternatus</i>	82
4.6. Análise de GO.....	83
4.7. Componentes de peçonha identificados nos ESTs.....	85
4.7.1. Toxinas mais abundantes	86
4.7.1.1. Metaloproteinases/desintegrinas.....	86
4.7.1.2. Fosfolipases A ₂ (PLA ₂).....	87
4.7.1.3. Serinoproteinases.....	88
4.7.1.4. Lectinas do tipo C	88
4.7.1.5. Precursores dos peptídeos potenciadores da bradicinina (BPPs).....	89
4.7.2. Toxinas menos abundantes	89
4.8. Identificação de proteínas relacionadas ao funcionamento da glândula.....	91
4.9. Análise de peptídeo de sinal	93
4.10. Análise de polimorfismos de nucleotídeos de base única.....	93

4.11. Identificação de repetições simples.....	93
4.12. Identificação de elementos de transposição (TEs)	94
4.13. Análise comparativa da biblioteca de ESTs de <i>B. alternatus</i>	98
5. Discussão	99
6. Conclusões	131

Capítulo III

Caracterização molecular e bioquímica parcial da dipeptidil peptidase IV

1. Introdução.....	137
1.2. Ação cardiovascular de peçonhas de serpentes.....	137
1.3. Dipeptidil peptidase IV (DPP IV)	139
1.4. Aminopeptidases	144
1.4.1. Aminopeptidase N	145
1.4.2. Aminopeptidase A	147
1.4.3. Aminopeptidases em peçonhas	148
2. Objetivos	151
3. Materiais e Métodos.....	153
3.1. Amplificação do gene da DPP IV	153
3.2. Purificação da DPP IV da peçonha de <i>B. alternatus</i>	162
3.2.3. Eletroforese por SDS-PAGE	163
3.3. Amplificação parcial do gene da aminopeptidase A (APA)	164
3.4. Amplificação parcial do gene da aminopeptidase M (APM)	166
4. Resultados.....	169
4.1. Obtenção do RNAm e cDNA	169
4.2. Amplificação do gene da DPP IV	169
4.2.1. LD-PCR do gene da DPP IV.....	171

4.2.2. Sequenciamento dos <i>amplicons</i> de DPP IV	172
4.3. Sequência da proteína da DPP IV	174
4.4. Amplificação da região de interesse para produção de DPP IV recombinante	178
4.4.1. Construção do cassete de expressão da região final do gene da DPPIV.....	180
4.4.2. Confirmação (através de PCR)	181
4.4.3. Confirmação (através de digestão)	181
4.4.4. Confirmação (através de digestão)	182
4.4.5. Testes preliminares de indução e purificação.....	183
4.4.6. Testes iniciais de purificação utilizando resina.....	185
4.4.7. <i>Western blotting</i>	186
4.5. Purificação da DPP IV da peçonha de <i>B. alternatus</i>	187
4.6. Amplificação parcial do gene da aminopeptidase A.....	190
4.7. Amplificação parcial do gene da aminopeptidase M.....	194
5. Discussão	197
6. Conclusões	205
Referências Bibliográficas	207

LISTA DE ABREVIATURAS

Base calling - Processo de leitura dos dados sequenciador

BSA - Albumina Bovina Sérica

BA - *Bothrops alternatus*

Contig - Grupo de sequências com regiões sobrepostas

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

dNTP - Desorribonucleotídeos trifosfatados (A, T, G e C)

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

EST- Expressed Sequence Tag

cDNA - DNA complementar

FASTA -Formato de arquivo utilizado em Bioinformática para o intercâmbio de informação entre bancos de dados

GenBank - Banco de dados do NIH (National Institutes of Health)

LD-PCR - Long Distance-PCR

Pb - Pares de base

PCR - Polymerase Chain Reaction

Pipeline - Sequência de programas que trabalham em conjunto

Primer - Oligonucleotídeo iniciador

RNA - Ácido ribonucléico

SDS - Sodium Dodecyl Sulfate

TE - Tris – EDTA

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. CICLO CELULAR DURANTE A BIOSÍNTESE DE PEÇONHA NA GLÂNDULA VENENÍFERA.	44
FIGURA 2. OPERAÇÕES DESENCADEADAS PELA ENTRADA DE SEQUÊNCIAS (ATRAVÉS DO ZIP FILE)	57
FIGURA 3. ABUNDÂNCIA DE CLONES RELACIONADOS COM TOXINAS OBTIDOS EM ESTUDOS DE ESTS	59
FIGURA 4. <i>BOTHROPS ALTERNATUS</i> (URUTU).	60
FIGURA 5. AS PRINCIPAIS FAMÍLIAS DE TOXINAS DETECTADAS NA PEÇONHA DE <i>B. ALTERNATUS</i>	61
FIGURA 6. AS PRINCIPAIS FAMÍLIAS DE TOXINAS DETECTADAS EM PEÇONHAS BOTRÓPICAS	62
FIGURA 7. MAPA DE VETOR PDONR 222 UTILIZADO PARA A CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DE CDNA.	67
FIGURA 8. RESUMO DA MONTAGEM DA BIBLIOTECA DE CDNA	68
FIGURA 9. ANÁLISE DA QUALIDADE DO RNA EXTRAÍDO DA GLÂNDULA VENENÍFERA	75
FIGURA 10. A - ELETROFORESE DA cDNA DA GLÂNDULA VENENÍFERA.....	76
FIGURA 11. cDNAs DA BIBLIOTECA EXTRAÍDOS A PARTIR DE LISE ALCALINA.....	77
FIGURA 12. ELETROFORESE DOS PRODUTOS DA PCR.	78
FIGURA 13. RESULTADO DA ANÁLISE DE VALIDAÇÃO DE DUAS BIBLIOTECAS.....	79
FIGURA 14. PÁGINA DE ANOTAÇÃO DA BIBLIOTECA DE ESTS DE <i>B. ALTERNATUS</i>	80
FIGURA 15. PIPELINE DE BIOINFORMÁTICA DESENVOLVIDO PARA CLUSTERIZAÇÃO.....	81
FIGURA 16. O TAMANHO DOS ESTS OBTIDOS NAS BIBLIOTECAS DE <i>B. ALTERNATUS</i>	82
FIGURA 17. COMPARAÇÃO ENTRE O NÚMERO DE <i>HITS</i> E <i>NO-HITS</i> APÓS BLAST CONTRA SERPN.....	83
FIGURA 18. AS FUNÇÕES MOLECULARES IDENTIFICADAS PELA ANÁLISE DE GO DOS ESTS.....	84
FIGURA 19. OS PROCESSOS BIOLÓGICOS IDENTIFICADOS PELA ANÁLISE DE GO DOS ESTS.....	84
FIGURA 20. PRINCIPAIS CLASSES DE TOXINAS NA BIBLIOTECA DE CDNA DE <i>B. ALTERNATUS</i>	85
FIGURA 21. A DISTRIBUIÇÃO DOS TRANSCRITOS RELACIONADOS COM METALOPROTEINASES	87
FIGURA 22. ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA DUSP6 DE <i>B. ALTERNATUS</i>	92
FIGURA 23. ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA TIOREDOXINA (TRX)	92
FIGURA 24. EXEMPLO DE UM IR LONGO ENCONTRADO NO CONTIG649 DO GENE DA BPP/CNP	96
FIGURA 25. ABUNDÂNCIA RELATIVA DAS PRINCIPAIS CLASSES DE TOXINAS	98
FIGURA 26. COMPONENTES PRESENTES EM PEÇONHAS DE SERPENTES.	140
FIGURA 27.A - AÇÃO DE PEPTIDASES SOBRE PEPTÍDEOS E PROTEÍNAS.	141

FIGURA 28. (A) PCR DA PORÇÃO INICIAL DO GENE DA DPP IV.....	170
FIGURA 29. (A) PCR DA PORÇÃO MÉDIA DO GENE DA DPP IV.....	170
FIGURA 30. (A) PCR DA PORÇÃO FINAL DO GENE DA DPP IV.....	171
FIGURA 31. AMPLIFICAÇÃO DO GENE DA DPP IV POR LD-PCR.....	172
FIGURA 32. SEQUÊNCIA DO GENE DA DPPIV.....	173
FIGURA 33. SEQUÊNCIA DA PROTEÍNA DA DPP IV.....	175
FIGURA 34. ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DA PROTEÍNA DA DPP IV DE <i>B. ALTERNATUS</i>	177
FIGURA 35. CLADOGrama MOSTRANDO A RELAÇÃO ENTRE A DPP IV DE <i>B. ALTERNATUS</i>	178
FIGURA 36. (A) PCR DA PORÇÃO FINAL DO GENE DA DPP IV.....	179
FIGURA 37. SEQUÊNCIA DO GENE DA DPPIV.....	179
FIGURA 38. DIGESTÃO DO VETOR PET-TEV.....	180
FIGURA 39. AMPLIFICAÇÃO DA DPP IV.....	181
FIGURA 40. DIGESTÃO DO DNA DE QUATRO COLÔNIAS.....	182
FIGURA 41. DIGESTÃO DO DNA DE TRÊS COLÔNIAS POSITIVAS.....	183
FIGURA 42. ELETROFORESE DAS AMOSTRAS NÃO INDUZIDAS E INDUZIDAS.....	184
FIGURA 43. ELETROFORESE.....	185
FIGURA 44. <i>WESTERN BLOT</i> COM ANTICORPO ANTI-HIS TAG.....	186
FIGURA 45. <i>WESTERN BLOT</i> COM ANTICORPO ANTI-HIS TAG.....	187
FIGURA 46. PURIFICAÇÃO PARCIAL DA DPP IV DA PEÇONHA DE <i>B. ALTERNATUS</i>	188
FIGURA 47. SDS-PAGE DA PROTEÍNA ISOLADA.....	189
FIGURA 48. ATIVIDADE DPP IV DA PROTEÍNA ISOLADA POR TROCA IÔNICA.....	190
FIGURA 49. SEQUÊNCIA DO GENE DA APA.....	192
FIGURA 50. SEQUÊNCIA DO GENE DA APA.....	193
FIGURA 51. LD-PCR DA APA.....	193
FIGURA 52. PCR DA PORÇÃO MÉDIA DO GENE DA APM.....	194
FIGURA 53. SEQUÊNCIA DO GENE DA APM/N DA SERPENTE <i>G. B. BREVICAUDUS</i>	195

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. AS POSIÇÕES DOS SNPs NA BIBLIOTECA DE CDNA DA GLÂNDULA VENENÍFERA DE <i>B. ALTERNATUS</i>	95
TABELA 2. A DETECÇÃO DE ELEMENTOS DE TRANSPOSIÇÃO (TES) NA BIBLIOTECA DE CDNA.....	97
TABELA 3. PURIFICAÇÃO DA DPP IV DA PEÇONHA DE <i>B. ALTERNATUS</i>	189

RESUMO

O estudo do transcriptoma de bibliotecas de cDNA da glândula venenifera de serpentes, realizado a partir da análise de ESTs (*expressed sequence tags*), tem se mostrado útil na identificação de genes expressos neste tecido, inclusive no gênero *Bothrops*, responsável pela maioria dos acidentes ofídicos no Brasil. Neste trabalho utilizamos uma abordagem transcriptômica para analisar a composição gênica da glândula venenifera da serpente *Bothrops alternatus*, uma espécie encontrada no sudeste e sul do Brasil, Uruguai, norte da Argentina e leste do Paraguai. Também clonamos e caracterizamos parcialmente a enzima dipeptidilpeptidase IV (DPP IV), uma enzima que cliva peptídeos com prolina ou alanina na penúltima posição em sua porção N-terminal e que tem sido detectada em diversas peçonhas ofídicas. A construção de bibliotecas de cDNA usando métodos convencionais de clonagem, sequenciamento e análise bioinformática resultou em 5,350 ESTs que foram reunidas em 838 *contigs* and 4512 singletons. Pesquisas a partir de bancos de dados relevantes (BLAST) mostraram 30% de *hits* e 70% *no-hits*. Os transcritos relacionados a toxinas correspondem a 23% do total de transcritos e 78% dos *hits*, respectivamente. A análise por ontologia gênica (GO) detectou genes relacionados ao metabolismo geral, transcrição, tradução, processamento, degradação de polipeptídeos, funções estruturais, e regulação celular. Os principais grupos de toxinas identificados foram metaloproteinases (81%), peptídeos potenciadores da bradicinina/peptídeos natriuréticos do tipo C (8,8%), fosfolipases A₂ (PLA₂; 5,6%), serinoproteinases (1,9%) e lectinas do tipo C (1,5%). As metaloproteinases eram quase que

exclusivamente da classe PIII, com poucas da classe PII e nenhuma da classe PI. As PLA₂ eram todas ácidas; nenhuma PLA₂ básica foi detectada. Outras toxinas encontradas incluíram a L-aminoácido oxidase, proteínas secretadas ricas em cisteína, DPP IV, hialuronidase, toxinas *three-finger* e ohanina. Foram identificadas duas proteínas não-tóxicas, a tioredoxina e a Dusp6 (fosfatase de dupla especificidade) que mostraram alto grau de similaridade a proteínas semelhantes de outras serpentes. Também foram observados polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs – *single-nucleotide polymorphisms*), microssatélites, *transposons* e repetições invertidas, todos os quais podem contribuir de alguma forma para a multiplicidade de toxinas na glândula. Estes resultados mostram que a glândula venenífera de *B. alternatus* possui as principais classes de toxinas encontradas em estudos transcriptômicos e proteômicos de outras espécies botrópicas. A predominância de metaloproteinases da classe PIII está condizente com a atividade hemorrágica da peçonha, enquanto o conteúdo reduzido de serinoproteinases e lectinas do tipo C pode refletir na coagulopatia menos intensa observada após envenenamento por esta espécie. A ausência de PLA₂ básica é refletida na miotoxicidade menos acentuada desta peçonha quando comparada a outras espécies do gênero. A clonagem da DPP IV e dedução da sequência de aminoácidos revelaram uma proteína com alta homologia com a enzima da serpente *Gloydius blomhoffi brevicaudus* de 751 aminoácidos, inclusive o sítio ativo conservado composto pela tríade Ser⁶¹⁶, Asp⁶⁹⁴ e His⁷²⁶ na região C-terminal, e a sequência de consenso (Gly-X-Ser-X-Gly) característica de serinoproteinases na posição Ser⁶¹⁶. Tentativas de expressar de forma parcial a proteína em *Escherichia coli* BL21 não foram bem sucedidas. Entretanto, usando uma

combinação de gel filtração e troca iônica, foi isolada da peçonha de *B. alternatus* uma proteína com massa molecular de ~116 kDa (por SDS-PAGE). A atividade específica foi de $23,3 \pm 0,2$ nmol/min/mg, com fator de purificação foi de 34 e rendimento protéico de 0,32%. A atividade enzimática da peçonha e da proteína isolada foi inibida 100% pela diprotina A, inibidor específico clássico da DPP IV, confirmando a natureza da enzima.

ABSTRACT

Transcriptomic studies of snake venom gland cDNA based on the analysis of expressed sequence tags (ESTs) have been useful in identifying the genes expressed in this organ in a variety of species, including the genus *Bothrops*, which is responsible for most venomous snakebites in Brazil. In this work, we used a transcriptomic approach to analyze the gene composition of the venom gland of *Bothrops alternatus* (urutu), a species found in southeastern and southern Brazil, Uruguay, northern Argentina e eastern Paraguay. We also cloned and partially characterized dipeptidylpeptidase IV (DPP IV), an enzyme that cleaves peptides with proline or alanine as the penultimate residue in the N-terminal region and has been identified in several snake venoms. A cDNA library constructed using conventional methods of cloning, sequencing and bioinformatic analysis yielded 5,350 ESTs that formed 838 contigs and 4512 singletons. Databank BLAST searches yielded 30% hits and 70% no-hits. Toxin-related transcripts accounted for 23% of the total transcripts and 78% of the hits. Gene ontology analysis detected genes related to general metabolism, transcription, translation, processing, polypeptide degradation, structural functions and cellular regulation. The main toxin groups identified were metalloproteinases (81%), bradykinin-potentiating peptides/C-type natriuretic peptides (8.8%), phospholipases A₂ (PLA₂; 5.6%), serine proteinases (1.9%) and C-type lectins (1.5%). Metalloproteinases were almost exclusively class PIII, with few class PII and no class PI enzymes. The PLA₂ were all acidic; no basic PLA₂ were detected. Other toxins identified included

L-amino acid oxidase, cysteine-rich secretory proteins, DPP IV, hyaluronidase, three-finger toxins and ohanin. Two non-toxic proteins, thioredoxin and a dual specificity phosphatase (Dusp6), shared high sequence homology with similar proteins from other snakes. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs), microsatellites, transposons and inverted repeats were also observed and may contribute to the toxin diversity of the gland. These results show that the venom gland of *B. alternatus* contains the major toxin classes identified in transcriptomic and proteomic studies of other *Bothrops* species. The predominance of class PIII metalloproteinases agrees with the hemorrhagic activity of this venom, while the low content of serine proteinases and C-type lectins could account for the less intense coagulopathy observed after envenoming by this species. The lack of basic PLA2 agrees with the lower myotoxicity of this venom compared to other *Bothrops* species. The cloning of DPP IV and deduction of its amino acid sequence revealed a protein with high homology to the corresponding 751-amino acid enzyme from the snake *Gloydius blomhoffi brevicaudus*, with conservation of the active site formed by the triad of Ser616, Asp694 and His726 in the C-terminal region and the presence of a consensus sequence (Gly-X-Ser-X-Gly) characteristic of serine proteinases at position Ser616. However, using a combination of gel filtration and ion exchange chromatography, a protein with a molecular mass ~116 kDa (by SDS-PAGE) was isolated from the venom. The specific activity of this enzyme was 23.3 ± 0.2 nmol/min/mg, with a purification factor of 34 and a protein yield of 0.32%. The enzymatic activity of the venom and the isolated protein was completely inhibited by diprotin A, a specific inhibitor of DPP IV, thus confirming the identity of the enzyme.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

1. Introdução Geral

As peçonhas de serpentes são misturas complexas de mais de 100 componentes que incluem proteínas, peptídeos, carboidratos e pequenas moléculas orgânicas e inorgânicas (1; 2; 3;4; 5;6). As proteínas incluem neurotoxinas pré- e pós-sinápticas (7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15), e enzimas tais como (metalo)proteínases, peptidases, fosfolipases, nucleases, oxidases, entre outras (4; 16; 17; 18).

1.2. Estrutura da glândula venenífera

A produção de peçonha por serpentes peçonhentas ocorre em glândulas especializadas, cuja estrutura e organização têm sido bastante estudadas em diversas espécies (19;20;21; 22; 23; 24). Nas serpentes que fazem parte das famílias Elapidae [que inclui as cobras corais (*Micrurus*) no Brasil] e Viperidae [que inclui as cascavéis (*Crotalus durissus* ssp.), jararacas (*Bothrops* spp.) e surucucu (*Lachesis muta*), no Brasil, a peçonha é produzida em células epiteliais especializadas que forram a superfície interna da glândula, e secretam a peçonha para o lúmen da glândula, onde é estocada até ser injetada na presa ou extraída manualmente (19; 21). Entre as serpentes peçonhentas do Brasil, as mais bem estudadas quanto à estrutura da glândula venenífera e a biossíntese de peçonha são a cascavel, *Crotalus durissus terrificus* (25;26;27;28), *Bothrops jararaca* (29;30; 31; 32; 33; 34; 35; 36; 37; 38) e *Bothrops jararacussu* (39).

1.3. Biossíntese de peçonha

A biossíntese e secreção dos componentes protéicos de peçonha seguem a via secretória convencional envolvendo o retículo endoplasmático rugoso, o aparato de Golgi e a formação de vesículas ou grânulos secretores, com exocitose das proteínas produzidas (27; 39; 40; 41). O pico máximo da atividade biossintética ocorre aproximadamente quatro dias após a extração da peçonha (19;20;29; 39; 42)(Fig.1).

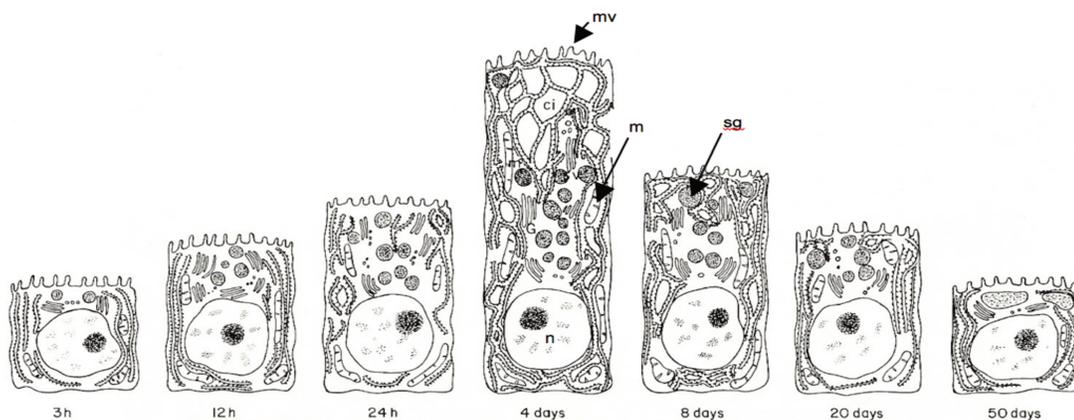


Figura 1. Ciclo celular durante a biossíntese de peçonha na glândula venenífera. Os intervalos indicam o período após a extração de peçonha da glândula da serpente *Vipera palestinae*. ci – cisterna do retículo endoplasmático rugoso, G – complexo de Golgi, m – mitocôndria, mv – microvilos, n – núcleo, sg – grânulo secretor. Fonte: Kochva et al (19).

A análise deste perfil de atividade biossintética tem sido baseada em alterações ultraestruturais (26; 27; 29; 39; 40), na análise da síntese de RNAm (42; 43; 44; 45) e de proteína (25; 26; 27; 40) e na quantificação do acúmulo de enzimas/proteínas específicas dentro das células secretoras, por imunohistoquímica (28; 34; 35; 46; 47; 48) ou hibridização *in situ* (47; 48), e na peçonha, por dosagem da atividade enzimática (19;21; 49). A regulação ou controle da biossíntese das proteínas de peçonhas parece envolver um

componente físico (através de variações na pressão intraluminal sobre as células epiteliais secretoras da glândula, a qual varia de acordo com o volume de peçonha presente no lúmen (19), bem como um componente neuronal envolvendo a inervação simpática através da estimulação de receptores β -adrenérgicos por catecolaminas (29; 30; 36; 37; 38) e por proteínas ligadoras de cálcio (50). Entretanto, tais controles não são essenciais para a biossíntese de peçonha uma vez que alguns estudos já demonstraram ser possível cultivar células de glândula venenífera *in vitro*, com produção de peçonha, embora por tempo limitado (51; 52; 53; 54; 31).

1.4. Controle da expressão gênica

Muitos componentes de peçonhas são codificados por um único gene na glândula (55), enquanto que outros são codificados por dois ou mais genes que podem constituir “famílias” de genes para proteínas estreitamente relacionadas em termos de estrutura e função biológica, como é o caso para serinoproteinases (56), metaloproteinases (57; 58; 59; 60; 61), fosfolipases A2 (62; 63; 64; 65; 66; 67) e neurotoxinas (68; 69; 70; 71). Em alguns casos, especialmente no grupo de metaloproteinases/desintegrinas e lectinas do tipo C, há a produção de uma proteína precursora a partir da qual os componentes individuais são liberados por hidrólise em sítios específicos (42; 57; 58; 60; 61; 72; 73; 74). Este mesmo mecanismo de hidrólise, também ocorre no grupo dos peptídeos potencializadores de bradicinina (BPPs) e peptídeos natriuréticos atriais do tipo C (CNP) (75; 76; 77; 78).

Variações nos níveis de atividade gênica contribuem para a expressão independente ou assíncrona dos componentes da peçonha, com padrões diferentes de acúmulo para cada proteína (40;49;46; 79; 80) e também para a variabilidade individual (32;33; 81; 82) e geográfica (65;83; 84; 85; 86) vista na composição das peçonhas de muitas espécies. Eventos como a duplicação gênica e rearranjo gênico (64; 68; 87; 88; 89; 90; 91) , a presença de snoRNA (small nucleolar RNA) e mRNA sexo específico (92; 93), de seqüências adicionais ou “invasoras” e inserções de DNA (94;95; 96;89), de mutações/substituições de nucleotídeos (levando à troca de aminoácidos) (56; 69;94; 97), de deleções (69; 73; 98), a ação de elementos silenciadores (99), a presença de elementos de transposição (100;101; 102; 103; 104) e de polimorfismos de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphisms* - SNPs) e microssatélites (93) podem regular os níveis de expressão e dar origem a isoformas de enzimas, toxinas e novas toxinas em peçonhas. Além do controle da expressão propriamente dito, a edição pós-transcricional (45; 105; 106), splicing alternativo (55; 68; 107; 108; 109), e modificações pós-transdacionais (110; 111; 112; 106;113) podem contribuir para a variabilidade na composição de peçonhas.

1.5. Clonagem de genes

Historicamente, a caracterização estrutural, bioquímica e fisiológica de componentes de peçonhas tem sido feita utilizando material purificado por meios convencionais envolvendo cromatografias de baixa e alta pressão e eletroforese preparativa. O principal obstáculo desta abordagem é a obtenção dos componentes purificados em quantidades suficientes para análise, uma vez que

em muitos casos o rendimento obtido usando métodos convencionais é muito baixo. Além disso, a análise da proteína purificada pouco oferece em termos de informação sobre a estrutura gênica e sua expressão e regulação na glândula venenífera. Daí o interesse na clonagem e expressão *in vitro* de diversos componentes de peçonha para permitir a análise da sua estrutura gênica. Um levantamento em bancos de dados como a PubMed mostra que nos últimos anos um número cada vez maior de componentes (proteínas e peptídeos) de peçonhas de diversas espécies de serpentes têm sido clonados e sua estrutura gênica determinada.

No caso de peçonhas de serpentes sul-americanas (principalmente do gênero *Bothrops*), a clonagem tem sido aplicada em numerosos trabalhos para estudar componentes tais como peptídeos potenciadores de bradicinina (BPPs) e peptídeos natriuréticos atriais do tipo C (CNPAs) (114; 75; 115; 116; 117; 78), fosfolipases (66; 118; 119; 120; 121;122; 123;124; 125), serinoproteinases (126;127; 128; 129), metaloproteinases (42;130; 131; 132; 133; 134; 135)proteínas que afetam a coagulação (136; 137; 138; 139), neurotoxinas (109; 110; 140; 141), miotoxinas básicas do tipo crotamina (142; 143; 144; 145; 146), lectinas e proteínas tipo lectina (109; 147; 148; 149), fator de crescimento neuronal (150;151), fatores de crescimento do endotélio vascular (152;153; 151), L-amino oxidase (154; 155), desintegrinas (156; 157; 158), e uma proteína com homologia à calmodulina e troponina-C (159).

2. OBJETIVOS

Os objetivos gerais desta investigação foram: (1) produzir um amplo banco de ESTs que permitiria analisar o transcriptoma da glândula de peçonha da *B. alternatus* com o intuito de obter uma visão global e abrangente da expressão gênica desta glândula, e (2) avaliar a presença da peptidase dipeptidil peptidase IV nesta glândula, visando a expressão e purificação desta enzima para estudo das suas atividades biológicas. Estes dois objetivos são descritos nos capítulos II e III, respectivamente.

CAPÍTULO II

**TRANSCRIPTOMA DA GLÂNDULA VENENÍFERA
DE *B. ALTERNATUS***

1. INTRODUÇÃO

1.1. Utilização de ESTs (expressed sequence tags)

O desenvolvimento dos transcriptomas glandulares através de bibliotecas de cDNA da glândula venenífera de serpente, a partir da análise das sequências expressas (*expressed sequence tags* - EST), têm se mostrado uma excelente estratégia para a identificação de genes expressos neste tecido, além de fornecer informações importantes sobre o funcionamento do genoma das serpentes. Os genes expressos codificam diversas proteínas com diferentes funções, por exemplo, proteínas estruturais, enzimáticas e de regulação. Entretanto, sabe-se que não é a expressão de um ou dois genes, mas a expressão conjunta de múltiplos genes, expressos em um determinado momento, interagindo em diferentes níveis, que diferencia uma resposta biológica de outra. As ESTs obtidas a partir da glândula venenífera são sequências parciais de uma das extremidades da molécula de DNA complementar, portanto são sequências dos RNA mensageiros (mRNA) expressos neste tecido, o que permite a caracterização preliminar deste transcriptoma. De modo geral, existem informações suficiente em 100-400 bases de nucleotídeos sequenciadas para a identificação desses cDNAs (93; 160;161).

A caracterização das ESTs precisa ser acompanhada de sua anotação, que converte a informação produzida em conteúdo biológico, isto é, identifica os genes expressos em um dado momento em determinado tecido, e as prováveis proteínas resultantes. Deste modo, para esta análise *in silico* do funcionamento de um tecido específico e suas funções biológicas a partir de dados gerados de

uma biblioteca de cDNA, é indispensável a bioinformática, que pode ser definida como o agrupamento de modalidades que abrangem os aspectos de aquisição, processamento, armazenamento, distribuição, análise e interpretação da informação biológica. Para isto, se faz necessário um conjunto de conhecimentos como a engenharia de softwares, a matemática, a estatística, a ciência da computação e a biologia molecular a bioinformática.

A bioinformática, através de programas computacionais, permite a análise das sequências geradas pelo sequenciamento das ESTs. Os dados brutos provenientes do sequenciador de DNA são submetidos diretamente para um programa de *base calling*. O *base calling* é um processo de leitura dos dados advindos do sequenciador e de identificação da sequência de DNA gerada, atribuindo ainda um valor de qualidade para cada posição nucleotídica identificada, e verificando a qualidade do sequenciamento de cada base das várias sequências geradas. O software mais utilizado nessa fase é o PHRED (162), que reconhece dados de sequências a partir de arquivos SCF (*standard chromatogram format*), que são arquivos de cromatograma dos analisadores automáticos de DNA. O PHRED reconhece a sequência de nucleotídeos resultantes do sequenciamento, atribui valores de qualidade às bases sequenciadas e gera arquivos de saída com as informações sobre o *base calling* e os valores de qualidade (163).

Em seguida, os dados são submetidos à trimagem para remoção do vetor e de sequências bacterianas pelo programa BD Trimmer (163). Posteriormente, os dados são passados para um software de montagem, onde é realizado o agrupamento de sequências, ou clusterização, com a utilização do programa

(CAP3) que comparam as sequências a bancos de dados já existentes (164). Estes programas são responsáveis pela leitura das informações do *base call* e montagem dos pequenos fragmentos de DNA sequenciados em sequências maiores (conhecidos como contíguos ou contigs). Resumidamente, os passos para análise de sequência estão mostrados na Figura 2.

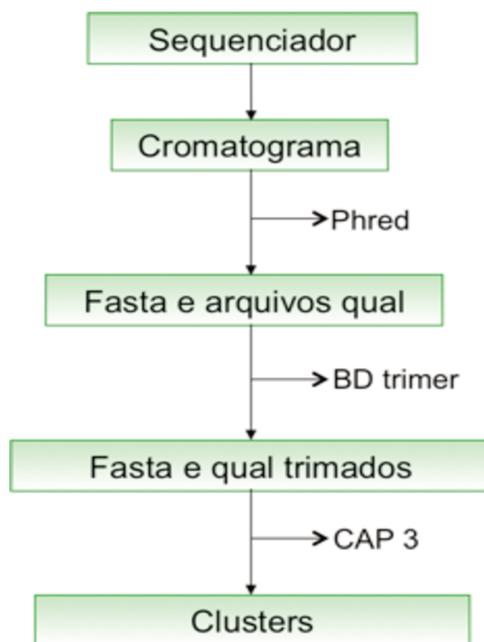


Figura 2. Operações desencadeadas pela entrada de sequências (através do zip file) no *pipeline* de análise. Os programas usados em cada etapa estão indicados à direita das setas. Arquivos qual = arquivos de qualidade; BD - banco de dados.

1.2. Bibliotecas de cDNA de glândula de serpente

O conhecimento de novos genes a partir de bibliotecas de cDNA está sendo cada vez mais usado para análise da expressão e caracterização de determinados genes em serpentes. De fato, a clonagem de genes a partir de bibliotecas de cDNA de glândulas veneníferas vem sendo usada desde a década

de 90, embora ainda haja poucos artigos publicados contendo estes dados de forma completa.

Aproximadamente 300 espécies de serpentes peçonhentas são conhecidas no mundo, mas até o presente momento este tipo de estudo tem sido relatado para algumas espécies do gênero *Bothrops*, como a *Bothrops atrox*(165), *Bothrops insularis*(106; 116), *Bothrops jararaca*(166) e *Bothrops jararacussu*(66), além de diversas espécies não-botrópicas, tais como *Agkistrodon acutus* (167), *Bitis arietans* (168), *Bitis gabonica* (169), *Bungarus flaviceps* (170), *Bungarus multicinctus* (171), *Cerberus rynchops* (172), *Crotalus adamanteus* (173), *Crotalus durissus collilineatus* (151), *Deinagkistrodon acutus* (174), *Drysdalia coronoides* (175), *Echis* ssp. (176; 177; 178), *Lachesis muta* (179; 180), *Micrurus corallinus* (109), *Naja atra* (171), *Philodryas olfersii* (181) e *Sistrurus catenatus edwardsii* (182).

No caso das espécies de *Bothrops*, os resultados destas investigações de ESTs mostram que as principais classes de toxinas são as metaloproteinases, BPPs, PLA₂, serinoproteinases e lectinas tipo C. A análise dos dados também indica que há variações interespecíficas na abundância de alguns grupos de toxinas, como o alto conteúdo de BBPs, metaloproteinases, PLA₂ e serinoproteinases nos transcriptomas de *B. insularis*, *B. atrox*, *B. jararacussu* e *B. jararaca*, respectivamente (Fig.3).

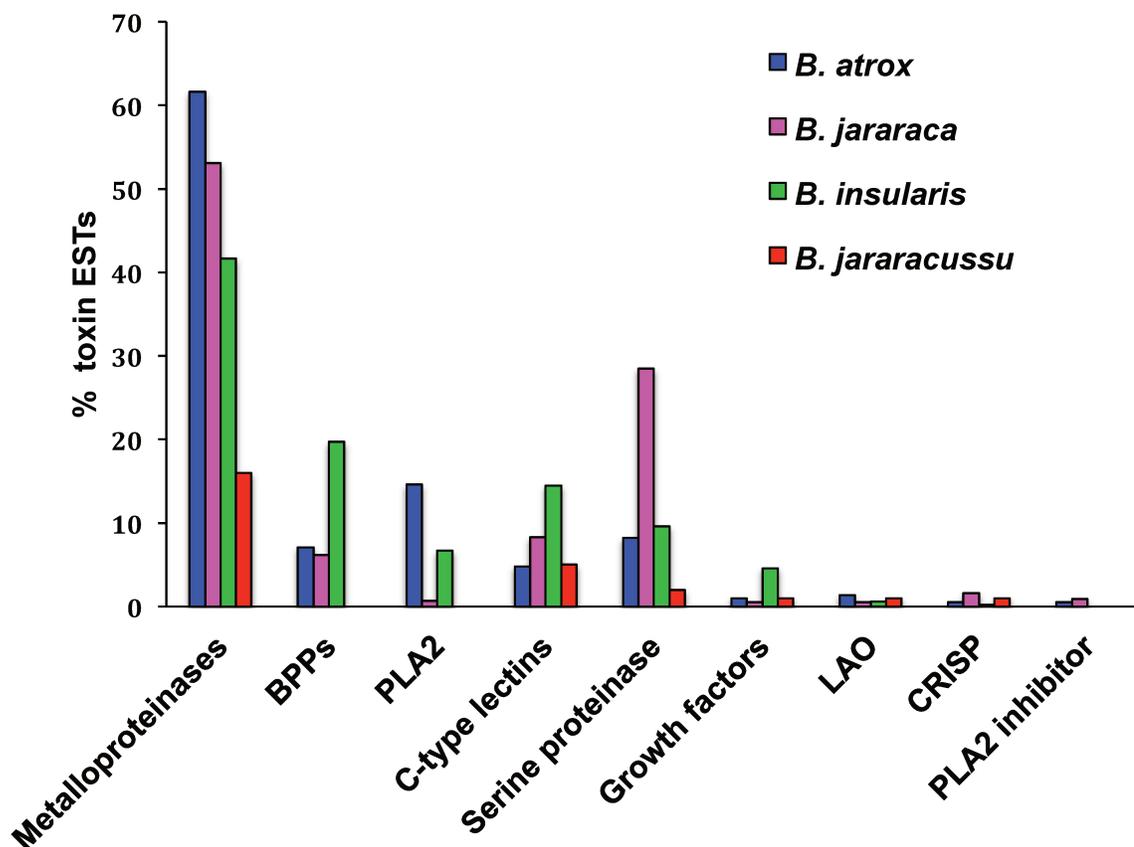


Figura 3. Abundância de clones relacionados com toxinas obtidos em estudos de ESTs da glândula venenifera de serpentes do gênero *Bothrops*. Fontes: *B. atrox*(165); *B. insularis*(106; 116);*B. jararaca* (166)e*B. jararacussu* (66).

1.3. *Bothrops alternatus*

A serpente *Bothrops alternatus*, também conhecida popularmente como urutu, urutu-cruzeiro ou cruzeira, boicotiara, jararaca-de-agosto e víbora *de la cruz*, dentre outros, é uma serpente encontrada predominantemente em áreas abertas, como campos, cerrados e brejos das regiões sul, sudeste e parte do centro-oeste do Brasil, além da Argentina, Paraguai e Uruguai (183). Possui hábito noturno e tamanho médio de 1,20 m, podendo alcançar até 1,70 m de comprimento quando adulta (Fig. 4) e produzir quantidades de peçonha acima de 200 mg (peso seco) por serpente (184; 185; 186).



Figura 4. *Bothrops alternatus* (urutu). Fonte: (<http://eco.ib.usp.br>).

Os principais efeitos locais e sistêmicos observados em envenenamento por *B. alternatus* são edema, hemorragia e necrose (187; 188) e se assemelham a outras peçonhas botrópicas (189; 190). Alguns dos efeitos locais da peçonha, como o edema e a resposta inflamatória podem ser mediados por metaloproteinases (191) e PLA2 da peçonha (192;193;194), sendo que a liberação do ácido araquidônico leva posteriormente à formação de produtos como leucotrienos pela via lipoxigenase (195). Pode haver também a liberação de mediadores endógenos como a bradicinina e histamina (196; 197) e citocinas como o TNF- α (198).

Como outras espécies do gênero *Bothrops*, a peçonha de *B. alternatus* contém uma diversidade de proteínas (199), algumas das quais já foram caracterizadas bioquímica e fisiologicamente, como PLA2 (192; 193; 194; 200; 201), enzimas tipo trombina (202;129), desintegrinas (203), metaloproteinases (204; 205), uma L-amino ácido oxidase (206), um inibidor de trombina (botroalternina)(207) e uma fosfodiesterase (208). Além da caracterização bioquímica, algumas proteínas foram clonadas, como a enzima tipo trombina Bhalternin(129), desintegrinas - Dis-Ba(209) e uma serinoproteinase

BthaTL(210).Recentemente, a análise global da composição protéica da peçonha de *B. alternatus* através de um estudo proteômico (ou venômico) identificou 100 componentes da peçonha com massas moleculares entre 10 kDa e 100 kDa, subdivididos em seis grandes famílias de proteínas(199) (Fig. 5). A maior família de proteínas foi a de metaloproteinases, principalmente do tipo III, que estão envolvidas na ação hemorrágica da peçonha.

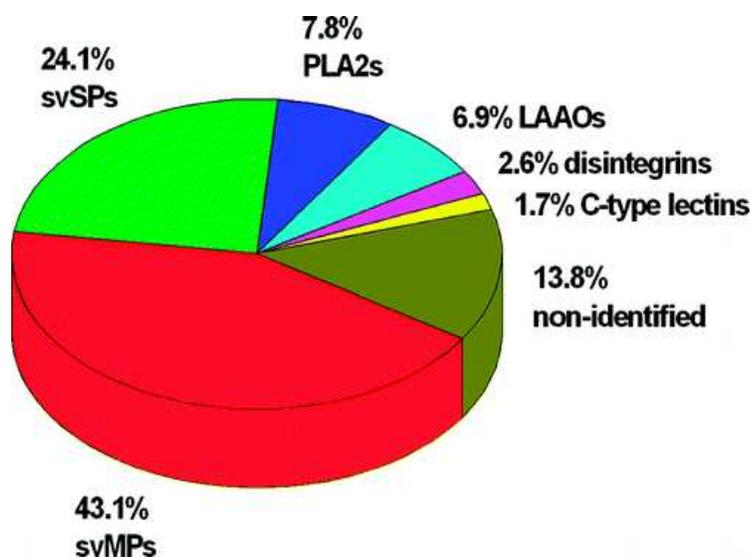


Figura 5. As principais famílias de toxinas detectadas na peçonha de *B. alternatus* através de análise proteômica. LAAO – L-aminoácido oxidases, PLA₂ – fosfolipases A₂, svMP – metaloproteinases de peçonha de serpente, svSP – serinoproteinases de peçonha de serpente. Fonte: Ohler *et al.* (199).

A comparação da análise proteômica de *B. alternatus* com as de outras espécies botrópicas mostra que as principais famílias de toxinas são similares entre eles, embora existam diferenças quantitativas de cada grupo de toxinas (Fig. 6). Esta diversidade na abundância de toxinas, tanto nas análises

transcriptômicas quanto proteômicas,refletevariações que podem ter origem individual (sexo, idade, etc.), genética e geográfica(81; 86;211;212).Com relação à *B. alternatus*, apesar de vários estudos sobre a composição e modo de ação da peçonha, pouco se sabe da expressão gênica de toxinas na glândula venenifera desta serpente, e a relação entre as principais classes de toxinas expressas neste tecido e a composição protéica revelada por análises bioquímicas e enzimáticas convencionais (213; 214) e estudos proteômicos (199).

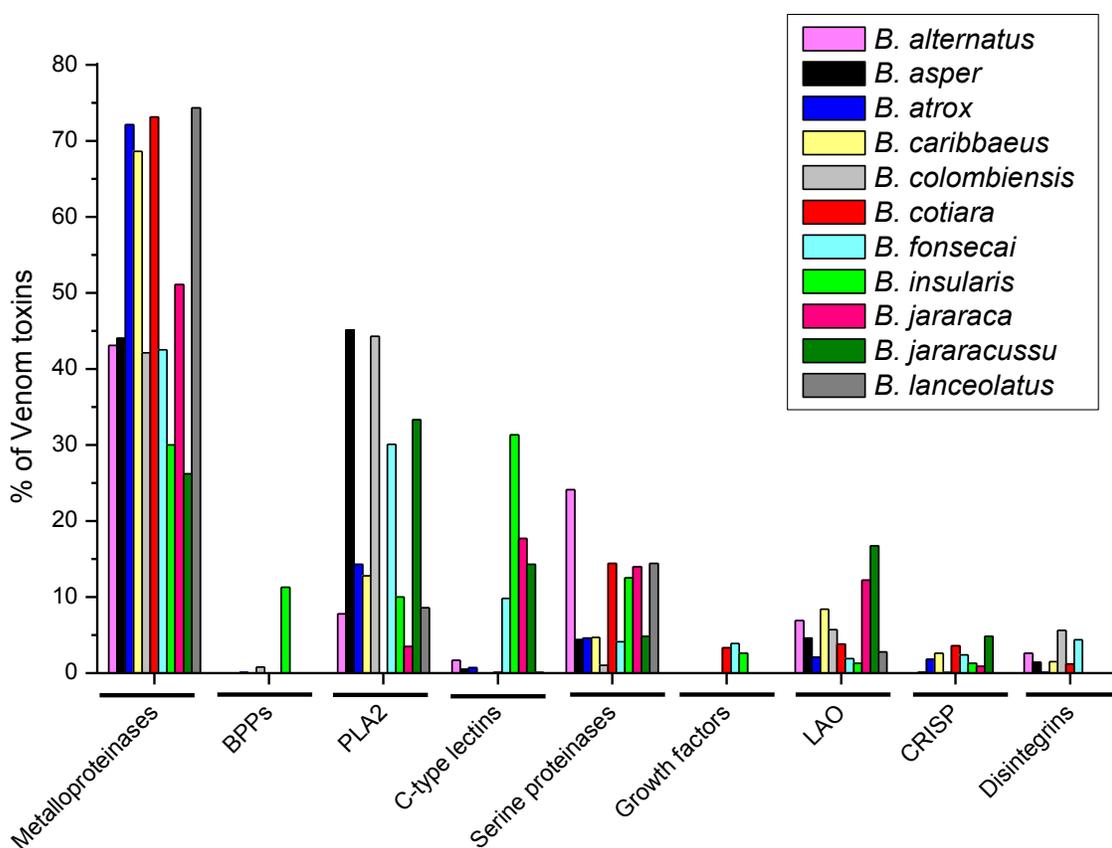


Figura 6. As principais famílias de toxinas detectadas em peçonhas botrópicas através de análises proteômicas. CRISP – proteínas secretoras ricas em cisteína (cysteine-rich secretory proteins), LAO – L-aminoácido oxidases, PLA2 – fosfolipases A2. Fontes: *B. alternatus* (199), *B. asper* (população do lado pacífico) (86) *B. atrox* (população brasileira) (212), *B. caribbaeus*(215), *B. colombiensis*(6), *B. cotiara* (216), *B. fonsecai* (216)*B. insularis* (106), *B. jararaca* (217), *B. jararacussu* (218) e *B. lanceolatus* (215).

2. OBJETIVOS

Construir uma biblioteca de cDNA a partir da glândula venenífera de *B. alternatus*, validá-la e analisar todos ESTs (Expressed Sequences Tags) de forma detalhada e criteriosa.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção das glândulas veneníferas

Espécimes adultas de *B. alternatus* foram obtidas do Instituto Butantan. Quatro dias após a extração de peçonha para estimular a produção de RNA (19; 20; 42; 128) pelas glândulas veneníferas, as serpentes foram anestesiadas (ketamina 80 mg/kg -xilazina 2 mg/kg, i.v.; protocolo usado no Instituto Butantan) e as glândulas foram removidas, congeladas em nitrogênio líquido, e armazenadas a -80°C até o momento da sua utilização. Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal institucional (CEEA/UNICAMP, protocolo no. 864-1) e seguiu as recomendações éticas gerais da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

3.2. Extração do RNA total

O RNA total foi extraído das glândulas veneníferas usando Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. O poly(A)⁺ mRNA foi purificado do RNA total usando Oligotex-dT (Qiagen, Valencia, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A pureza e a integridade do RNA foram avaliadas pela absorbância em 260/280 nm e por eletroforese em gel de agarose 1% e formaldeído (37%).

3.3. Construção da biblioteca de cDNA

A biblioteca de cDNA foi construída usando o SuperScript cDNA Synthesis and CloneMiner cDNA library kit (Invitrogen) conforme os protocolos do fabricante. Um micrograma do mRNA foi transcrito de forma reversa utilizando um primer

poly-T que contém o adaptador (attB2) e, posterior à formação da segunda fita de cDNA, o primer com o adaptador attB1 foi ligado (Fig. 7). A eficiência da síntese do cDNA foi monitorada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e documentado em equipamento EagleEye (Stratagene, La Jolla, CA, EUA).

A segunda fita do cDNA foi sintetizada pela substituição do RNA nos híbridos com DNA utilizando uma combinação de RNaseH, DNA polimerase I e DNA clonase, em uma reação de amplificação por *Long Distance* PCR (LD-PCR). Para este passo, foi usada uma polimerase específica e uma mistura de reação comercial (Advantage 2 polymerase mix, 50X; Clontech, Mountain View, CA, EUA). Para o ensaio, foram usados os ciclos descritos no kit da enzima, ou seja, 95°C por 20 seg e 20 a 25 ciclos de 95°C por 5 seg e 68°C por 6 min. Todas as reações foram realizadas em uma máquina de PCR GeneAmp 9700 da Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA). Após o término da reação, 5 uL do produto de PCR foram corridos em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo para verificar a presença e qualidade do amplicon. A dupla fita de cDNA foi visualizada como um *smear* de 0,1 - 4,0 kb, com as possíveis bandas correspondentes aos mRNAs sendo mais abundantes. O *smear* com cDNAs de tamanho mínimo de 500 pares de base (pb) foram cortadas do gel de agarose, purificadas usando um kit Wizard (Promega, Madison, WI, USA) e ligadas no vetor pDONR 222 (Invitrogen), que possui sítios específicos (ccdB) para a recombinação homóloga (Fig. 7).

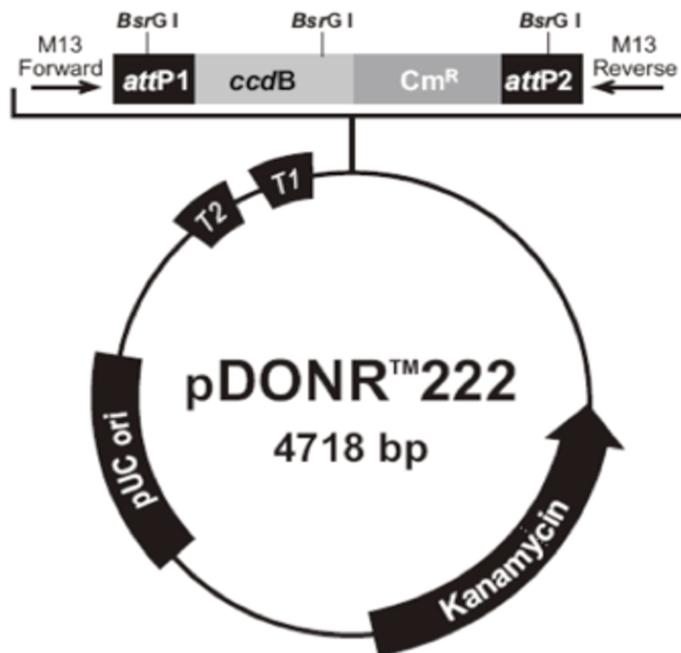


Figura 7. Mapa de vetor pDONR 222 utilizado para a construção da biblioteca de cDNA.

Os plasmídeos resultantes foram transformados em novas cepas de *Escherichia coli* DH10B (ELECTROMAX DH10B Cells, Invitrogen) por eletroporação, utilizando o BioRad *gene pulser electroporator* (Hercules, CA, EUA) com uma voltagem ótima de 1,6 kV em cubetas de 0,1 cm, resistência de 200 ohms e capacitância de 25 μ F. Os clones positivos (que incorporaram a biblioteca por recombinação homóloga) foram detectados pela sua resistência ao antibiótico kanamicina em placas de cultura. Posteriormente, os clones contendo a biblioteca, foram plaqueados e as colônias individuais foram picadas e transferidas para placas de 96 poços com meio líquido Circle Grow (BIO 101) contendo 100 μ g de kanamicina/mL e 8% glicerol. Após crescimento sob agitação durante a noite, os clones foram armazenados à -80°C .

A Figura 8 explica, de forma resumida, cada passo da montagem da biblioteca usando o kit comercial.

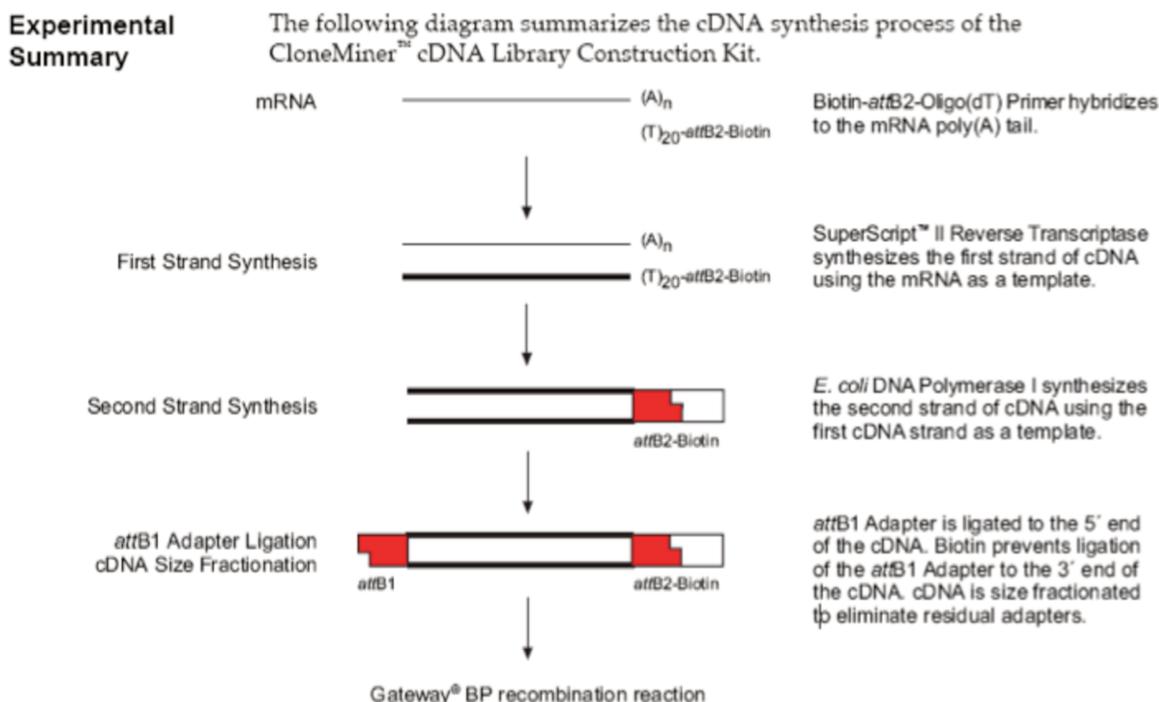


Figura 8. Resumo da montagem da biblioteca de cDNA para o preparo do DNA plasmidial e sequenciamento do DNA.

As preparações de DNA e as reações de sequenciamento foram feitas em placas de 96 poços. Os plasmídeos foram preparados usando a lise alcalina modificada, segundo o protocolo utilizado no projeto genoma EST da cana-de-açúcar, descrito no site <http://sucest.lad.ic.unicamp.br/en/Downloads/html/Plasmid.html>. As reações de sequenciamento foram feitas utilizando um quarto do volume padrão do ABI PrismBigDye Terminator sequencing kit (Applied Biosystems) e o primer M13 (forward, -20: 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') que hibridiza antes do sítio do attB1 no polylinker do vetor pDONR (extremidade 5' dos insertos de cDNA) ou o primer reverse do M13 (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'),

que hibridiza após o sítio do adaptador attB2 (extremidade 3' dos insertos de cDNA). Os produtos da reação foram precipitados com etanol 95% contendo acetato do sódio (3 M) e glicogênio (1 g/L). O DNA foi então lavado duas vezes com etanol 75% e seco sob vácuo. Os produtos foram sequenciados em um equipamento ABI 3700 de 96 capilares (Applied Biosystems).

Neste trabalho foram construídas três bibliotecas de serpente diferentes que foram nomeadas de Ba1, Ba2 e Ba3, no entanto todos os dados foram analisados conjuntamente; somente para a avaliação de SNPs é que os dados foram separados.

3.4. Validação final da biblioteca

A fim de verificar o sucesso da síntese de cDNA e o tamanho dos insertos clonados no vetor, alguns clones isolados foram aleatoriamente selecionados para validação. Este processo consistiu em uma PCR simples, e os *primers* utilizados para a construção da biblioteca attb1 e attb2 foram usados para flanquear os insertos de cDNA contidos no vetor pDONR 222. Para a amplificação, foram usados os seguintes reagentes (concentrações finais): tampão de PCR (Tris 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), dNTPs (200 μ M cada), oligonucleotídeos (100 ng de cada) e 1 U de polimerase de *Thermus aquaticus* (*Taq*; Promega). Os cDNAs foram amplificados com 35 ciclos, com uma temperatura de anelamento de 55°C. Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo, visualizado em luz UV e documentados em sistema de fotodocumentação EagleEye (Stratagene).

Para validação *in silico* da biblioteca, as sequências foram enviadas para o site <http://bmp.cbmeg.unicamp.br> no Servidor BMP (PowerEdge 2900, Dell), localizado no CBMEG (Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética da UNICAMP). Este site gerou gráficos que mostraram a estabilidade do sequenciamento e os tamanhos das sequências, o que permitiu saber se a biblioteca estava validada ou não.

3.5. Bioinformática das sequências de EST

Para montagem do banco de dados e análises de bioinformática foi criado um site (<http://bmp.cbmeg.unicamp.br/BA/>) no Servidor BMP (PowerEdge 2900, Dell) do CBMEG. Os dados de sequenciamento dos clones foram gerados no sequenciador de DNA e enviados por FTP (*File Transfer Protocol*) ao servidor. Em seguida, um programa detectou a recepção dos arquivos contendo cromatogramas e fez o tratamento inicial. O *pipeline* de tratamento dos cromatogramas envolveu os programa Phred, que identificou e atribuiu qualidade às sequências de bases a partir dos cromatogramas. Já o programa Crossmatch fez o mascaramento de sequências de vetor. Após esta etapa, foi iniciado o processo de trimagem dos dados, onde foram removidas todas as sequências e regiões de sequências de baixa qualidade. Após o tratamento das sequências, relatórios gráficos e textos foram gerados automaticamente. As sequências assim tratadas foram comparadas através do software BLAST (219), com sequências de outros organismos, disponíveis em bancos de dados públicos como o NR (*non-redundant* GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF) para sequências de proteínas, NT ou NR (*non-*

*redundant*GenBank+EMBL+DDBJ+PDB) para sequências de nucleotídeos e Uniprot (www.uniprot.org) para sequências de proteínas. Como análise adicional os ESTs foram comparados com bancos montados pelo laboratório a partir de dados do GenBank como o: SerpP (apenas com proteínas de serpente), SerpN (nucleotídeos de serpente) e o genoma do lagarto *Anolis carolinensis* (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway?db=ano-Car1>). Todos os bancos foram atualizados mensalmente de forma automática.

Cada clone foi nomeado pelas iniciais BA (*Bothrops alternatus*), seguido da numeração de cada placa e posteriormente o número e letra do poço da placa de 96 poços. Os *e-values*, indicadores do grau de homologia entre a sequência encontrada e os dados já existentes nos bancos de dados, foram aceitos até no máximo $1e-5$. Além disso, os relatórios apresentaram gráficos demonstrando a qualidade dos *reads* sequenciados, com o uso de diferentes cores para identificar o vetor e as sequências de cDNA. Com esta abordagem, foi possível controlar a qualidade de cada placa e de cada sequência depositada no banco. A Figura 2 mostra, de forma esquemática, o *pipeline* que foi adotado. Os resultados foram armazenados neste site, que é de acesso restrito.

3.6. Anotação da biblioteca de *B. alternatus*

A anotação inicial das sequências geradas foi automática, através do BLAST contra os bancos descritos acima. Além da anotação automática todos os resultados foram analisados manualmente, isto é cada transcrito foi analisado uma a uma. Para uma anotação automática e padronizada da biblioteca, e a descrição das características funcionais, moleculares e dos produtos gênicos foi

utilizado o *Gene Ontology* (GO) (<http://www.geneontology.org>) com o Blast2GO, com o termo do ancestral nível um, contra duas ontologias *molecular_function* e *biological_process*.

3.7. Análise de peptídeo sinal

Para análise da presença de peptídeos de sinal nos ESTs não caracterizados, foi utilizado o programa SignalP 3.0 (<http://cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).

3.8. Alinhamento das sequências

O alinhamento das sequências foi feito com o programa ClustalW (220).

3.9. Análise de nucleotídeos de base única (*single-nucleotide polymorphisms* ou SNPs)

Para avaliar a presença de SNPs utilizamos o software QualitySNP (221). Após o programa identificar as posições polimórficas nas ORFs (*open-reading frames*) que resultaram dos contigs, os dados foram analisados em formato Fasta contra os bancos do Uniprot (222). Em seguida, os dados foram curados e separados em tabelas. Para evitar artefatos, as sequências usadas para montar os *contigs* foram de bibliotecas diferentes e realizadas em dias e placas diferentes.

3.10. Identificação repetições simples (microssatélites), repetições invertidas (*inverted repeats* - IRs) e de elementos de transposição (*transposon elements* - TEs)

Para a análise de elementos repetidos as sequências foram submetidas ao alinhamento com o programa RepBase 14.08 (223), e o BLASTN foi gerado através de *scripts* Perl (<http://www.perl.org>). O e-value utilizado foi de 1e-10 e somente alinhamentos com no mínimo 50 pb e sequências com 80% de identidade em no mínimo 10% de seu tamanho foram considerados. As repetições simples e em “tandem” sem “match” com elementos de transposição (TEs) foram classificadas como microssatélites.

Para identificar as repetições invertidas (IRs) foi utilizada a anotação manual, pois estes elementos não foram detectados pelo RepBase. Para analisar os elementos de transposição e as repetições invertidas foi utilizado o programa Palindrome do EMBOSS (224) (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/palindrome>). As sequências que continham repetições invertidas foram detectadas através de alinhamento delas com elas mesmas, utilizando o BLASTN e um e-value de 1e-5. As sequências foram analisadas manualmente para checar se o alinhamento estava na direção oposta. O limite máximo de erros permitidos para estas sequências repetidas foi de 10%.

Para identificar a possível integração funcional dos elementos de transposição (TEs) nos genes hospedeiros, procuramos transcritos quiméricos, isto é, que continham TEs ligados a genes que codificavam proteínas. Para isto, selecionamos as sequências que alinhavam parcialmente com TEs (alinhamento cobrindo 10% a 90% de suas sequências) e utilizamos estas como sequências

complementares, para mascarar os TEs e, por fim, realizamos o BLASTN. Para o tBLASTX remoto, apenas as sequências que continham pelo menos 70% de identidade e 50% de identificação na sua sequência foram consideradas como *best hits*.

3.11. Análise comparativa da biblioteca de ESTs de *B. alternatus* com as de outras espécies botrópicas

O padrão da expressão gênica da glândula venenífera da *B. alternatus* foi comparado com ESTs de outras espécies de *Bothrops*, como a *Bothrops atrox* (165), *Bothrops insularis* (106; 153), *Bothrops jararaca* (166) e *Bothrops jararacussu* (150). A porcentagem de ESTs para cada categoria de ESTs foi calculada a partir do número total de ESTs identificado em cada espécie. De modo semelhante, a porcentagem relativa de cada classe de toxina foi calculada a partir dos dados de ESTs totais relacionados com toxinas.

4. RESULTADOS

4.1. Extração do RNA total

O RNA total da glândula foi obtido utilizando Trizol, conforme descrito nos Métodos. A pureza e a integridade do RNA foram avaliadas pela absorvância em 260/280 nm (dados não mostrados) e por eletroforese em gel de agarose/formaldeído. Conforme mostrado na Figura 9, foram detectadas bandas de RNA de 28S e 18S, o que confirmou a integridade e boa qualidade do RNA.

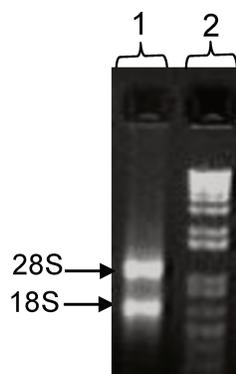


Figura 9. Análise da qualidade do RNA extraído da glândula venenífera de *B. alternatus*. Coluna 1 - RNA, coluna 2 - Ladder de marcador de 1 kb Plus (Gibco).

4.2. Construção da biblioteca de ESTs

Como passo inicial para a construção da biblioteca de cDNA da glândula venenífera, foi sintetizada a primeira fita de cDNA usando 0,5 - 2,0 μ g de RNA total, seguindo-se o protocolo descrito no kit comercial Cloneminer. Para isso, foram utilizados 18 ciclos para a síntese da primeira fita do cDNA. Posteriormente, o cDNA foi amplificado usando LD-PCR e 5 μ L do produto de PCR foi corrido em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. A Figura 10 mostra que a dupla fita de cDNA foi visualizada como um *smear* de 0,1 - 4,0 kb. A região de

interesse, que corresponde aos tamanhos de 1 kb até 4 kb foi retirada do gel de agarose e purificada, e o cDNA obtido foi usado para recombinação homóloga.

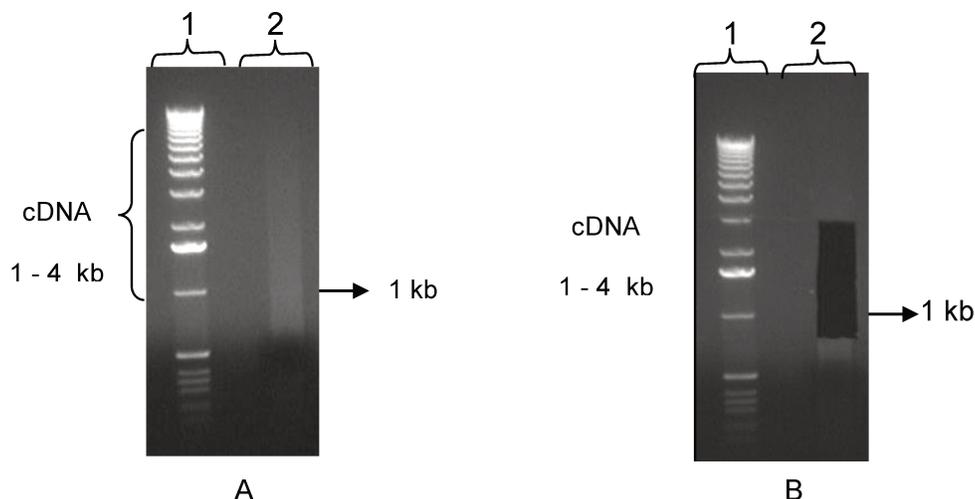


Figura 10. A - Eletroforese da cDNA da glândula venenífera de *B. alternatus*. Coluna 1 – Ladder de 1 kb (Gibco). Coluna 2 - Dupla fita de cDNA mostrando o *smear*. B - Mostra a região onde foi recortado o cDNA do gel de agarose.

Após a recombinação homóloga, os clones positivos resultantes (contendo as bibliotecas) foram plaqueados e as colônias individuais foram picadas e transferidas para placas de 96 poços. Após crescimento, os plasmídeos foram preparados usando a lise alcalina modificada, e os cDNAs foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (Fig. 11). As placas que continham o cDNAs íntegros foram selecionadas para iniciar o processo de validação da biblioteca, procedimento que antecede o sequenciamento.

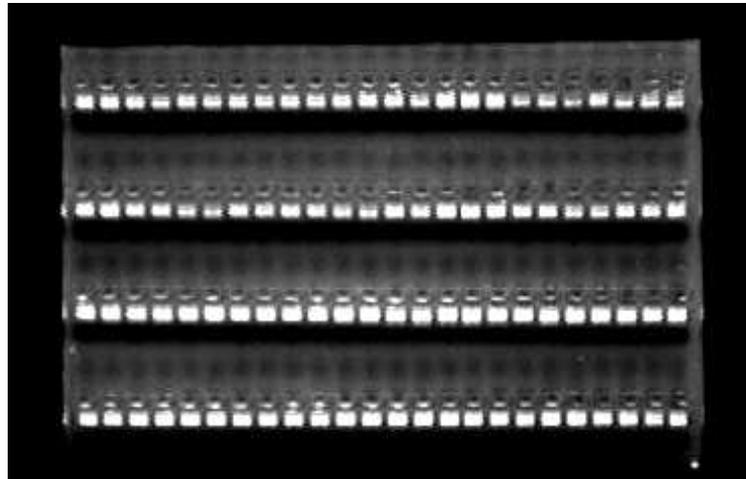


Figura 11. cDNAs da biblioteca extraídos a partir de lise alcalina, e visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

4.3. Validação final da biblioteca

Após a extração do cDNA através de lise alcalina e da verificação da integridade do cDNA em gel de agarose, amostras aleatórias do cDNA foram coletadas da placa de 96 poços para o procedimento da PCR para validar a biblioteca. Este passo consistiu em uma reação simples de PCR, utilizando os mesmos *primers* que foram usados para construir a biblioteca, neste caso os *primers* com os adaptadores attb1 e attb2. As bibliotecas validadas foram as que possuíam um número elevado de *amplicons* de tamanhos que variaram entre 800 bp até 4 kb. Estes dados indicam se a biblioteca foi construída de forma correta e se os insertos estão inseridos nos vetores no tamanho esperado (de 1 kb até 4 kb). A Figura 12 abaixo demonstra uma biblioteca validada, isto é, que apresentou cDNAs de tamanho >1 kb na maioria das amostras. Com esta validação, prosseguiu-se para a reação de sequenciamento.

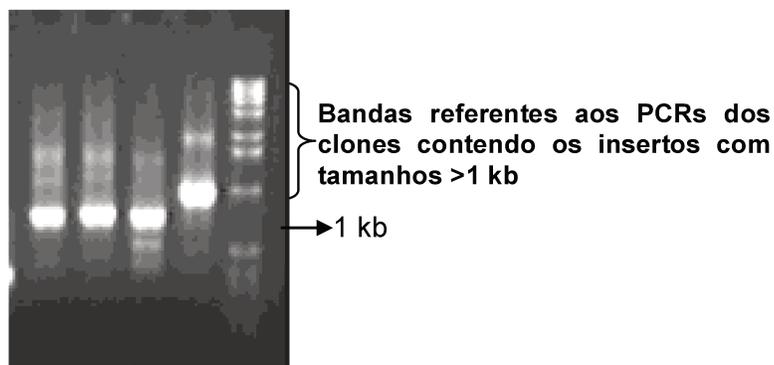


Figura 12. Eletroforese dos produtos da PCR realizados para validação da biblioteca. As bandas amplificadas com tamanho >1 kb indicam que os insertos foram inseridos, em sua maioria, com o tamanho correto.

Após sequenciamento de cada placa de 96 poços, os dados seguiram o *pipeline* descrito anteriormente. As sequências também puderam ser validadas *in silico* através do *site* <http://bmp.cbmeg.unicamp.br/BA/>. A Figura 13 mostra o resultado da análise de duas bibliotecas, uma não validada e a outra validada. A biblioteca validada e usada para os sequenciamentos subsequentes foi identificada como a BACCGV4 (nomenclatura interna).

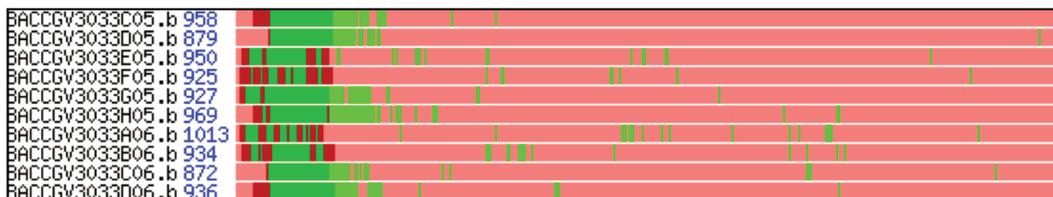
4.4. Bioinformática das sequências de ESTs

Após o sequenciamento dos cDNAs das bibliotecas, as sequências foram trimadas, clusterizadas e anotadas conforme anteriormente. A notação foi realizada através do *site* <http://bmp.cbmeg.unicamp.br/BA/> no Servidor BMP do CBMEG. A Figura 14 mostra a página utilizada para a anotação automática e manual.

A Figura 15 resume o pipeline utilizado na análise da biblioteca de ESTs da glândula venenífera de *B. alternatus*. Um total de 5.350 ESTs válidos foram obtidos, através do sequenciamento, com um tamanho que variou entre 100 bp

até 848 bp (média de 562 bp) (Fig. 16). Os ESTs foram depositados no dbEST do GenBank com os números de acesso de GW575430 até GW583300.

A



B

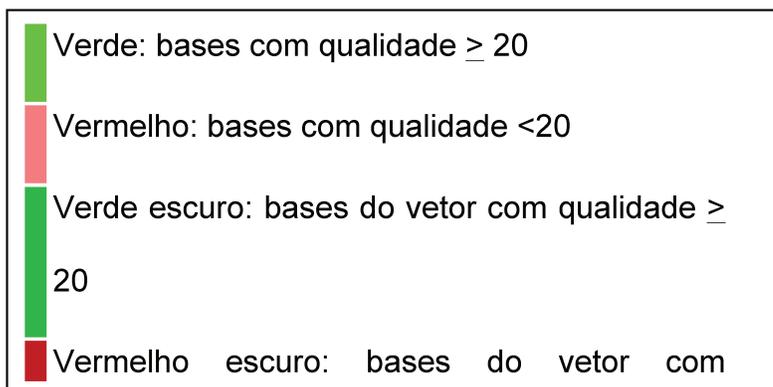
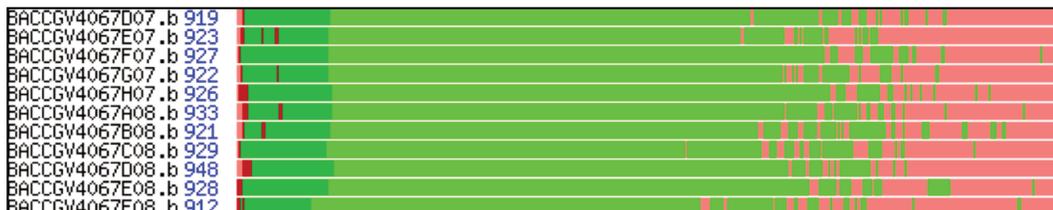


Figura 13. Resultado da análise de validação de duas bibliotecas. **(A)** A biblioteca (BACCGV3) não apresentou boa qualidade nas sequências, com insertos pequenos e instabilidade, e foi considerada não validada. **(B)** A biblioteca (BACCGV4) apresentou ótima qualidade e estabilidade nas sequências, e foi considerada validada. O quadro inferior define o significado das cores usadas em **(A)** e **(B)**.

[<<<](#) **Contig3** [>>>](#)

IDENTIFICATION

PRODUCT:

FUNCTION:

DOMAIN:

HOMOLOG ORGANISM:

GENE SYMBOL: **EC NUMBER:** **TC NUMBER:**

CLASSIFICATION

CUSTOM CLASSIFICATION :
 Category:

GENE ONTOLOGY :

CELULAR COMPONENT :

GO ID:

TERM:

AMIGO UNK CC ADD DELETE

MOLECULAR FUNCTION :

GO ID:

TERM:

AMIGO UNK MF ADD DELETE

BIOLOGICAL PROCESS :

GO ID:

TERM:

AMIGO UNK BP ADD DELETE

VIEW

ESTScan	Contig (752 bp) #Estimated errors: 25 (3%)	243 Read(s)	VIEW
-------------------------	---	-----------------------------	----------------------

TAGS

Figura 14. Página de anotação da biblioteca de ESTs de *B. alternatus*.

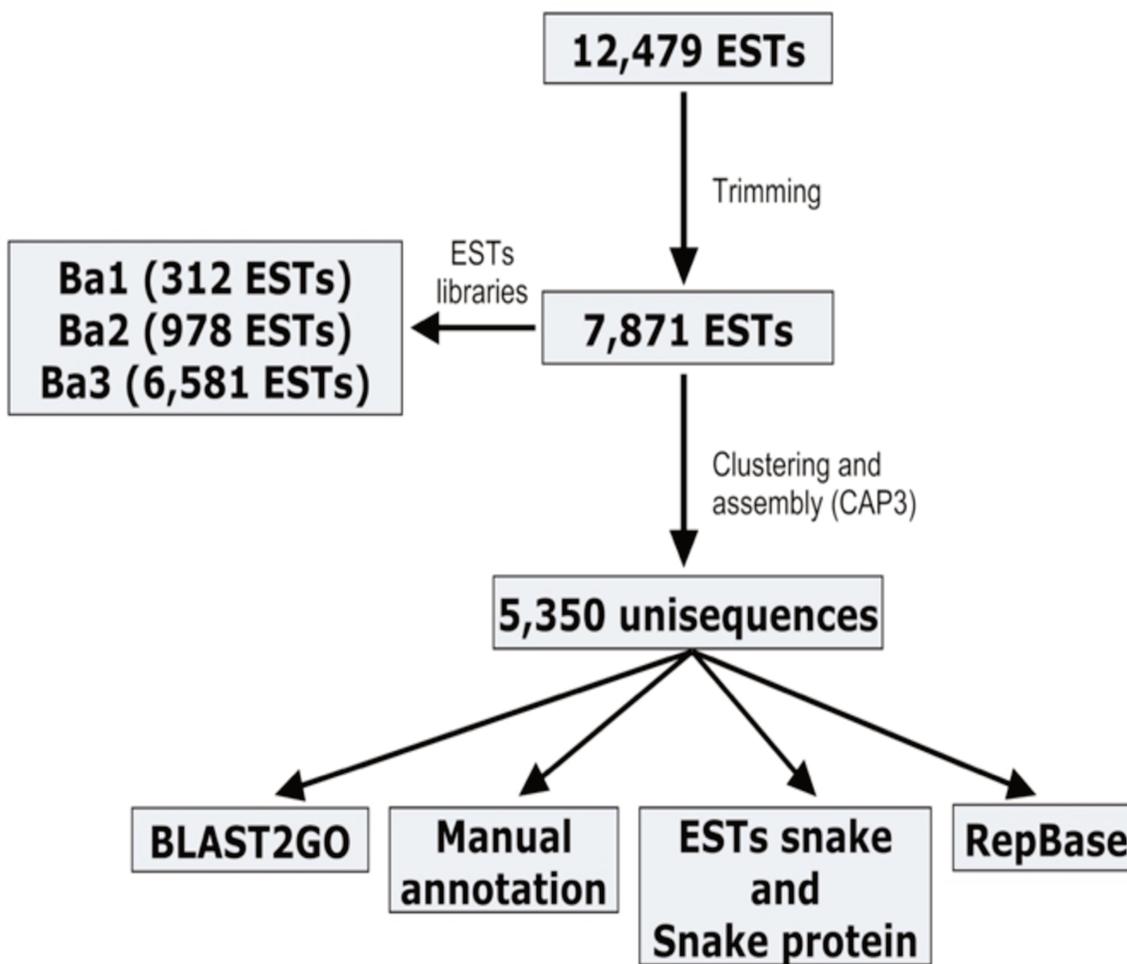


Figura 15. Pipeline de bioinformática desenvolvido para clusterização, montagem e anotação das bibliotecas. O número total de ESTs gerados pela soma das três bibliotecas (Ba1, Ba2 e Ba3) foi de 12.479. Após trimagem, 5.350 seqüências válidas foram obtidas.

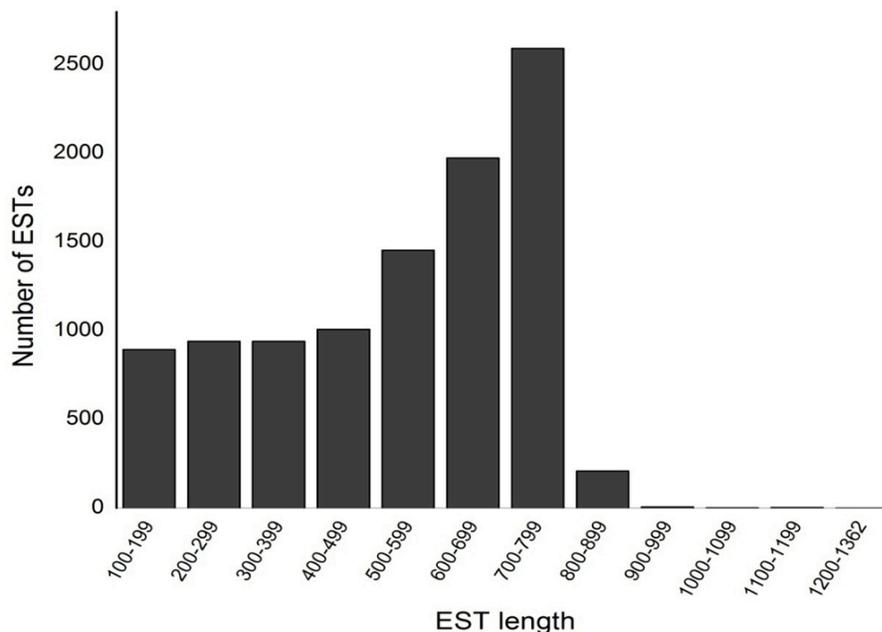


Figura 16. O tamanho dos ESTs obtidos nas bibliotecas de *B. alternatus*. A maioria dos 5.350 ESTs apresentou comprimento entre 500 pb e 800 pb.

4.5. Anotação da biblioteca de *B. alternatus*

A anotação inicial foi realizada automaticamente através da análise de BLAST enquanto a anotação final da biblioteca foi realizada manualmente, avaliando a qualidade de cada sequência, bem como selecionando de forma criteriosa sua anotação. As sequências foram montadas em 838 *contigs* e 4.512 *singlets*, sendo que 30% das sequências (1.605 ESTs) mostraram *hits*, dos quais 1.245 ESTs (23% do total de ESTs e ~78% dos *hits*) foram relacionadas a toxinas. Os 70% restantes (3.745 ESTs) foram *no-hits*. A Figura 17 mostra a proporção de *hits* e *no-hits* para bancos de dados selecionados. Houve maior proporção de *hits* com GenBank e SerpN quando comparado com SerpP. O número reduzido de *hits* com SerpP talvez seja um reflexo do baixo número de sequências de

proteínas ofídicas não relacionadas a toxinas disponível atualmente nos bancos de dados.

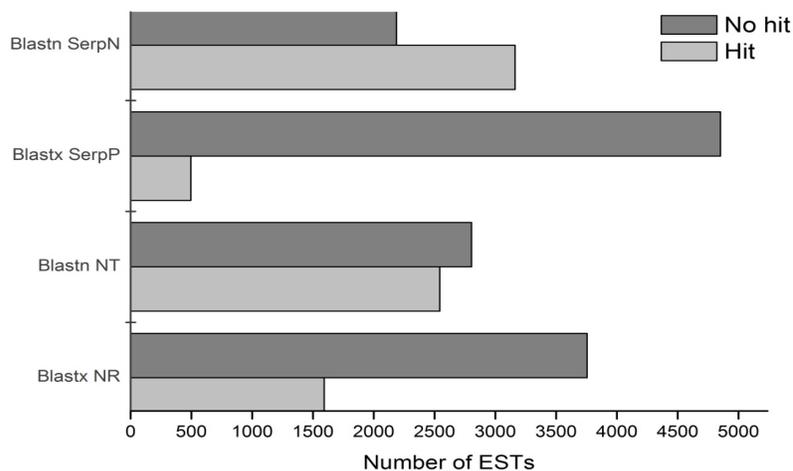


Figura 17. Comparação entre o número de *hits* e *no-hits* após BLAST contra SerpN (somente nucleotídeos de serpente), SerpP (somente proteínas de serpente) e GenBank (nr e nt).

4.6. Análise de GO

Para uma avaliação global e a descrição das características funcionais, moleculares e produtos gênicos foi utilizado o *Gene Ontology* (GO), contra duas ontologias: função molecular (*Molecular function*) e processo biológico (*Biological process*). A análise do GO para função molecular revelou uma grande quantidade de ESTs relacionadas à ligação proteica (*Protein binding*), atividade peptidásica (*Peptidase activity*), atividade transferase (*Transferase activity*) e ligação ao cálcio (*Calcium ion binding*) (Fig. 18). A análise de GO de processos biológicos revelou dois grupos principais: um com mais de 100 ESTs por categoria, relacionados ao estresse (*Response to stress*), estímulos externos (*Response to external stimulus*) e desenvolvimento multicelular (*Multicelular organismal development*), entre outros, e outro com menos de 100 ESTs por categoria, onde predominaram

processos relacionados ao ciclo celular (*Cell cycle*), regulação da qualidade biológica (*Regulation of biological quality*), proliferação celular (*Cell proliferation*) e transporte iônico (*Ion transport*), entre outros (Fig. 19).

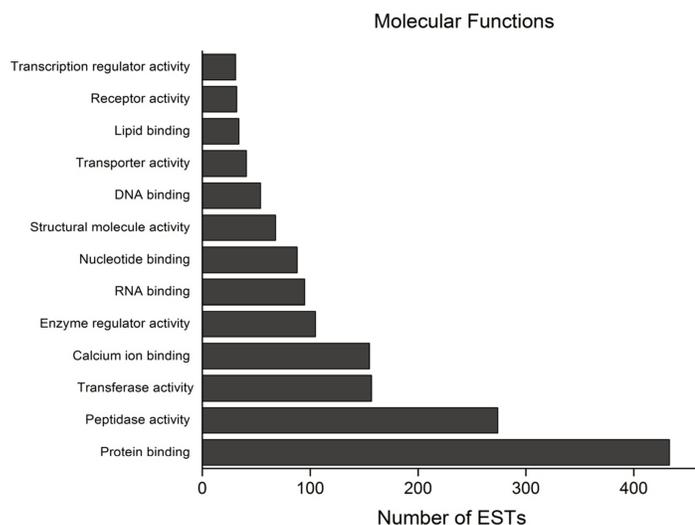


Figura 18. As funções moleculares identificadas pela análise de GO dos ESTs da biblioteca de *B. alternatus*. O eixo X mostra o numero de ESTs e Y os termos de GO.

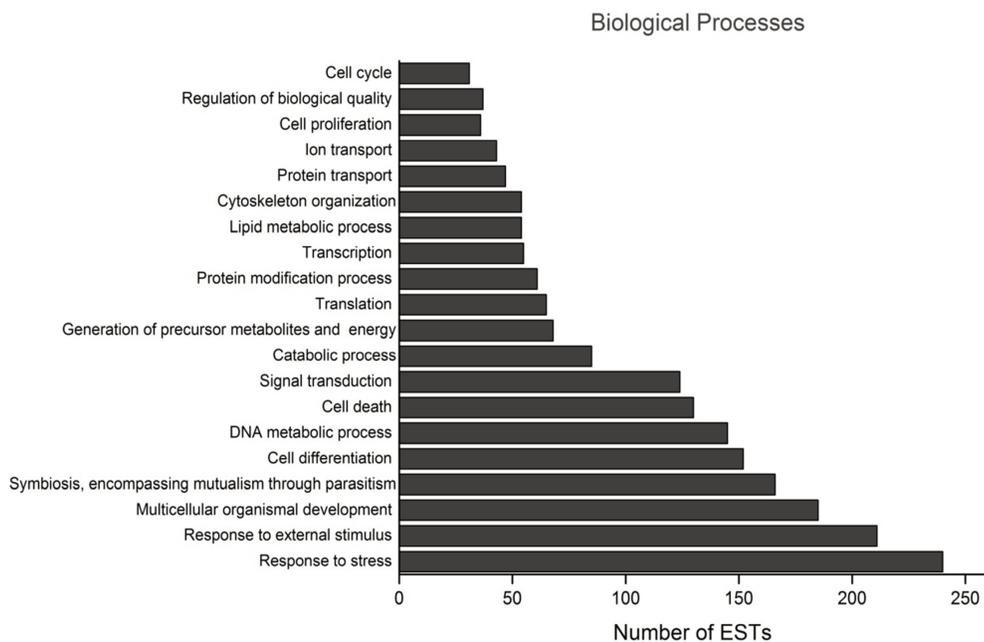


Figura 19. Os processos biológicos identificados pela análise de GO dos ESTs da biblioteca de *B. alternatus*. O eixo X mostra o numero de ESTs e Y os termos de GO.

4.7. Componentes de peçonha identificados nos ESTs

Após a anotação manual separamos as principais classes de toxinas encontradas neste transcriptoma. A Figura 20 mostra que os transcritos mais expressos foram os de metaloproteinases/desintegrinas, precursores do peptídeo natriurético CNP/BPP, PLA₂, serinoproteases e lectinas do tipo C, enquanto os menos expressos foram os de proteínas secretadas ricas em cisteína (*cysteine-rich secretory proteins*; CRISPs), uma proteína relacionada à taicatoxina, um ativador da protrombina, um precursor da catrocollastatina e a dipeptidilpeptidase IV (DPP IV).

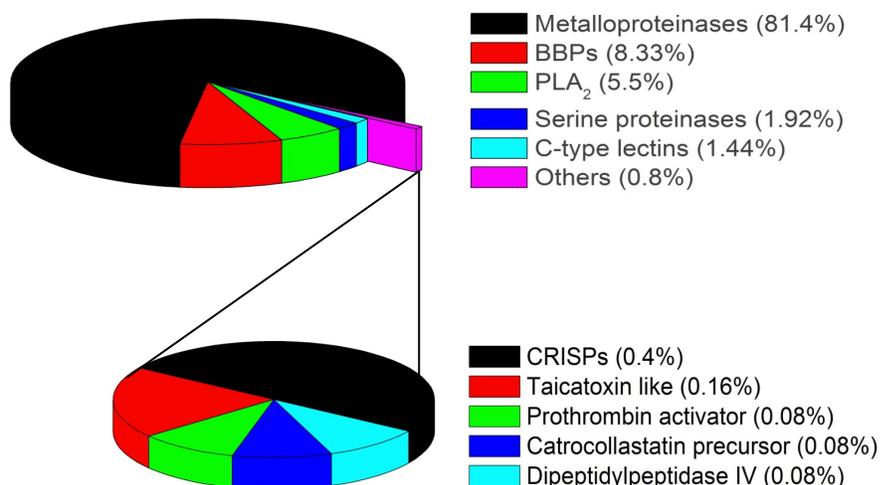


Figura 20. Principais classes de toxinas na biblioteca de cDNA de *B. alternatus*. O painel superior mostra os principais grupos de toxinas enquanto o inferior mostra os componentes de baixa expressão nesta biblioteca. As porcentagens indicam a abundância de cada classe de toxina relativa ao número total de ESTs da biblioteca. Os resultados são de BLAST somente contra o nr com *hits* para proteínas.

4.7.1. Toxinas mais abundantes

4.7.1.1. Metaloproteinases/desintegrinas

As SVMPs foram a classe de toxinas mais expressa neste transcriptoma. Foram encontrados 1.010 ESTs de SVMPs, agrupados em 23 contigs. A Figura 21 mostra a diversidade de metaloproteinases, sendo que os ESTs mais abundantes eram relacionados à jararagina (da *B. jararaca*), à cadeia pesada do fator X da víbora de Russell (Russell's viper, *Daboia (Vipera) russelli*, factor X-heavy chain; RVV-X heavy chain), fator hemorrágico HF3 (*B. jararaca*), halysase, berythactivase (da *B. erythromelas*), botropasina (*B. jararaca*), e metaloproteinases II (Bojumet II) e III (Bojumet III) da *B. jararacussu*. Na biblioteca de *B. alternatus* os genes de metaloproteinases mais expressos foram da classe P-III. Houve um número baixo de transcritos para SVMPs da classe P-II (por exemplo, um transcrito para contortostatina e um contig para insularinase), mas nenhum EST para SVMP da classe P-I foi detectado.

O processamento de SVMPs das classes P-II e P-III leva à formação, respectivamente, de desintegrina-RDG e de domínios ricos em cisteína relacionados à desintegrina-ECD, as quais interagem com integrinas na superfície celular. Nos ESTs de *B. alternatus* foram detectados quatro transcritos para desintegrinas, o que está de acordo com dados proteômicos para a peçonha desta espécie e com a presença de desintegrinas como a alternagina-C e DisBa-01.

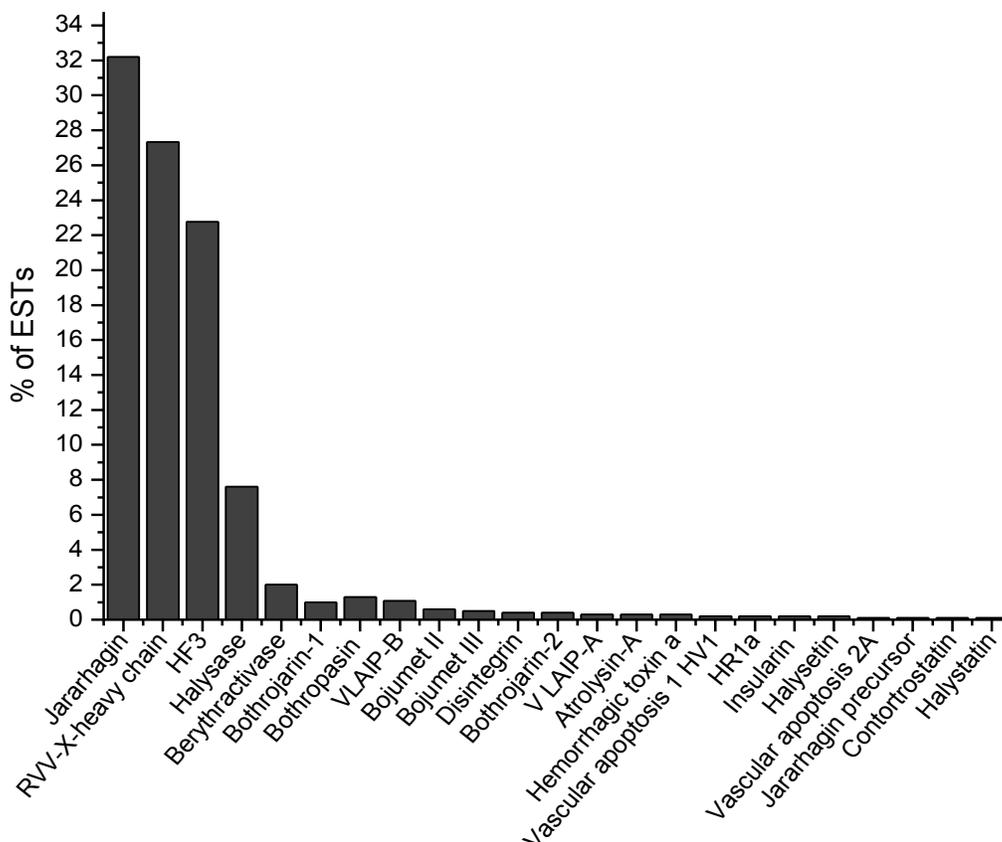


Figura 21. A distribuição dos transcritos relacionados com metaloproteínas na biblioteca de *B. alternatus*. Os resultados são mostrados como a frequência (%) do total de transcritos para metaloproteínas na biblioteca. O BLAST realizado foi contra o nr com *hits* para proteínas e curados manualmente.

4.7.1.2. Fosfolipases A₂ (PLA₂)

As peçonhas botrópicas são conhecidas pelo seu alto conteúdo de PLA₂ e, na biblioteca de *B. alternatus*, as PLA₂ correspondiam a 5,6% dos ESTs relacionados a toxinas (1,28% do total de ESTs). Do total de 69 ESTs, 41 eram relacionados às PLA₂ ácidas BinTX-I e BinTX-II da peçonha de *B. insularis*, e 28 à uma PLA₂ ácida com ação hipotensora da peçonha de *B. jararacussu*; todas eram PLA₂ com Asp⁴⁹. Não foram detectadas PLA₂ básicas, porém observamos dois ESTs para a PLA₂ básica da crotoxina, principal neurotoxina da peçonha de

cascaavel (*C. d. terrificus*), e um transcrito para a ammodytoxina, uma β -neurotoxina fosfolipásica de *Vipera ammodytes*. Também foram detectados inibidores de PLA₂ (17 ESTs com *hits* apenas na região 3'UTR).

4.7.1.3. Serinoproteinases

As serinoproteinases foram a quarta classe de toxinas mais abundante no transcriptoma de *B. alternatus*, correspondendo a 1,9% dos ESTs de toxinas e 0,45% do total de ESTs. Destes ESTs, ~42% (10 ESTs) eram relacionadas à serinoproteinase BthaTL, uma enzima tipo trombina da peçonha de *B. alternatus*. Outras proteínas deste grupo estavam relacionadas à serinoproteinase isoforma 5 (7 ESTs), ao precursor da serinoproteinase HS112 (1 EST) e à enzima tipo trombina (TLE; 1 EST). Também encontramos um transcrito com um *hit* somente na região 3'UTR, relacionado à KN-BJ2 da peçonha de *B. jararaca*.

4.7.1.4. Lectinas do tipo C

As lectinas do tipo C foram o quinto grupo mais expresso de transcritos relacionados a toxinas, com 18 ESTs com proteínas (1,46% dos ESTs de toxinas, ou 0,33% do total de ESTs). Estes transcritos estavam relacionados à subunidade α da proteína que se liga à glicoprotein Ib de plaquetas (8 ESTs), à cadeia β da proteína ACF 1/2 (7 ESTs) e à botrojaracina (1 EST). Detectamos também um *singlet* em 3' UTR, da convulxina, uma lectina do tipo C inicialmente identificada na peçonha de *C. d. terrificus*.

4.7.1.5. Precusores dos peptídeos potenciadores da bradicinina (BPPs) e de peptídeos natriuréticos do tipo C(CNPs)

Os transcritos para precusores dos peptídeos BPP/CNP representaram ~9% dos ESTs de toxinas, com 110 ESTs codificando os precusores BPP/CNP (especificamente a região de CNP) enquanto 156 ESTs mostraram semelhança somente na região 3'UTR. Os genes destes peptídeos continham repetições invertidas, conforme descrita adiante.

4.7.2. Toxinas menos abundantes

Além das principais classes de toxinas mencionadas acima, identificamos várias toxinas de abundância menor, algumas das quais nunca antes detectadas em transcriptomas de *Bothrops*. Estas toxinas foram:

- Proteínas secretadas ricas em cisteína (CRISPs ou *cysteine-rich secretory proteins*): cinco ESTs com proteínas (0,4% dos ESTs de toxinas).
- Dipeptidilpeptidase IV (DPP IV): um transcrito.
- Fatores de crescimento como o fator de crescimento derivado do endotélio vascular (svVEGF ou *snake venom vascular endothelial growth factor*) e fator de crescimento neuronal (NGF ou *nerve growth factor*): seis ESTs para svVEGF (cinco semelhantes a VEGF de *B. insularis* e um semelhante a VEGF de *L. muta*) e um EST semelhante a NGF de *C. d. terrificus*.
- Hialuronidase: um EST.
- L-aminoácido oxidase (LAO): sete ESTs na região nucleotídica (quatro relacionados à LAO de *B. jararaca* e três ESTs na região 3'UTR relacionados à enzima de *O. hannah*).

- Toxinas do tipo *three-finger* (3-FTx): 30 ESTs com hits somente em nucleotídeos (2,4% dos ESTs de toxinas e 0,56% do total de ESTs); é a primeira identificação de 3-FTx em *Bothrops*.
- Ohanina: 24 ESTs com *hits* na região 3'UTR do precursor para ohanina, uma proteína de ~12 kDa associada à hipolocomoção e hiperalgesia; é a primeira identificação de ohanina em *Bothrops*.
- Proteína relacionada à taicatoxina: dois ESTs para uma proteína relacionada ao inibidor de serinoproteinase do complexo protéico da taicatoxina, uma proteína multimérica composta de um peptídeo semelhante à α -neurotoxina (8 kDa), uma neurotoxina PLA₂ (16 kDa) e um inibidor de serinoprotease (7 kDa).
- Outras toxinas: várias outras toxinas foram detectadas, porém com um número baixo de *hits*, com resultados apenas no BLAST contra a base de dados para nucleotídeos. Estes *hits* incluíram toxinas relacionadas a cardiotoxinas (12 *reads*), uma toxina relacionada à toxina muscarínica de *Bungarus multicinctus* (três *reads*), precursores semelhantes à α -neurotoxina pós-sináptica NTX-2 de *Naja sputatrix* (um contig) e neurotoxina 6, e uma molécula relacionada ao fator de veneno de cobra (*cobra venom factor*) (um *read*).
- Proteínas relacionadas ao metabolismo de nucleotídeos: foram observados transcritos para enzimas relacionadas: (a) ao precursor da DNase II α (DNase lisosomal) de camundongo (três ESTs), (b) à ecto-5'-nucleotidase (um EST relacionado à enzima do peixe zebra *Danio rerio* e outro transcrito

para esta enzima em cavalo, *Equus caballus*), (c) à pirofosfatase/ fosfodiesterase 3 (dois ESTs, um relacionado à enzima de macaco, *Macaca mulata*, e um para camundongo, *Mus musculus*), e (d) à adenosina desaminase de rã, *Xenopus laevis* (um EST).

- Proteínas possivelmente relacionadas à resposta inflamatória: foi detectado um EST para uma proteína tipo citocina semelhante à citocina de cavalo, e dois ESTs para fator de necrose tumoral (semelhante à proteína de galinha, *Gallus gallus*).

4.8. Identificação de proteínas relacionadas ao funcionamento da glândula de peçonha e proteínas inéditas

Detectamos um transcrito codificando por uma proteína semelhante ao adrenoreceptor α_{1D} de *B. jararaca*, possivelmente envolvido na regulação da biossíntese de peçonha. Também foi observado um EST para o receptor ET_A do peptídeo endotelina, potente vasoconstritor envolvido na regulação do tônus vascular. Houve também um contig relacionado à proteína calglandulina, um ligante de cálcio estruturalmente semelhante à calmodulina e troponina C; esta proteína pode estar relacionada à síntese, secreção e regulação da atividade de toxinas na glândula.

Além das proteínas acima, detectamos pela primeira vez neste gênero uma sequência parcial para a proteína Dusp6 (*Dual specificity phosphatase 6*), que mostrou alta similaridade com a proteína de *Pantherophis guttatus* (“corn snake”) (número de acesso ABW 82165), principalmente na porção final da sequência (Fig. 22). Também encontramos uma sequência, relacionada à tioredoxina (Trx)

descrita anteriormente na glândula de peçonha de *Ophiophagus hannah* (“king cobra”)(número de acesso AAK09384), também inédita para este gênero. O alinhamento destas duas sequências mostrou que elas eram idênticas (Fig. 23).

```

Dusp6 P. guttatus      1 MDCRAQELYESSHIESAINVALPGIMLRRLLQKGNLPLRALFARGEEREK 50
Dusp6 B. alternatus    0 ----- 0

Dusp6 P. guttatus      51 FARRCGTDTVVLYDENSSDWNENTVGD SVLGLLLKRLKDDGCKAFYLEGG 100
Dusp6 B. alternatus    1 -----:|| QGG 3

Dusp6 P. guttatus      101 FCRFQAEYALHCETNLDSSCSSNSPPLPVLGGLRISDSSSDVESDID 150
Dusp6 B. alternatus    4 FNNFQTEYSEHCETNLDSSSPANSPPASVGLGGLRISD-CSDGES--D 50

Dusp6 P. guttatus      151 RDPNSATSDSGSPLSNNQPSFPVEILPYLYLGC AKDSTNLDVLEEFGIKY 200
Dusp6 B. alternatus    51 REPSSATESDGSPIPNQPAFPVQILPYLYLGC AKDSSNLDVLGKYGIKY 100

Dusp6 P. guttatus      201 ILNVTPLNLPNLFENAGEFKYKQIPI SDHWSQNL SQFFPEAIFIDEARGK 250
Dusp6 B. alternatus    101 ILNVTPLNLPNMFEDHGEFKYKQIPI SDHWSQNL SQFFPEAIAFIDEARSK 150

Dusp6 P. guttatus      251 NCGVLVHCLAGISRSVTVTVAYILMQKLNLSMNDAYD 286
Dusp6 B. alternatus    151 KCGILVHCLAGISRSVTVTVAYILMQKLNLSLNDAYD 186
    
```

Figura 22. Alinhamento da sequência de aminoácidos da Dusp6 de *B. alternatus* com a de *P. guttatus*. Inserções e deleções são representadas por (-), resíduos idênticos por (|), resíduos com alta similaridade por (:) e resíduos com pouca similaridade por (.)

```

Trx O. hannah          1 MVKIVGDLTEFRAELSDAGNKLI VVDF SATWCGPCKMIKPFHSMVEKYP 50
Trx B. alternatus       1 MVKIVGDLTEFRAELSDAGNKLI VVDF SATWCGPCKMIKPFHSMVEKYP 50

Trx O. hannah          51 DVVFIEIDVDDAQDVASHCDVKCMPTFQFYKNNEKVHEFSGANKEKLEEA 100
Trx B. alternatus       51 DVVFIEIDVDDAQDVASHCDVKCMPTFQFYKNNEKVHEFSGANKEKLEEA 100

Trx O. hannah          101 IKKYM 105
Trx B. alternatus       101 IKKYM 105
    
```

Figura 23. Alinhamento da sequência de aminoácidos da tioredoxina (Trx) de *B. alternatus* e *O. hannah*. A sequência foi traduzida a partir do cDNA de *B. alternatus* e apresentou 100% de similaridade com a de *O. hannah*.

4.9. Análise de peptídeo de sinal

A análise do SignalP identificou 147 ESTs com peptídeo de sinal, dos quais 62 ESTs foram relacionados a toxinas de serpentes (37 relacionados à PLA₂, sete relacionados às metaloproteinases, seis relacionados a proteínas que se ligam à glicoproteína 1 β de plaquetas, seis relacionados à cadeia β da proteína ACF 1/2, quatro relacionados a serinoproteinases, um relacionado à desintegrina e um relacionado ao precursor do peptídeo potencializador de bradicinina), 50 eram de proteínas não relacionadas a toxinas e 35 ESTs eram de proteínas desconhecidas.

4.10. Análise de polimorfismos de nucleotídeos de base única (*single-nucleotide polymorphisms* ou SNPs)

Foram detectados 132 possíveis SNPs no transcriptoma de *B. alternatus*, dos quais 31 (16 substituições não sinônimas e 15 substituições sinônimas) foram localizadas em ORFs (*open reading frames*) (Tabela 1). Também foram identificados 32 polimorfismos de inserção-deleção (*insertion-deletion polymorphisms* ou Indels).

4.11. Identificação de repetições simples (microssatélites) e Identificação de repetições invertidas (IRs)

A identificação de repetições simples em “tandem” (microssatélites) resultou em 321 sequências, com a exclusão de repetições classificadas como elementos de transposição (TEs), 244 sequências com microssatélites foram identificadas (dados não mostrados). A investigação dos elementos de repetição

nos ESTs de *B. alternatus* mostrou que alguns genes continham longos trechos de repetições invertidas (IR), isto é, uma parte da sequência possuiu uma orientação diferente de sua sequência original. Um resultado interessante envolveu o gene das BPPs/CNPs, onde foram encontrados 16 sequências deste gene com IR longa. A Figura 24 mostra de forma esquemática como esta IR ocorreu na porção do mRNA que codifica a parte do gene da CNP.

4.12. Identificação de elementos de transposição (TEs)

Os elementos de transposição (TEs) foram identificados utilizando os critérios descritos nos Métodos. O alinhamento identificou 492 sequências com elementos de repetição, o que corresponde a 9% dos ESTs de *B. alternatus*. Várias famílias de TEs foram identificadas, sendo que a predominante foi a BovB, com 120 ESTs (Tabela 2).

Em análise criteriosa dos 492 ESTs que apresentaram TEs, 193 mostraram fusão com sequências que não estavam presentes nos bancos de dados de sequências repetidas. Para identificar estas sequências, os TEs foram mascarados e as sequências foram submetidas ao BLAST novamente contra o nr do GenBank. Estes resultados revelaram 80 ESTs com TEs fusionados com genes codificadores de proteínas (dados não mostrados).

Tabela 1. **As posições dos SNPs na biblioteca de cDNA da glândula venenífera de *B. alternatus*.** Os polimorfismos foram detectados utilizando o programa TrueSNP, sendo o maior número foi detectado em genes relacionados à jararagina de *B. jararaca*.

Contig	Tamanho (bp)	SNPs	Primeiro hit
Contig531	1006	9	Jararhagin [<i>Bothrops jararaca</i>]
Contig473	749	6	Zinc metalloproteinase-disintegrin ACLD [<i>Gloydus brevicaudus</i>]
Contig425	844	6	Zinc metalloproteinase/disintegrin precursor [<i>Bothrops insularis</i>]
Contig500	715	5	Protein disulfide isomerase 3 precursor [<i>Gallus gallus</i>]
Contig322	700	4	ATP synthase F0 subunit 6 [<i>Agkistrodon piscivorus</i>]
Contig662	1213	3	Hypothetical 18K protein - goldfish mitochondrion
Contig310	568	2	Predicted: hypothetical protein [<i>Gallus gallus</i>]
Contig 54	758	2	Zinc metalloprotease-disintegrin halysase [<i>Gloydus halys</i>]
Contig538	784	2	Ribosomal protein S2 [<i>Homo sapiens</i>]
Contig117	281	1	Similar to ribosomal protein L34 [<i>Monodelphis domestica</i>]
Contig285	594	1	Phospholipase A ₂ BITP01A precursor [<i>Bothrops insularis</i>]
Contig278	762	1	Unnamed protein product [<i>Homo sapiens</i>]
Contig181	763	1	Predicted: similar to calmodulin [<i>Mus musculus</i>]
Contig384	789	1	Piscivorin precursor [<i>Agkistrodon piscivorus</i>]
Contig 26	1001	1	Zinc metalloproteinase/disintegrin precursor [<i>Bothrops jararaca</i>]
Contig349	1051	1	Calreticulin [<i>Gallus gallus</i>]
Contig149	1313	1	Predicted: similar to PLC α , partial [<i>Ornithorhynchus anatinus</i>]
Contig335	1448	1	Cytochrome oxidase subunit 1 [<i>Campephilus guatemalensis</i>]
Contig840	1891	1	Zinc metalloproteinase-disintegrin jararhagin [<i>Bothrops jararaca</i>]
Contig255	745	1	Predicted: similar to U2 (RNU2) [<i>Pan troglodytes</i>]

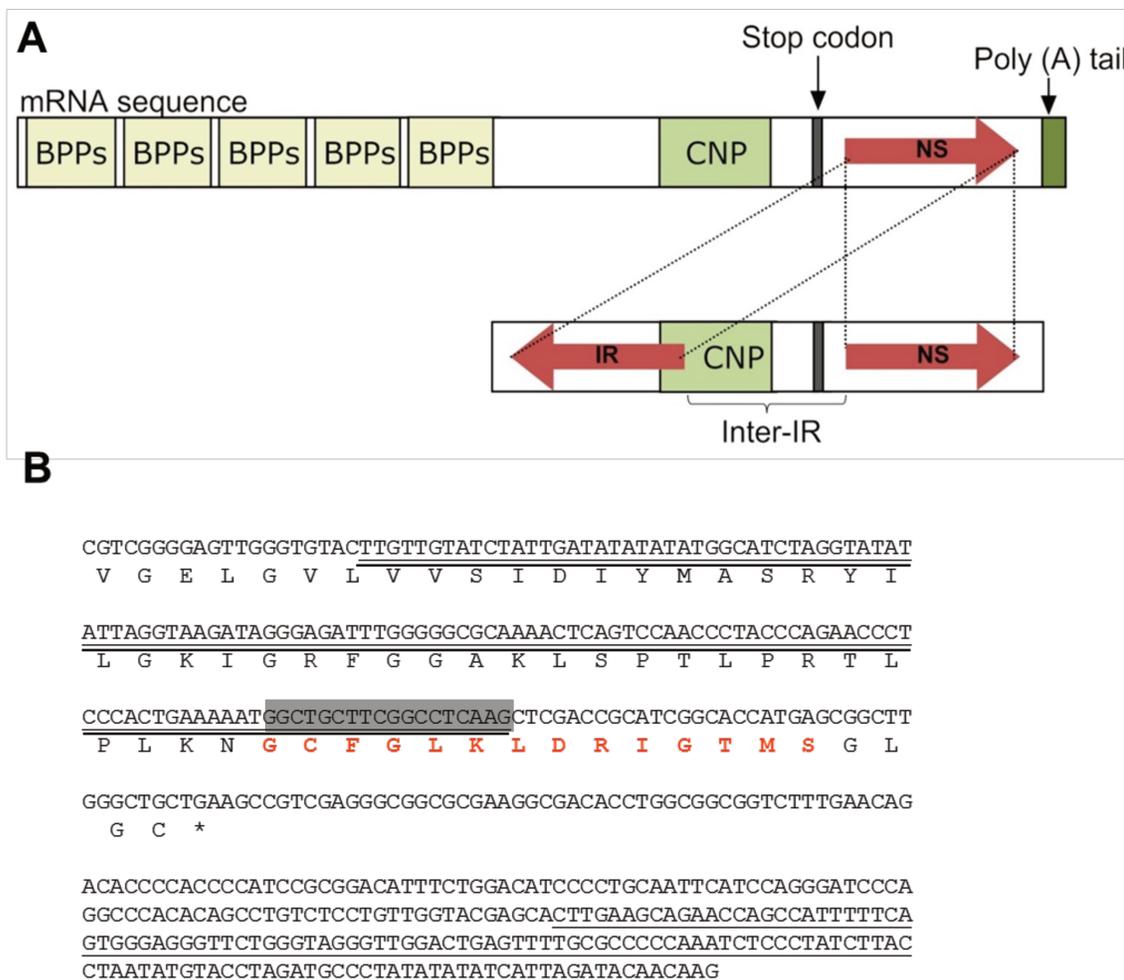


Figura 24. Exemplo de um IR longo encontrado no contig649 do gene da BPP/CNP no transcriptoma de *B. alternatus*. **(A)** Organização normal do gene, mostrando a sequência normal (NS, *normal sequence*) representada pela seta vermelha (apontando para a direita) que antecede a cauda poli(A), no terminal 3'-UTR. A parte inferior do painel **(A)** mostra a localização do IR (seta vermelha apontando para a esquerda) em relação à sequência original. O IR ocorre como uma repetição perfeita (sequência palindrômica) envolvendo parte da região codificadora do CNP. O IR e a NS são separadas por uma região de 183 nucleotídeos chamada de região inter-IR. **(B)** Sequência nucleotídica e protéica do contig649 (466 pb), para o qual foram obtidos 56 ESTs. A NS é identificada por um sublinhado simples, e o IR por um sublinhado duplo. A caixa cinza mostra a região do CNP incluso no IR e os aminoácidos do CNP estão indicados em vermelho. * = stop codon.

Tabela 2.A detecção de elementos de transposição (TEs) na biblioteca de cDNA da glândula venenífera de *B. alternatus*. O TE mais frequentemente encontrado foi a BovB, também identificado em *Vipera*.

Família	Nome	Gênero em que foi descrito pela primeira vez	Unisequências de <i>B. alternatus</i>
RTE	BovB	<i>Vipera</i> (serpente)	120
CR1	CR1_HS	<i>Homo</i> (humano)	19
L2	LINE2_CH1	<i>Crotalus</i> (serpente)	15
hAT	HAT3_MD	<i>Monodelphis</i> (rato)	13
L2	LINE2_NT1	<i>Natrix</i> (serpente)	8
hAT-Charlie	SPIN_MI	<i>Myotis</i> (morcego)	6
hAT-Charlie	URR1_Xt	<i>Xenopus</i> (rã)	4
		<i>Walterinnesia</i>	
L2	LINE2_WA1	(serpente)	3
hAT-Charlie	SPIN_Og	<i>Otolemur</i> (primata)	3
TcMar-Tc1	Tc1-3_Xt	<i>Xenopus</i> (rã)	3
hAT-Charlie	nhAT4b_ML	<i>Myotis</i> (morcego)	2
hAT-Charlie	SPIN_NA_6_Et	<i>Echinops</i> (planta)	2
Sauria	AFESINE	<i>Azemiops</i> (serpente)	1
R4	Rex6	<i>Takifugu</i> (peixe)	1
TcMar-Tc1	Tc1-2_FR	<i>Takifugu</i> (peixe)	1
TcMar-Tc1	TZF28B	<i>Danio</i> (peixe)	1

4.13. Análise comparativa da biblioteca de ESTs de *B. alternatus* com a de outras espécies botrópicas

A grande quantidade de sequências parciais de DNA obtidas para *B. alternatus* (5.350 ESTs válidos) supera consideravelmente o número correspondente obtido para outras espécies de *Bothrops*: 610 ESTs para *B. atrox* (165), 610 e 2.042 ESTs para *B. insularis* (106; 116), 2.318 ESTs para *B. jararaca* (166) e 549 ESTs para *B. jararacussu* (66). Estes dados permitem comparar a expressão gênica de diversas espécies deste gênero. A abaixo mostra as principais classes de toxinas identificadas em transcriptomas destas espécies. De modo geral, os ESTs mais expressos foram os de metaloproteinases, BPPs, PLA₂, serinoproteinases e lectinas do tipo C. Os ESTs menos abundantes foram os de LAO, CRISPs e fatores de crescimento como o VEGF e NGF.

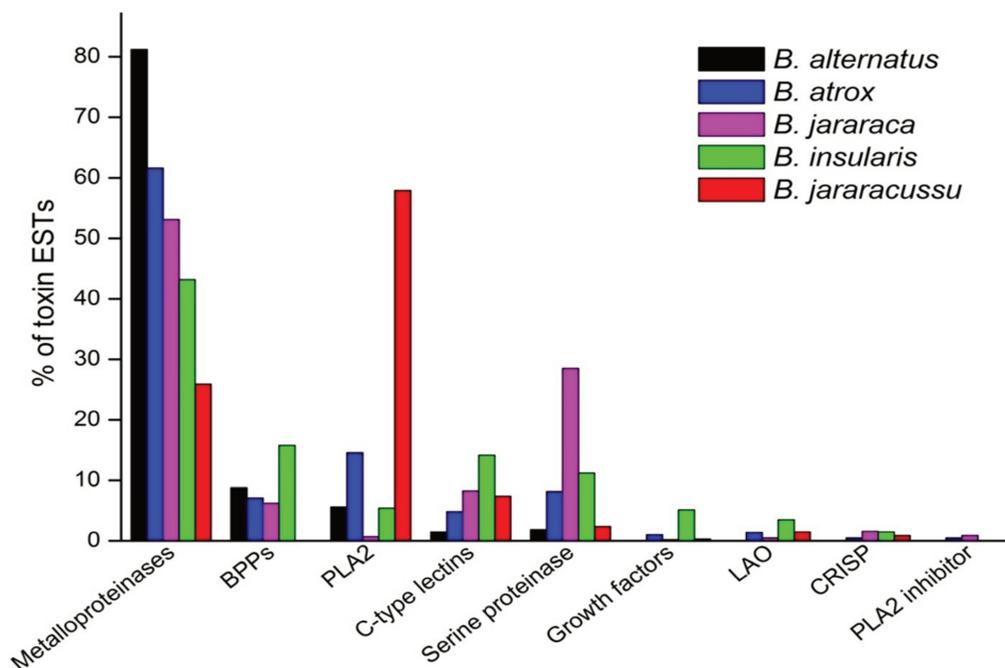


Figura 25. Abundância relativa das principais classes de toxinas identificadas em estudos transcriptômicos em algumas espécies do gênero *Bothrops*. Fontes: *B. alternatus* (este trabalho) *B. atrox* (165), *B. insularis* (116; 106), *B. jararaca* (166) e *B. jararacussu* (66).

5. DISCUSSÃO

5.1. Construção e anotação da biblioteca de cDNA da glândula de venenífera de *B. alternatus*

Conforme descrito nos Materiais e Métodos (M&M), foram construídas três bibliotecas de cDNA válidas a partir da glândula venenífera de *B. alternatus*. Na primeira etapa deste trabalho, isolamos o RNA total da glândula venenífera, e este foi utilizado na construção das bibliotecas de cDNA com base na metodologia descrita no kit Cloneminer. Inicialmente tivemos dificuldade para validar as bibliotecas, pois apesar de todos os passos serem rigorosamente controlados, mesmo assim, a porcentagem de fragmentos de cDNA com tamanho elevado (500 pb até 4000 pb) inseridos no vetor pDONR222 foi muito baixa. Na tentativa de contornar este problema, utilizamos uma quantidade maior de RNA para iniciar a fita simples, porém, sem melhora nos resultados, ou seja, continuamos com a inserção de apenas fragmentos pequenos de cDNA no vetor. Outras abordagens, tais como a extração do RNA mensageiro com material radioativo, também não foram bem sucedidas.

Visando solucionar as dificuldades encontradas anteriormente, utilizamos novas cepas de célula DH10b para a eletroporação do cDNA da biblioteca, novas alíquotas de vetor pDONR222 e também da enzima 2 Advanced polymerase. E somente após diversas tentativas, foram validadas as bibliotecas de cDNA. A nomenclatura interna utilizada para as bibliotecas foi BACCGV seguida do número do poçinho de cada placa de 96 poços. O processo de validação foi iniciado com as reações de PCR utilizando os cDNAs resultantes das mini-

preparações. Obtivemos uma excelente porcentagem de fragmentos de cDNA com tamanho ideal e aceitável para uma biblioteca de ESTs (800 pb até 4 kb) inseridos no vetor pDONR222.

A segunda validação foi realizada *in silico* baseada nos gráficos gerados durante o sequenciamento através do site <http://bmp.cbmeg.unicamp.br/BA>. Esta análise confirmou a qualidade das sequências depositadas no banco, bem como a estabilidade nos tamanhos dos fragmentos e o baixo conteúdo de fragmentos pequenos. De modo geral, fragmentos de 800 pb até 4 kb conferem dados mais seguros dos genes expressos no tecido alvo uma vez que quando há grande quantidade de insertos pequenos pode ocorrer excesso de artefatos e uma baixa detecção de informações seguras. Após a validação criteriosa da biblioteca foi realizado o sequenciamento em larga escala.

O sequenciamento total resultou em 12.479 transcritos brutos (soma das três bibliotecas) que foram analisados utilizando o *pipeline* de bioinformática descrito nos M&M deste capítulo. Após o processamento das sequências (remoção das sequências de baixa qualidade, as sequências ribossômicas, de clones contendo apenas vetor e de regiões homopoliméricas) e a clusterização obtivemos 5.350 ESTs de alta qualidade (números de acesso no GenBank dbEST: GW575430 até GW583300) com tamanho médio de 562 pb (100 - 848 pb), que foram montadas em 838 contigs e 4512 singletons.

A partir dos 5.350 ESTs, foi iniciado o processo de anotação, onde todos as ESTs foram submetidas ao BLAST remoto contra o GenBank (contra o nr) e contra um banco criado manualmente apenas com nucleotídeos de serpente (SerpN) e outro com proteínas de serpente (SerpP). No BLAST contra o GenBank,

30% das sequências (1.605 ESTs) tiveram *hits* contra o “nr”, dos quais 1.245 ESTs (23% do total ou ~78% destes *hits*) estavam relacionados a toxinas; os 70% restantes dos ESTs não tiveram *hits* com nenhuma sequência conhecida. O BLAST contra o banco criado manualmente seguiu o mesmo padrão do BLAST remoto e revelou uma baixa quantidade de acertos (*hits*) contra proteínas de serpente relacionadas à peçonha ou não, o que provavelmente refletiu a baixa quantidade de dados sobre serpentes disponíveis em bancos públicos e também pelo fato de não termos o genoma completo. Estes achados demonstram a riqueza de novas sequências que este tecido contém e que ainda necessitam de caracterização.

Outra análise realizada foi a anotação automática convencional com termos de GO para processos função molecular e processos biológicos e os dados encontrados foram semelhantes às análises realizadas em outras espécies botrópicas(66; 106; 116; 166) e *L. muta* (179). No entanto, a anotação manual, que consistiu em analisar todos os contigs e singlets, visualizando um a um através do *site* e *pipeline* criados para este trabalho, revelaram de forma segura as toxinas mais expressas e menos expressas, possíveis toxinas e proteínas inéditas presentes neste tecido.

5.2. Toxinas mais expressas

Com relação aos transcritos para toxinas, os mais expressos (em ordem decrescente) foram os de metaloproteinases/desintegrinas, precursores do peptídeo natriurético CNP/BPP, PLA₂, serinoproteases e lectinas do tipo C, enquanto os menos expressos foram os de proteínas secretadas ricas em cisteína

(*cysteine-rich secretory proteins*; CRISPs), uma proteína taicatoxina-símile, um ativador da protrombina, um precursor da catrocollastatina e a dipeptidilpeptidase IV (DPP IV). O perfil das principais classes de toxinas identificadas neste estudo (SVMPs/desintegrinas, CNP/BPP, PLA₂, serinoproteinases e lectinas do tipo C) foi semelhante ao relatado em análises transcriptômicas de outras espécies botrópicas, onde estas classes também predominam (66; 106; 116; 165; 166) e *L. muta* (179).

5.2.1. Metaloproteinases/desintegrinas

As metaloproteinases (SVMPs, *snake venom metalloproteinases*) representam um grupo importante de toxinas em diversas peçonhas ofídicas, onde contribuem para a hemorragia local e sistêmica vista experimental e clinicamente (191; 225), inclusive com as peçonhas botrópicas (189; 190; 191). As SVMPs são classificadas em três grandes classes (P-I, P-II e P-III) (226; 227), sendo que em peçonhas botrópicas a classe P-III é a mais abundante.

Na biblioteca de cDNA de glândula de veneno de *B. alternatus* as metaloproteinases foram as toxinas predominantes, sendo quase exclusivamente da P-III. As principais SVMPs detectadas aqui foram a jararagina de *B. jararaca*, a cadeia pesada do fator X da peçonha da víbora de Russell (*Vipera russelli*) e o fator hemorrágico 3 (HF3) de *B. jararaca*. Também foram detectados alguns *hits* para metaloproteinases de *Bothrops*, tais como a berythactivase de *B. erythromelas*(138), bothropasina de *B. jararaca*(131; 228) e metaloproteinases II e III (Bojomet II e Bojomet III) de *B. jararacussu*(66). Houveum baixo número de transcritos para SVMPs de classe P-II, que incluíram um transcrito (singlet) para

contortostatina e um contig relacionado à insularinase; nenhum EST para SVMPs da classe P-I foi detectado. A abundância de transcritos de SVMPs de classe P-III comparada com os poucos para P-II e nenhum para P-I está de acordo com os resultados de uma análise proteômica da peçonha de *B. alternatus*, a qual mostrou predomínio de SVMPs de classe P-III (transcritos de jararagina e berythactivase) (199).

A abundância de SVMPs da classe P-III, tanto na análise proteômica quanto transcriptômica, tem sido corroborada por estudos bioquímicos nos quais algumas toxinas P-III foram isoladas e caracterizadas da peçonha de *B. alternatus*. Assim, Souza *et al.* (229) descreveram a caracterização da alternagina, uma metaloproteinase P-III (~55 kDa) presente nesta peçonha; esta proteína pode sofrer autólise para liberar um domínio tipo ECD-desintegrina rico em cisteína (*ECD-disintegrin-like cysteine-rich domain*) conhecido como alternagina-C (28 kDa). A alternagina inibe a ligação de células K562 ao colágeno através do bloqueio seletiva da integrina $\alpha_2\beta_1$, de maneira semelhante à jararagina da peçonha de *B. jararaca*; esta inibição é mediada pela alternagina-C. A alternagina, denominada balteragina, também foi isolada da peçonha da *B. alternatus* da Argentina (205; 229). Esta proteína causa edema, hemorragia e necrose locais quando administrada por via intramuscular em camundongos, e hemorragia sistêmica, começando pelos pulmões, rins e fígado, quando administrada por via endovenosa.

Da peçonha de *B. alternatus* brasileira Cominetti *et al.* (230) caracterizaram uma toxina P-III dimérica denominada BaG de 130 kDa (forma monomérica: 55 kDa) constituída de uma metaloproteinase e uma desintegrina RDG(Arg-Gly-

Asp). Esta enzima que corresponde a pelo menos de 0,2% das proteínas da peçonha, inibe a agregação plaquetária induzida por ADP (*Adenosine diphosphate*) através de um mecanismo independente da sua atividade enzimática. A BaG também bloqueia a adesão das células K562 à fibronectina, um fenômeno mediado pela integrina $\alpha_5\beta_1$, mas não afeta a ligação destas células ao colágeno tipo I, interação esta que é mediada pela integrina $\alpha_2\beta_1$.

O processamento de metaloproteinases das classes P-II e P-III origina uma RDG-disintegrina e domínios tipo ECD-disintegrina e ricos em cisteína (DC), respectivamente, os quais exercem uma variedade de atividades biológicas através de interações com integrinas na superfície celular (226). Os ESTs de *B. alternatus* apresentaram quatro ESTs relacionados com às disintegrinas, e menos de três desintegrinas foram identificadas em estudo proteômico da peçonha de *B. alternatus*(199). Conforme indicado acima, a autólise da alternagina gera alternagina-C (229), que está envolvida em várias atividades celulares, como a migração de neutrófilos mediada por integrinas (231), a estimulação da migração de células endoteliais venosas umbilicais (203; 232) e a modulação da angiogênese *in vitro* e *in vivo*(233), porém com pouco efeito na regeneração muscular (234).

Mais recentemente foi identificada uma desintegrina, a DisBa-01, através da análise de cDNA da glândula de veneno da *B. alternatus*(209). Esta proteína inibe a angiogênese e a metástase de melanoma através da sua interação com a integrina $\alpha_v\beta_3$. Também inibe a adesão plaquetária ao fibrinogênio, aumentando

assim o tempo de sangramento em camundongos, esta inibição é mediada pela interação com a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ de plaquetas (235).

5.2.2. Fosfolipases A₂ (PLA₂)

As peçonhas botrópicas são ricas em PLA₂ ácidas e básicas, tendo o aminoácido Asp⁴⁹ ou Lys⁴⁹ no sítio ativo. Muitas destas PLA₂ causam dor, edema, inflamação e miotoxicidade (236; 237), além de bloqueio neuromuscular *in vitro*(238). O conteúdo de PLA₂ miotóxicas varia entre as espécies, com as peçonhas de *B. asper*, *B. colombiensis*, *B. fonsecai*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi* e *B. pradoi*, tendo alto conteúdo de PLA₂ enquanto outras como as de *B. alternatus*, *B. atrox*, *B. cotiara*, *B. erythromelas* e *B. jararaca*, possuem pouca ou nenhuma PLA₂ miotóxica (156; 239; 240; 241; 242).

Conforme mostrado aqui, as PLA₂ representaram 5,6% do total dos ESTs relacionados a toxinas e 1,28% do total da biblioteca. Esta proporção de PLA₂ é semelhante ao conteúdo encontrado nas bibliotecas de *B. insularis* (6,7%) (116) e *B. jararaca* (6,7%) (166), mas consideravelmente mais baixa que na biblioteca de *B. atrox* (14,6%)(165) e *B. jararacussu* (58%) (66).

As sequências de PLA₂ encontradas na biblioteca de *B. alternatus* formaram dois grandes grupos: 41 ESTs relacionados com BOTIN PLA₂ (PA2-BOTIN ou BinTX-II; número de acesso Q8QG87 na base de dados SwissProt/trEMBL), que corresponde a uma de duas isoformas ácidas de uma PLA₂ Asp⁴⁹ ácida caracterizadas de *B. insularis*(243) (BinTX-I = pI 5,05; BinTX-II = pI 4,49), e 28 ESTs relacionados a uma PLA₂ Asp⁴⁹ com atividade hipotensora da

peçonha de *B. jararacussu* (número de acesso Q8AXY1 na base de dados SwissProt/trEMBL) (244).

A BinTX-I causa edema em pata de camundongos bem como um bloqueio neuromuscular parcial e mionecrose em preparações biventer cervicis de pintainho (243). É possível que a PLA₂ de *B. alternatus* exerça efeitos semelhantes no envenenamento. Por outro lado, a PLA₂ ácida hipotensora da peçonha de *B. jararacussu* não é miotóxica, citotóxica ou letal, mas causa edema e hipotensão, além de inibir a agregação plaquetária (244).

Nisenbom *et al.*(192; 193) caracterizaram uma PLA₂ ácida (pI 5,04-5,08) da peçonha de *B. alternatus*, e mostraram que ela era responsável pela maior parte da letalidade da peçonha em camundongos e que produziu alterações cardiovasculares, tais como dispnéia, taquicardia, arritmia e choque circulatório, bem como dano tecidual (hemorragia e necrose). Estes achados indicam que esta PLA₂ possui propriedades semelhantes às de *B. insularis* e *B. jararacussu*.

As PLA₂ básicas Lys⁴⁹ características de muitas peçonhas de *Bothrops* não foram detectadas na biblioteca de *B. alternatus*, o que corrobora com os resultados da análise proteômica desta peçonha (199) e com análises de ESTs de *B. insularis*(116) e de *L. muta*(179). No entanto, foram identificados dois transcritos relacionados à crotocina, uma PLA₂ básica e principal neurotoxina de *C. d. terrificus*; esta PLA₂ também foi identificada nos ESTs de *B. insularis*(116). Além disto, também detectamos um *singlet* semelhante à PLA₂β-neurotoxina ammodytoxina da *Vipera ammodytes*.

A ausência de PLA₂ básicas Lys⁴⁹ no transcriptoma de *B. alternatus* está de acordo com o baixo conteúdo de PLA₂ miotóxicas básicas na peçonha desta

espécie (156;242). De fato, até o momento, somente uma PLA₂ básica (pl 8,63) foi isolada e caracterizada da peçonha de *B. alternatus*(192; 193).Esta enzima, que corresponde a <1% do conteúdo da peçonha, causa edema de pata, a necrose de músculo esquelética, lise de mioblastos de células musculares C2C12 e bloqueio neuromuscular em preparações de biventer cervicis de pintainho e nervo frênico-diafragma de camundongo. Entretanto, o baixíssimo nível em que esta PLA₂ se encontra na peçonha sugere que ela provavelmente contribui muito pouco para as atividades da peçonha *in vivo*.

Além de PLA₂, detectamos também inibidores destas enzimas (17 ESTs com *hits* apenas na região 3'UTR; situação semelhante aos inibidores de PLA₂ da *Trimeresurus flavoviridis*). Os inibidores de PLA₂ de glândulas de veneno ofídicas compartilham considerável homologia sequencial com a γ -PLI, inibidores de PLA₂ identificados em soro de serpentes, inclusive no de *B. alternatus*(245).

5.2.3. Serinoproteinases

A coagulopatia é uma complicação importante do envenenamento botrópico, e junto com a ação das SVMPs, pode contribuir para a hemorragia sistêmica (189; 190). Os distúrbios de coagulação causados por peçonhas botrópicas são mediados por uma variedade de enzimas, principalmente serinoproteinases, que agem em diversos pontos da cascata de coagulação, incluindo na degradação do fibrinogênio e da fibrina. A manifestação clínica destes distúrbios é o sangue incoagulável. Algumas das serinoproteinases envolvidas na coagulopatia também podem contribuir para a dor, vasodilatação e hipotensão sistêmica (246; 247). Na biblioteca de *B. alternatus*, as

serinoproteinases formaram o quarto maior grupo de ESTs, representando 1,9% do total de transcritos e 0,45% dos ESTs relacionados a toxinas. Destes ESTs, ~42% (10 ESTs) estavam relacionados à BthaTL, uma serinoproteinase identificada na peçonha de *B. alternatus* baseada em estudo de clonagem e análise da sequência de aminoácidos (210). A BthaTL compartilha >60% da sua sequência de aminoácidos com várias enzimas trombina-símile (TLE, *thrombin-like enzyme*) e é provavelmente a mesma enzima que a TLE balterobina identificada por Smolka *et al.*(202).

Outras proteínas deste grupo estavam relacionadas à serinoproteinase isoforma 5 (7 ESTs), ao precursor da serinoproteinase HS112 (1 EST), e à TLE (1 EST). Além destas proteínas, encontramos um transcrito com um *hit* somente na região 3'UTR, relacionado à KN-BJ2, uma enzima de *B. jararaca* que libera cininas e coagula fibrinogênio (166; 217;247). A variedade de serinoproteinases identificada neste transcriptoma está em acordo com o perfil de enzimas coagulantes (BthaTL e vários TLEs homólogas a batroxobin, proteinases HS114 e palase) e enzimas liberadoras de cininas identificadas na análise proteômica da peçonha de *B. alternatus* (199). A abundância de serinoproteinases neste transcriptoma é semelhante aos 2% descritos no transcriptoma de *B. jararacussu*(66), mas consideravelmente abaixo do conteúdo destas enzimas em outras espécies deste gênero, onde variam de 8,2% em *B. atrox*(165) a 28,6% em *B. jararaca*(166). Estas diferenças na proporção de serinoproteinases poderiam contribuir com as variações na gravidade da coagulopatia causada pelas diferentes espécies de *Bothrops*.

5.2.4. Lectinas do tipo C

As proteínas do tipo lectinas do tipo C são muito comuns no reino animal, inclusive em peçonhas. As lectinas do tipo C presentes em peçonhas ofídicas formam dois grandes grupos: as verdadeiras lectinas do tipo C com domínios que se ligam a carboidrato e lectinas do tipo C sem domínios que se ligam a carboidrato, sendo que este último grupo consiste principalmente de proteínas que se ligam ao fator IX/X e proteínas que interagem com receptores de plaquetas.

Lectinas do tipo C tem um papel importante nos distúrbios de coagulação induzidos por peçonhas e têm sido identificadas em vários transcriptomas de espécies de *Bothrops* (66; 106; 116; 165; 166). Estas proteínas foram o quinto grupo mais expresso de transcritos relacionados a toxinas, com 18 ESTs com proteínas (1,46%, ou 0,33% do total do transcriptoma). Estes transcritos estão relacionados à subunidade α da proteína que se liga à glicoproteína Ib de plaquetas (8 ESTs), à cadeia β da proteína ACF 1/2 (7 ESTs) e à botrojaracina (1 EST). Detectamos também um *singlet* em 3' UTR, da colvulxina, uma lectina do tipo C inicialmente identificada na peçonha de *C. d. terrificus* e também identificada em *B. insularis* (116). A abundância de lectinas do tipo C no transcriptoma de *B. alternatus* foi consideravelmente menor que em *B. atrox* (4,8%) (165), *B. jararaca* (8,3%) (166) e *B. jararacussu* (5%) (66). A baixa proporção destas proteínas pode contribuir com a baixa coagulopatia no envenenamento por *B. alternatus* quando comparada a outras espécies de *Bothrops*.

Poucas proteínas desta classe têm sido caracterizadas na peçonha de *B. alternatus*. A botrojaracina, um heterodímero de 27 kDa (13 kDa e 15 kDa), inicialmente purificado da peçonha de *B. jararaca*, compartilha homologia com várias proteínas da família de lectinas do tipo C, e inibe a atividade de trombina, por exemplo, agem na agregação plaquetária e na coagulação do fibrinogênio através da interação com os exossítios I e II da enzima, formando assim um complexo não-covalente (248; 249). Também foi caracterizada a botroalternina, um homodímero de 27 kDa relacionado à botrojaracina (199). A botroalternina se liga a anticorpos contra botrojaracina, e compartilha homologia sequencial (68% a 84%) com as cadeias α e β da proteína que se liga ao fator IX/X e à botrocetina de *B. jararaca*, inibindo a agregação plaquetária. A botroalternina também foi detectada em análise proteômica da *B. alternatus* (199).

Lectinas verdadeiras que se ligam a açúcares, e que são relacionadas às lectinas do tipo C, têm sido detectadas em alguns transcriptomas de *Bothrops*(66; 106;165), mas não foram detectadas neste transcriptoma de *B. alternatus* e no transcriptoma de *B. jararaca*(166).

5.2.5. Precursores do peptídeo natriurético CNP/BPPs

As peçonhas botrópicas são conhecidas por seu conteúdo de BPPs que potenciam a hipotensão induzida pela peçonha por inibirem a enzima conversora de angiotensina, uma enzima pivô na formação da angiotensina II (peptídeo vasoconstrictor) e na degradação da bradicinina (peptídeo vasodilatador) (250). Vários BPPs já foram identificados em peçonhas de *Bothrops*, e no final da década de 90 os genes que codificam BPPs na glândula de veneno de *B.*

jararaca foram clonados e sequenciados (75;115). Estes mesmos estudos mostraram a presença de genes que codificam peptídeos natriuréticos do tipo C (CNP) que contribuem para a hipotensão induzida pela peçonha.

Transcriptomas da glândula de veneno de espécies de *Bothrops* confirmam estes achados e mostram que os genes que codificam estes dois peptídeos representam de 6% a 20% dos ESTs relacionados a toxinas (106; 116; 165; 166). Uma porcentagem similar (~9%) também foi observada para *B. alternatus*, com 110 ESTs codificando os precursores BPP/CNP (especificamente a região de CNP), enquanto 156 ESTs mostraram semelhança somente na região 3'UTR. Ao contrário da abundância de transcritos de precursores BPP/CNP detectados em espécies de *Bothrops*, a análise proteômica mostra que estes peptídeos representam menos de 1% da composição das peçonhas(251), com exceção da *B. insularis* onde o conteúdo de BPPs é ~10% (106). Uma situação similar foi relatada para CNPs, para os quais algumas análises peptidômicas não detectaram estes peptídeos, mesmo com a identificação dos transcritos correspondentes, como por exemplo, em *B. insularis*(106) e *L. muta*(252).

5.3. Toxinas menos expressas

5.3.1. Proteínas secretadas ricas em cisteína (*cysteine-rich secretory proteins*; CRISPs)

As CRISPs (*cysteine-rich secretory proteins*) de peçonhas ofídicas são proteínas de 23 a 26 kDa contendo grande quantidade de resíduos de cisteína (165) que formam oito pontes de dissulfeto. As CRISPs têm ampla distribuição em peçonhas ofídicas e têm sido detectadas em estudos de transcriptoma onde

representam 0,5-2% dos genes de toxinas (106; 116; 165; 166) e proteômica onde correspondem a 0-3,6% das toxinas(86; 106; 215; 216; 239; 251,253)de espécies de *Bothrops*. Em concordância com estes estudos, detectamos cinco transcritos que codificaram CRISPs, o que corresponde a 0,4% dos ESTs relacionados a toxinas. Embora o papel das CRIPS permaneça pouco esclarecido, vários membros desta família bloqueiam uma variedade de canais iônicos, incluindo o de cálcio tipo L, canais iônicos regulados por nucleotídeos cíclicos, canais de K ativados por voltagem (Kv1.3), canais de cálcio de alta condutância ativados por K (BCa) e canais de rianodina sensível ao cálcio intracelular. Peichoto *et al.*(254) mostraram que a CRISP isolada da peçonha da colubrídea *Philodryas patagoniensis* era capaz de causar mionecrose em músculo esquelético de camundongos. Considerando que a mionecrose é um efeito local importante no envenenamento botrópico, é possível que as CRISPs da peçonha de *B. alternatus* tenham uma participação neste fenômeno.

5.3.2. Dipeptidilpeptidase IV (DPP IV)

A DPP IV, também conhecida como CD26, tem uma ampla distribuição em peçonhas ofídicas (255). Os genes da DPP IV têm sido identificados em glândula de veneno da *Gloydius blomhoffii brevicaudus*(256), *B. jararaca*(166), *L. muta*(179) e vários elapídeos australianos (257). Gasparello-Clemente e Silveira (258)relataram a presença da DPP IV em várias peçonhas botrópicas, com alta atividade na de *B. alternatus*.

Na análise transcriptômica de *B. alternatus* detectamos um EST com alta similaridade à DPP IV descrita para *G. b. brevicaudus*. A DPP IV de peçonha

possui propriedades enzimáticas semelhantes a outras DPP IVs eucarióticas (256) e pode contribuir para as alterações cardiovasculares induzidas pela peçonha, possivelmente degradando peptídeos endógenos através de uma associação com vesículas exossômicas na peçonha bruta (259), e/ou interferindo na homeostase da glicose e interagindo com os sistemas imune e neuroendócrino (260). A DPP IV pode também ser importante no processamento de precursores polipeptídicos de peptídeos de venenos, conforme sugerido para as peçonhas de vespa e abelha (261; 262).

5.3.3. Fatores de crescimento

Os fatores de crescimento de peçonhas ofídicas incluem principalmente o fator de crescimento endotelial vascular (svVEGF) e o fator de crescimento neuronal (NGF), ambos os quais têm sido detectados em ESTs de *Bothrops* (66; 106; 116; 165; 166). Neste estudo, detectamos cinco ESTs para VEGF semelhante ao VEGF de *B. insularis* (116; 152), um EST semelhante ao VEGF de *L. muta* (179) e um EST semelhante ao NGF de *C. d. terrificus*. Entretanto, a proporção de transcritos para fatores de crescimento em *B. alternatus* foi menor que em outros estudos de *Bothrops*. Junqueira-de-Azevedo *et al.* (152) mostraram que o svVEGF da peçonha de *B. insularis* era capaz de aumentar a permeabilidade vascular e sugeriram que esta proteína possa estar envolvida nas respostas locais e sistêmicas ao envenenamento.

5.3.4. Hialuronidase

A hialuronidase tem um papel importante em facilitar a difusão de peçonha e toxinas do sítio de inoculação devido à sua capacidade de degradar o ácido hialurônico da matriz extracelular (263; 264). Embora amplamente distribuída em peçonhas botrópicas (214), de modo geral a hialuronidase não tem sido detectada em estudos transcriptômicos e proteômicos deste gênero, talvez devido ao baixo nível de expressão do gene correspondente nas glândulas de veneno. No presente estudo, detectamos apenas um EST semelhante à hialuronidase truncada de *B. arietans*.

5.3.5. L-aminoácido oxidase

A L-aminoácido oxidase (LAO) tem distribuição ampla em peçonhas botrópicas (265) onde exerce uma variedade de atividades, tais como interferência na agregação plaquetária, citotoxicidade and atividade microbicida (266;267). Estes efeitos deletérios são mediados principalmente via a produção de H₂O₂ durante a oxidação de α -ceto aminoácidos. LAO corresponde a 0,5% a 2,6% dos transcritos de toxinas em transcriptomas de *Bothrops*(116;66; 166;165) e tem sido purificada e caracterizada destas peçonhas (267). No caso da *B. alternatus*, detectamos sete ESTs para esta toxina na região nucleotídica: quatro destes eram relacionados à LAO de *B. jararaca* and três eram ESTs na 3'UTR relacionados à LAO da *Ophiophagus hannah*. Ao contrário da baixa abundância de transcritos, a proteína da LAO corresponde a 6,9% das proteínas identificadas em análise proteômica da peçonha de *B. alternatus*(199). A LAO purificada

dapeçonha de *B. alternatus* é uma glicoproteína ácida (pI ~5,37) homodimérica (123 kDa) que agrega plaquetas, causa edema, é bactericida e bem baixa atividade hemorrágica (268); é possível que esta enzima seja responsável em parte pela citotoxicidade da peçonha de *B. alternatus* em células cultivadas da linhagem MDCK (*Madin-Darby canine kidney*) (269).

5.4. Identificação de transcritos inéditos no gênero *Bothrops*

5.4.1. Toxinas do tipo *three-finger* (3-FTx)

As toxinas do tipo *three-finger* (3-FTx) consistem principalmente de neurotoxinas elapídicas, tais como α -neurotoxinas, cardiotoxinas e fasciculinas, além uma variedade de outras proteínas menos caracterizadas [24; 270]. No início, pensava-se que as 3-FTx eram restritas aos elapídeos, porém vários estudos já detectaram estas toxinas em glândulas de veneno de crotalídeos (179;182) e colubrídeos (24;271; 272). As 3-FTx exercem diversas atividades biológicas que incluem o bloqueio de receptores colinérgicos (muscarínicos e nicotínicos), receptores β -adrenérgicos, canais de cálcio do tipo L e integrinas, bem como inibição da acetilcolinesterase e cardiotoxicidade mediada por interação com fosfolipídios.

Os ESTs de 3-FTx identificados aqui mostraram 90% de similaridade com a região do íntron II do gene para 3FTx-3 da cascavel norte-americana *Sistrurus catenatus edwardsi*(182), sem nenhum *hit* para 3-FTx de colubrídeos, elapídeos ou *L. muta*(179). Pahari *et al.*(182) também notaram que as sequências nucleotídica e protéica da 3-FTx de *S. c. edwardsii* não mostraram semelhança

com as 3-FTx da *L. muta*; este achado foi confirmado por uma análise filogenética que posicionou as toxinas de *L. muta* distantes das de *S. c. edwardsii*.

Os nossos dados representam a primeira identificação de genes para 3-FTx no gênero *Bothrops* e, junto com outros estudos, sugerem que esta classe de toxinas tem uma distribuição em vários gêneros crotalídeos do Novo Mundo, tais como *Bothrops* (a presente investigação), *Lachesis*(179) e *Sistrurus* (182) (baseado em análises transcriptômicas), e *Atropoides mexicanus (nummifer)*, mas não em *Atropoides picadoi* (baseado em análises proteômicas) (273). Por outro lado, análises transcriptômicas não detectaram estas toxinas em outros gêneroscrotalídeos do Novo Mundo (*Agkistrodon piscivorus leucostoma*(274) e *C. d.collilineatus*(151) e do Velho Mundo (*Agkistrodon (Deinagkistrodon) acutus* (167;174) ou em víboras como *Bitis gabonica*(169) e espécies de *Echis*(176;178). Embora a análise transcriptômica tenha mostrado a presença de 3-FTx em *S. c. edwardsii*(182), estas toxinas não foram detectadas em análise proteômicas de peçonhas de várias espécies deste gênero (180). De modo semelhante, a peçonha de *A. mexicanus (nummifer)*, mas não a de *A. picadoi*, contém toxinas 3-FTx (182). Tais variações podem refletir a baixa abundância de transcritos e de proteínas, tornando difícil sua detecção, mas também podem indicar o recrutamento ou incorporação heterógena destas toxinas ao proteoma das peçonhas (182). Isso poderia explicar por que análises transcriptômicas (66; 106; 116; 165; 166) e proteômicas(86; 106; 215; 216; 239; 251; 275)que geralmente não têm detectado estes genes e proteínas no gênero *Bothrops*.

A contribuição das 3-FTx ao envenenamento botrópico não está clara, especialmente considerando a baixa abundância de transcritos observada aqui.

As peçonhas botrópicas causam bloqueio neuromuscular em preparações de aves e mamíferos *in vitro*(276). Embora boa parte deste bloqueio seja devido à ação de PLA₂ miotóxicas (238), é possível que as toxinas 3-FTx também contribuam para este bloqueio através da sua capacidade de interferir com a neurotransmissão.

5.4.2. Ohanina

O envenenamento botrópico resulta em dor no local da picada (190;189). Os componentes da peçonha implicados neste fenômeno incluem PLA₂, metaloproteinases e serinoproteinases que atuam através da liberação de mediadores endógenos tais como metabólitos do ácido araquidônico (leucotrienos e prostaglandinas), bradicinina, citocinas pro-inflamatórias e óxido nítrico neuronal (236;277;278). Por outro lado, pouco se sabe do envolvimento de outras proteínas de peçonha nesta dor. A identificação de ESTs relacionados à ohanina, uma proteína de ~12 kDa associada à hipolocomoção e hiperalgesia inicialmente identificada na peçonha da serpente *Ophiophagus hannah* e que faz parte da família de proteínas conhecidas como vesprinas (279; 280), levanta a possibilidade de que outras proteínas, além daquelas indicadas acima, podem contribuir para a dor causada por peçonhas botrópicas. Desde sua descrição inicial, a ohanina (vesprina) tem sido detectada em elapídeos australianos (257; 281) e crotalídeos como *A. acutus*(167), *C. d. collilineatus*(151) e *L. muta*(179). Os nossos achados representam a primeira descrição para o gênero *Bothrops* e, junto com os estudos acima, sugerem uma ampla distribuição desta proteína em peçonhas ofídicas onde pode contribuir para a dor causada pelo envenenamento.

5.4.3. Proteína relacionada à taicatoxina

A taicatoxina (TCX) é uma toxina multimérica (um peptídeo de 8 kDa semelhante à α -neurotoxina, uma neurotoxina PLA₂ de 16 kDa e um inibidor de serinoproteinase de 7 kDa, na proporção 1:1:4) inicialmente isolada da peçonha do elapídeo australiano *Oxyuranus scutellatus scutellatus* (282; 283). A TCX bloqueia canais de cálcio dependentes de voltagem em membranas cardíacas e em cultura de miócitos ventriculares; parte deste bloqueio pode ser mediada pela atividade PLA₂ da toxina (283;284). A detecção de transcritos que codificam uma proteína relacionada ao inibidor de serinoproteinase da TCX em *B. alternatus* levanta a possibilidade da presença de toxinas semelhantes à TCX nesta peçonha onde poderia contribuir para a ação cardiovascular da peçonha e das peçonhas botrópicas de modo geral. Entretanto, até o momento, nenhuma proteína com estas características tem sido caracterizada deste gênero.

5.4.4. Dusp6 (Dual specificity phosphatase 6)

As fosfatases de dupla especificidade (Dusp) têm funções importantes na embriogênese, crescimento celular e resposta imune onde atuam como reguladores de *feedback* negativo de cinases ativadas por mitógeno (MAPK; *mitogen-activated protein kinases*) (285). A Dusp6 tem um papel importante na embriogênese ofídica, com alta expressão gênica na região anterior da mesoderme pré-somática (286; 287). Até o presente estudo, esta proteína não havia sido detectada em análises transcriptômicas de glândula de veneno, e não há relato da presença desta proteína em peçonha. A sequência parcial detectada

aqui mostrou alta similaridade com a proteína descrita para a serpente *Pantherophis guttatus* (*corn snake*; número de acesso ABW82165). A função específica da DUSP6 na glândula de veneno de serpente ainda não está clara, mas pode estar relacionada ao desenvolvimento do epitélio secretório e à produção da peçonha.

5.4.5. Tioredoxina (Trx)

A tioredoxina (Trx) é uma proteína com diversas funções relacionadas à síntese de DNA, redução das ligações dissulfetos em proteínas e degradação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), além de um papel na proteção contra o estresse oxidativo e a indução de apoptose (288). A Trx participa em reações de redox via a oxidação reversível do seu grupo ativo ditiol para um dissulfeto, catalisando assim reações que envolvem a troca de ditiol por dissulfeto. A redução do dissulfeto do sítio ativo da Trx oxidada para regenerar o ditiol é catalisada pela tioredoxina redutase, uma flavoproteína contendo selênio (289). A Trx também está envolvida na S-nitrosilação reversível de resíduos de cisteína em proteínas alvo, um passo importante para a sinalização intracelular do óxido nítrico (NO). A sequência protéica da Dusp6 encontrada no transcriptoma da glândula de veneno de *B. alternatus*, mostrou-se idêntica à sequência anteriormente identificada em cDNA de *Ophiophagus hannah* (número de acesso AAK09384). A função da Trx na glândula de veneno é desconhecida, mas pode estar relacionada à proteção das células epiteliais secretórias da glândula contra o estresse oxidativo e mortecelular (por necrose ou apoptose), especialmente considerando que alguns

componentes da peçonha, como a LAO podem causar a morte celular através da formação de H_2O_2 (266;267).

5.5. Proteínas com possível potencial toxinológico

As peçonhas ofídicas contêm uma variedade de nucleotidasas (fosfodiesterase, 5'-nucleotidase, fosfatases ácida e alcalina, e ADP/ATPases) e nucleases (desoxirribonuclease – DNase e ribonucleases – RNase) que potencialmente têm um papel importante no envenenamento, principalmente através de uma atuação na agregação plaquetária e nas respostas cardiovasculares (hipotensão, permeabilidade vascular) (16; 17). Neste estudo, encontramos transcritos relacionados a algumas destas proteínas, tais como uma DNase ácida semelhante a um precursor da DNase II α de camundongo (DNase lisosomal), ecto-5'-nucleotidase, ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase 3 e adenosina deaminase. Entretanto, apesar da detecção dos genes destas proteínas nesta e outras análises transcriptômicas (116;169;167;178; 179), não está claro se as proteínas correspondentes são de fato componentes da peçonha ou se são simplesmente parte da maquinaria do metabolismo intracelular. Já purificamos uma fosfodiesterase (290), 5-nucleotidase e uma DNase ácida (DNase II) da peçonha de *B. alternatus*, porém ainda não sabemos a relação estrutural entre estas proteínas e aquelas codificadas pelos genes acima. Ogawa *et al.*(291) demonstraram recentemente que a ecto-5'-nucleotidase da *G. blomhoffi* é estruturalmente semelhante à enzima correspondente em outros vertebrados.

Outros genes identificados e que possivelmente tenham um papel no envenenamento incluem uma proteína relacionada à citocina de cavalo (também identificada em ESTs de outras serpentes (169; 275) e fator de necrose tumoral semelhante à proteína de *Gallus gallus* (frango). É possível que ambas estas proteínas tenham um papel na resposta inflamatória local induzida pela peçonha.

5.6. Proteínas relacionadas com a produção de veneno

A produção de peçonha em *B. jararaca* envolve mecanismos α - e β -adrenérgicos, principalmente através de receptores estruturalmente relacionados aos adrenoreceptores α_{1D} e α_{2B} (30;36; 37). A detecção de um transcrito codificando uma proteína semelhante ao receptor adrenérgico α_{1D} de *B. jararaca* sugere que mecanismos reguladores semelhantes também estejam envolvidos na produção de peçonha em *B. alternatus*. Já a detecção de um transcrito para o receptor A da endotelina (ET_A) pode indicar que este peptídeo vasoconstritor tenha um papel na regulação do tônus vascular nos vasos sanguíneos que irrigam a glândula de veneno. A endotelina atuando através dos receptores ET_A tem um papel vasoconstritor importante em aorta de *B. jararaca*(226).

Também foi identificada uma proteína relacionada à calglandulina, uma proteína que se liga ao Ca²⁺ e que é estruturalmente semelhante à calmodulina e troponina C. A calglandulina da glândula de veneno foi inicialmente identificada em *B. insularis* baseado em análise transcriptômica (116) e subsequentemente clonada e expressa (159). Estudos posteriores também detectaram esta proteína em glândulas de veneno de elapídeos (215; 257). A calglandulina ofídica é específica para o tecido glandular uma vez que não foi detectada em outros

órgãos ou em peçonha (159). Esta proteína pode ter um papel no transporte e secreção de toxinas e outros componentes da peçonha, além de modular a atividade de algumas toxinas devido à sua ação como quelante de Ca^{2+} intracelular.

5.7. Análise diferencial dos ESTs de *B. alternatus*

5.7.1. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs; *single nucleotide polymorphisms*) e microssatélites (repetições simples)

Alguns estudos têm identificado polimorfismos em sequências de DNA de proteínas de peçonhas ofídicas, especialmente em PLA_2 , (65;292). Estas modificações genéticas surgem da rápida duplicação gênica que resulta em polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs; *single nucleotide polymorphisms*), com aumento de substituições nucleotídicas não-sinônimas que alteram a sequência de DNA que codifica a proteína. Ohno *et al.*(65) sugeriram que estas alterações resultam em um rápido aparecimento de novas toxinas com diferentes atividades biológicas.

No transcriptoma de *B. alternatus* detectamos vários SNPs, alguns localizados em ORFs (*open reading frames*), e também identificamos polimorfismos de inserção-deleção (*insertion-deletion polymorphisms* ou Indels). A análise mais detalhada destes SNPs poderia ser útil em estudos de genética de população e na avaliação da importância de alterações rápidas de sequência na diversidade genética dos genes envolvidos a produção de peçonha (292).

Além dos SNPs, foram identificadas várias repetições simples em “tandem” (microssatélites). Estas sequências podem ser úteis no desenvolvimento de

marcadores moleculares para auxiliar na caracterização da variabilidade genética e na estrutura populacional de *B. alternatus* em sua distribuição geográfica.

5.7.2. Elementos de transposição (TEs)

Os genomas de eucariotos contêm uma grande quantidade de sequências repetidas, com uma alta proporção que consiste em elementos de transposição (TEs). Em serpentes, os TES foram inicialmente identificados nos genes de PLA₂ da glândula de veneno da *Vipera ammodytes*(100;293). Estes TEs são retrotransposons de ruminantes que correspondem a um LINE (*5'-truncated Bov-B long interspersed repeated DNA*) e foram identificados em genes de amoditina L (um mutante natural do de uma PLA₂ do grupo II) e amoditoxina C (estrutura semelhante à de outras PLA₂ do grupo II de mamíferos).

Conforme mostrado aqui, várias famílias de TE foram detectadas no transcriptoma de *B. alternatus*, algumas com alta frequência, sendo que a predominante foi a BovB. Estes retrotransposons também já foram identificados em *B. insularis*(116) e *L. muta*(179). A expressão destas famílias de TEs indicou que o genoma continha um número elevado de elementos potencialmente ativos que poderiam contribuir para a variedade de ESTs observados neste estudo.

Em muitos dos ESTs que continham TEs, estes TEs estavam fusionados a genes que codificam proteínas. De modo geral, a maioria de eventos de transposição envolvendo regiões codificadoras de proteínas é deletéria ao genoma do hospedeiro uma vez que interrompe a tradução, localização e estabilidade do mRNA. No entanto, considerando que os TEs associados a genes de PLA₂ são transcritos (211; 294), sugerimos que os TEs de *B. alternatus* podem

ser importante fonte de variabilidade genética para entender a origem da diversidade dos genes relacionados a toxinas.

5.7.3. Identificação de repetições invertidas (IRs)

O alinhamento das sequências de cDNA de *B. alternatus* com seus genes correspondentes indicaram que algumas sequências continham sequências invertidas longas (IRs), isto é, parte da sequência estava invertida em relação à sua sequência original. Um exemplo destas inversões foi a que envolveu os genes de BPPs/CNPs, com 16 sequências tendo este tipo de inversão repetida. Conforme mencionado anteriormente em relação ao CNP, embora estudos de ESTs têm relatado a presença de genes para estes peptídeos em espécies de *Bothrops* e *Lachesis*, no entanto estudos proteômicos nem sempre têm sido bem sucedidos em isolar e identificar estes peptídeos (106; 252). A razão para esta discrepância entre os dados de ESTs e proteômicos não está clara, mas poderia estar relacionada à ocorrência de IRs que poderiam interferir com a transcrição gênica ou na tradução da proteína *in vivo*, deste modo inibindo a produção destas toxinas.

A origem dos transcritos com IRs é desconhecida. Teoricamente, os IRs poderiam ser um artefato gerado por um erro da transcriptase reversa, que deleta porções do cDNA em regiões que apresentam pequenas sequências repetidas próximas (295), gerando assim uma fita molde (*template*) errada e que pode ser interpretada como um transcrito alternativo. Estes artefatos são dependentes da qualidade das enzimas utilizadas para a elaboração das diferentes fases de transcrição. Assim, se a enzima transcriptase reversa for de baixa qualidade e

pouco termoestável estes transcritos são comumente encontrados nos resultados, mas quando se utiliza um *kit* de qualidade (como foi feito neste trabalho) os artefatos advindos destes erros, não são mais encontrados (295). Outros motivos para estas IRs não serem consideradas artefatos seriam: 1) o fato de não termos encontrado, de forma abundante, outras repetições com interações intermoleculares como estas nas bibliotecas; 2) o fato de termos encontrado o mesmo padrão de IRs em múltiplas leituras de sequências na mesma biblioteca e em bibliotecas diferentes. Por estes motivos, é pouco provável que as IRs observadas aqui sejam um artefato.

5.8. Análise comparativa da biblioteca de ESTs de *B. alternatus* com a de outras espécies de *Bothrops*

Depois do estudo inicial de expressão gênica da glândula de veneno de *B. insularis* (116), e atualizado por Valente *et al.*(106), estudos semelhantes foram realizados em outras espécies de *Bothrops*, incluindo *B. atrox*(165), *B. jararaca* (166) e *B. jararacussu*(66). A disponibilidade de dados de várias espécies de *Bothrops* proporciona a oportunidade de comparar estes dados e tirar algumas conclusões gerais sobre a composição das peçonhas destas serpentes, bem como sobre a expressão gênica na glândula de veneno. Há poucas comparações transcriptômicas deste tipo para outros gêneros (178).

Os dados do presente estudo representam o maior banco de dados de ESTs para uma espécie de *Bothrops* até o momento, sendo que o total de ESTs (5.350) é expressivamente maior do que os tamanhos relatados para *B. atrox* (610 ESTs) (165), *B. insularis* (inicialmente com 610 ESTs e atualmente com

2.042 ESTs) (106;116), *B. jararaca* (2.328 ESTs) (166) e *B. jararacussu* (549 ESTs) (66). Optamos por gerar uma grande quantidade de dados para tentar identificar novos genes, além daqueles grupos de toxinas já conhecidos deste gênero. De fato, esta base de dados maior permitiu a detecção de genes de toxinas como a ohanina e as toxinas 3-FTx, anteriormente identificados em outros gêneros mas não em *Bothrops*, além da presença de proteínas não relacionadas a toxinas, como a Dusp6 e a tioredoxina.

A grande quantidade de dados gerados para *B. alternatus* não alterou significativamente o perfil de expressão dos principais grupos de toxinas (metalloproteinasas, BPPs/CNPs, PLA₂, serinoproteinasas, lectinas do tipo C, fatores de crescimento, etc.) quando comparado com outras espécies de *Bothrops*, o que sugere que uma base de dados extensa não é essencial para detectar os maiores grupos de toxinas, mas pode ser útil para aumentar as chances de detectar toxinas pouco abundantes. Esta conclusão concorda com os dados encontrados em *B. insularis*, onde um aumento no tamanho do banco de dados de 610 ESTs para 2042 ESTs (106;116), não alterou a proporção relativa dos principais grupos de toxinas como metalloproteinasas (41,7% vs. 43,2% para 610 ESTs vs. 2042 ESTs), BPPs/CNPs (19,7% vs. 15,8%), lectinas do tipo C (14,6% vs. 14,2%), serinoproteinasas (9,6% vs. 11,2%), PLA₂ (6,7% vs. 5,4%), svVEGF (4,3% vs. 4,7%), LAO (2,6% vs. 3,5%), CRISPs (0,6% vs. 1,5%) e NGF (0,3% vs. 0,4%). Neste estudo, 78% dos *hits* corresponderam a toxinas, o que compara favoravelmente com os valores para outras espécies botrópicas (54% a 78%)(66; 106; 116; 165; 166) e indica que a proporção relativa de

transcritos relacionada a toxinas não está diretamente associadas ao tamanho da biblioteca de cDNA.

Por outro lado, a geração de um grande banco de dados resulta em aumento no número de *no-hits*: 70% neste estudo quando comparado com 13% a 25% encontrados em estudos com outras espécies de *Bothrops* (66; 106; 116; 165; 166). e 7% a 54% para outros gêneros de serpente (109; 167; 169; 174; 177-179; 181; 182; 274].

Estes *no-hits* refletem a pouca quantidade de informação disponível nos bancos de dados de ESTs da glândula de veneno para o gênero *Bothrops* e outras espécies de serpentes. Estes *no-hits* representam uma rica fonte para a identificação de novas toxinas.

A Figura 25 compara de forma relativa a abundância das principais classes de toxinas observadas em espécies de *Bothrops* com base em análise de ESTs. Em todos os casos houve predominância das metaloproteinases, BPPs, PLA₂, serinoproteinases e lectinas do tipo C, e baixa abundância de grupos com a LAO, CRISPs e fatores de crescimento (principalmente svVEGF e NGF).

Há considerável variação interespecífica no conteúdo das principais toxinas. Assim, a *B. alternatus* mostrou a maior proporção de transcritos para metaloproteinases (>3 vezes mais abundante que em *B. jararacussu*). Já a abundância de PLA₂ foi semelhante à de *B. insularis*, maior que em *B. jararaca*, mas menor que *B. atrox* e *B. jararacussu*; esta última espécie foi a única em que os transcritos das PLA₂ foram mais abundantes (~2 vezes) que os de metaloproteinases. A proporção de transcritos de BPPs/CNP foi semelhante à de *B. atrox* e *B. jararaca*, mas aproximadamente a metade da quantidade dos

transcritos encontrados em *B. insularis*, enquanto que serinoproteinases e lectinas do tipo C foram menos abundantes que nas outras espécies. A baixa proporção destas últimas proteínas poderia colaborar para a coagulopatia menos intensa observada clinicamente no envenenamento por *B. alternatus* quando comparado com outras espécies de *Bothrops* (296).

Apesar da variação interespecífica na proporção relativa de ESTs para cada classe de toxinas, estes achados confirmam que os principais componentes de peçonhas botrópicas podem ser classificados em alguns poucos grupos predominantes. Esta conclusão concorda com a análise proteômica destas peçonhas que também tem identificado estes grupos como as principais famílias de toxinas (86;106;199; 211;212;215, 216; 218; 239) (Fig. 6). Além da variação interespecífica, estes estudos proteômicos também revelaram variação individual, ontogenética e geográfica no conteúdo das principais classes de toxinas que compõem a peçonha (86; 211; 212).

Para cinco espécies de *Bothrops* (*B. alternatus*, *B. atrox*, *B. insularis*, *B. jararaca* e *B. jararacussu*) há análises transcriptômicas e proteômicas que permitem uma comparação da frequência de toxinas detectadas em cada abordagem. Assim, para as metaloproteinases e PLA₂ há boa concordância entre a proporção de transcritos e o nível das proteínas correspondentes nas peçonhas enquanto para outras classes (BPPs, lectinas do tipo C e serinoproteinases) há discrepâncias marcantes entre os dados transcriptômicos e proteômicos (compare Figs. 6 e 25). No caso da *B. alternatus*, houve boa concordância entre a proporção de ESTs e o conteúdo protéico de PLA₂ (5,5% vs. 7,8%, respectivamente) e lectinas do tipo C (1,4% vs. 1,7%), mas divergência

considerável entre estes dois conjuntos de dados para as metaloproteinases (81,4% vs. 43,1%), serinoproteinases(1,9% vs. 24,1%) e LAO (0,6% vs. 6,9%) deste estudo e ref.199. Discrepâncias entre os dados transcriptômicos e proteômicos também já foram observadas para toxinas de outros gêneros ofídicos como a *Echis* (177) e *L. muta*(294). As causas e implicações destas discrepâncias são várias e indicam a necessidade de cautela na interpretação de dados transcriptômicos como sendo representativos da composição final da peçonha.

Por fim, deve-se notar que as principais classes de toxinas identificadas por análises transcriptômica e proteômica são justamente aquelas que têm sido implicadas nas principais efeitos locais e sistêmicos produzidos por peçonhas botrópicas experimentalmente e clinicamente (190;191;237;297;298; 299;300), ou seja, atividade hemorragia mediada por metaloproteinases, mionecrose mediada por PLA₂, resposta inflamatória mediada por metalo- e serinoproteinases e PLA₂, coagulopatia mediada por lectinas do tipo C, desintegrinas e serinoproteinases, e efeitos cardiovasculares mediados por metaloproteinases, PLA₂, serinoproteinases como enzimas do tipo calicreína, e peptídeos como os BPPs.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a glândula de veneno de *B. alternatus* expressa as principais classes de toxinas (metaloproteinases, PLA₂, serinoproteinases, lectinas do tipo C e BPP/CNPs) identificadas em outras espécies de *Bothrops* baseado em estudos transcriptômicos e proteômicos. Também foram detectados genes relacionados para proteínas inéditas para este gênero como a ohanina, toxinas 3-FTx, taicatoxina, Dusp6 e tioredoxina que podem contribuir para o envenenamento e também pra a produção deste veneno. Este conjunto de dados amplia o nosso conhecimento sobre a composição da peçonha de *B. alternatus* e ajuda a explicar as principais manifestações observadas em envenenamento por esta espécie.

CAPÍTULO III

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E
BIOQUÍMICA PARCIAL DA DIPEPTIDILPEPTIDASE IV**

1. INTRODUÇÃO

1.2. Ação cardiovascular de peçonhas de serpentes

A inoculação local ou sistêmica de peçonhas de serpentes, seja experimentalmente em animais de laboratório ou como consequência de acidentes em humanos, resulta em uma variedade de efeitos que dependem, entre outras coisas, do gênero e da espécie da serpente envolvida. Os efeitos locais incluem distúrbios de coagulação, hemorragia sistêmica, neurotoxicidade, cardiotoxicidade, hipotensão e insuficiência renal aguda, entre outros. No que diz respeito à ação cardiovascular direta (cardiotoxicidade, hipo- e/ou hipertensão, etc.), os componentes e as vias envolvidos são muitos, mas podem ser resumidos em três grupos principais: 1) compostos orgânicos (aminas, purinas, pirimidinas, nucleotídeos, nucleosídeos, etc.) de massa molecular geralmente <500 Da, 2) peptídeos, inclusive neurotoxinas (massa molecular de 500 a 10.000 Da) e 3) proteínas, principalmente enzimas (massa molecular >10.000 Da) (16; 15). A Figura 26 apresenta um resumo das possíveis interações de vários destes componentes na produção de hipotensão e choque cardiovascular por peçonhas ofídicas de modo geral.

Em relação a peçonhas botrópicas, os principais componentes com ação cardiovascular identificados até o momento incluem peptídeos como os BPPs (116; 250; 301; 302; 303; 304; 305; 306; 307; 308; 309; 310) e peptídeos natriuréticos do tipo C (CNP) (75; 116; 115; 311), e uma variedade de enzimas tais como PLA₂ (123; 312) e serinoproteinases (129; 139; 313), especialmente cininogenases (314; 315), entre outras. Do ponto de vista terapêutico, a

descoberta e estudo detalhado dos BPPs identificados inicialmente na peçonha de *B. jararaca* levou posteriormente ao desenvolvimento do grupo de medicamentos mais vendido no mundo para o tratamento da hipertensão, a saber, os inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA), que incluem o captopril, enalapril e correlatos (316;317;318).

O papel dos BPPs no desenvolvimento desta classe de remédios ressalta a importância da biodiversidade nacional e da bioprospecção de peçonhas animais, com fontes de substâncias que, eventualmente, podem redundar em novos medicamentos. De fato, peptídeos de peçonhas de várias espécies animais têm se mostrado úteis como ferramentas para pesquisa e como base para o desenvolvimento de novas substâncias para uso terapêutico (319;320; 321).

Entre os diversos componentes de peçonha capazes de atuar no sistema cardiovascular (Fig. 26), há um grupo que tem recebido relativamente pouca atenção, apesar de ser potencialmente de grande relevância fisiológica, a saber, as peptidases. Vários estudos já demonstraram que as peçonhas de serpentes contêm uma variedade de (oligo)peptidases (16;256; 259; 322; 323), tais como aminopeptidases (258; 324; 325;326;327; 328 ;329)angiotensinase (330), cininases (331; 332), dipeptidil peptidases (I a IV) (256; 258; 260; 325; 326; 333) e peptidases ativas sobre encefalinas (semelhantes à aminopeptidase M e endopeptidase neutra 24.11) (322; 323;334).Destas, as mais estudadas em peçonhas de serpentes brasileiras (essencialmente do ponto de vista de mapear sua distribuição) tem sido as aminopeptidases e a dipeptidil peptidase IV (258; 260; 324; 326).

De modo geral, as peptidases regulam a biossíntese, atividade e degradação de uma grande variedade de peptídeos endógenos, tais como angiotensinas, cininas, encefalinas, endotelinas, neuropeptídeos de vários tipos, e peptídeos natriuréticos atriais, entre outros (Fig. 27). Entretanto, até o momento há poucos relatos de purificação e caracterização bioquímica, farmacológica e fisiológica de peptidases de peçonhas de serpentes (16), apesar da sua importância e contribuição no controle cardiovascular e renal (335).

1.3. Dipeptidil peptidase IV (DPP IV)

A peptidase DPP IV (E.C. 3.4.14.5; CD26) cliva dipeptídeos em sua porção N-terminal, removendo seletivamente peptídeos com prolina ou alanina na penúltima posição (336). Em mamíferos, a DPP IV ocorre ancorada à membrana celular, mas também existe na forma solúvel (circulante). A forma ancorada à membrana é encontrada em diversos órgãos, como fígado, intestino, rim, epidídimo e endotélio vascular (337; 338; 339; 340; 341; 342), e também na superfície de células imunes, onde é conhecida como CD26. Em linfócitos tipo T, CD26 participa de reações imunes e inflamatórias, devido à sua capacidade de se ligar à adenosine deaminase (343; 344; 345; 346). A susceptibilidade das células a serem infectadas pelo vírus HIV está correlacionada com a expressão do CD26 (345; 347). A forma solúvel é encontrada em fluídos corporais, como o sangue, soro, saliva e líquido seminal (348; 349).

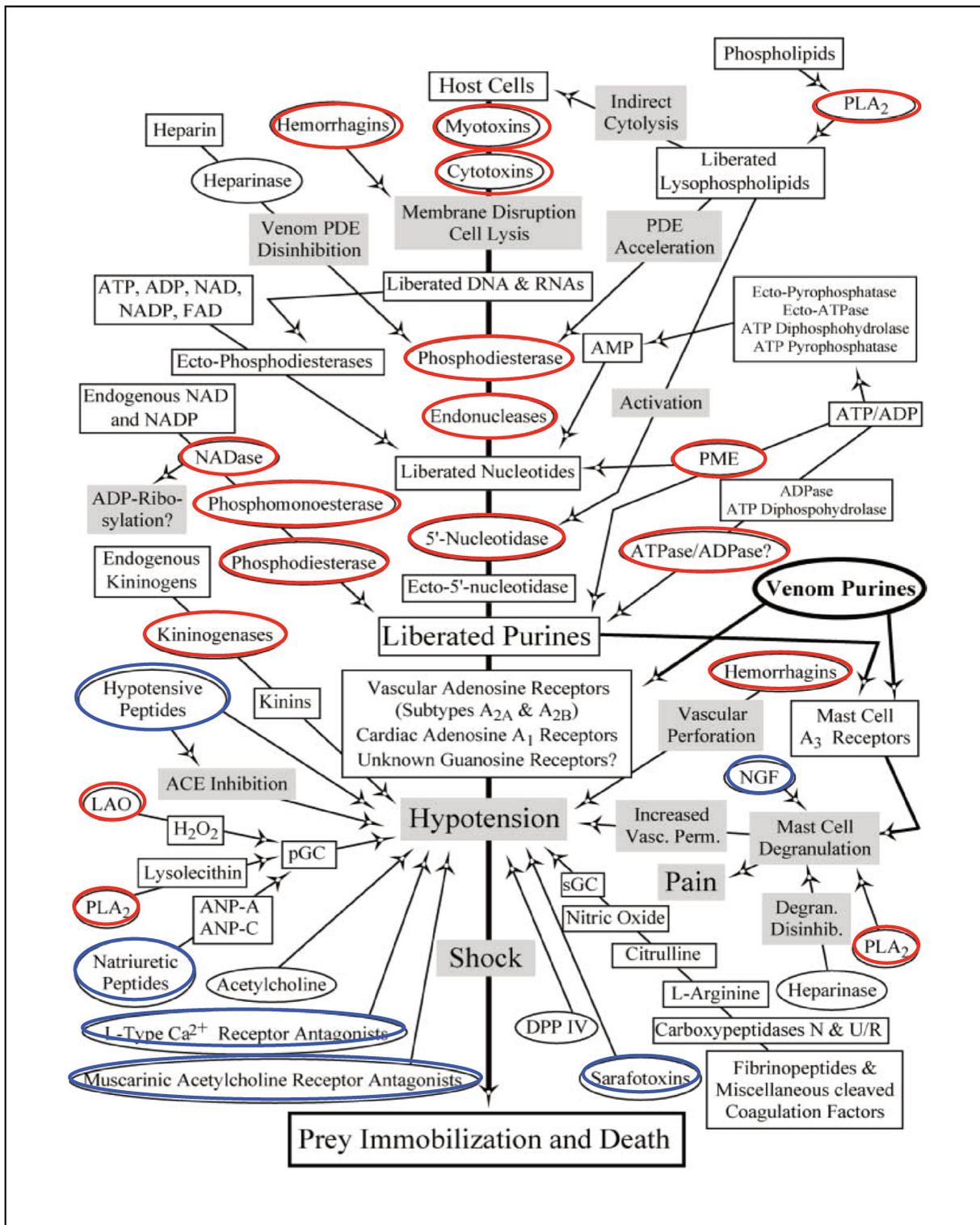


Figura 26. Componentes presentes em peçonhas de serpentes que podem atuar no sistema cardiovascular para produzir hipotensão, com ênfase no papel de purinas neste fenômeno. Em vermelho – enzimas; em azul – peptídeos/proteínas não enzimáticos. (Fonte: 16).

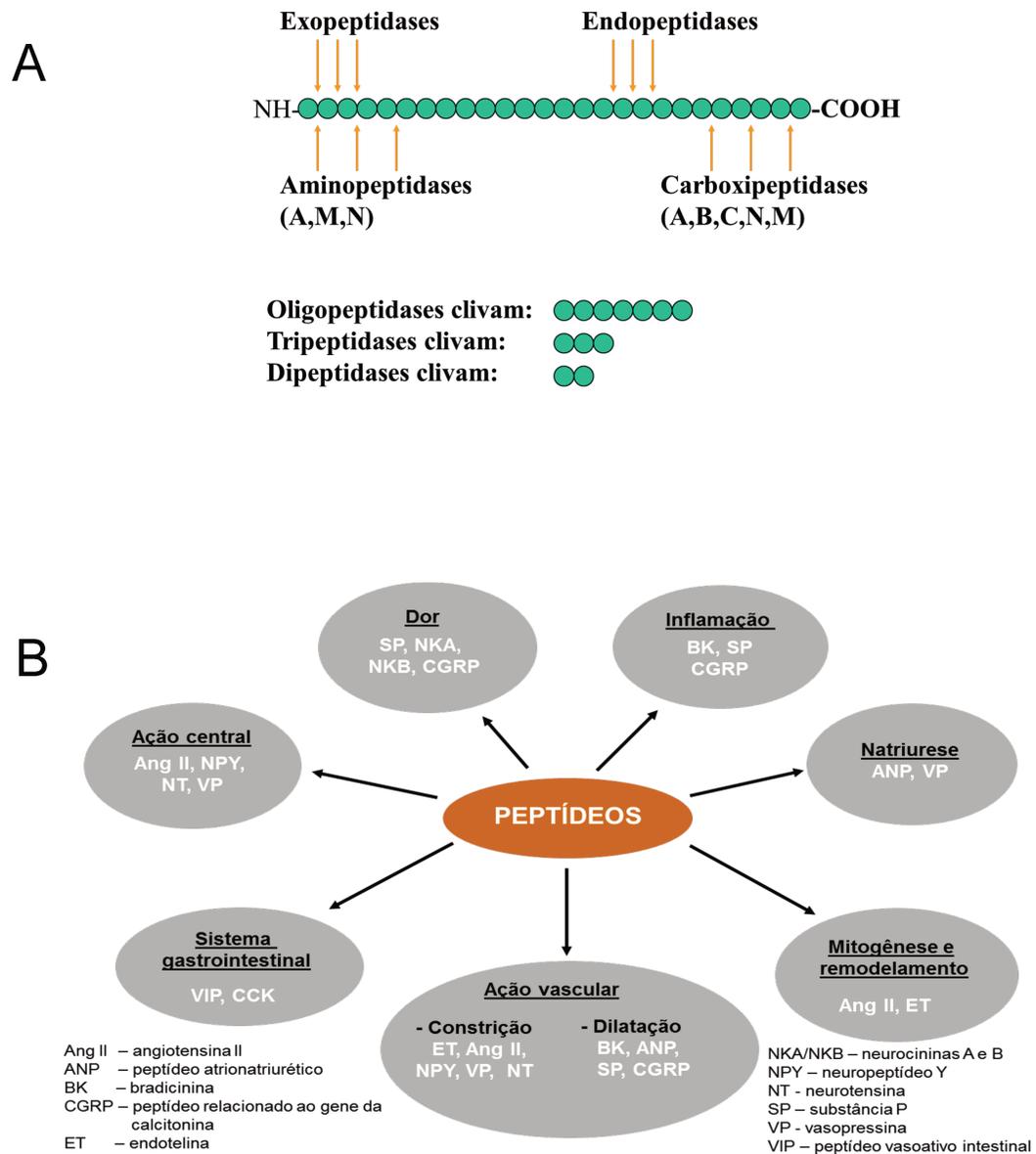


Figura 27. **A** - Ação de peptidases sobre peptídeos e proteínas. As exopeptidases clivam aminoácidos do terminal N (amino peptidases dos tipos A, M/N) ou C (carboxipeptidases dos tipos A,B,C e M/N), enquanto as endopeptidases clivam os peptídeos internamente. Ambos os grupos podem liberar dipeptídeos, tripeptídeos ou oligopeptídeos. **B** - Diversidade de peptídeos endógenos e exemplos das suas funções fisiológicas.

A DPP IV também ocorre em bactéria (350; 351), no entanto sua função neste organismos ainda não está clara. A determinação inicial da estrutura primária da DPP IV foi realizada através de clonagem e sequenciamento do cDNA da enzima de rato (352), seguido por estudos em camundongo (353), humanos (339; 354), rã (355), serpente (256) e diversas espécies de bactéria (356; 357; 358).

Fisiologicamente, a DPP IV desempenha diversas funções relacionadas à forma da enzima (solúvel/circulante ou membrana/ancorada). A DPP IV ancorada à membrana tem sido implicada em reações autoimunes(346) e diversas respostas celulares e cardiovasculares(359; 360;361; 362;363) enquanto a forma solúvel e circulante desempenha um papel importante na regulação da glicemia (346). A principal diferença entre as formas solúvel e membrana da enzima diz respeito ao acesso de substratos e inibidores ao sítio ativo das enzimas. Terapeuticamente, a DPP IV é atualmente alvo de intensos estudos devido ao seu papel na degradação de hormônios do tipo incretina, que incluem o peptídeo glucagon-símile (*glucagon-like peptide* ou GLP-1) e o peptídeo insulínico dependente de glicose (*glucose-dependent insulintropic polypeptide* ou GIP). O GLP-1 tem um papel fundamental na regulação dos níveis endógenos de glicose, estimulando a liberação de insulina, inibindo a liberação de glucagon e retardando o esvaziamento gástrico. A inibição da DPP IV eleva o níveis circulantes do GLP-1, o que, por sua vez, melhora a captação de glicose (pelos mecanismos mencionados acima), abaixando a glicemia em indivíduos com diabetes do tipo 2 (364), inclusive na presença concomitante de outras terapias como a metformina (365; 366).Esta abordagem o uso de inibidores da DPP IV, conhecidos como

gliptinas (367), e.g., alogliptina (368), linagliptina (369) e vildagliptina (370), e a administração de agonistas do receptor GLP-1 (371; 372), tem sido investigada como nova terapia no tratamento do diabetes (373; 374).

Em serpentes, a atividade da DPP IV tem sido reportada em peçonhas de *Naja naja*, *Bungarus multicinctus*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops alternatus* (258; 326), *Ophiophagus hannah*, *Crotalus viridis viridis*, *Crotalus viridis lutosus* e *Crotalus viridis helleri* (260). No entanto, a primeira caracterização molecular da DPP IV em serpente foi realizada com a serpente asiática *Gloydius blomhoffi brevicaudus* (256), onde a sequência do *open reading frame* (ORF) do gene da DPP IV apresentou 4254 e 4250 pares de bases (pb) para as isoformas A e B, respectivamente, com uma sequência de aminoácidos contendo 751 resíduos. A sequência de aminoácidos da DPP IV isoforma A de *G. b. brevicaudus* apresenta 62% de similaridade com humano, 61% com rato, 60% com sapo e 27% com bactéria. Os principais sítios ativos descritos em outras DPP IV compostos pela tríade Ser⁶¹⁶, Asp⁶⁹⁴ e His⁷²⁶ foram encontrados na região C-terminal, e a sequência consenso das serinoproteinases (Gly-X-Ser-X-Gly) foi detectada na posição Ser⁶¹⁶ (256). Posteriormente, genes para DPP IV também foram identificados em elapídeos australianos, com a ORF de 2256pb que codifica 751 aminoácidos para uma proteína com massa molecular calculada de 86 kDa (375).

Este estudo mostrou a existência de variações em alguns aminoácidos na sequência de DPP IV de elapídeos, sendo que a DPP IV da *Demansia vestigiata* apresentou uma deleção de dois aminoácidos nas posições 330-333, que foi exclusiva desta espécie. A comparação entre as DPP IV elapídicas e a de *G. b.*

brevicaudus revelou alta homologia entre as sequências, bem como conservação do peptídeo sinal destas proteínas (256; 375)

A função da DPP IV em peçonhas ainda não está totalmente elucidada, mas pode estar relacionada à degradação de peptídeos vasoconstritores (como o neuropeptídeo Y) e vasodilatadores (substância P e peptídeo natriurético tipo-B ou *brain-type natriuretic peptide*; BNP) endógenos (16; 376), modulando assim as respostas hemodinâmicas e cardiovasculares em geral, além de interferir na homeostase de glicose e no funcionamento dos sistemas imunológico e neuroendócrino (16). A DPP IV também pode ser importante no processamento de precursores de peptídeos da própria peçonha, conforme sugerido para peçonhas de abelha e vespa (261; 262; 362).

1.4. Aminopeptidases

As aminopeptidases são enzimas proteolíticas que removem aminoácidos da porção N terminal de peptídeos e proteínas, e são classificadas nas famílias M1 e M17 de peptidases. Estas enzimas são amplamente distribuídas em células animais, e de plantas, bactéria e fungos (377;378). Desempenham diversas funções biológicas, atuando em carcinogênese, em processos neurológicos, na regulação dos níveis hormonais, no controle do ciclo celular, na degradação protéica intracelular e no processamento de peptídeos que serão apresentados como antígenos (379; 380; 381; 382; 383; 384; 385).

As aminopeptidases têm um papel fundamental na regulação cardiovascular, especialmente no controle da pressão arterial (386), sendo que as

mais estudadas neste contexto incluem: (1) aminopeptidase A (glutamil aminopeptidase; EC 3.4.11.7), que hidrolisa aminoácidos ácidos, (2) aminopeptidase B (arginina aminopeptidase; EC 3.4.11.6), que hidrolisa aminoácidos básicos e (3) aminopeptidase N ou M (alanina aminopeptidase, CD 13; EC 3.4.11.2), que hidrolisa aminoácidos neutros na região N-terminal (383; 387; 388; 389;390) e, em grau menor, (4) várias leucina-aminopeptidases (377), e.g., LAP placentária (ocitocinase ou cistinil aminopeptidase; EC 3.4.11.3), que hidrolisa cisteínas adjacentes a resíduos de tirosina na região N-terminal, e LAP de adipócitos (391; 392).

A interação complexa que às vezes existe entre estas enzimas é exemplificada na metabolização da angiotensina II, que pode ser convertida em angiotensina III pela aminopeptidase A (uma glutamil aminopeptidase - GluAP), que por sua vez é convertida em angiotensina IV pela APN, APB ou leucil aminopeptidase, e a conversão da angiotensina I em angiotensina 2-10 por aspartil aminopeptidase (386).

1.4.1. Aminopeptidase N

A aminopeptidase N (APN) é uma peptidase de alta massa molecular (110-160 kDa) inicialmente isolada de rim de porco (390; 393). A APN humana foi clonada em 1989 (394), sendo posteriormente mapeada no cromossomo 15 q25-26 (395). A sequência do cDNA contém a sequência His-Glu-Xaa-Xaa-His com um sítio de ligação com Zn²⁺ (*binding motif*) (396). Experimentos de mutagênese sítio dirigido indicam que uma cisteína extracelular confere a estrutura correta e a atividade enzimática, e regulam a

expressão da APN (397). Mutações no ácido glutâmico 355 na região conservada (GAMEN *motif*) resultam em inativação da enzima (398), o que sugere que este aminoácido tem papel fundamental no sítio de ligação aniônica da enzima.

A APN é encontrada ancorada à membrana plasmática celular e também livre (solúvel) na circulação, embora ainda não se saiba o mecanismo pelo qual a forma solúvel é liberada da forma ligada à membrana. A APN presente na membrana celular forma um dímero com a associação de duas subunidades não covalentes (383;399;400).

A APN cliva aminoácidos neutros na região N-terminal de vários peptídeos, com exceção daqueles que têm prolina na penúltima posição (396). Os principais substratos clivados pela APN são neuropeptídeos (Met e Leu nas encefalinas, neurocinina A e endorfinas) (401; 402; 403), peptídeos vasoativos como a angiotensina III, calidina e somastatina e peptídeos quimiotáticos como a MCP-1 (404; 405; 406).

Alterações na expressão da APN, tanto da isoforma solúvel quanto da ancorada na membrana, têm sido observadas em doenças como melanomas, onde a atividade de APN está aumentada em células tumorais (407;408), e em diversos tipos de cânceres (409), como de rim (410), pâncreas (411), colo (412) próstata (413), estômago (414) e tireóide (415). Há também a super-expressão da APN em leucemias agudas (416) e linfomas (417; 418), onde a peptidase é conhecida como CD13 e funciona em parte como molécula de adesão. Há aumento da atividade da APN em doenças inflamatórias (artrite reumatóide,

esclerose múltipla e lúpus eritematoso), diabetes e hipertensão, além de infecções de HIV (419; 420;421). A expressão da APM também pode ser induzida em células endoteliais em resposta a fatores angiogênicos (422; 423).

Fisiologicamente, a APN está associada a vários tipos de câncer (409), em parte através da sua ação angiogênica (424) que pode contribuir para a metástase de tumores na parede vascular (425). A APN também tem ação analgésica (426), está envolvida em respostas imunes (427; 428), e tem papel importante na regulação da pressão arterial (429). Além disso, em diversos tipos celulares, a CD13 funciona com receptor para vários tipos de vírus (400).

A ampla variedade de situações em que a APN está envolvida (vide supra) tem levado à busca de inibidores eficazes desta enzima como nova abordagem terapêutica (383; 430;431) em doenças da pele (432), câncer (400)433; 434) e dor (435; 436).

1.4.2. Aminopeptidase A

A aminopeptidase A (APA) tem sido caracterizada em diversos órgãos como cérebro, intestino e rim (437; 438; 439) e é encontrada como uma proteína transmembrana ou solúvel, sendo que as duas formas possuem massa molecular semelhante (~110-150 kDa). A forma solúvel foi inicialmente purificada de soro e urina humanos (440; 441; 442) e durante a gravidez a enzima solúvel também está presente no soro retroplacentar (443).

As duas formas da enzima (solúvel e transmembrana) possuem a mesma especificidade de substratos e pH ótimo, e sua ativação é dependente de metais

(441; 443). A estrutura primária da APA foi determinada em diversas espécies, como camundongo (444), humanos, porcos e ratos (445; 446;) e mostra que se trata de uma enzima dependente de zinco (446). O domínio extracelular da APA transmembrana é dividido em dois subdomínios, um correspondente à região N-terminal que contém a região catalítica com o *motif* HEXXH e outro ao C-terminal que é responsável pela dimerização da proteína, sua estruturação correta, sua movimentação intracelular, e sua atividade enzimática (443; 447).

A APA cliva seletivamente aminoácidos ácidos (Glu e Asp) da região N terminal de proteínas e peptídeos (448). Esta enzima também cliva peptídeos como a angiotensina II (em angiotensina III) e a colecistocinina 8 (CCK-8) (449). Fisiologicamente, a APA estimula a angiogênese (450) e tem papel fundamental no controle da pressão arterial, especialmente no sistema nervoso central (451; 452;453).

1.4.3. Aminopeptidases em peçonhas

A atividade aminopeptidásica já foi relatada em diversas peçonhas ofídicas das famílias Viperidae e Elapidae usando substratos dipeptídicos, tripeptídicos e tetrapetídicos sintéticos (333). Posteriormente, Aird e da Silva (324) observaram atividade leucina-aminopeptidásica em diversas peçonhas de serpentes corais (*Micrurus* spp.) e Faiz *et al.* (325) detectaram esta atividade em peçonhas de diversas espécies de Elapidae e Viperidae. A leucina-aminopeptidase também foi encontrada nas peçonhas de *Bothriopsis bilineatae* *Bothriopsis taeniata* (327). Anderson e Dufton (322) e Anderson *et al.* (323) detectaram atividade oligopeptidásica (endopeptidásica e

aminopeptidásica) na peçonha da serpente *Naja naja atra* da Taiwan, sendo que a aminopeptidase era inibida por bestatina, inibidor clássico desta atividade. Gasparello-Clemente e Silveira (258), usando substratos sintéticos fluorimétricos, detectaram a atividade de várias aminopeptidases (A, B, M/N e cisteína peptidases, além da DPP IV) em peçonhas de *Bothrops jararaca*, *Bothrops atrox*, *Bothrops alternatus*, *Bothrops insularis*, *Bothrops moojeni*, *Bitis arietans* e *Crotalus durissus terrificus*. Mais recentemente, foi observada a atividade de aminopeptidases A, B e N em peçonhas de *Gloydius blomhoffi brevicaudus*, *G. halys blomhoffii*, *Trimeresurus flavoviridis*, *Crotalus atrox* e *Bothrops jararaca*, bem como a caracterização molecular (clonagem e sequenciamento) da APA (259;328). De modo semelhante, Vaiyapuri *et al.* (329) descreveram a purificação e caracterização bioquímica, enzimática e estrutural da rhiminopeptidase A, uma APA presente na peçonha da víbora africana *Bitis gabonica rhinoceros*. Com a exceção destes relatos, há poucos estudos sobre a caracterização de aminopeptidases de peçonhas ofídicas e quase nada se sabe da sua real contribuição para as manifestações do envenenamento. Por outro lado, há estudos mostrando que a administração de peçonhas pode alterar o perfil de atividade de peptidases endógenas em músculo esquelético (325) e tecido renal (335; 454; 455), tais alterações poderiam contribuir para os efeitos deletérios observados após o envenenamento.

2. OBJETIVOS

O principal objetivo desta parte do trabalho foi clonar e expressar a DPP IV a partir do cDNA da glândula de peçonha da *B. alternatus* e iniciar a purificação e caracterização da enzima presente neste veneno.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a amplificação da DPP IV foi utilizado o cDNA resultante da primeira etapa da construção da biblioteca de cDNA da glândula de peçonha de *B. alternatus*. Os mesmos critérios de avaliação e checagem da qualidade do RNAm da glândula foram adotados. Os detalhes experimentais estão descritos no capítulo II.

Durante os experimentos para clonar o gene da DPP IV, foi descrita a clonagem e caracterização da enzima aminopeptidase A (APA) da glândula de peçonha da serpente *G. b. brevicaudus*(328). Tendo em vista que a atividade da APA foi detectada em peçonha botrópica (328), investigamos também a presença desta enzima na glândula de peçonha de *B. alternatus*, bem como a da aminopeptidase M/N (APM), que também já foi detectada em peçonha de *B. alternatus*(258).

3.1. Amplificação do gene da DPP IV

3.1.1. Obtenção do RNAm e do cDNA

O RNAm e o cDNA da glândula de peçonha de *B. alternatus* utilizados na clonagem da DPP IV foram obtidos conforme descrito acima (capítulo II, seção 3.1, página 41).

3.1.2. Amplificação do gene da DPP IV

Diferentes regiões do gene da DPP IV foram amplificadas através da reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*, PCR). Os *primers* para o gene da DPP IV foram desenhados a partir do alinhamento de sequências

de DNAs de diversas DPP IV descritas na literatura, juntamente com a sequência de DNA da DPP IV descrita a partir do cDNA da glândula de peçonha da serpente *G. b. brevicaudus* (256). Seguem abaixo as sequências dos *primers* usados (F – *forward*, R – *reverse*).

F-1 DPPIV: 5'-GGAGCTTCCCGCAATG-3'

F-2 DPPIV: 5'-ATGAAGACTGTAGTGAAATGCTT-3'

F-3 DPPIV: 5'-CACCCGACAGAAAATTTGC-3'

F-4 DPPIV: 5'-CGGAGGTTCTGTTATGGA-3'

F-5 DPPIV: 5'-GCGTGCAGTGGCTGAGA-3'

F-6 DPPIV: 5'-GGAAGTAATCAGTATATCTGCCG-3'

R-1 DPPIV: 5'-CGGCAGATATACTGATTACTTCC-3'

R-2 DPPIV: 5'-TATGGCAATTTAAAACACTG-3'

R-3 DPPIV: 5'-TCCATAACAGGAACCTCCG-3'

R-4 DPPIV: 5'-GCAAATTTTCTGTCTGGGTG-3'

O cDNA obtido a partir da biblioteca de ESTs da glândula de peçonha de *B. alternatus* foi usado como molde para a reação de PCR. A amplificação consistiu dos seguintes reagentes (concentrações finais): tampão de PCR (Tris 20 mM, pH 8,4 e KCl 50 mM), dNTPs (200 μ M cada), oligonucleotídeos (100 ng de cada), 1 U de *Taq* polimerase (Promega), 10 ng de cDNA e água q.s.p. para 50 μ L. A temperatura de cada reação foi baseada na condição de anelamento de cada oligonucleotídeo. As reações foram realizadas em média com 35 ciclos.

O cDNA amplificado foi clonado no vetor pGEM-T Easy (Promega) e transformado de *E. coli*, cepa DH5 α , seguido de incubação em placas de ágar e

meio de cultura LB (Luria-Bertani) a 37°C por 18 h. As colônias resultantes foram cultivadas em minipreparações e a presença da inserção correta no DNA foi avaliada através da digestão com a enzima de restrição *EcoR1* (5000 U; Fermentas, Hanover, MD, USA) durante 2 h a 37°C. Para verificar a eficiência da digestão e se o tamanho dos fragmentos estava correto, todo o conteúdo da reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,7-1,0% contendo brometo de etídeo, seguido por visualização em luz UV e documentação com equipamento EagleEye (Stratagene).

Para a *long-distance* PCR (LD-PCR) do gene da DPP IV, foi utilizado o molde (*template*) de cDNA adquirido a partir da construção da biblioteca de ESTs, e as reações foram realizadas usando uma mistura comercial (Advantage 2 polymerase mix; Clontech) contendo uma polimerase específica. Os ciclos de reações consistiram de 95°C por 20 seg e 20 a 25 ciclos de 95°C por 5 seg e 68°C por 6 min, feitas em máquina de PCR GeneAmp 9700 (Applied Biosystems). Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo, visualizado em luz UV e documentados em equipamento EagleEye. A posição e direção dos insertos foram confirmadas por sequenciamento com a mesma reação utilizada para a biblioteca de cDNA, conforme descrito no M&M do capítulo II (pag.42). Cada região amplificada foi sequenciada e posteriormente os dados foram analisados através do programa BLAST. As sequências de aminoácidos da DPPIV deduzidas dos cDNA correspondentes foram utilizadas para pesquisar bancos de dados de proteínas através de BLAST. As árvores filogenéticas foram construídas com o CLUSTAL X (220).

3.1.3. Amplificação da região de interesse para produção de DPP IV recombinante

A região final do gene da DPP IV, que contém o sítio ativo da enzima, foi amplificada através PCR, usando *primers* contendo sítios para enzimas de restrição, para posterior inserção do inserto no vetor de expressão de proteína. Os *primers* foram desenhados a partir da sequência de DNA da DPP IV descrita para o cDNA da glândula de peçonha da serpente *G. b. brevicaudus* (256). O *primerforward* foi desenhado contendo um sítio de restrição enzimática para *NdeI* (Fermentas) e um códon ATG inicial na sua porção 5', e o *primer reverse* com um sítio de enzima de restrição *XhoI* (Fermentas). A posição e direção do *amplicon* foi confirmadas por sequenciamento. Seguem abaixo as sequências dos *primers* usados (F – *forward*, R – *reverse*), onde as regiões sublinhadas denotam os sítios enzimáticos.

F: NDE-DPP4a-F5 5'-CATATGRATGATMTTRCCTCCTMATTTTGAT-3'

R: XHO-DPP4a-R5 5'-CTCGAGRCAYTGYTKVAKRAARTGRCTCATGTG-3'

O cDNA (obtido conforme descrito anteriormente) foi usado em reações contendo os seguintes reagentes (concentrações finais): tampão de PCR (Tris 20 mM, pH 8,4 e KCl 50 mM), dNTPs (200 μ M cada), oligonucleotídeos (100 ng de cada), 1 U de *Taq* polimerase (Promega), 10 ng de cDNA e água q.s.p. para 50 μ L. A temperatura de cada reação foi de 55° C. As reações foram realizadas em média com 35 ciclos. O cDNA amplificado foi clonado no vetor pGEM-T Easy (Promega) e transformado de *E. coli*, cepa DH5 α , conforme descrito acima.

3.1.4. Construção do cassete de expressão da região final do gene da DPP IV

Para a expressão protéica inicial, foi utilizado o vetor pET-TEV que é o pET-28a (Novagen) modificado, isto é, foi inserido neste vetor um sítio da protease TEV (*tobacco etch virus*) que auxilia na clivagem da cauda de histidina através da protease TEV (o pET-TEV foi gentilmente concedido pelo prof. Dr. Jorg Kobarg do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron - LNLS). Este vetor possui as mesmas características do pET-28a como 5.369 pares de base, com um gene que confere resistência ao antibiótico kanamicina, e a expressão protéica é controlada pelo promotor T7. Além disso, possui uma etiqueta com uma sequência que codifica seis histidinas (*His-tag*) na região N-terminal da proteína recombinante, o que facilita a purificação da proteína por cromatografia de afinidade empregando-se resinas contendo níquel ou cobalto (456). No entanto, o sítio de clivagem por trombina (CTGGTGCCGCGCGGCAGC) foi substituído por um sítio de TEV protease (GAAAACCTGTATTTTCAGGGC) e a T7 tag(ATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGC) foi removida.

Para a construção do vetor de expressão, o pET-TEV foi digerido com as enzimas de restrições *NdeI* e *XhoI* por 2 h a 37°C seguido de defosforilação com CIP (fosfatase intestinal de bezerro; *calf intestinal fosfatase*) por 1 h a 37°C, para evitar o fechamento do vetor sem estar ligado com o inserto. Após inativação das enzimas a 80°C por 20 min e eletroforese em gel de agarose a 1%, contendo brometo de etídeo, o vetor foi purificado do gel usando o kit Wizard (Promega). O DNA plasmidial purificado foi usado para a ligação com o inserto.

3.1.5. Ligação do inserto no vetor de expressão pET-TEV

Após a confirmação (por seqüenciamento) da presença da seqüência correta do inserto, o mesmo foi recuperado do vetor de clonagem pGEM-T Easy através da digestão com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI* por 2 h a 37°C, seguido de inativação das enzimas a 65°C por 20 min. A mistura de digestão foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 1% contendo brometo de etídeo e visualizada em luz UV. O fragmento contendo o inserto foi retirado do gel e purificado usando um kit Wizard (Promega).

A ligação entre o fragmento e o vetor foi realizada nas proporções de 3:1, respectivamente. A reação foi realizada com 3 µL de inserto, 1 µL de vetor, ambos digeridos com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI*, 1 µL do tampão da T4 ligase (New England), 1 µL da enzima T4 ligase (Fermentas) e água Milli-Q q.s.p. para 10 µL. Após incubação da ligação por 12 h em banho-maria a 16°C, 2 µL da ligação foram usados para transformação em *E. coli* cepa DH5α, seguida de incubação em placas de ágar e meio de cultura LB, contendo o antibiótico kanamicina (50 µg/mL), a 37°C por 18 h. As colônias positivas foram cultivadas em minipreparações, o cDNA foi extraído e a presença da inserção correta foi investigada através de digestão com enzimas de restrição (*NdeI* e *XhoI*) e PCR de colônia.

3.1.6. PCR de colônia para verificação da presença do inserto

Para a PCR de colônia foram utilizadas as mesmas condições da reação para a clonagem da DPP IV truncada descritas acima, e os mesmos *primers* e

temperatura. No entanto, o molde (*template*) de DNA consistiu em uma quantidade pequena da colônia que cresceu em placa de ágar, resultado da primeira transformação do cassete de expressão em cepa bacteriana DH5 α . A amplificação deste DNA ocorreu na presença de inserto da DPP IV truncada no vetor pET-TEV, resultando em uma banda de 700 pb.

3.1.7. Expressão da proteína recombinante

Para expressão da proteína, o pET-TEV contendo o inserto correto foi transformado, através de choque térmico, em *E. coli* cepa BL21(DE3) / BL21 (pLysS) e BL21 (Pril-*CodonPlus*) (Stratagene). Estas linhagens de *E. coli* são deficientes em proteases, evitando degradação da proteína heteróloga. Além disso, elas expressam o gene da T7 RNA polimerase sob o controle do repressor *lacI*. Na presença de IPTG (lactose ou outro análogo) este se liga ao repressor *lac* permitindo que o promotor T7 induza a transcrição do gene e sob o seu controle inicie a expressão da proteína heteróloga em grande quantidade.

As colônias positivas da clonagem nas diferentes cepas foram cultivadas em minipreparações, o DNA foi extraído e a presença da inserção correta foi investigada através de digestão com enzimas de restrição por 2 h a 37° C (*NdeI* e *XhoI*).

3.1.8. Testes iniciais de expressão da proteína e de solubilidade

As colônias positivas das bactérias BL21 (DE3, pLysS e Pril) foram utilizadas para a produção da proteína recombinante em 5 mL de meio LB (pré-inóculo) ou Circle Grow (BIO 101) contendo 5 μ L de kanamicina (50 μ g/mL) por 16

h a 37°C sob agitação constante de 250 rpm. Para os testes de expressão e solubilidade foi inoculado 1 mL de pré-inóculo em 100 mL de meio LB contendo kanamicina (50 µg/mL), sob agitação constante de 250 rpm, a 37°C, até atingir a densidade óptica ideal ($OD_{600nm} = 0,6$). Nesta fase, uma alíquota de 500 µL foi retirada e centrifugada a 12.000 rpm por 5 min, o sobrenadante foi descartado, e o precipitado foi ressuspendido em 200 µL de água Milli-Q estéril.

Em seguida foram adicionados 100 µL de tampão de amostra SDS-PAGE 2x (contendo 5% de β-mercaptoetanol) seguido de sonicação por 1 min. Posteriormente, a amostra foi incubada a 95°C por 5 min e armazenada a -70°C até o momento do uso (esta amostra foi identificada como NÃO INDUZIDA).

Após a coleta da amostra não induzida, foi adicionado à cultura bacteriana IPTG (concentração final: 0.1 mM) e alíquotas do meio de cultura foram coletadas após 2, 6 e 24 h de indução (amostras INDUZIDAS), e processadas conforme descrito acima. As induções foram realizadas nas temperaturas de 30°C e 37°C para os testes iniciais. Após a retirada da última amostra da indução (24 h), foi realizado o teste de solubilidade. Para isso, a cultura bacteriana foi coletada por centrifugação (5.000 g, 5 min, 4°C), o sobrenadante foi descartado, e o precipitado ressuspendido em 5 mL TS-10 (Tris 20 mM, pH 7,5, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, lisozima 1 mg/mL e PMSF 25 µg/µL). A amostra foi sonicada por aproximadamente 8 pulsos de 30 seg, com intervalos de entre os pulsos de 1 min (descanso em gelo). Depois da sonicação a amostra foi colocada em nitrogênio líquido por 1 min, seguido por centrifugação (10.000 g, 30 min, 4°C). Frações do sobrenadante (porção solúvel) e do precipitado (porção insolúvel) contendo tampão SDS-PAGE 2x (Tris-HCl 100 mM, SDS 4%, azul de bromofenol 0,2%,

glicerol 20% e β -mercaptoetanol 5%), foram incubadas a 95°C por 5 min e armazenadas a -70° C até o momento da eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%.

3.1.9. Testes iniciais de purificação utilizando renina carregada com níquel

Para este teste foi adicionado 1 mL de resina carregada com níquel (Ni-NTA; Qiagen) ao sobrenadante (50 mL) resultante do teste de solubilidade seguido por agitação com rotação vertical durante 2 h a 4°C. Posteriormente, a amostra foi centrifugada (1.000 g, 1 min, 4°C) e uma alíquota de 500 μ L do sobrenadante foi coletada (amostra TS-10, tampão de lise descrito acima). Seguiu-se então uma sequência de lavagens em tampões diferentes: (1) a resina foi ressuspensa em 500 μ L de TS-30 (Tris 20 mM, pH 7,5, NaCl 300 mM, imidazol 30 mM) e centrifugada (1.000 g, 1 min, 4°C), (2) o sobrenadante foi coletado, a resina foi ressuspensa em 500 μ L de TS-50 (imidazol 50 mM), centrifugada conforme descrito anteriormente e o sobrenadante coletado, e (3) repetiu-se este mesmo procedimento para o TS-100 (imidazol 100 mM) e TS-250 (imidazol 250 mM).

Alíquotas de 20 μ L das amostras foram preparadas com 10 μ L de tampão SDS-PAGE 2x (contendo 5% de β -mercaptoetanol) e incubadas a 95°C por 5 min antes de serem analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%. O restante das alíquotas foi armazenado a -70°C.

3.1.10. Western blotting

Após SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad) em uma cuba de transferência Trans-Blot SD *semi-dry transfer* (Bio-Rad). Marcadores moleculares foram incluídos na corrida. Após a transferência, sítios inespecíficos na membrana foram bloqueados *overnight* com 5% de leite desnatado em tampão PBS (tampão fosfato-salina). As membranas foram então incubadas por 90 min em temperatura ambiente com PBS contendo 5% de leite desnatado e o anticorpo Tetra-His *Antibody* (Qiagen) na diluição de 1:3.000. Após lavagens com PBS-T (tampão fosfato-salina contendo Tween 20 0,05%) as membranas foram incubadas com um conjugado anti-camundongo acoplado à peroxidase (Pierce), diluído 1:4.000 em PBS. Ao final de 2 h, a membrana foi lavada com PBS-T e as bandas imunorreativas foram detectadas utilizando um kit de quimioluminescência e filme fotográfico (Kodak, São José dos Campos, SP, Brasil).

3.2. Purificação da DPP IV da peçonha de *B. alternatus*

3.2.1. Cromatografia por exclusão molecular

A peçonha liofilizada de *B. alternatus* (100 mg) foi dissolvida em 1 mL de tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, contendo 150 mM NaCl e centrifugada (10.000 g, 10 min, 4°C). O sobrenadante resultante (~80 mg de proteína) foi aplicado a uma coluna (1,6 cm x 100 cm) de Sephacryl S-200 (Amersham) equilibrada com o mesmo tampão Tris-HCl(256). A coluna foi eluída(0,5 mL/min) com o tampão Tris usando um cromatógrafo ÄKTAprime e o perfil de eluição foi monitorada em 280

nm. Frações de 2 mL foram coletadas e testadas para atividade DPP IV. Em seguida, as frações ativas foram juntadas, e dessalinizadas e concentradas por centrifugação (3.000 g, 30 min, 4° C) em filtros da Millipore antes da próxima etapa.

3.2.2. Cromatografia por troca iônica

As frações com atividade DPP IV foram juntadas e aplicada a uma coluna de troca iônica HiTrap Q-Sepharose 5 mL (Amersham) equilibrada com Tris-HCl 50 mM, pH 8,0. Após lavagem da coluna com tampão de equilíbrio (quatro volumes da coluna), as proteínas foram eluídas usando um gradiente linear (0-1,0 M) de NaCl no mesmo tampão a um fluxo de 0,5 mL/min. Frações de 1 mL foram coletadas e testadas para atividade DPP IV.

3.2.3. Eletroforese por SDS-PAGE

Os picos ativos obtidos nas etapas cromatográficas foram analisados por SDS-PAGE em sistema descontínuo, com gel de empacotamento de 4% em tampão Tris-HCl, pH 6,8 e gel de corrida de 10% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl, pH 8,8, ambos contendo 0,4% SDS (457). Após diluição em tampão de empacotamento contendo glicerol 20%, azul de bromofenol 0,4% e SDS 4%, as amostras foram fervidas e aplicadas ao gel (10 cm x 12,5 cm). As corridas foram realizadas em sistema mini-VE 206E (GE LifeSciences) com voltagem constante (100 V). Proteínas marcadoras de massa molecular foram incluídas na corrida. Terminada a corrida, os géis foram corados com azul brilhante de Coomassie e documentados.

3.2.4. Ensaio enzimático para DPP IV

A atividade da DPP IV foi avaliada em uma mistura de reação contendo 50 µl de amostra, 40 µl de tampão (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0) e 10 µl de substrato específico para DPP IV (H-Gly-Pro β-naftilamina, concentração final 1 mM; Calbiochem). Após incubação por 10 min a 37°C a reação foi interrompida com 900 µl de formiato de amônio 2 M, pH 4,5 e a fluorescência foi medida em fluorímetro F2000 (Hitachi), com excitação em 410 nm e emissão em 335 nm (458; 459).

Para confirmar a especificidade do ensaio, foi utilizado diprotina A, um inibidor específico da DPP IV(460). Foram adicionados 40 µl do inibidor (concentração final: 2 mM) à mistura de tampão e amostra e, após incubação a 37°C por 10 min, foi adicionado o substrato (461; 462). Os ensaios foram feitos em duplicata com controles apropriados. A quantidade de β-naftilamina liberada foi determinada através de uma curva padrão preparada com a própria β-naftilamina.

3.3. Amplificação parcial do gene da aminopeptidase A (APA)

3.3.1. Obtenção do RNAm e do cDNA

O RNAm e o cDNA da glândula de peçonha de *B. alternatus* utilizados na clonagem da aminopeptidase A (APA) foram obtidos conforme descrito para DPP IV acima.

3.3.2. Amplificação parcial do gene da APA

Diferentes regiões do gene da APA foram amplificadas através de PCR. Os *primers* para o gene da APA foram desenhados a partir da seqüência do cDNA da APA caracterizado da glândula de peçonha da serpente *G. b. brevicaudus* (328). A posição e direção dos insertos foram confirmadas por sequenciamento. Seguem abaixo as seqüências dos *primers* usados (F – *forward*, R – *reverse*).

- F-1 APA: 5'-GTCCGTTTCAGCCAAAGAGAG-3'
- F-2 APA: 5'-TGGGACTCGGATTAGGTT-3'
- F-3 APA: 5'-GTGGTGATAGAGGCAGAAG-3'
- F-4 APA: 5'-CTTCTGCCTCTATCACCCAC-3'
- F-5 APA: 5'-AGATTTTGGCACTGGGGC-3'
- F-6 APA: 5'-GGAAAGAGGGGAATACATCAAG-3'
- R-7 APA: 5'-CTTGATGTATTCCCCTCTTTCC-3'
- F-8 APA: 5'-GGGGAATGCCTCTTTGTTGT-3'
- R-9 APA: 5'-ACAACAAAGAGGCATTCCCC-3'
- R-10 APA: 5'-CAGGTTGCTACATCATCTCGG-3'
- R-11 APA: 5'-ATGAGGACTGAGACCCAAT-3'

O cDNA obtido conforme descrito no capítulo II foi usado como molde para a reação de PCR. A amplificação consistiu dos seguintes reagentes (concentrações finais): tampão de PCR (Tris 20 mM, pH 8,4 e KCl 50 mM), dNTPs (200 µM cada), oligonucleotídeos (100 ng de cada), 1 U de *Taq* polimerase (Promega), 10 ng de cDNA e água q.s.p. para 50 µL. A temperatura de cada reação foi baseada na condição de anelamento de cada oligonucleotídeo. As

reações foram realizadas em média com 35 ciclos. O cDNA amplificado foi clonado no vetor pGEM-T Easy (Promega) e transformado de *E. coli*, cepa DH5 α , conforme descrito acima. O *long-distance* PCR (LD-PCR) do gene da APA foi feito usando o molde de cDNA adquirido a partir da construção da biblioteca de ESTs, essencialmente conforme descrito para DPP IV.

3.4. Amplificação parcial do gene da aminopeptidase M (APM)

3.4.1. Obtenção do RNAm e cDNA

O RNAm e o cDNA da glândula de peçonha de *B. alternatus* utilizados na clonagem da aminopeptidase M (APM) foram obtidos conforme descrito acima para DPP IV.

3.4.2. Amplificação parcial do gene da APM

Diferentes regiões do gene da APM foram amplificadas através de PCR. Os *primers* degenerados e não degenerados para o gene da APM foram desenhados a partir do alinhamento de diversas seqüências de cDNA descritas na literatura. A posição e direção dos insertos foram confirmadas por sequenciamento. Seguem abaixo as seqüências dos *primers* usados (F – *forward*, R – *reverse*).

Primers degenerados:

F-1 APM: 5'-TKKCHGATGAYYTGGSKGG-3'

F-2 APM: 5'-GAYGARCCRGCMATGAARGC-3'

F-3 APM: 5'-GMRRRBCAAGGHGADT-3'

F-4 APM: 5'-CNGACTTCAACGCBGGHG-3'
 R-5 APM: 5'-CDCCVGC GTTGAAGTCNG-3'
 F-6 APM: 5'-GTGGY TSAAYGAGGGYTTYGCCTC-3'
 R-7 APM: 5'-GAGGCRAARCCCTCRTTSARCCAC-3'
 F-8 APM: 5'-ACAGYAAGGGVGCVTCRTASCAB-3'
 R-9 APM: 5'-VTGSTAKGABGCBCCCTTKCTGT-3'
 F-10 APM: 5'-BKCACAMTCATCNCNTT-3'
 F-11 APM: 5'-GRRVCACTTCTTHYTDGACMS-3'
 R-12 APM: 5'-SKGTCHARDAAGAAGTGBYYC-3'
 F-13 APM: 5'-GKCHGCBCTVAVAAVCTGG-3'
 R-14 APM: 5'-CCAGBTTBTBAGVGCDGMC-3'
 F-15 APM: 5'-YACYTCYACCATYRWCAGCAT-3'
 R-16 APM: 5'-ATGCTGWYRATGGTRGARGTR-3'
 R-17 APM: 5'-GTTCTS YTYCACCCABTTGA-3'

Primers não degenerados:

F-1 APM: 5'-ATGGCCAAGGGCTTCTA-3'
 F-2 APM: 5'-CCCAGGAGAAGAACAAGA-3'
 F-3 APM: 5'-CTGAGACCCTACCTCACC-3'
 R-4 APM: 5'-GGTGAGGTAGGGTCTCAG-3'
 F-5 APM: 5'-CAAGAAGCTCAACTACACC-3'
 R-6 APM: 5'-GGTGTAGTTGAGCTTCTTG-3'
 F-7 APM: 5'-GGCTTCTACCGCAGCGA-3'
 R-8 APM: 5'-TCGCTGCGGTAGAAGCC-3'

F-9 APM: 5'-GCCATGGAGAACTGGGG-3'
R-10 APM: 5'-CCCCAGTTCTCCATGGC-3'
F-11 APM: 5'-GGAATGACCTGTGGCTGA-3'
R-12 APM: 5'-TCAGCCACAGGTCATTCC-3'
F-13 APM: 5'-CATCTCCTACAGCAAGGG-3'
R-14 APM: 5'-CCCTTGCTGTAGGAGATG-3'
F-15 APM: 5'-CCTGTCATCAATCGGGC-3'
R-16 APM: 5'-GCACGGTTGATGACAGG-3'
F-17 APM: 5'-GGCCCCATGAAGAACTACC-3'
R-18 APM: 5'-GGTAGTTCTTCATGGGGCC-3'
F-19 APM: 5'-CTGTTTCAGGATCCACACCT-3'

O cDNA obtido conforme descrito no capítulo II foi utilizado como molde para a reação de PCR. A amplificação consistiu dos seguintes reagentes (concentrações finais): tampão de PCR (Tris 20 mM, pH 8,4 e KCl 50 mM), dNTPs (200 μ M cada), oligonucleotídeos (100 ng de cada), 1U de *Taq* polimerase (Promega), 10 ng de cDNA e água q.s.p. para 50 μ L. A temperatura de cada reação foi baseada na condição de anelamento de cada oligonucleotídeo. As reações foram realizadas em média com 35 ciclos. O cDNA amplificado foi submetido ao sequenciamento direto, sendo que a reação de sequenciamento seguiu o mesmo protocolo descrito nos M&M do capítulo II (pag. 44).

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção do RNAm e cDNA

O RNA total da glândula foi obtido usando Trizol, conforme descrito nos Materiais e Métodos do capítulo II. A pureza e a integridade do RNA foram avaliadas pela absorbância em 260/280 nm (dados não mostrados) e por eletroforese em gel de agarose/formaldeído. Conforme mostrado na Figura 9, foram detectadas bandas de RNA de 28S e 18S, o que confirmou a integridade e boa qualidade do RNA. Para a obtenção do cDNA da glândula de peçonha, foram utilizados 0,5-2,0 µg de RNA total, seguindo-se o protocolo descrito no kit comercial Cloneminer.

4.2. Amplificação do gene da DPP IV

A clonagem do gene da DPP IV foi realizada utilizando como molde de DNA para a PCR o cDNA resultante da construção da biblioteca de cDNA da glândula peçonha de *B. alternatus* conforme descrito no capítulo II. As amplificações foram parciais, isto é, foram realizadas em diferentes partes do gene. As Figuras 28, 29 e 30 mostram a amplificação das porções inicial nucleotídeos de 1 a 1,201 (1,2 kb), média nucleotídeos de 840 a 1210 (681 pb) e final nucleotídeos de 1461 a 2281 (700 pb) do gene, respectivamente. As regiões intermediárias que não foram clonadas pela PCR normal foram clonadas por *long-distance* (LD)-PCR.

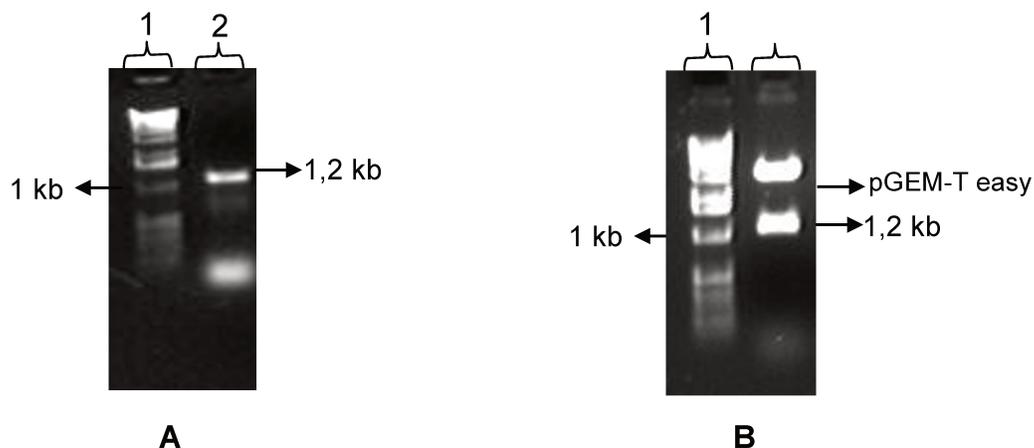


Figura 28. **(A)** PCR da porção inicial do gene da DPP IV, correspondente às bases iniciais do gene (1,2 kb). Coluna 1 - Ladder de 1 kb (Fermentas), Coluna 2 - Produto da PCR referente à parte inicial do gene DPP IV. **(B)** Digestão do plasmídeo pGEM-T easy (Promega) contendo o fragmento de cDNA da DPP IV com a enzima *EcoR1* (Fermentas). Coluna 1 - Ladder de 1 kb, Coluna 2 - Reação de digestão. Em cada painel, as amostras foram corridas em géis de agarose a 1%, contendo brometo de etídeo, e visualizada em UV.

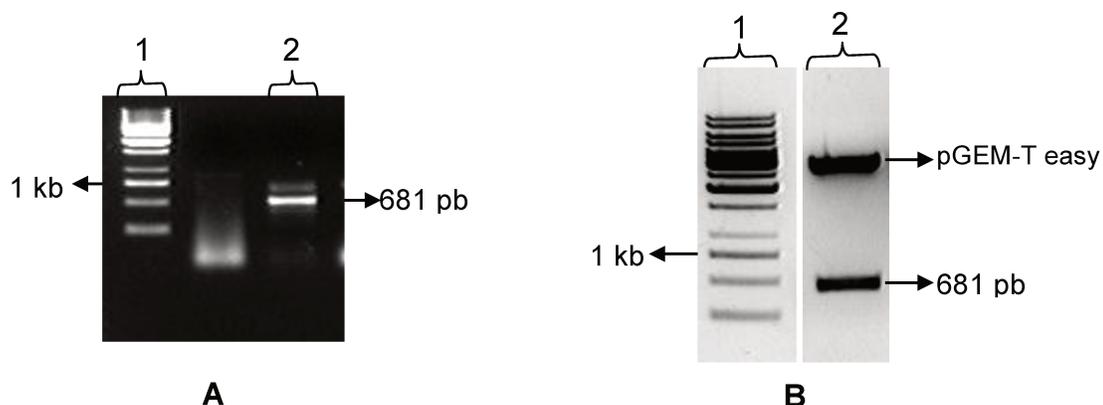


Figura 29. **(A)** PCR da porção média do gene da DPP IV, correspondente às 681 bases internas do gene. Coluna 1 - Ladder de 1 kb (Fermentas), Coluna 2 - Parte média do gene da DPP IV. **(B)** Digestão do plasmídeo pGEM-T easy (Promega) contendo o fragmento de cDNA da DPP IV com a enzima *EcoR1* (Fermentas). Coluna 1 - Ladder de 1 kb (Fermentas), Coluna 2 - Reação de digestão. Em cada painel, as amostras foram corridas em géis de agarose a 1%, contendo brometo de etídeo, e visualizada em UV.

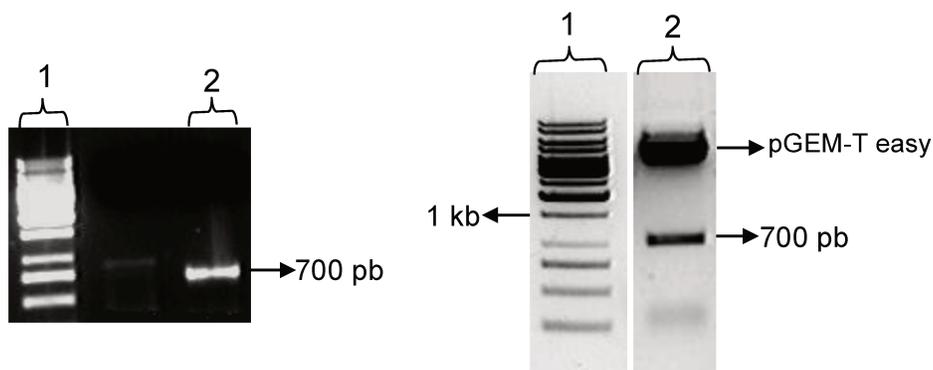


Figura 30. **(A)** PCR da porção final do gene da DPP IV, correspondente às 700 bases finais do gene. Coluna 1 - Ladder de 1 kb (Fermentas), Coluna 2 - Parte final do gene DPP IV. **(B)** Digestão do plasmídeo pGEM-T easy (Promega) contendo o fragmento de cDNA da DPP IV. Para a digestão foi usada a enzima *EcoR1* (Fermentas). Coluna 1 - Ladder de 1 kb (Fermentas), coluna 2 - Reação de digestão. Em cada painel, as amostras foram corridas em géis de agarose a 1%, contendo brometo de etídeo, e visualizada em UV.

4.2.1. LD-PCR do gene da DPP IV

Baseado nos resultados positivos obtidos com a clonagem e caracterização parcial do gene da DPP IV, clonamos a região codificadora do gene da DPP IV. A amplificação por LD-PCR possibilita a clonagem de fragmentos grandes, como é o caso do gene da DPP IV, que possui aproximadamente 2,3 kb. A Figura 31 mostra da amplificação da banda referente ao gene (2,3 kb). No entanto, não conseguimos sequenciar o gene inteiro e sim os amplicons gerados em cada clonagem.

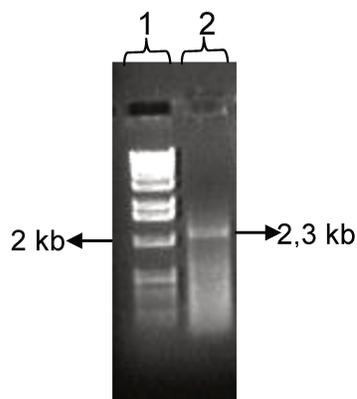


Figura 31. Amplificação do gene da DPP IV por LD-PCR. Coluna 1 - Ladder de 1 kb (Gibco), Coluna 2 - Produto do LD-PCR do gene inteiro da DPP IV (2,3 kb). A eletroforese foi feita em gel de agarose a 1% contendo brometo de etídeo, e visualizada em luz UV.

4.2.2. Sequenciamento dos *amplicons* de DPP IV

A Figura 32 mostra as sequências do cDNA obtidas com as amplificações parciais. As regiões amplificadas pelos diferentes primers estão indicadas em cores e as não-amplificadas estão em negrito. As sequências das regiões não amplificadas foram preditas por comparação com a sequência da DPP IV de *G. b. brevicaudus* (256). Os resultados do BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLASTn>) apresentaram de 93% a 97% de identidade com a sequência de *G. b. brevicaudus*.

```

1 caaagaacca gcaggagctt cccgcaatna agactgtagt gaaatgctta ttaggtcttc
61 ttgcacttgg agttatcatt acagccatag ttgttccagt agttttgcta acaagggatg
121 attccgatat ccgtagaaaa ttttcttttag aggattatct gtagtgatgaa tttcagtaca
181 aatcgtataa tctgcggtgg atgtcaggac atgagtatgt ctacacaaat cagaacaatg
241 ttcttctcta caacattgat gatgaaagag agtctatagt cttatcaaat gacacattag
301 acagtttcaa tagttctcag gcaatattgt caccgcagac aaaatttgcct cttctgcaat
361 acagttatga gaagggtgag aggcactcat acactgcatc ataccatatac tatgatctaa
421 ataacagaac caaaaataact gagaacccac ttccatacaaa tatccagatg atatcatggt
481 cacctgttgg acacaaaactg gcttatgttt accgtaataa tgtctatgtg aaagcaacac
541 caaacgccag tcctgttcaa atcactgaga atggagccga aaacaaaatt ttaaatggat
601 tagcagactg ggtgtacgaa gaggaaatgt ttggcactca ttctgctctg tgggtgctctc
661 caaatggcag gtttttggcg tttgcagaga ttaatgacac ggaggttccct gttatggagt
721 attcgtttta ttcagaagat aactgcaat atccaaagac cattaataatc ccatatccta
781 aggcaggtgc tataaatcca acaataagac tttttgtttt ggatatctcc ctttccccc
841 aaaatatctc ggaaattggt gcaccatcta gtataatatac aggggaccac tacttgagtg
901 ctgtaacgtg ggtgactgat gaaagaatth gcgtagcagtg gctgagaagc attcaaaact
961 tttctgtgct caccatctgt gactatagcg gcgcatggca ctgcccacaa gaaagggagc
1021 atcttgaaga aagtaaaact ggctgggttg gcagatttca gccatctgaa ccttacttta
1081 cttctgataa aatcagctac tacagaatta tcagtgattc agaaggatat aaacatattc
1141 actacactga tagtgacgga aaagttaaac ctattacaag tggaaaatgg gaagtaatca
1201 gtatatctgc cgtaacaaat aacagcctat actttattag taatgaatth gaaggtagac
1261 caggaggaag acatctttat aaagtggact taaaaaatga cctgaaaaaa atatgtatca
1321 cttgtaattc aaaggaggaa gcatgtcagt atttctctgt atctttcagc acagattcaa
1381 gatattataa attgaattgt tacggctcctg acctgcccta cttcaccttg caaaacagca
1441 ttacagacaa agctattaag accctagaag ataacaacaa cttgaaaaat gtattgaaag
1501 aaattcagat gccctgcaaa agactgagca atattactct gcatggacaa acatactggt
1561 atcagatgat attgcctcct aattttgatg agtcaaaaaa gtatcccttg ctcatgtatg
1621 tgtatgcagg gcctttagtg cagaaagcag atgctgcctt ccggtacaac tggctacgt
1681 atctggcaag ctccgaaggg attattgtgg ctagcttoga tggtagggga agcggcttcc
1741 aaggagataa aattttgcat cgcataatcc gaagactggg aacctatgaa gtcgaagatc
1801 agatctcagc agccaagcta ttttctgaaa tgagctttgt tgataaggac agaatagcta
1861 tttggggctg gtcttacgga ggttatgtaa cttccatggt cctcggagct ggaagtgatg
1921 tgttcaagtg tggaatagct gtggcacctg tctcacgctg gcaatattat gattctatat
1981 atactgaacg ctacatgggt ttgcctgaaa aaaacgataa cctgaatttc tatgagaact
2041 ctacagttat ggctagagca aaaaacttcc ggacagtoga ctatctattg atccatggaa
2101 cagcagatga taatgttcat tttcagcaag cagcccagat ttcaaaagct ctgggttgatg
2161 cagaggtgga tttccaagca atgtggtata cagataaaga tcatggaatt ggaggacatg
2221 cccacagcca tatctaccaa cacatgagtc attttatgaa acagtgtttt aaattgccca
2281 aatattggga gtgccttatc tgtgtgaagc tggtaactt ctgaagtctt aagaacactt
2341 ttctagtaaa ttgtcccata tttcattgga tgactccgctc tgtttaatth gtgtaggac

```

Figura 32. Sequência do gene da DPPIV. Nas caixas vermelhas estão representados o códon iniciador (ATG) do *open reading frame* (ORF) e o códon de terminação (TAA). Nucleotídeos coloridos representam as diferentes regiões que foram amplificadas e sequenciadas: verde – a porção inicial do gene; rosa – a porção média; azul e laranja – a porção final. Os nucleotídeos em preto são as regiões não amplificadas do gene, mas cuja sequência foi inferida por comparação com a DPP IV de *G. b. brevicaudus*. Nucleotídeos sublinhados foram amplificados, mas não foram sequenciados, e nucleotídeos inseridos na caixa amarela indicam a região de sobreposição de sequências amplificadas por diferentes primers.

4.3. Sequência da proteína da DPP IV

A Figura 33 mostra a sequência da proteína da DPP IV deduzida a partir da sequência nucleotídica indicada acima. A proteína contém 10 sítios potenciais de N-glicosilação (baseada na comparação com a DPP IV de *G. b. brevicaudus*) e uma sequência conservada contendo Ser (GWSYG) na porção C-terminal, que corresponde ao sítio ativo característico destas enzimas, que são serinoproteases.

```

      K N Q Q E L P A M K T V V K C L L G L L
3    aagaaccagcaggagcttcccgcaatgaagactgtagtgaaatgcttattaggtcttctt 62
      A L G V I I T A I V V P V V L L T R D D
63    gcacttggagttatcattacagccatagttgttccagtagttttgctaacaagggatgat 122
      S D I R R K F S L E D Y L S D E F Q Y K
123   tccgatatccgtagaaaatctttagaggattatctgagtgatgaatttcagtacaaa 182
      S Y N L R W M S G H E Y V Y T N Q N N V
183   tcgtataatctgcggtggatgtcaggacatgagtagtctacacaaaatcagaacaatggt 242
      L L Y N I D D E R E S I V L S N D T L D
243   cttctctacaacattgatgatgaaagagagtctatagtcttatcaaatgacacattagac 302
      S F N S S Q A I L S P D R K F A L L Q Y
303   agtttcaatagttctcaggcaatattgtcaccgcagaaaaattgtctctctcgaatac 362
      S Y E K V W R H S Y T A S Y H I Y D L N
363   agttatgagaaggtgtggaggcactcatacactgcatcataccatatctatgatctaaat 422
      N R T K I T E N P L P T N I Q Y I S W S
423   aacagaaccaaataactgagaaccacttcctacaaaatccagtatatatcatgggtca 482
      P V G H K L A Y V Y R N N V Y V K A T P
483   cctgttggacacaaaactggcttatgtttaccgtaataatgtctatgtgaaagcaacacca 542
      N A S P V Q I T E N G A E N K I L N G L
543   aacgccagtcctgttcaaatcactgagaatggagccgaaaaacaaaatcttaaatggatta 602
      A D W V Y E E E M F G T H S A L W W S P
603   gcagactgggtgtacgaagaggaaatgtttggcactcattctgctctgtgggtggtctcca 662
      N G R F L A F A E I N D T E V P V M E Y
663   aatggcagggtttttggcgtttgagagattaatgacacggagggttctgttatggagtat 722
      S F Y S E D T L Q Y P K T I K I P Y P K
723   tcgttttattcagaagatacactgcaatatccaaagaccattaaaatccatatacctaag 782
      A G A I N P T I R L F V L D I S L S P K
783   gcaggtgctataaaatccaacaataagactttttgtttgggataatctccctttccccaaa 842
      N I S E I V A P S S I I S G D H Y L S A
843   aatatctcggaattgttgcacatctagtagataatcaggggaccactacttgagtgct 902
      V T W V T D E R I C V Q W L R R I Q N F
903   gtaacgtgggtgactgatgaaagaatttgcgctgagtgagtgaggaaggattcaaaacttt 962
      S V L T I C D Y S G A W H C P K E R E H
963   tctgtgctcaccatctgtgactatagcggcgcatggcactgccccaaaggaaaggagcat 1022
      L E E S K T G W V G R F Q P S E P Y F T
1023  cttgaagaaagtaaaactggctgggtggcagatttcagccatctgaaccttactttact 1082
      S D K I S Y Y R I I S D S E G Y K H I H
1083  tctgataaaatcagctactacagaattatcagtgattcagaaggatataaacatattcac 1142
      Y T D S A G K V K P I T S G K W E V I S
1143  tacactgatagtgaggaaaagttaaacctattacaagtggaaaaatgggaagtaatcagt 1202
      I S A V T N N S L Y F I S N E F E G R P
1203  atatctgcgctaacaataacagcctatactttattagtaatgaatttgaaggtagacca 1262

```



```

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment
1_B.alternatus      MKTIVVKCLLGLLALGVIIITAIIVPVLVLLTRD---DSDIRRKFSLEDYLSDEFQYKSYNL
2_Gloydus           MKTIVVKCLLGLLALGVIIITAIIVPVLVLLTRD---DSDIRRKFSLEDYLSDEFQYKSYNL
3_Gallus            MKTLLKWLGLLGVAVVITVIAVPLALLTGES-IPESDSRSTYTLLENYLNNDYVYKTHNL
7_Homo              MKTPWKVLLGLLGAALVTIITVFPVLLLNKGTDDATADSRKTYTLTDYLNKTYRKLKLYSL
9_Pan               MKTPWKVLLGLLGAALVTIITVFPVLLLNKG-NDATADSRKTYTLTDYLNKTYRKLKLYSL
6_Pongo            MKTPWKVLLGLLGAALVTIITVFPVLLLNKG-NDATADSRKTYTLTDYLNKTYRKLKLYSL
4_Bos               MKTPWKVLLGLLGAALVTIITVFPVLLTKG-NDASTDSRRTYTLADYLNKTYRKFYNL
5_Sus              MKTPWKVLLGLLGAALVTIITVFPVLLLNKGTDDAAADSRRTYTLTDYLNKTYRKFYTL
8_Mus              MKTPWKVLLGLLGAALVTIITVFPVLLSKD--EAAADSRRTYSLADYLNKTYRKFVKSYSL
10_Xenopus         MKTWLKWLLGILMGAVVTVVAVPVALLATK--GKEDTRKTFLEDFYGFDEYRKSFFGL
***  *  ***:  .  .  .  *  .  .  .  .  .  *  *  .  .  .  *  .  .  *  *
1_B.alternatus      RWMSGHEYVYTNQN-NVLLYNIDDERESIVLSNDTLDLDFNS--QAILSPDRKFALLQYS
2_Gloydus           RWMSGHEYVYTNQN-NVLLYNIDDERESIVLSNDTLDLDFNS--QAILSPDRKFALLQYS
3_Gallus            QWISGNQYLHETSNGNINLRFDAETGTSVSVLLNNTTISITHEAT--TAILSPDQRFALLQYK
7_Homo              RWISDHEYLYKQEN-NILVFNAEYGNSSVFLENSTFDEFHGHSINDYSISPDQGFILLEYN
9_Pan               RWISDHEYLYKQEN-NILVFNAEYGNSSVFLENSTFDEFHGHSINDYSISPDQGFILLEYN
6_Pongo            RWISDHEYLYKQEN-NILVFNAEYGNSSAFLENSTFDEFHGHSINDYSISPDQGFILLEYN
4_Bos               RWVSDHEYLYKQEN-NILVFNAEYGNSSIFLENSTFDEFHGHSINDYSVSPDRQYILFEYN
5_Sus              QWISDHEYLYKQEN-NILVFNAEYGNSSIFLENSTFDELGYSTNDYSVSPDRQYILFEYN
8_Mus              WWVSDFEYLYKQEN-NILLNNAEHGNSIFLENSTFDEFSGY---HSVSPDRFLVLLLEYN
10_Xenopus         KWVSENEFLERTKD-NVLLYNVDNEKTTEMISNTTIYNSNS--FYTLSDNRNIALQYN
**  *  .  .  .  .  .  *  *  .  .  .  .  .  *  *  .  .  .  *  *  .  .  .  *  *
1_B.alternatus      YEKVWRHSYTASYHIYDLNLRKITEENPLPTNIQYISWSVPGHKLAYVYRNNVYKATPN
2_Gloydus           YEKVWRHSYTASYHIYDLNLRKITEENPLPTNIQYISWSVPGHKLAYVYRNNVYKATPN
3_Gallus            YEKLWRHSYTASYHIYDFNTSSILDDALLPNDTQYISWSVPGHKLAYVWNNNIYIKASPT
7_Homo              YVKQWRHSYTASYDIYDLNKRQLITEERIPNNTQWVTWSPVGHKLAYVWNNDIYVKEPN
9_Pan               YVKQWRHSYTASYDIYDLNKRQLITEERIPNNTQWVTWSPVGHKLAYVWNNDIYVKEPN
6_Pongo            YVKQWRHSYTASYDIYDLNKRQLITEERIPNNTQWVTWSPVGHKLAYVWNNDIYVKEPN
4_Bos               YVKQWRHSYTASYDIYDLNKRQLITEERIPNNTQWVTWSPVGHKLAYVWNNDIYVKEPN
5_Sus              YVKQWRHSYTASYDIYDLNKRQLITEERIPNNTQWVTWSPVGHKLAYVWNNDIYVKEPN
8_Mus              YVKQWRHSYTASYNIYDVNKRQLITEEKIPNNTQWVTWSPVGHKLAYVWNNDIYVKEPH
10_Xenopus         YEKLWRHSYTASYHIYDTVKGEIVTANVLPNQYITWSPVGNKLAYVWENNIYIKETPG
*  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
1_B.alternatus      ASPVQITENGAENKILNGLADWVYEEEMFGTHSALWWSPNGRFLAFAEINDTEVPVMEYS
2_Gloydus           ASPVQITENGAENKILNGLADWVYEEEMFGTHSALWWSPNGRFLAFAEINDTEVPVMEYS
3_Gallus            AAPVQITSNGEENKIFNGIPDWVYEEEMFGSHSALWWSPNGNFVAYAAFNDTEVPVIEYS
7_Homo              LPSYRIWTGKEDIYNGITDWVYEEEFVSAYSALWWSPNGTFLAYAQFNDTEVPLIEYS
9_Pan               LPSYRIWTGKEDIYNGITDWVYEEEFVSAYSALWWSPNGTFLAYAQFNDTEVPLIEYS
6_Pongo            LPSHRIWTGKEDIYNGITDWVYEEEFVSAYSALWWSPNGTFLAYAQFNDTEVPLIEYS
4_Bos               SPSQRIWTGKEDVIYNGITDWVYEEEFVSAYSALWWSPNSTFLAYAQFNDTEVPLIEYS
5_Sus              LSSQRIWTGKENVIYNGITDWVYEEEFVSAYSALWWSPNGTFLAYAQFNDTEVPLIEYS
8_Mus              LPSHRIWTGGEENVIYNGITDWVYEEEFVFGAYSALWWSPNNTFLAYAQFNDTGVPLIEYS
10_Xenopus         GSSIQITTNGEHNKILNGLIPDWVYEEEMFSTNYALWWSPDAASLAYVEFNDTDVPAIEYS
.  .  *  *  *  .  *  *  .  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
1_B.alternatus      FYSEDTLQYPKTIKIPYPKAGAINPTIRLFLVDISLSPK---NISEIVAPSSIIISGDHY
2_Gloydus           FYSEDTLQYPKTIKIPYPKAGAINPTIRLFLVDISLSPK---NISEIVAPSSIIISGDHY
3_Gallus            FYSEDTLQYPKTIRIPYPKAGAKNPTVKFFIVDIQMLPDF---NSTEISPPAEIKSGDHY
7_Homo              FYSDSLQYPKTVRVPYPKAGAVNPTVKFFVNTDSLSSVTNATSIQITAPASMLIGDHY
9_Pan               FYSDSLQYPKTVRVPYPKAGAVNPTVKFFVNTDSLSSVTNATSIQITAPASMLIGDHY
6_Pongo            FYSDSLQYPKTVRVPYPKAGAVNPTVKFFVNTDSLSSVTNATSIQITAPASMLIGDHY
4_Bos               FYSDSLQYPKTVKIPYPKAGAVNPTIKFFVNISSLSPNINATSQIVPPGSVLIGDHY
5_Sus              FYSDSLQYPKTVRIIPYPKAGAVNPTVKFFVNTDSLSSVTNATSIQITAPASMLIGDHY
8_Mus              FYSDSLQYPKTVWIIPYPKAGAVNPTVKFFIVNIDSLSSSSAAPIQIPAPASVARGDHY
10_Xenopus         FYGEDSDQYPKTVIIPYPKAGAKNPTVRLFFVNTASLPAF---NSVEIPPPAELRTIDYY
**  .  .  .  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
1_B.alternatus      LSVVTWVTDERICVQWLRRIQNFSVLTICDYS---GAWHCPKEREHLEESK-TGWVGRFQ
2_Gloydus           LSAVVTWVTDERICVQWLRRIQNFSVLTICDYS---GAWHCPKEREHLEESK-TGWVGRFQ
3_Gallus            LSVVTWVTDERICVQWLRRIQNYSVLTICDFESATGNWCHRKNWFKKVQLAGWQ--IS
7_Homo              LCDVTWATQERISLQWLRRIQNYSVMDICDYDESSGRWNCLVARQHIEMST-TGWVGRFR
9_Pan               LCDVTWATQERISLQWLRRIQNYSVMDICDYDESSGRWNCLVAVQHIEMST-TGWVGRFR
6_Pongo            LCDVTWATQERISLQWLRRIQNYSVMDICDYDESSGRWNCLVARQHIEMST-TGWVGRFR
4_Bos               LCDVTWVTEERISLQWLRRIQNYSIMDICDYDRSTGRWISSVGRQHIEMST-TGWVGRFR
5_Sus              LCGVTWVTEERISLQWIRRAQNYSIIDICDYDESSGRWISSVGRQHIEMST-TGWVGRFR
8_Mus              LCDVWVATEERISLQWLRRIQNYSVMAICDYDKINLWNCBPEQHVEMST-TGWVGRFR
10_Xenopus         INGMNVVTNGKMAVQWLRRIQNYSLLTVCDFAP--AWNCQP--PVYEQST-TGWVGYFQ
:  :  *  *  *  .  .  .  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

```


A Figura 35 mostra a análise filogenética (cladograma) destas sequências, que confirma a semelhança da DPP IV de *B. alternatus* com enzimas congêneras, especialmente a estreita relação com a de *G. b. brevicaudus*.

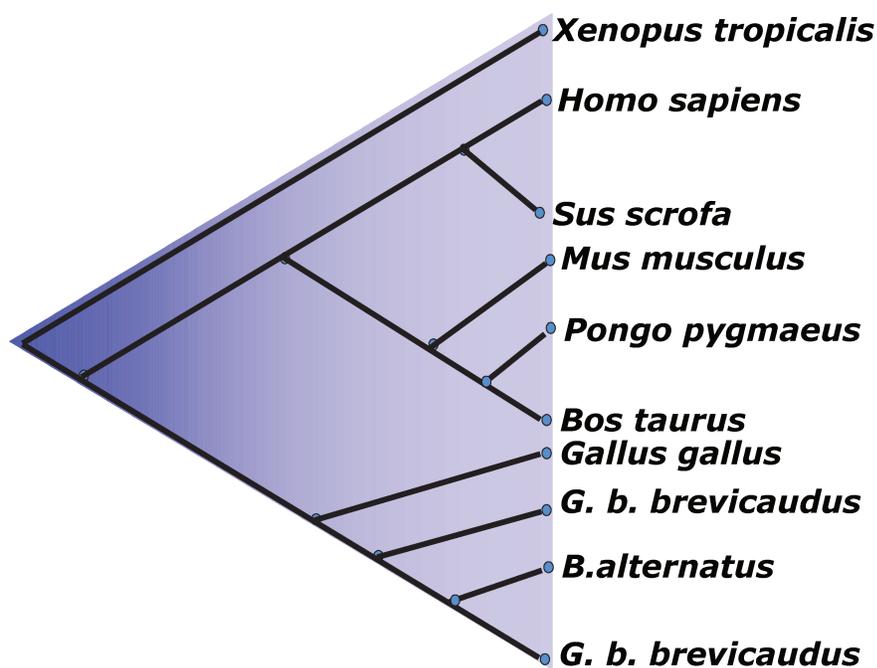


Figura 35. Cladograma mostrando a relação entre a DPP IV de *B. alternatus* e a de outros vertebrados, especialmente com a DPP IV da glândula de peçonha de *G. b. brevicaudus*. Note que no caso da *G. b. brevicaudus* foram incluídas as duas isoformas da enzima (DPP IVa e DPP IVb) (256).

4.4. Amplificação da região de interesse para produção de DPP IV recombinante

A clonagem da porção final do gene da DPP IV foi realizada utilizando o mesmo molde de DNA (*template*) descrito acima. Posteriormente à amplificação, o fragmento foi inserido em vetor de clonagem, e em seguida submetido à digestão com enzimas específicas (Fig. 36), e sequenciado.

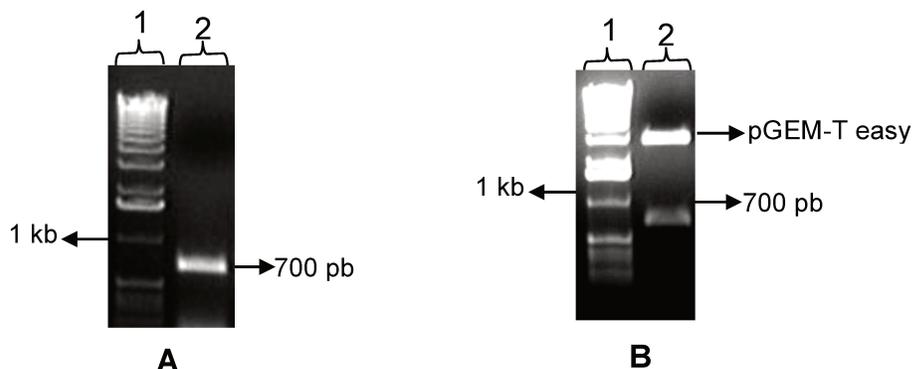


Figura 36. (A) PCR da porção final do gene da DPP IV, contendo os sítios de restrição enzimática *Nde* I e *Xho* I (Fermentas), correspondente às 700 bases finais do gene. Coluna 1 - Ladder de 1 kb (Fermentas), Coluna 2 - Parte final do gene DPP IV. (B) Digestão do plasmídeo pGEM-T easy (Promega) contendo o fragmento de cDNA da DPP IV. Para a digestão foi usada a enzima *Eco*R1 (Fermentas). Coluna 1 - Ladder 1 kb (Fermentas), coluna 2 - Reação de digestão. Em cada painel, as amostras foram corridas em géis de agarose a 1%, contendo brometo de etídeo, e visualizada em UV.

A Figura 37 abaixo mostra a porção final (em azul) do cDNA da DPP IV que foi utilizada para a construção do cassete de expressão.

```

1  caaagaacca gcaaggagcct cccgcaatga agactgtagt gaaatgctta ttaggtcttc
61  ttgcacttgg agttatcatt acagccatag ttgttccagt agttttgcta acaaggggatg
121 attccgatat ccgtagaaaa ttttctttag aggattatct gactgatgaa tttcagtaca
181 aatcgtataa tctgcggtgg atgtcaggag atgagtatgt ctacacaaat cagaacaatg
241 ttcttctcta caacattgat gatgaaagag agtctatagt cttataaat gacacattag
301 acagtttcaa tagttctcag gcaatattgt caccggacag aaaatttgcct cttctgcaat
361 acagttatga gaaggtgtgg aggcactcat acactgcatc ataccatatc tatgatctaa
421 ataacagaac caaaataact gagaaccac ttcctacaaa tatccagtat atatcatggt
481 cacctgttgg acacaaactg gcttatgttt accgtaataa tgtctatgtg aaagcaacac
541 caaacgccag tcctgttcaa atcactgaga atggagccga aaacaaaatt ttaaatggat
601 tagcagactg ggtgtacgaa gaggaaatgt ttggcactca ttctgctctg tgggtgctc
661 caaatggcag gtttttggcg tttgcagaga ttaatgacac ggaggttcct gttatggagt
721 attcgtttta ttcagaagat aactgcaat atccaaagac cattaaaatc ccatatccta
781 aggcaggtgc tataaatcca acaataagac tttttgtttt ggatatctcc ctttcccca
841 aaaatatctc ggaaattggt gcaccatcta gtataatatc aggggaccac tacttgagtg
901 ctgtaacgtg ggtgactgat gaaagaattt gctgacagtg gctgagaagg attcaaaact
961 tttctgtgct caccatctgt gactatagcg gcgatggca ctgcccaaag gaaagggagc
1021 atcttgaaga aagtaaaact ggctgggttg gcagatttca gccatctgaa ccttacttta
1081 cttctgataa aatcagctac tacagaatta tcagtgattc agaaggatat aaacatattc
1141 actacactga tagtgacgga aaagttaaac ctattacaag tggaaaatgg gaagtaatca
1201 gtatatctgc cgtaacaaat aacagcctat actttattag taatgaattt gaaggtagac
1261 caggaggaag acatctttat aaagtggact taaaaaatga cctgaaaaaa atatgtatca
1321 cttgtaattc aaaggaggaa gcatgtcagt atttctctgt atctttcagc acagattcaa
1381 gatattataa attgaattgt tacggtcctg acctgcccta cttcaccttg caaacacgca
1441 ttacagacaa agctattaag accctagaag ataacaacaa cttgaaaaat gtattgaaag
1501 aaattcagat gccctgcaaa agactgagca atattactct gcatggacaa acatactggt
1561 atcagatgat attgcctcct aattttgatg agtcaaaaaa gtatcccttg ctcatgatg
1621 tgtatgcagc gccttgtagt cagaaaagcag atgctgcctt ccgatcaac tggctctactg
    
```

```

1681 atctggcaag ctccgaaggg attattgtgg ctagcttcga tggtagggga agcggcttcc
1741 aaggagataa aatthttgcat gcgatatacc gaagactggg aacctatgaa gtcgaagatc
1801 agatctcagc agccaagcta ttttctgaaa tgagctttgt tgataaggac agaatagcta
1861 tttggggctg gtcttacgga ggttatgtaa cttccatggt cctcggagct ggaagtgatg
1921 tgttcaagtg tggaaatagct gtggcacctg tctcacgctg gcaatattat gattctatat
1981 atactgaacg ctacatgggt ttgcctgaaa aaaacgataa cctgaatttc tatgagaact
2041 ctacagttat ggctagagca aaaaacttcc ggacagtcga ctatctattg atccatggaa
2101 cagcagatga taatgttcat tttcagcaag cagcccagat ttcaaaagct ctggttgatg
2161 cagaggtgga tttccaagca atgtggtata cagataaaga tcatggaatt ggaggacatg
2221 cccacagcca tatctaccaa cacatgagtc atthttatgaa acagtgtthtt aaattgcca
2281 aatattggga gtgccttatc tgtgtgaagc tggtaactt ctgaagtctt aagaacactt
2341 ttctagtaaa ttgtcccata tttcattgga tgactccgctc tgtttaattt gtgtaggcac
    
```

Figura 37. Sequência do gene da DPPIV. Nas caixas vermelhas estão representados o códon iniciador (ATG) da *open reading frame* (ORF) e o códon de terminação (TAA). Nucleotídeos marcados a cor azul representam a porção final do gene que foi amplificada, sequenciada e utilizada para a expressão da proteína recombinante parcial da DPPIV e os nucleotídeos em verde mostram os *primers* utilizados. Os nucleotídeos em rosa são os nucleotídeos que compõem o sítio ativo (GWSYG) da enzima.

4.4.1. Construção do cassete de expressão da região final do gene da DPPIV

O vetor de expressão protéica, pET-TEV, foi submetido à digestão com as enzimas *NdeI* e *XhoI*, e tratado com fosfatase alcalina intestinal. Em seguida, a mistura de reação foi submetida à eletroforese em gel de agarose, purificada e armazenada até o momento do uso (Fig. 38).

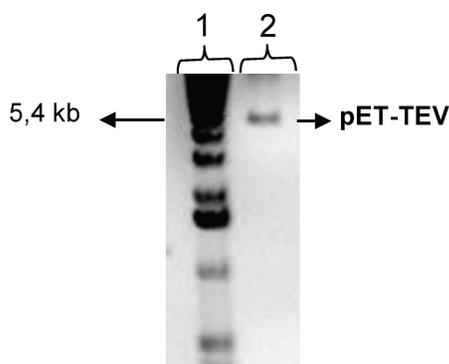


Figura 38. Digestão do vetor pET-TEV (~5,4 kb) com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI* (Fermentas). Coluna 1 - Ladder de 1 kb (Fermentas), Coluna 2 – pET-TEV. A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 1%, contendo brometo de etídeo, e visualizada em luz UV.

4.4.2. Confirmação (através de PCR) da presença do inserto no vetor pET-TEV nas colônias resultantes da transformação em DH5 α

Posterior à ligação do inserto com o vetor de expressão, foi realizada uma transformação inicial em *E. coli* cepa DH5 α . Foram investigadas sete colônias através de PCR de colônia, com avaliação da presença correta do inserto. Foram utilizados os primers específicos de clonagem da DPP IV truncada. Das sete colônias analisadas, sete amplificações foram bem sucedidas e apresentavam o inserto do tamanho esperado (Fig. 39).

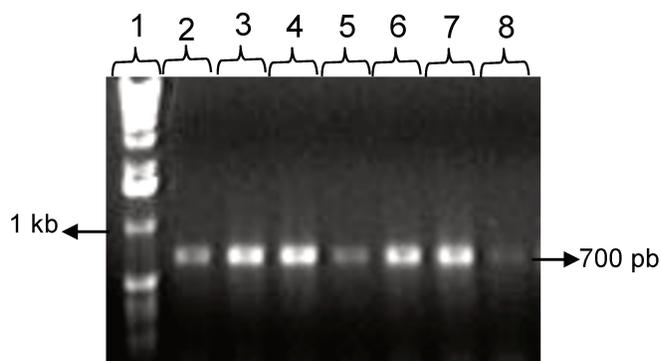


Figura 39. Amplificação da DPP IV truncada mostrando as sete colônias (2-8) com o inserto correto. Coluna 1 - Ladder de 1 kb (Gibco), Coluna 2 - Produto de PCR da DPP IV truncada (700 pb). A eletroforese foi feita em gel de agarose a 1% contendo brometo de etídeo e visualizada em luz UV.

4.4.3. Confirmação (através de digestão) da presença do inserto no vetor pET-TEV nas colônias resultantes da transformação em DH5 α

Após a ligação do inserto com o vetor de expressão foi realizada uma transformação inicial em *E. coli* cepa DH5 α . Foram investigadas quatro colônias digerindo os DNAs previamente preparados em minipreparações, com *Nde*I e *Xho*I para confirmação da presença do inserto de forma correta. Das quatro colônias analisadas através de seu perfil de restrição, duas apresentavam o inserto do tamanho esperado (Fig. 40).

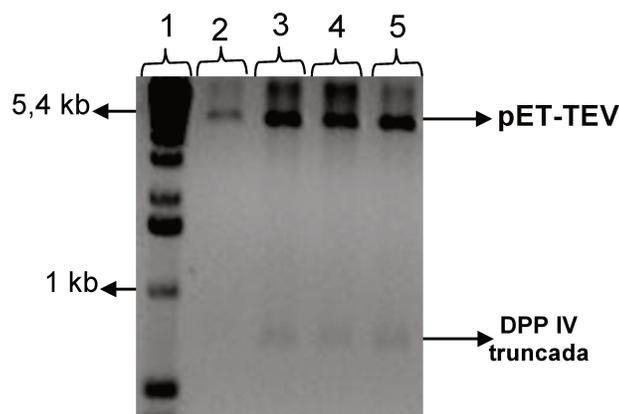


Figura 40. Digestão do DNA de quatro colônias para confirmar a transformação em DH5 α . Três colônias foram positivas. Coluna 1 - Ladder de 1 kb (Fermentas), Colunas 2, 3, 4 e 5 - quatro colônias compET-TEV+DPPIVemDH5 α . A eletroforese foi feita em gel de agarose a 1%, contendo brometo de etídeo, e visualizada em luz UV.

4.4.4. Confirmação (através de digestão) da presença do inserto no vetor pET-TEV nas colônias resultantes da transformação em BL21 (DE3, PLYS-S e Pril)

Após a confirmação das colônias positivas transformadas em DH5 α , foi efetuada uma segunda transformação em *E. coli* cepa BL21, nas linhagens DE3, PLYS-S e Pril, que são específicas para a expressão protéica por serem deficientes na produção de proteases. A presença do inserto foi analisada através da digestão dos DNAs previamente preparados em minipreparações, com *NdeI* e *XhoI* para confirmar a presença do inserto de forma correta de três colônias resultantes da transformação em BL21 (DE3) (Fig. 41).

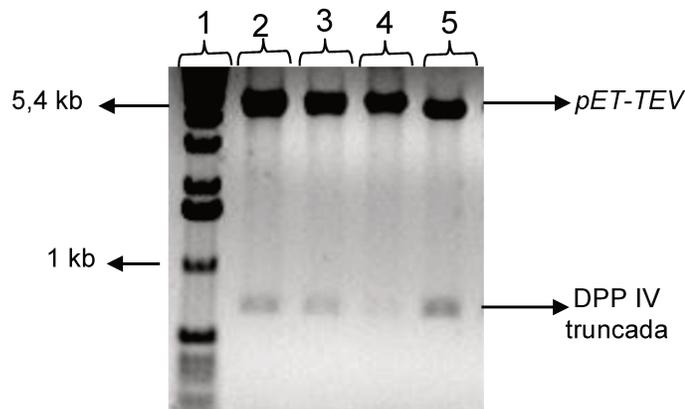


Figura 41. Digestão do DNA de três colônias positivas para transformação nas linhagens DE3, pLYS-S e pRIL da BL21. Todas as colônias foram positivas. A colônia da coluna 4 ficou com o inserto mais fraco, por isso foi repetido na coluna 5. Estes DNAs foram usados para expressar a proteína recombinante parcial da DPP IV. Coluna 1 - Ladder de 1 kb (Fermentas), Coluna 2 -pET-TEV+DPP IVem BL21/DE3, Coluna 3 -pET-TEV+DPP IVemBL21/pLys-S, Coluna 4 -pET-TEV+ DPP IVemBL21/pRIL, Coluna 5 -pET-TEV+DPP IVemBL21/pRIL. A eletroforese foi feita em gel de agarose a 1%, contendo brometo de etídeo, e visualizada em luz UV.

4.4.5. Testes preliminares de indução e purificação da proteína recombinante

Para os procedimentos iniciais de indução, foi utilizado pET-TEV contendo o inserto e transformado em BL21 (DE3, pLYS-S e pRIL). Os testes foram realizados a 30°C e 37°C em meio de cultura Circle Grow. O tamanho esperado da proteína recombinante da porção final do gene da DPP IV é de ~26 kDa. Conforme mostrado na Figura 42, apesar das diferentes linhagens da cepa *E. coli* BL21 testadas, não houve expressão da proteína (indicado pela ausência de uma banda nítida na região de ~26 kDa), mesmo depois de numerosas tentativas.

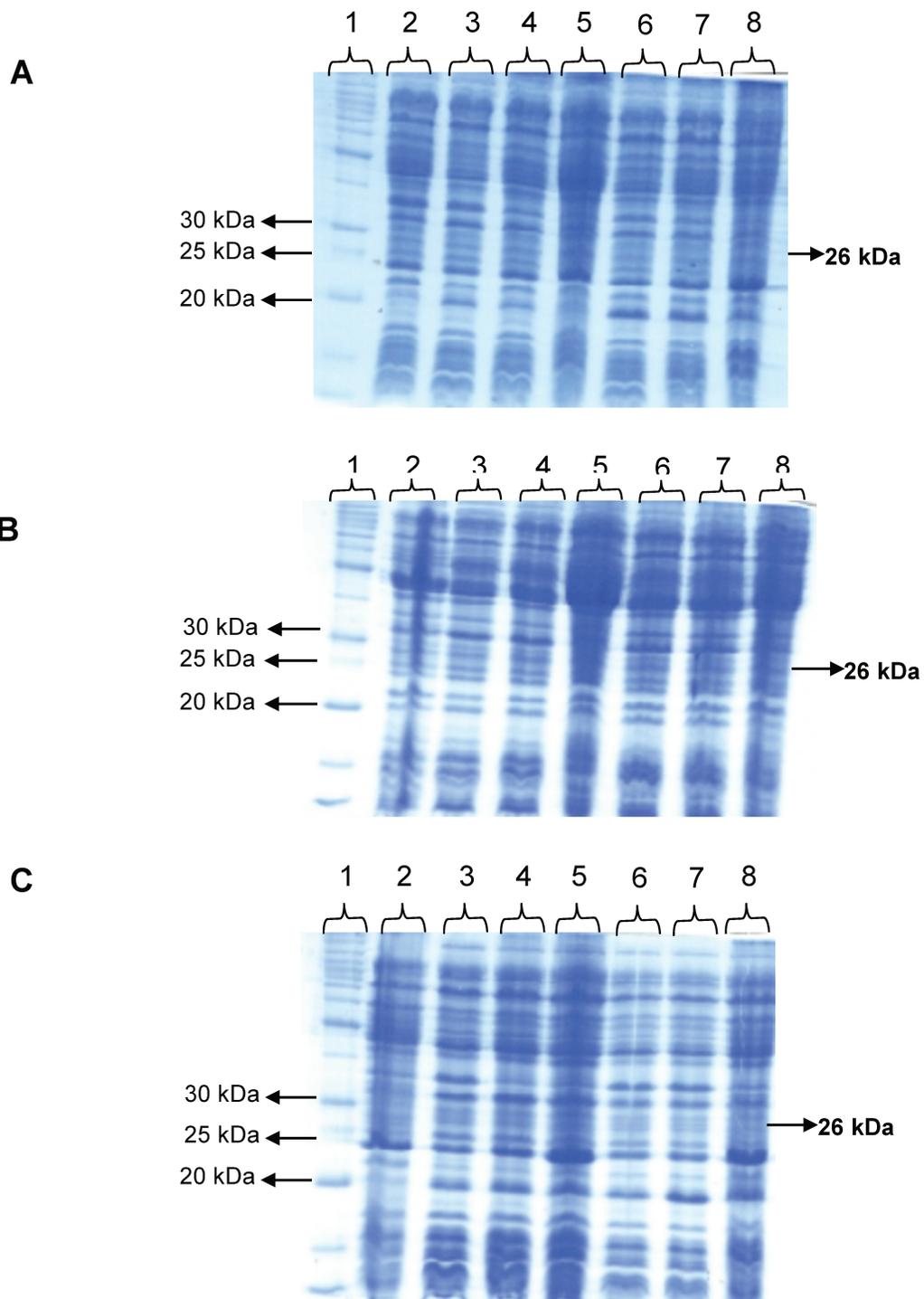


Figura 42. Eletroforese das amostras não induzidas e induzidas. Expressão preliminar na linhagem DE3 (A), pLYS-S (B) e pRIL (C). Coluna 1 - Ladder Benchmark (Invitrogen). Coluna 2 - pET-TEV+DPP IV truncada não induzido. Colunas 3, 4 e 5 - pET-TEV+DPP IV truncada induzido com 0,1 mM de IPTG, a 30°C, nos tempos de 4 h, 6 h e 24 h. Colunas 6, 7 e 8 - pET-TEV+DPP IV truncada induzido com 0,1 mM de IPTG, a 37°C, nos tempos de 4 h, 6 h e 24 h.

4.4.6. Testes iniciais de purificação utilizando resina carregada com níquel

Os testes de purificação foram realizados no lisado celular em solução com a resina níquel (Nin)-TA para o intervalo de 24 h, usando a linhagem pLYS-S da cepa BL21. Este teste foi feito para certificarmos de que nada havia sido expresso nos experimentos acima. Utilizou-se o tampão de lise contendo lisozima, e ciclos de sonicação e congelamento com nitrogênio líquido. Conforme esperado baseado nos resultados acima, não houve purificação da proteína (Fig. 43).

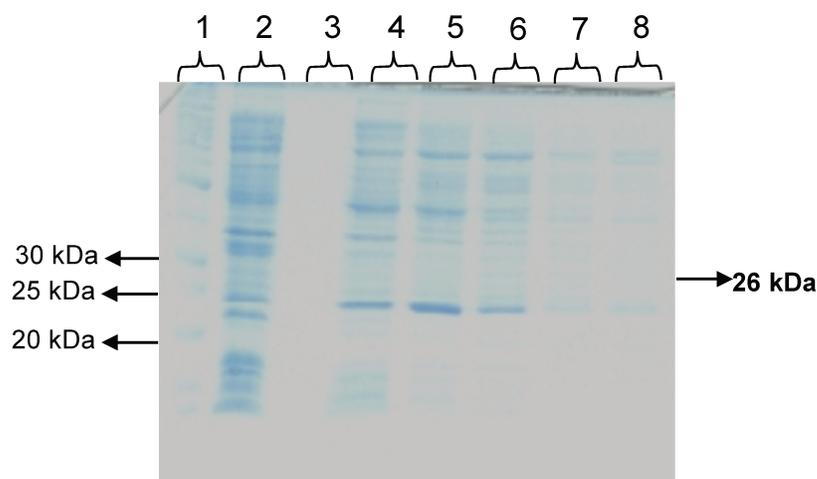


Figura 43. Eletroforese (gel de 10% de poliacrilamida corado com azul brilhante de Coomassie) das amostras coletadas no teste com resina de níquel. Coluna 1 - Marcadores de massa molecular Benchmark (Invitrogen), Coluna 2 - pET-TEV+DPP IV truncada não induzido, Coluna 3 - Amostra de resina pura sem lisado, Colunas 4, 5, 6, 7 e 8 - TS10, TS30, TS50, TS100, TS 250 e TS400, respectivamente. TS10 até TS400 = tampão com imidazol 10 mM até 400 mM.

4.4.7. Western blotting

Como não houve expressão significativa da DPPIV truncada, utilizamos o *western blotting* para verificar se a construção estava correta. Este experimento foi realizado com anticorpo específico para a cauda de histidina (His tag), sendo que como controle foi utilizado o pET-TEV + inserto não induzido, além de somente o vetor pET-TEV, para confirmar que o anticorpo não tivesse nenhuma ligação inespecífica com outras proteínas bacterianas que possuem His tag, e que a bactéria não tivesse expressando alguma proteína com cauda de histidina, além da proteína de interesse. O *western blotting* confirmou que a construção estava correta (Figuras 44 e 45).

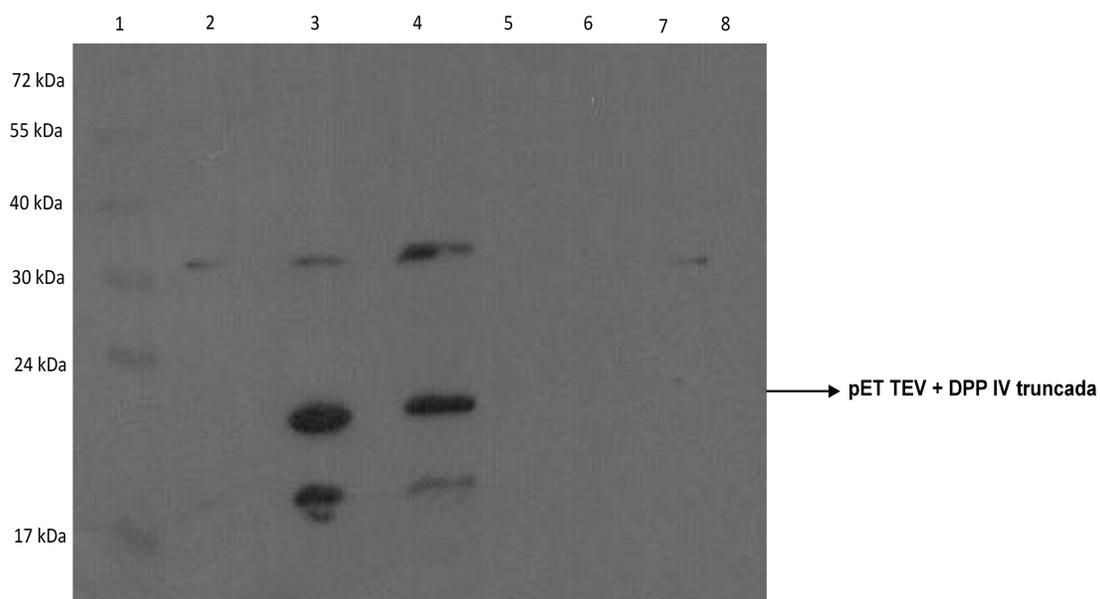


Figura 44. *Western blot* com anticorpo anti-His tag. Coluna 1 - marcadores de massa molecular (Fisher). Coluna 2 – Somente lisado bacteriano, Coluna 3 - pET-TEV + DPP IV truncada não induzido, Coluna 4 - pET-TEV + DPP IV induzido por 6 h, Coluna 5 - *Flowthrough* (purificação com coluna de níquel), Colunas 5, 6, 7 e 8 - TS10, TS20, TS30 e TS50 respectivamente. TS10 até TS50 = tampão com imidazol 10 mM até 50 mM.

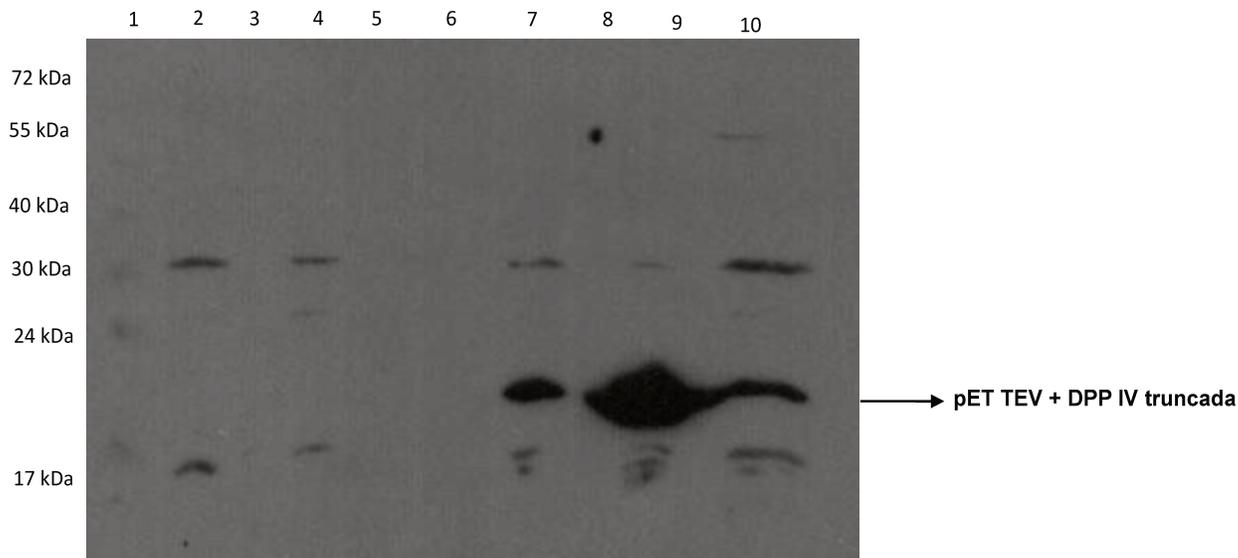


Figura 45. Western blot com anticorpo anti-His tag. Coluna 1 - Marcadores de massa molecular (Fisher), Coluna 2 - pET-TEV não induzido, Coluna 3 - Sem amostra, Coluna 4 - pET-TEV induzido por 6 h, Coluna 5 e 6 - Sem amostra, Coluna 7 - pET-TEV + DPP IV induzido 6 h porção solúvel, Coluna 8 e 9 - pET-TEV + DPP IV porção insolúvel da indução de 6h e 10h. Coluna 10 - Resina com pET-TEV + DPP IV.

4.5. Purificação da DPP IV da peçonha de *B. alternatus*

A cromatografia da peçonha de *B. alternatus* em coluna de Sephacryl S-200 equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, contendo 150 mM NaCl resultou em cinco picos principais (Fig. 46 A), sendo que a atividade DPP IV foi encontrada apenas no início do primeiro pico, região que corresponde a proteínas de alta massa molecular. As frações com atividade foram reunidas e aplicadas a uma coluna de troca iônica HiTrap Q-Sepharose equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, e as proteínas foram eluídas com gradiente linear de NaCl (0-1 M) no mesmo tampão. Desta etapa resultou um pico principal que continha a atividade enzimática da DPP IV (Fig. 46 B).

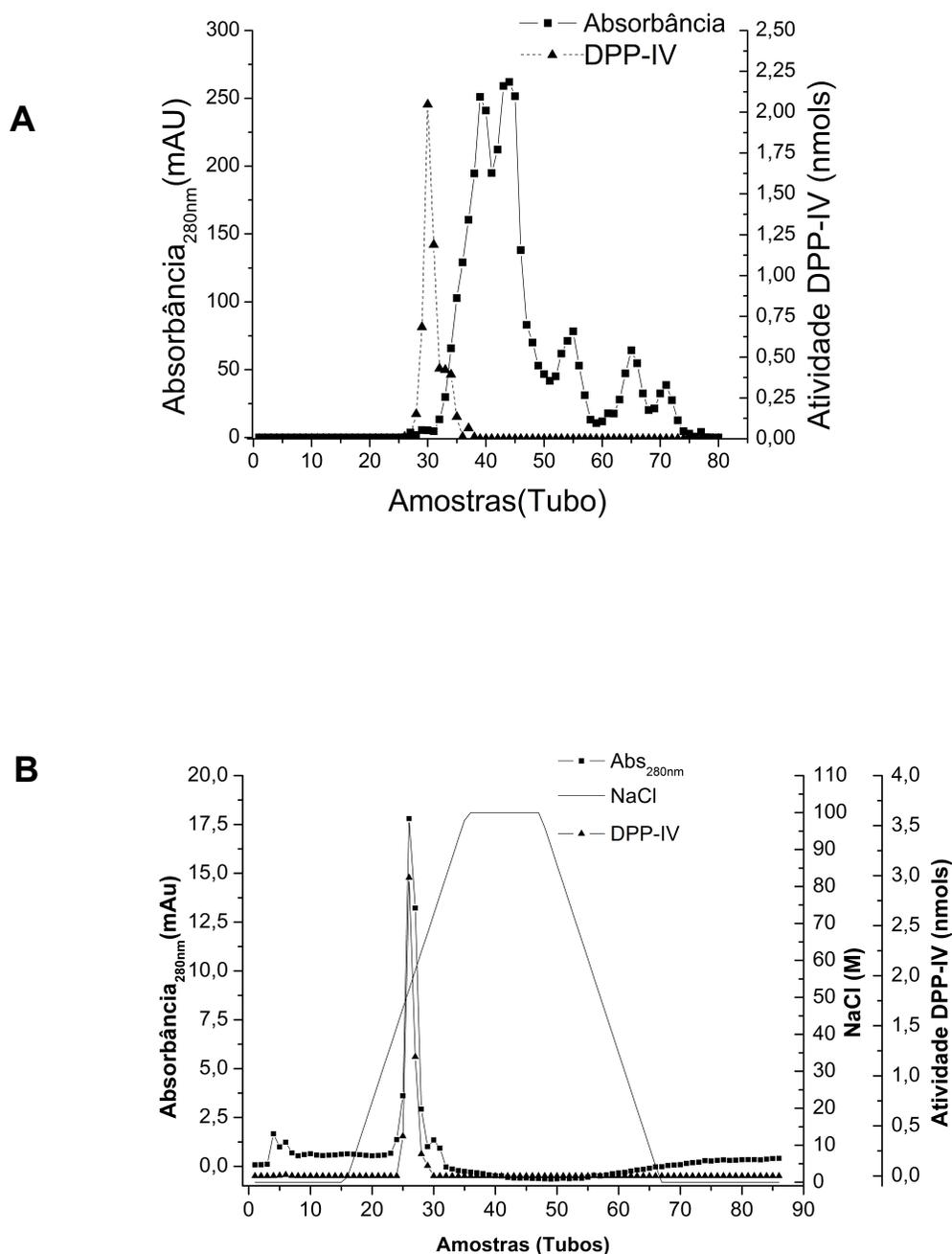


Figura 46. Purificação parcial da DPP IV da peçonha de *B. alternatus*. **(A)** Cromatografia por exclusão molecular em coluna Sephacryl S-200. A peçonha (100 mg) foi aplicada à coluna equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; a coluna foi eluída com a mesma solução. A eluição foi monitorada a 280 nm e foram coletados frações de 1 ml. **(B)** Cromatografia por troca iônica do pico ativo obtido em **(A)**. A amostra (1 mg) foi aplicada a uma coluna de troca iônica Q-Sepharose equilibrada com Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, e eluída com um gradiente linear de NaCl (0-1 M) no mesmo tampão. A eluição foi monitorada a 280 nm e foram coletados frações de 1 ml.

A eletroforese (SDS-PAGE) deste pico indicou uma proteína de massa molecular de ~116 kDa (Fig. 47). A Tabela 3 resume a purificação da DPP IV, onde houve rendimento protéico de 0,32% e fator de purificação de 34

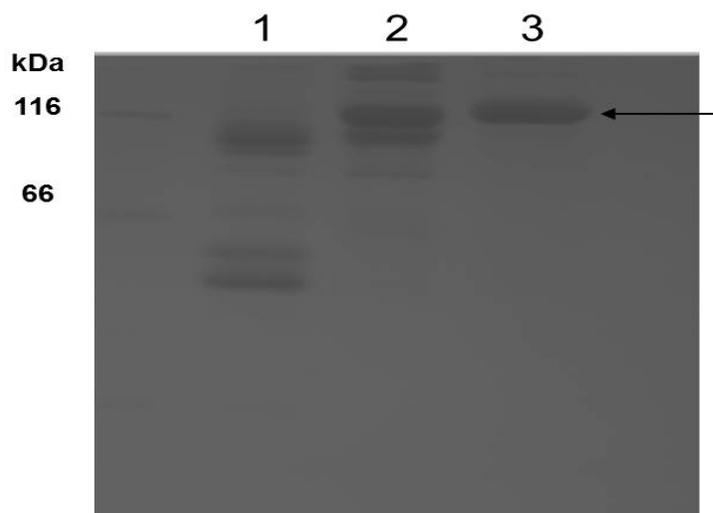


Figura 47. SDS-PAGE da proteína isolada, onde 1 é a peçonha, 2 é o pico 1 da exclusão molecular e 3 é o pico da troca iônica. Note a banda principal entorno de 116 kDa (seta).

Tabela 3. Purificação da DPP IV da peçonha de *B. alternatus*.

Etapa	Proteína total (mg)	Rendimento protéico (%)	Atividade específica (nmol/min/mg)	Fator de purificação
Peçonha	80,4	100	0,685±0,001*	1,0
Sephacryl S-200	1,714	2,13	12,84±0,07	18,7
Q-Sepharose	0,260	0,32	23,30±0,18	34,0

*Média ± SEM (n=3).

A atividade DPP IV foi detectada utilizando um ensaio fluorimétrico com o substrato específico Gli-Pro- β -naftilamina. Conforme mostra a Figura 48, a atividade da enzima obtida por troca iônica sobre este substrato foi totalmente inibida pela diprotina A, inibidor específica da DPP IV, confirmando que a enzima isolada foi de fato a DPP IV.

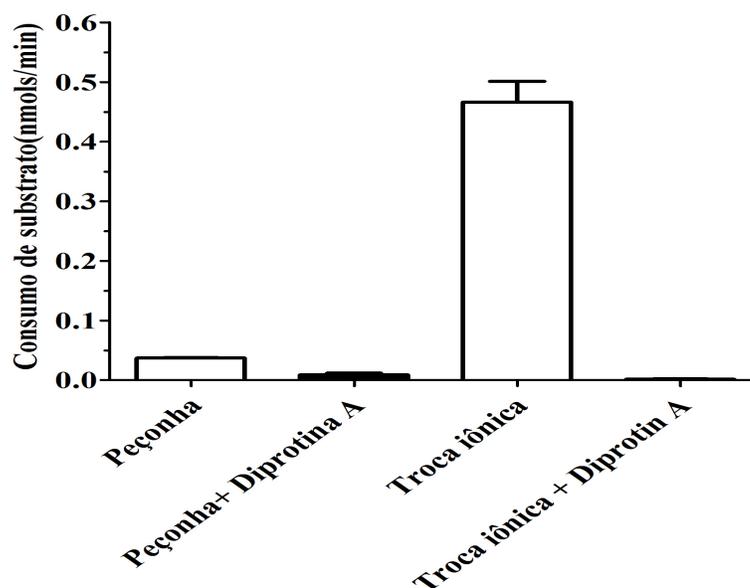


Figura 48. Atividade DPP IV da proteína isolada por troca iônica e sua inibição por diprotina A (2 mM), inibidor específico para DPP IV. As colunas são a média \pm SD de 3 determinações.

4.6. Amplificação parcial do gene da aminopeptidase A

Para clonagem do gene da APA foi utilizado o cDNA resultante da construção da biblioteca de cDNA como descrito acima para DPP IV. As amplificações foram parciais, isto é, foram realizadas em diferentes partes do gene. Posteriormente, a amplificação o fragmento foi inserido em vetor de

expressão bacteriano (pGEM-T-easy), e em seguida submetido à digestão com enzimas específicas.

Cada região amplificada foi sequenciada e os dados foram analisados através do programa BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLASTn>). A Figura 49 mostra a sequência do cDNA obtida com este procedimento. As regiões amplificadas pelos diferentes *primers* (PF-2 APA com PR-7 APA e PF-6 com PR-11 APA) estão indicadas em cores e as não-amplificadas estão em preto. Análise de BLAST destas sequências mostrou entre 90% e 97% de identidade com a sequência de *G. b. brevicaudus*. As sequências das regiões em preto foram inferidas por comparação com a sequência da APA de *G. b. brevicaudus*(291). A região amplificada foi sequenciada e os dados foram analisados através do programa BLASTn. Os *primers* utilizados (PF-2 e PR-10 APA) estão indicados na cor verde claro, e a região sequenciada está em azul (Fig. 50). A LD-PCR foi realizada com o objetivo de clonar o gene inteiro da APA e foi utilizado o mesmo DNA (*template*) descrito acima. A amplificação resultou em um fragmento de 2,8 kb referente à região codificadora do gene (Fig. 51).

```

1  atgcaaggaa tggatattga agataagtca tccaaaatgc attgcatgaa aggcaagcac
61  gtggccatca tttgtggagt ggtaattgcg gtgggcttaa ttttgggact cggattaggt
121  ttaggattaa aacctgagggc ctgcaatcct ccagaagaca atgggctact gtcaacaaaa
181  ccaccacaaa ccagtactcc aaatgtcaca aatccttcag ggagcagtgt gttttgcagt
241  gccaaaaatg atgaaaatgg agcctggaca aatttcaggc tgcccaacta tgttcagcct
301  gttcattacg acttagactt gaccctgag atggaagccg aggtgtacac cggaatggta
361  aatatctcca tcaggttgga agaacagaca accaggcatt tgtggcttca cctgagagaa
421  acaaagatca cggaaatgcc tcagctcagg acatcctcgg gccaggtcac tgagataaag
481  cgttgctttg gatatgaacc acaagaatat gtggtgatag aggcagaaga agacctacgt
541  cctggcaact acttctcgag tatgaagtto aaaggctatt tgaatggtto cctggttgga
601  ttttatagta caacttatgg agagaatgga aagaccaaact acatagcagc aactgatcat
661  gagccaactg atgcacgaaa atcatttctt tgctttgatg aacctaacaa aaaagcaaca
721  tatacgatat ctattactca tgaacatgac tatgaagcca tatcaaacat gccagtgagg
781  aaaacaatth cattagataa caaatggaca aagacaatat tcaagaaatc tgtcccaatg
841  agtacttact tgggtggcctg ggctgtgcac cagtttaaat atgaagaaag aatttcatct
901  cgtggaatth cactacgcgt ttatgcccaa ccacagcaga taaacacaac catctatgca
961  gcaaatgtaa ccaaggttgt atttgattat tttgaaaact atttcaacat gaactattct

```

```

1021 cttccaaaac tggacaaaat agcaattcca gattttggca ctggggccat ggagaattgg
1081 ggactgatca cttatagaga aactaatctc ctttatgatt cacaagaatc tgctgcttca
1141 aacaaacaaa gagtggcagc tgtggttgcc catgaacttg ttcacagtg gtttggaat
1201 attgtgacca tggattggtg ggatgactta tggctaaatg aaggatttgc cagtttcttt
1261 gagtttatgg gtgtaaattgc taaagaagaa aaatggcaaa tgctggatca aattttaatt
1321 gatgacctac tgccagtget gaaggatgat tctttggttt catctcacc cagcaaagga
1381 aatgtgtctt ctctgatga aataacatct gtatttgatg gcatactcta cagcaaagga
1441 gcgtcaattc tcagaatgct tgaagactgg atctcaccag atcacttcag agctggatgt
1501 cagaagtacc taacagacca ttattttaaa aatgcaaaaa cagatgattt ctggaaagca
1561 atggaagagg taagtgggaa gcctgtcaga gaagtgatgg acacatggac cacagatgt
1621 ggttatcctg tgctgaaagt tgatttaaac tcaacagtca cacagcaacg tttctattg
1681 gatcccaaag cagatccctc caagccatct tctcaattta gttacaagtg gaatattcca
1741 gtgaaatgga aagaggggaa tacatcaagt ataacattct acaataaatc agaattagca
1801 ggaattacta ttatgcaacc cagtgatctt cctcccgatt ctttcttgaa agtaaacaaa
1861 gatcatggtg gtttttatog tgtaaaattat gaaccccaag tctggcgtac tttagctgat
1921 attatgatga aagaccatca gaattttaat ctaaccgatc gtgctggttt tatagatgat
1981 gcttttgctt tggccagagc tggactctct aagtatgctg atgcattaaa ccttacaaga
2041 tatctgcaaa acgagacaga atatatctcg tggcaaagag ctgtagtagc tgtatctat
2101 attggacaga tggttgaaga tgataaggcg ctctatccca aatttcagag atattttggt
2161 agcctgggtc agcccattgc aagtgaactg aaaatgggaga atgatgagga ccatacaaaa
2221 agtctacttc gtacaactgt tttggaattt gcatgcaata tggacgaccc agaagctttg
2281 gggaatgcct ctttgttggt taagaattgg acgagtggaa taagtctaga tgtaaattct
2341 cgtctcctgg tgtaccgttt tgggatgcag aactcagggt atgagcaagc ctggaattat
2401 atgtttgaga aatacagaac tgcaacatta gctcaagaaa aggagaagct actctacggc
2461 ctggcatcag tgaaaaacat aactctgctg aacagattcc taaattgcat caaaaaataca
2521 actctcataa gaagtcaaga tgtgttcact gtcttgagat acatctcctt taatagctat
2581 ggcaaaaatg tggcttggga ctgggtacgc ctcaactggg agtattttggt caaacgatac
2641 actcttaatg atagaaacct tggagccta atatcaagaa tatcaggaac atttaacaca
2701 gaagctcagc tttggcagat ggaaaaattc tttgagagat atcctgatgc tggagcaggg
2761 gagcctcaa gaaagcaagc tttggaact acaaagagca acatagaatg gctaaaacaa
2821 taccgatgat atgtagcaac ctggcttgaa aattcagagc agccaaactt tgtataa

```

Figura 49. Sequência do gene da APA. As letras em vermelho representam o códon iniciador (ATG) do *open reading frame* (ORF) e o códon de terminação (TAA). Nucleotídeos marcados em verde e em azul representam a porção inicial e a porção final do gene que foram amplificadas e seqüenciadas. Os nucleotídeos em preto são as regiões não amplificadas do gene, mas cuja seqüência foi inferida por comparação com a APA de *G. b. brevicaudus*.

```

1 atgcaaggaa tggatattga agataagtca tccaaaatgc attgcatgaa aggcaagcac
61 gtggccatca tttgtggagt ggtaattgcg gtgggcttaa ttttgggact cggattaggt
121 ttaggattaa aacctgaggc ctgcaatcct ccagaagaca atgggctact gtcaacaaaa
181 ccaccacaaa ccagtactcc aaatgtcaca aatccttcag ggagcagtggt gttttgcagt
241 gccaaaaatg atgaaaatgg agcctggaca aatttcaggc tgcccaacta tgttcagcct
301 gttcattacg acttagactt gacctgag atggaagccg aggtgtacac cggaatggta
361 aatatctcca tcaggttgga agaacagaca accaggcatt tgtggcttca cctgagagaa
421 acaaagatca cggaaatgcc tcagctcagg acatcctcgg gccaggtcac tgagataaag
481 cgttgctttg gatatgaacc acaagaatat gtggtgatag aggcagaaga agacctacgt
541 cctggcaact acttctgag tatgaagtto aaaggctatt tgaatggttc cctggttgga
601 ttttatagta caacttatgg agagaatgga aagaccaaata acatagcagc aactgatcat
661 gagccaactg atgcacgaaa atcatttctt tgctttgatg aacctaacaa aaaagcaaca
721 tatacgatat ctattactca tgaacatgac tatgaagcca tatcaaacat gccagtgag
781 aaaacaattt cattagataa caaatggaca aagacaatat tcaagaaatc tgtcccaatg
841 agtacttact tgggtggcctg ggctgtgcac cagtttaaat atgaagaaag aatttcatct
901 cgtggaatcc cactacgcgt ttatgcccaa ccacagcaga taaacacaac catctatgca

```

```

961 gcaaatgtaa ccaaggttgt atttgattat tttgaaaact atttcaacat gaactattct
1021 cttccaaaac tggacaaaat agcaattcca gattttggca ctggggccat ggagaattgg
1081 ggactgatca cttatagaga aactaatctc ctttatgatt cacaagaatc tgctgcttca
1141 aacaaacaaa gagtggcagc tgtggttgcc catgaacttg ttcacagtg gtttggaat
1201 attgtgacca tggattggtg ggatgactta tggctaaatg aaggatttgc cagtttcttt
1261 gagtttatgg gtgtaaatgc taaagaagaa aaatggcaaa tgctggatca aattttaatt
1321 gatgacctac tgccagtgct gaaggatgat tctttggttt catctcacc tattacgggtg
1381 aatgtgtctt ctctgatga aataacatct gtatttgatg gcataccta cagcaaagga
1441 gcgtcaattc tcagaatgct tgaagactgg atctcaccag atcacttcag agctggatgt
1501 cagaagtacc taacagacca ttattttaa aatgcaaaaa cagatgattt ctggaaagca
1561 atggaagagg taagtgggaa gcctgtcaga gaagtgatgg acacatggac cagacagatg
1621 ggttatctctg tgctgaaagt tgatttaaac tcaacagtca cacagcaacg ttttctattg
1681 gatcccaaag cagatccctc caagccatct tctcaattta gttacaagtg gaatattcca
1741 gtgaaatgga aagaggggaa tacatcaagt ataacattct acaataaatc agaattagca
1801 ggaattacta ttatgcaacc cagtgatctt cctcccgatt ctttcttgaa agtaaacaaa
1861 gatcatggtg gtttttatcg tgtaaattat gaaccccaag tctggcgtagc tttagctgat
1921 attatgatga aagaccatca gaattttaat ctaaccgatc gtgctggttt tatagatgat
1981 gcttttgcct tggccagagc tggacttctg aagtatgctg atgcattaaa ccttacaaga
2041 tatctgcaaa acgagacaga atatatccg tggcaaagag ctgtagtagc tgtatcctat
2101 attggacaga tggttgaaga tgataaggcg ctctatccca aatttcagag atattttggt
2161 agcctggtca agcccattgc aagtgaactg aaatgggaga atgatgagga ccatatcaaa
2221 agtctacttc gtacaactgt tttggaattt gcatgcaata tggacgacc agaagctttg
2281 gggaatgcct ctttgttggt taagaattgg acgagtggaa taagtctaga tgtaaactt
2341 cgtctctctg tgtaaccgtt tgggatgagc aactcagggtg atgagcaagc ctggaattat
2401 atgtttgaga aatacagaac tgcaacatta gctcaagaaa aggagaagct actctacggc
2461 ctggcatcag tgaaaaacat aactctgctg aacagattcc taaattgcat caaaaataca
2521 actctcataa gaagtcaaga tgtgttctag gtcttgagat acatctcctt taatagctat
2581 ggcaaaacaa tggcttggga ctgggtacgc ctcaactggg agtatttggt caaacgatac
2641 actcttaatg atagaaacct tggacgccta atatcaagaa ttcaggaac atttaacaca
2701 gagctccagc tttggcagat ggaaaatttc tttgagagat atcctgatgc tggagcaggg
2761 gaagcctcaa gaaagcaagc tttgaaaact acaaagagca acatagaatg gctaaaacaa
2821 taccgagatg atgtagcaac ctggccttgaa aattcagagc agccaaactt tgtataa

```

Figura 50. Sequência do gene da APA. As letras em vermelho representam o códon iniciador (ATG) do *open reading frame* (ORF) e o códon de terminação (TAA). Nucleotídeos em azul representam a parte sequenciada por LD-PCR. Os nucleotídeos em preto são as regiões não amplificadas do gene.

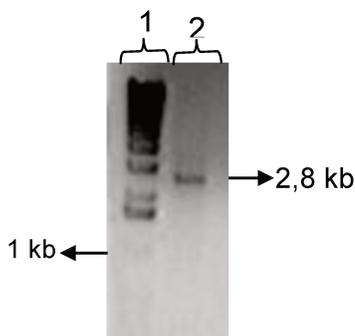


Figura 51. LD-PCR da APA. Coluna 1 - Ladder de 1 kb (Gibco), Coluna 2 - Produto de PCR da APA (2,8 kb). A eletroforese foi feita em gel de agarose a 1%, contendo brometo de etídeo, e visualizada em luz UV.

4.7. Amplificação parcial do gene da aminopeptidase M

Para clonagem do gene da APM foi utilizado o cDNA resultante da construção da biblioteca de cDNA como descrito acima para DPP IV e APA. Várias tentativas de amplificar este gene foram realizadas, no entanto somente um amplicon foi gerado com 93% de semelhança com a sequência da APM/N de *G. b. brevicaudus* (número de acesso no GenBank - AB332387.1; dados não publicados) A Figura 52 mostra a porção que foi clonada na região média da ORF da APM e correspondeu a 567 pb.

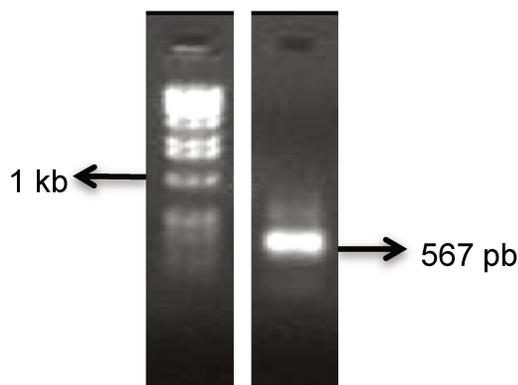


Figura 52. PCR da porção média do gene da APM, correspondente a uma região interna do gene (567 pb). Coluna 1 - Ladder de 1 kb (Fermentas), Coluna 2 - Produto da PCR referente à parte média do gene da APM. As amostras foram corridas em géis de agarose a 1%, contendo brometo de etídeo, e visualizada em UV.

A Figura 53 mostra a sequência do gene da APM/N de *G. b. brevicaudus*, e em azul a sequência que conseguimos clonar a partir do cDNA de *B. alternatus*, a análise de BLASTn mostrou 93% de identidade com a sequência de *G. brevicaudus*. A LD-PCR não foi realizada com sucesso para este gene.

```

1 attttcagc gaccctgaag gctcaggaac cacatcaagg tgcattcagc tctccattaa
61 ctccctcaca agataagaga agatggccac agagcagaag tgaccttcgc ccagcatttc
121 tggcttaata attgacatgt ttcaccacgc taagaaacac atctataaag gacctgcggt
181 gtcttagcga tcccttcgtg tgogagccc actctggcct ctctcagcc atggcctaaag

```

```

241 gattcttcat cagcaagtct ttggggggtg taggccttgt ccttggcctg ggggcccgtg
301 ccaccatcat cgccctctcg gttgtctact cccaggagaa gcagcgggca gacgacctct
361 ccaaccagggt cccaagcagc accagcgcgg ctgtcgcccc cggcactact atagccggca
421 ccgcccaaac taccacggcc aacggcagtg tccaaactac cacggccaac ggcagtgctc
481 aagctaccac aaccaagact ttggagcctt gggaccacat gcggttgccc aaaactttga
541 tgccaacctt ttacaacatc tctttgcagc cattttctgac agaggttggc ccaaacttct
601 acattttcaa aggaaacagc acagtggagt ttcagtgcaa gcagcctacg gacctcatac
661 tcatacacag caaaaagctg aattatacta tgcagggggc tttccatgtg tccctgacgg
721 gaattggcgt caccccacct gccatccata gtacttggct agaggagaag acagagtact
781 tgggtggtgaa actcaaagag aacctccagc agaataagaa ctatcagctg catgccgtct
841 tcactgggga acttgcagat gatctgggat gcttctaccg cagtgcatac acagaaggag
901 ataaagccaa gctgttggct acaaccaga tgcaggctgc tgatgccgc aaagctttc
961 cttgctttga tgagccagcc atgaaggcca acttctccat cacgctgatt cacttgccctg
1021 attataaggc gctctccaac atgccatta agagcgtga gcaggtaaca atgccagacg
1081 gagcaatctg gacgcggact gaatttcatc ccaccctcaa gatgtccacc tacttgcttg
1141 cttttattgt cagcgagttt gagaatgtgt ctgctatcga gaataacatc ctgatccaga
1201 tctggggccg ccccaacgcg atcatggagg gccagggggc ctacgctctc aacgtcacgg
1261 tcctccattct caggttcttt gagcgggaat acagagtacc ttatcctctg acgagattag
1321 accaagttgc ccttccggat ttcaatgctg gagcaatgga gaactggggg ctgattacat
1381 accgtgagag tgcoctactc tttgacgaac aatactcttc cattggcaac aaggaacgga
1441 ttgtgacagt cattgctcat gaagttgcc accagtgggt tggaaacctg gttacctg
1501 agtgggtgaa tgagctgtgg ctaaatgagg gctttgcgtc ctatgtggaa tatctgggtg
1561 cccatgaagc tgagcccacg tggaatatta aagatctgat tgtgcccgaat gatgtctacc
1621 tggtgatggc catcgacgcc ctggcttcc cacaccctc ctccagccc gcagaggaaa
1681 tcaacactcc tgctcagatc agtgaagtct ttgactccat ttcctacagt aaggggctc
1741 ctgtgatccg gatgctctcg gaattcctca ctgaggccgt gttcagagaa gggctgcaga
1801 cctactttga gacctaccaa tatggaaata ctgtttgtga tgacctctgg gaacagctgc
1861 agaaggcagt aaacaagaac gtgagtcttc caagcaccgt caagaccatc atggaccgtt
1921 ggaccttgca gatgggcttc ccagttctca cggttaatac ctccacaggc atcatttccc
1981 aaaaacattt tctgctggac ccagaaagcc cogttgagag accctcaccg ttcaattaca
2041 tctggatcgt tccagtttcc tggctgagca aaggaaagga tgctgctca ggcagagatg
2101 cagacactaa cgctgaaaat gtcaacttct caacttctgc tgaccccac cagtggctgc
2161 tgctcaacgt taacgtcaca ggctacttcc gggtaacta tgatttggaa aactggcaga
2221 ggctcatgaa tcagctgaac aaagacctcc aggaaatccc ggttctaaat cgtgctcaga
2281 tcacgatga tgccctcaac ttggccagag ccaagcatgt ggggaccgac ctggccctga
2341 acaccaccg ctacctgggc ctggagaggg agtaccttcc ttgggacacg gacctggaca
2401 acctggacta cttccgcctc atgttgacc gcagcgaagt ctacgggccc atcgagat
2461 acatccggaa acaggtcacc cccctgtttg agcacttctg gaacctcact ctcaactgga
2521 acgaaatccc ggatggcttg atgaaccagt ataaccagat cctggccatc cgcacggcct
2581 gtcctacgg cgccctggg tgcaatgaac tggcctcctc ctggtttgag gcctggaaaa
2641 acaactccaa catcaacctg atctcgcca atctgcgctc cgccgtctac tgacgcgcca
2701 tccgcacagg cagcccggag gactgggact tcgtctggga gatgttccgc aaggccccgg
2761 tgatctcaga ggccgacaag ctgcgcgcg ccctgacctg cagccagacc ccgtggatcc
2821 ttcagaggta ccttcggtat accctggacc ccagcaagat ccgccgccc gatgccatgt
2881 ccaccatcaa cagcattgcc agcaacgtgg ttgggcaacc tctggcctgg gattttgtgc
2941 gcatgaactg gaagacctc ttccagcagt ttgggagaag ctccttctct ttctccagcc
3001 tcacccagtc ggtaaccag aggttttcat ccccatttga acttcaacag ctggagcaat
3061 tcaagaaaga caacgaggac gtgggcttcg gctcagccac ccgggcgctt gacgagccc
3121 tggagagaaa gaaggccaac atcaagtggg tggcagagaa caaggcgctc gtcctgaagt
3181 ggttccagga caactcgt gggaatcggc cggtgctgct gcagggtgag ggccagaggg
3241 tcaacatctg ggatgttgca gtggcctcgg tgacactttg cccttgagcc acggctctct
3301 ctccgcacac ccaagggcag aggagcaggt gggctgcgac tctctccggt ggccgtggaa
3361 aggccccgct atgattttat aaccgcaatg ctgtaaatta aagagtcctc tg

```

Figura 53. Sequência do gene da APM/N da serpente *G. b. brevicaudus*. Nas caixas vermelhas estão representados o códon iniciador (ATG) *doopen reading frame* (ORF) e o códon de terminação (TAG). Nucleotídeos marcados a cor azul representam a parte do gene de *B. alternatus* que foi amplificada e sequenciada.

5. DISCUSSÃO

5.1. Clonagem e caracterização do gene da DPP IV

Durante a análise dos ESTs de *B. alternatus* detectamos um transcrito para o gene da DPP IV. Para investigar melhor este gene, realizamos amplificações a partir de *primers* desenhados baseado em alinhamentos de DPP IV de várias espécies, inclusive da sequência do gene da DPP IV da glândula de peçonha de *G. b. brevicaudus*(256). Os primers foram desenhados para as mais diversas partes do gene com o intuito de permitir a clonagem do gene inteiro. Utilizamos como molde para estas amplificações o cDNA obtido na biblioteca de ESTs.

Conforme demonstrado nas Figuras 28, 29 e 30, conseguimos clonar a maior parte do gene, sendo que as regiões clonadas mostraram grande homologia (quase idêntica) com a sequência da DPP IV da *G. b. brevicaudus*. Baseada nesta comparação, inferimos as sequências das regiões ainda não sequenciadas para permitir uma análise inicial da estrutura gênica e protéica desta peptidase. Baseado na sequência de aminoácidos deduzida do cDNA, a DPP IV de *B. alternatus* possui 751 aminoácidos, uma massa molecular calculada de 86,1 kDa e um ponto isoelétrico (pI) teórico de 6,11. Esta massa molecular calculada é igual à da *G. b. brevicaudus*(256) e do elapídeo australiana *Demansia vestigiata* (e semelhante a vários outros elapídeos deste país) (257) sequência da DPP IV de *B. alternatus* possui as principais características destas enzimas, a saber, um sítio ativo no C- terminal contendo Ser⁶¹⁶ como parte de uma sequência conservada (GWSYG), a presença de Asn⁶⁹⁴ e His⁷²⁶ como aminoácidos que

contribuem para a atividade catalítica no sítio ativo, e vários (10) sítios para N-glicosilação (baseado na comparação com a DPP IV de *G. b. brevicaudus*).

O alinhamento de múltiplas sequências de DPP IV (Fig. 34) confirmou a grande semelhança entre a enzima de *B. alternatus* e a de outras fontes, conforme também demonstrado pelo cladograma obtido com estas sequências (Fig. 35). Em todos os casos, o sítio ativo com a sequência de serinoproteinases (GWSYG) e a tríade de aminoácidos envolvidos na atividade catalítica (Ser⁶¹⁶, Asn⁶⁹⁴ e His⁷²⁶, no caso de *B. alternatus*) são altamente conservados em diversas espécies, embora as vezes com variações na localização do sítio GWSYG dentro da molécula; por exemplo, a sequência ocorre nas posições 628 a 632 em humanos e 629 a 633 em ratos (354; 463; 464) comparado com 614 a 618 em *B. alternatus*. Além disso, a substituição de um único aminoácido nestas posições resulta em perda da atividade enzimática, conforme mostrado em estudo com ratos Fisher 344 onde uma mutação *missense* Gly → Arg, na posição 633 do sítio catalítico reduziu marcadamente a atividade enzimática (465)

Uma característica da DPP IV de *G. b. brevicaudus* é a aparente retenção do peptídeo de sinal na porção N-terminal. A grande homologia entre o N-terminal da DPP IV de *B. alternatus* e a de *G. b. brevicaudus* indica que este peptídeo de sinal também está presente na enzima de *B. alternatus*; situação semelhante também tem sido sugerida para alguns elapídeos (257). Assim, diferentemente de outras proteínas encontradas em peçonhas de serpentes, como serinoproteinases, metaloproteinases e PLA₂, que sofrem processamento na região N-terminal, a DPP IV aparentemente não passa por este processo. Esta

situação com DPP IV de serpentes também difere de estudos com DPP IV solúvel de soro humano (466) e DPP IV da secreção de pele de sapo (355), que não possuem o peptídeo de sinal na sua forma madura.

Além da abordagem descrita acima, também tentamos clonar o gene inteiro através de LD-PCR, para posteriormente expressar a proteína recombinante. Conseguimos amplificar um fragmento correspondendo ao tamanho do gene da DPP IV (~2,3 kb), porém não conseguimos a reprodutibilidade desejada.

5.2. Expressão da proteína recombinante correspondente à porção final do gene da DPP IV

Devido às dificuldades encontradas na clonagem do gene inteiro da DPP IV, optamos por expressar a proteína de forma parcial, focando a porção final da enzima que contém o sítio ativo da peptidase e que poderia fornecer dados importantes de funcionalidade bem como de estrutura primária desta região. Outro fator que influenciou nesta decisão foi o fato de não termos disponível um sistema mais complexo de expressão de proteínas maiores, como o sistema de baculovirus, que utiliza a maquinaria de células eucariotas para expressar proteínas complexas.

As amplificações desta parte do gene foram realizadas a partir de *primers* desenhados baseado em alinhamentos de DPP IV de várias espécies, inclusive da sequência do gene da DPP IV da glândula de peçonha de *G. b. brevicaudus*(256). Os primers foram desenhados para conter sítios de clivagem para enzimas de restrição (*Nde* I e *Xho* I), o que facilitou a construção subsequente do cassete de expressão da proteína recombinante da DPP IV

truncada. A porção truncada tinha 700 pb e correspondeu a uma proteína de 26 kDa.

Clonamos a região final do gene (Figs. 36 e 37) e iniciamos a construção do cassete de expressão usando o vetor pET-TEV, que é o vetor pET-28a modificado pela inserção de um sítio da protease TEV (*tobacco etch virus*); esta protease auxilia na clivagem da cauda de histidina. Além disso, esse vetor possui uma etiqueta com uma sequência que codifica seis histidinas (His-tag) na região N-terminal da proteína recombinante, o que facilita a purificação da proteína por cromatografia de afinidade empregando-se resinas contendo níquel ou cobalto (456). Ainda neste vetor, o sítio de clivagem por trombina (CTGGTGCCGCGCGGCAGC) é substituído por um sítio de TEV protease (GAAAACCTGTATTTTCAGGGC) e ele não possui a T7 tag (ATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGC). Optamos por utilizar este vetor, pois teríamos duas alternativas de purificação.

Após certificação da montagem correta do cassete de expressão, tanto na cepa de *E. coli* DH5 α , quanto nas cepas de *E. coli* BL21 (DE3, pLYS-S e pRIL) que são deficientes em proteases, iniciamos a produção da proteína recombinante. Realizamos os primeiros testes nas temperaturas de 30° e 37° C e nos tempos de 4, 6 e 24 horas, no entanto não conseguimos induzir a produção de proteína nestas condições uma vez que nenhuma banda mostrou expressão maior após a indução com o IPTG na cepas de *E. coli* usadas.

Apesar da baixa expressão da proteína, realizamos algumas purificações em resina carregada com níquel, para comprovar que nada havia sido expresso; de fato, estes experimentos indicaram que a proteína recombinante não foi

expressa em grandes quantidades nas condições utilizadas. Outro teste usado para avaliar a expressão da proteína foi a análise por *western blotting* com o anticorpo anti-His tag, que é específico para a cauda de histidina. O resultado deste teste indicou que a proteína estava sendo expressa, porém em nível muito baixo que não permitiu uma quantificação e purificação. Os resultados do *blotting* mostraram a proteína expressa em maior quantidade na fração insolúvel (pellet), mas ela também foi detectada em baixa quantidade no *flow-through* (sobrenadante).

Apesar de muitas tentativas de expressar a proteína recombinante em grande escala (litros), não conseguimos purificá-la utilizando a coluna de níquel, talvez devido à baixa expressão da proteína neste sistema, ou por apresentar uma conformação onde a cauda de histidina não estava disponível para se ligar ao níquel, ou devido a sua alta complexidade estrutural.

5.3. Purificação parcial da DPP IV

Como não tivemos sucesso em expressar e purificar a DPP IV recombinante, iniciamos a purificação da peptidase a partir da peçonha de *B. alternatus*, seguindo em parte o protocolo descrito para a enzima de *G. b. brevicaudus*(256). Usando uma combinação de gel filtração e troca iônica, isolamos uma proteína com massa molecular de 116 kDa por SDS-PAGE, valor este que é idêntico ao da DPP IV de *G. b. brevicaudus*. Conforme indicado acima, a massa molecular teórica da DPP IV da *B. alternatus* é de ~86 kDa, o que significa uma diferença de ~30 kDa entre este valor e o valor determinado por eletroforese. A principal explicação para esta discrepância de massa molecular é

a extensa glicosilação da proteína, uma vez que a enzima possui 10 sítios de glicosilação na sua estrutura. De fato, é bem conhecido que as DPP IV são extensamente glicosiladas (256). Situação semelhante (extensa glicosilação) também afeta outras peptidases de peçonhas, como a APA (ver Seção 1.4 deste capítulo). A identidade da proteína isolada como sendo DPP IV foi confirmada pelo fato da atividade ser totalmente inibida pela diprotina A, inibidor específico destas enzimas. Embora a pureza da proteína obtida requer confirmação por HPLC, os dados obtidos até o momento mostram a viabilidade de purificar e caracterizar esta enzima, permitindo assim a obtenção desta peptidase para estudos da sua atividade biológica e avaliação da sua contribuição às manifestações do envenenamento.

5.4. Clonagem parcial do gene da APA

A atividade da APA já foi detectada em peçonhas ofídicas, porém não foi observada na peçonha de *Bothrops alternatus* (258). De modo semelhante, não detectamos ESTs para APA na biblioteca da glândula de *B. alternatus*. Por outro lado, Ogawa *et al.* (291) caracterizaram o gene desta peptidase na glândula de peçonha de *G. b. brevicaudus* e, mais recentemente, Vaiyapuri *et al.* (329) relataram estudo semelhante onde descreveram a rhiminopeptidase A, uma APA da peçonha da víbora africana *Bitis gabonica rhinoceros*. Estas duas enzimas são zino-metalopeptidases da família M1, e possuem massa molecular de 150 kDa (rhiminopeptidase A) e 170 kDa (APA de *G. b. brevicaudus*) comparada com 110 kDa para ambas as enzimas calculada a partir da sequência deduzida do cDNA. Assim como a DPP IV, as APA de peçonha são glicoproteínas com vários sítios

de glicosilação, e esta glicosilação contribui consideravelmente para a massa molecular elevada destas enzimas (~32% no caso da rhiminopeptidase A). Baseado nestes estudos, investigamos a presença do gene da APA em *B. alternatus*. Os primers foram desenhados para diversas partes do gene, para permitir a clonagem do gene inteiro. Utilizamos como molde para estas ampliações o cDNA obtido na biblioteca de EST. Utilizando uma combinação de PCR normal e LD-PCR conseguimos clonar a parte inicial e média do gene, sendo que as regiões clonadas mostraram grande homologia (quase idêntica) com a sequência da APA de *G. b. brevicaudus*. Esta clonagem parcial demonstra pela primeira vez a expressão desta proteína no tecido glandular de *B. alternatus*.

5.5. Clonagem parcial do gene da APM

As ampliações do gene da APM foram realizadas a partir de *primers* desenhados baseado em alinhamentos de APM de várias espécies e também utilizando *primers* degenerados ou não. Clonamos parcialmente o gene, numa região correspondendo à porção média da ORF (*open reading frame*), que mostra alta semelhança com a sequência da APM/N de *G. b. brevicaudus* (número de acesso no GenBank - AB332387.1). Este resultado corrobora com a alta atividade desta enzima na peçonha de *B. alternatus*(258). Esta identificação parcial demonstra pela primeira vez a expressão desta proteína no tecido glandular de *B. alternatus*.

6. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste capítulo mostram claramente a presença de três peptidases (APA, APM e DPP IV) na glândula de peçonha de *B. alternatus* e estão de acordo com a detecção das atividades enzimáticas correspondentes na peçonha. A presença destas peptidases na peçonha de *B. alternatus* (e outras espécies de *Bothrops*) levanta a possibilidade de que elas podem contribuir para o envenenamento, possivelmente modulando respostas locais (dor) e sistêmicas (alterações cardiovasculares mediadas por peptídeos). A semelhança estrutural entre a DPP IV de *B. alternatus* e a de outras serpentes como a *G. b. brevicaudus* e várias espécies elapídicas, e entre a APA de *B. alternatus* e a de *G. b. brevicaudus* indica alto grau de conservação entre gêneros, o que pode apontar também para funções biológicas conservadas. Apesar da identificação e caracterização parcial de APA e DPP IV em algumas peçonhas, até o momento nenhum estudo tem investigado o papel destas enzimas no envenenamento. Considerando as dificuldades encontradas em expressar a DPP IV neste trabalho, a purificação e caracterização desta peptidase (e outras como APA e APM) da peçonha de *B. alternatus* (e outras peçonhas ofídicas) abre o caminho para o estudo das suas ações biológicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Elliott WB. Chemistry and immunology of reptilian venoms. In: *Biology of the Reptilia*. Vol. 8. Physiology B. (Gans C, Gans KA, eds.). 1978. pp. 163-436. Academic Press, New York.
- 2) Bieber AL. Metal and nonprotein constituents in snake venoms. In: *Snake venoms. Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 52. (Lee CY, ed.). (1979). pp. 295-306. Springer-Verlag, Berlin.
- 3) Lee CY. (Snake venoms. *Handbook of Experimental Pharmacology*. ed.) (1979). Vol. 52. Springer-Verlag, Berlin.
- 4) Bailey GS (ed.) *Enzymes from Snake Venom*. Alaken, Inc., Fort Collins. (1998).
- 5) Fox JW, Serrano SM. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. *FEBS J*. 2008 Jun;275(12):3016-30.
- 6) Calvete JJ. Venomics: digging into the evolution of venomous systems and learning to twist nature to fight pathology. *J Proteomics*. 2009 Mar 6;72(2):121-6. Epub 2009 Jan 23.
- 7) Karlsson E. Chemistry of protein toxins in snake venoms. In: *Snake Venoms. Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 52. (1979) (Lee CY, ed.). pp. 159-212. Springer Verlag, Berlin.
- 8) Harvey AL. Twenty years of dendrotoxins. *Toxicon*. 2001 Jan;39(1):15-26.
- 9) Nirthanan S, Gopalakrishnakone P, Gwee MC, Khoo HE, Kini RM. Non-conventional toxins from Elapid venoms. *Toxicon*. 2003 Mar;41(4):397-407.
- 10) Nirthanan S, Gwee MC. Three-finger alpha-neurotoxins and the nicotinic acetylcholine receptor, forty years on. *J Pharmacol Sci*. 2004 Jan;94(1):1-17.
- 11) Phui Yee JS, Nanling G, Afifiyan F, Donghui M, Siew Lay P, Armugam A, Jeyaseelan K. Snake postsynaptic neurotoxins: gene structure, phylogeny and applications in research and therapy. *Biochimie*. 2004 Feb;86(2):137-49.
- 12) Rossetto O, Morbiato L, Caccin P, Rigoni M, Montecucco C. Presynaptic enzymatic neurotoxins. *J Neurochem*. 2006 Jun;97(6):1534-45.
- 13) Larréché S, Mion G, Clapson P, Debien B, Wybrecht D, Goyffon M. [Neurotoxins from snake venom]. *Ann Fr Anesth Reanim*. 2008 Apr;27(4):310-6.
- 14) Kornhauser R, Hart AJ, Reeve S, Smith AI, Fry BG, Hodgson WC. Variations in the pharmacological profile of post-synaptic neurotoxins isolated from the venoms of the Papuan (*Oxyuranus scutellatus canni*) and coastal (*Oxyuranus scutellatus scutellatus*) taipans. *Neurotoxicology*. 2010 Mar;31(2):239-43.
- 15) Chaisakul J, Konstantakopoulos N, Smith AI, Hodgson WC. Isolation and characterisation of P-EPTX-Ap1a and P-EPTX-Ar1a: pre-synaptic neurotoxins from the venom of the northern (*Acanthophis praelongus*) and Irian Jaya (*Acanthophis rugosus*) death adders. *Biochem Pharmacol*. 2010 Sep 15;80(6):895-902.
- 16) Aird SD. Ophidian envenomation strategies and the role of purines. *Toxicon*. 2002 Apr;40(4):335-93.
- 17) Sales PB, Santoro ML. Nucleotidase and DNase activities in Brazilian snake venoms. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2008 Jan;147(1):85-95.
- 18) Dhananjaya BL, D Souza CJ. An overview on nucleases (DNase, RNase, and phosphodiesterase) in snake venoms. *Biochemistry (Mosc)*. 2010 Jan;75(1):1-6.
- 19) Kochva E (1978) Oral glands of the Reptilia. In: *Biology of the Reptilia*. Vol. 8. Physiology B. (Gans C, Gans KA, eds.). pp. 43-94. Academic Press, New York.

-
- 20) Kochva E. The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. *Toxicon*. 1987;25(1):65-106.
- 21) Bdolah A. The venom glands of snakes and venom secretion. In: *Snake venoms. Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 52. (Lee CY, ed.). pp. 41-57. (1979) Springer-Verlag, Berlin.
- 22) Weinstein SA, Kardong KV. Properties of Duvernoy's secretions from opisthoglyphous and aglyphous colubrid snakes. *Toxicon*. 1994 Oct;32(10):1161-85.
- 23) Hayes WK, Lavín-Murcio P, Kardong KV. Delivery of duvernoy's secretion into prey by the brown tree snake, *Boiga irregularis* (Serpentes:Colubridae). *Toxicon*. 1993 Jul;31(7):881-7
- 24) Fry BG, Scheib H, van der Weerd L, Young B, McNaughtan J, Ramjan SF, Vidal N, Poelmann RE, Norman JA. Evolution of an arsenal: structural and functional diversification of the venom system in the advanced snakes (Caenophidia). *Mol Cell Proteomics*. 2008 Feb;7(2):215-46.
- 25) Warshawsky H, Haddad A, Goncalves RP, Valeri V, De Lucca FL. Fine structure of the venom gland epithelium of the South American rattlesnake and radioautographic studies of protein formation by the secretory cells. *Am J Anat*. 1973 Sep;138(1):79-119.
- 26) De Lucca FL, Haddad A, Kochva E, Rothschild AM, Valeri V. Protein synthesis and morphological changes in the secretory epithelium of the venom gland of *Crotalus durissus terrificus* at different times after manual extraction of venom. *Toxicon*. 1974 Aug;12(4):361-8.
- 27) Marchi F, Haddad A, De Lucca FL. Radioautographic and biochemical studies of secretion of venom protein in the South American rattlesnake *Crotalus durissusterrificus*. *J Exp Zool*. 1978 Mar;203(3):429-42.
- 28) Carneiro SM, Fernandes W, Sant'Anna SS, Yamanouye N. Microvesicles in the venom of *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes, Viperidae). *Toxicon*. 2007 Jan;49(1):106-10.
- 29) Yamanouye N, Britto LR, Carneiro SM, Markus RP. Control of venom production and secretion by sympathetic outflow in the snake *Bothrops jararaca*. *J Exp Biol*. 1997 Oct;200(Pt 19):2547-56.
- 30) Yamanouye N, Carneiro SM, Scrivano CN, Markus RP. Characterization of beta-adrenoceptors responsible for venom production in the venom gland of the snake *Bothrops jararaca*. *Life Sci*. 2000 Jun 8;67(3):217-26.
- 31) Yamanouye N, Kerchove CM, Moura-da-Silva AM, Carneiro SM, Markus RP. Long-term primary culture of secretory cells of *Bothrops jararaca* venom gland for venom production in vitro. *Nat Protoc*. 2006;1(6):2763-6.
- 32) Monteiro RQ, Dutra DL, Machado OL, Carlini CR, Guimarães JA, Bon C, Zingali RB (1998a) *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 120, 791-798.
- 33) Monteiro RQ, Yamanouye N, Carlini CR, Guimarães JA, Bon C, Zingali RB. 1998b. *Toxicon* 36, 153-163.
- 34) Carneiro SM, Fernandes W, Della Casa MS, Sesso A. Cytochemical analysis of acid phosphatase activity in the venom secretory cells of *Bothrops jararaca*. *Tissue Cell*. 2001 Aug;33(4):311-7.
- 35) Carneiro SM, Assakura MT, Barence FA, Cardoso SR, de Martins Camargo AC, Sesso A. Immunolocalization of venom metalloproteases in venom glands of adult and of newborn snakes of *Bothrops jararaca*. *Tissue Cell*. 2002 Dec;34(6):381-9.
- 36) Kerchove CM, Carneiro SM, Markus RP, Yamanouye N. Stimulation of the alpha-adrenoceptor triggers the venom production cycle in the venom gland of *Bothrops jararaca*. *J Exp Biol*. 2004 Jan;207(Pt 3):411-6.
- 37) Kerchove CM, Luna MS, Zabli MB, Lazari MF, Smaili SS, Yamanouye N. Alpha1-adrenoceptors trigger the snake venom production cycle in secretory cells by activating phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis and ERK signaling pathway. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2008 Aug;150(4):431-7.
- 38) Luna MS, Hortencio TM, Ferreira ZS, Yamanouye N. Sympathetic outflow activates the venom gland of the snake *Bothrops jararaca* by regulating the activation of transcription factors and the synthesis of venom

gland proteins.

J Exp Biol. 2009 May;212(Pt 10):1535-43.

39) Carneiro SM, Pinto VR, Jared C, Lula LA, Faria FP, Sesso A. Morphometric studies on venom secretory cells from *Bothrops jararacussu* (Jararacuçu) before and after venom extraction. *Toxicon*. 1991;29(6):569-80.

40) Oron U, Bdolah A. Intracellular transport of proteins in active and resting secretory cells of the venom gland of *Vipera palaestinae*. *J Cell Biol*. 1978 Aug;78(2):488-502.

41) Oron U, Kinamon S, Bdolah A. Asynchrony in the synthesis of secretory proteins in the venom gland of the snake *Vipera palaestinae*. *Biochem J*. 1978 Sep 15;174(3):733-9.

42) Paine MJ, Desmond HP, Theakston RD, Crampton JM. Purification, cloning, and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloprotease, jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. Insights into the disintegrin gene family. *J Biol Chem*. 1992 Nov 15;267(32):22869-76.

43) Rotenberg D, Bamberger ES, Kochva E. Studies on ribonucleic acid synthesis in the venom glands of *Vipera palaestinae* (Ophidia, Reptilia). *Biochem J*. 1971 Feb;121(4):609-12.

44) Vandenplas ML, Vandenplas S, Brebner K, Bester AJ, Boyd CD. Characterization of the messenger RNA population coding for components of viperid snake venom. *Toxicon*. 1985;23(2):289-305.

45) Liu LF, Chang CC, Liao MY, Kuo KW. Genetic characterization of the mRNAs encoding alpha-bungarotoxin: isoforms and RNA editing in *Bungarus multicinctus* gland cells. *Nucleic Acids Res*. 1998 Dec 15;26(24):5624-9.

46) Taylor D, Iddon D, Sells P, Semoff S, Theakston RD. An investigation of venom secretion by the venom gland cells of the carpet viper (*Echis carinatus*). *Toxicon*. 1986;24(7):651-9.

47) Ogawa T, Onoue H, Nakagawa K, Nomura S, Sueishi K, Hattori S, Kihara H, Ohno M. Localization and expression of phospholipases A2 in *Trimeresurus flavoviridis* (habu snake) venom gland. *Toxicon*. 1995 Dec;33(12):1645-52.

48) Lachumanan R, Armugam A, Durairaj P, Gopalakrishnakone P, Tan CH, Jeyaseelan K. In situ hybridization and immunohistochemical analysis of the expression of cardiotoxin and neurotoxin genes in *Naja naja sputatrix*. *J Histochem Cytochem*. 1999 Apr;47(4):551-60.

49) Brown RS, Brown MB, Bdolah A, Kochva E. Accumulation of some secretory enzymes in venom glands of *Vipera palaestinae*. *Am J Physiol*. 1975 Dec;229(6):1675-9.

50) Gonçalves LR, Yamanouye N, Nuñez-Burgos GB, Furtado MF, Britto LR, Nicolau J. Detection of calcium-binding proteins in venom and Duvernoy's glands of South American snakes and their secretions. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*. 1997 Oct;118(2):207-11.

51) Sells PG, Hommel M, Theakston RD. Venom production in snake venom gland cells cultured in vitro. *Toxicon*. 1989;27(11):1245-9.

52) Golubkov VS, Lavrovskaja VP, Lezhnev EI, Savel'eva LN, Moshkov DA. [The cultivation of fragments of the parotid venom-secreting gland in the common adder (*Vipera berus*). *Tsitologija*. 1997;39(7):537-40.

53) Golubkov VS, Lezhnev EI, Bezgina EN, Moshkov DA. [Primary culture of epithelial secretory cells from venom gland of the common adder *Vipera berus*. *Tsitologija*. 2001;43(5):453-61.

54) Duarte MM, Montes de Oca H, Diniz CR, Fortes-Dias CL. Primary culture of venom gland cells from the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). *Toxicon*. 1999 Dec;37(12):1673-82.

55) Cousin X, Bon S, Massoulié J, Bon C. Identification of a novel type of alternatively spliced exon from the acetylcholinesterase gene of *Bungarus fasciatus*. Molecular forms of acetylcholinesterase in the snake liver and muscle. *J Biol Chem*. 1998 Apr 17;273(16):9812-20.

-
- 56) Deshimaru M, Ogawa T, Nakashima K, Nobuhisa I, Chijiwa T, Shimohigashi Y, Fukumaki Y, Niwa M, Yamashina I, Hattori S, Ohno M. Accelerated evolution of crotalinae snake venom gland serine proteases. *FEBS Lett.* 1996 Nov 11;397(1):83-8.
- 57) Kini RM, Evans HJ. The role of enzymatic activity in inhibition of the extrinsic tenase complex by phospholipase A2 isoenzymes from *Naja nigricollis* venom. *Toxicon.* 1995 Dec;33(12):1585-90.
- 58) Kini RM. Are C-type lectin-related proteins derived by proteolysis of metalloproteinase/disintegrin precursor proteins? *Toxicon.* 1996 Nov-Dec;34(11-12):1287-94.
- 59) Ramos OH, Selistre-de-Araujo HS. Comparative analysis of the catalytic domain of hemorrhagic and non-hemorrhagic snake venom metalloproteinases using bioinformatic tools. *Toxicon.* 2004 Oct;44(5):529-38.
- 60) Fox JW, Serrano SM. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 repolysin family of metalloproteinases. *Toxicon.* 2005 Jun 15;45(8):969-85.
- 61) Fox JW, Serrano SM. Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research. *J Proteomics.* 2009 Mar 6;72(2):200-9. Epub 2009 Jan 21.
- 62) Nakashima K, Nobuhisa I, Ogawa T, Hattori M, Sakaki Y, Kihara H, Ohno M. Polymorphisms of *Trimeresurus flavoviridis* venom gland phospholipase A2 isozyme genes. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1994 Aug;58(8):1510-1.
- 63) Pan H, Liu XL, Ou-Yang LL, Yang GZ, Zhou YC, Li ZP, Wu XF. Diversity of cDNAs encoding phospholipase A2 from *Agkistrodon halys pallas* venom, and its expression in *E. coli*. *Toxicon.* 1998 Aug;36(8):1155-63.
- 64) Jeyaseelan K, Armugam A, Donghui M, Tan NH. Structure and phylogeny of the venom group I phospholipase A(2) gene. *Mol Biol Evol.* 2000 Jul;17(7):1010-21.
- 65) Ohno M, Chijiwa T, Oda-Ueda N, Ogawa T, Hattori S. Molecular evolution of myotoxic phospholipases A2 from snake venom. *Toxicon.* 2003 Dec 15;42(8):841-54.
- 66) Kashima S, Roberto PG, Soares AM, Astolfi-Filho S, Pereira JO, Giuliati S, Faria M Jr, Xavier MA, Fontes MR, Giglio JR, França SC. Analysis of *Bothrops jararacussu* venomous gland transcriptome focusing on structural and functional aspects: I--gene expression profile of highly expressed phospholipases A2. *Biochimie.* 2004 Mar;86(3):211-9.
- 67) de Paula RC, Castro HC, Rodrigues CR, Melo PA, Fuly AL. Structural and pharmacological features of phospholipases A2 from snake venoms. *Protein Pept Lett.* 2009;16(8):899-907.
- 68) Gong N, Armugam A, Jeyaseelan K. Molecular cloning, characterization and evolution of the gene encoding a new group of short-chain alpha-neurotoxins in an Australian elapid, *Pseudonaja textilis*. *FEBS Lett.* 2000 May 19;473(3):303-10.
- 69) Fujimi TJ, Nakajyo T, Nishimura E, Ogura E, Tsuchiya T, Tamiya T. Molecular evolution and diversification of snake toxin genes, revealed by analysis of intron sequences. *Gene.* 2003 Aug 14;313:111-8.
- 70) Peng LS, Zhong XF, Huang YS, Zhang Y, Zheng SL, Wei JW, Wu WY, Xu AL. Molecular cloning, expression and characterization of three short chain alpha-neurotoxins from the venom of sea snake--Hydrophiinae *Hydrophis cyanocinctus* Daudin. *Toxicon.* 2003 Dec;42(7):753-61.
- 71) Pungercar J, Krizaj I. Understanding the molecular mechanism underlying the presynaptic toxicity of secreted phospholipases A2. *Toxicon.* 2007 Dec 1;50(7):871-92. Epub 2007 Aug 22.
- 72) Zhou XD, Ding CH, Tai H, Jin Y, Chen RQ, Lu QM, Wang WY, Xiong YL. A novel disintegrin, jerdonatin, inhibits platelet aggregation and sperm-egg binding. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2004 Sep;139(1):117-22.

-
- 73) Hite LA, Shannon JD, Bjarnason JB, Fox JW. Sequence of a cDNA clone encoding the zinc metalloproteinase hemorrhagic toxin e from *Crotalus atrox*: evidence for signal, zymogen, and disintegrin-like structures. *Biochemistry*. 1992 Jul 14;31(27):6203-11.
- 74) Kini RM, Evans HJ. Structural domains in venom proteins: evidence that metalloproteinases and nonenzymatic platelet aggregation inhibitors (disintegrins) from snake venoms are derived by proteolysis from a common precursor. *Toxicon*. 1992 Mar;30(3):265-93.
- 75) Murayama N, Hayashi MA, Ohi H, Ferreira LA, Hermann VV, Saito H, Fujita Y, Higuchi S, Fernandes BL, Yamane T, de Camargo AC. Cloning and sequence analysis of a *Bothrops jararaca* cDNA encoding a precursor of seven bradykinin-potentiating peptides and a C-type natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Feb 18;94(4):1189-93.
- 76) Ferreira LA, Galle A, Raida M, Schrader M, Lebrun I, Habermehl G. Isolation: analysis and properties of three bradykinin-potentiating peptides (BPP-II, BPP-III, and BPP-V) from *Bothrops neuwiedi* venom. *J Protein Chem*. 1998 Apr;17(3):285-9.
- 77) Ianzer D, Konno K, Marques-Porto R, Vieira Portaro FC, Stöcklin R, Martins de Camargo AC, Pimenta DC. Identification of five new bradykinin potentiating peptides (BPPs) from *Bothrops jararaca* crude venom by using electrospray ionization tandem mass spectrometry after a two-step liquid chromatography. *Peptides*. 2004 Jul;25(7):1085-92.
- 78) Gomes CL, Konno K, Conceição IM, Ianzer D, Yamanouye N, Prezoto BC, Assakura MT, Rádis-Baptista G, Yamane T, Santos RA, de Camargo AC, Hayashi MA. Identification of novel bradykinin-potentiating peptides (BPPs) in the venom gland of a rattlesnake allowed the evaluation of the structure-function relationship of BPPs. *Biochem Pharmacol*. 2007 Nov 1;74(9):1350-60.
- 79) Gibbs HL, Sanz L, Calvete JJ. Snake population venomomics: proteomics-based analyses of individual variation reveals significant gene regulation effects on venom protein expression in *Sistrurus rattlesnakes*. *J Mol Evol*. 2009 Feb;68(2):113-25.
- 80) Zelanis A, Tashima AK, Rocha MM, Furtado MF, Camargo AC, Ho PL, Serrano SM. Analysis of the ontogenetic variation in the venom proteome/peptidome of *Bothrops jararaca* reveals different strategies to deal with prey. *J Proteome Res*. 2010 May 7;9(5):2278-9.
- 81) Lomonte B, Carmona E. Individual expression patterns of myotoxin isoforms in the venom of the snake *Bothrops asper*. *Comp Biochem Physiol B*. 1992 Jun;102(2):325-9.
- 82) Pimenta DC, Prezoto BC, Konno K, Melo RL, Furtado MF, Camargo AC, Serrano SM. Mass spectrometric analysis of the individual variability of *Bothrops jararaca* venom peptide fraction. Evidence for sex-based variation among the bradykinin-potentiating peptides. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2007;21(6):1034-42.
- 83) Chijiwa T, Yamaguchi Y, Ogawa T, Deshimaru M, Nobuhisa I, Nakashima K, Oda-Ueda N, Fukumaki Y, Hattori S, Ohno M. Interisland evolution of *Trimeresurus flavoviridis* venom phospholipase A(2) isozymes. *J Mol Evol*. 2003 Mar;56(3):286-93.
- 84) Chijiwa T, Hamai S, Tsubouchi S, Ogawa T, Deshimaru M, Oda-Ueda N, Hattori S, Kihara H, Tsunasawa S, Ohno M. Interisland mutation of a novel phospholipase A2 from *Trimeresurus flavoviridis* venom and evolution of Crotalinae group II phospholipases A2. *J Mol Evol*. 2003 Nov;57(5):546-54.
- 85) Tsai IH, Wang YM, Chen YH, Tu AT. Geographic variations, cloning, and functional analyses of the venom acidic phospholipases A2 of *Crotalus viridis viridis*. *Arch Biochem Biophys*. 2003 Mar 15;411(2):289-96.
- 86) Alape-Girón A, Sanz L, Escolano J, Flores-Díaz M, Madrigal M, Sasa M, Calvete JJ. Snake venomomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*: geographic, individual, and ontogenetic variations. *J Proteome Res*. 2008 Aug;7(8):3556-71.
- 87) Zupunski V, Kordis D, Gubensek F. Adaptive evolution in the snake venom Kunitz/BPTI protein family. *FEBS Lett*. 2003 Jul 17;547(1-3):131-6.

-
- 88) Jiang ZJ, Castoe TA, Austin CC, Burbrink FT, Herron MD, McGuire JA, Parkinson CL, Pollock DD. Comparative mitochondrial genomics of snakes: extraordinary substitution rate dynamics and functionality of the duplicate control region. *BMC Evol Biol.* 2007 Jul 26;7:123.
- 89) Reza MA, Swarup S, Kini RM. Structure of two genes encoding parallel prothrombin activators in *Tropidechis carinatus* snake: gene duplication and recruitment of factor X gene to the venom gland. *J Thromb Haemost.* 2007 Jan;5(1):117-26.
- 90) Yan J, Li H, Zhou K. Evolution of the mitochondrial genome in snakes: gene rearrangements and phylogenetic relationships. *BMC Genomics.* 2008 Nov 28;9:569.
- 91) Chen N, Zhao S. New progress in snake mitochondrial gene rearrangement. *Mitochondrial DNA.* 2009 Aug;20(4):69-71.
- 92) Chang LS, Cheng YC, Chen CP. Modification of Lys-6 and Lys-65 affects the structural stability of *Taiwan cobra* phospholipase A2. *Protein J.* 2006 Feb;25(2):127-34.
- 93) Schwartz TS, Tae H, Yang Y, Mockaitis K, Van Hemert JL, Proulx SR, Choi JH, Bronikowski AM. A *garter snake* transcriptome: pyrosequencing, de novo assembly, and sex-specific differences. *BMC Genomics.* 2010 Dec 7;11:694.
- 94) Fujimi TJ, Tsuchiya T, Tamiya T. comparative analysis of invaded sequences from group IA phospholipase A(2) genes provides evidence about the divergence period of genes groups and snake families. *Toxicon.* 2002 Jul;40(7):873-84.
- 95) Fujimi TJ, Yasuoka S, Ogura E, Tsuchiya T, Tamiya T. Comparative analysis of gene expression mechanisms between group IA and IB phospholipase A2 genes from sea snake *Laticauda semifasciata*. *Gene.* 2004 May 12;332:179-90.
- 96) Tamiya T, Fujimi TJ. Molecular evolution of toxin genes in Elapidae snakes. *Mol Divers.* 2006 Nov;10(4):529-43.
- 97) Chiou YL, Lin SR, Chang LS. Mutations on N-terminal region of Taiwan cobra phospholipase A(2) result in structurally distorted effects. *Pept Sci.* 2008 Aug;14(8):890-7.
- 98) Aoki N, Deshimaru M, Kihara K, Terada S. Snake fetuin: isolation and structural analysis of new fetuin family proteins from the sera of venomous snakes. *Toxicon.* 2009 Sep 15;54(4):481-90.
- 99) Ma D, Armugam A, Jeyaseelan K. Cytotoxic potency of cardiotoxin from *Naja sputatrix*: development of a new cytolytic assay. *Biochem J.* 2002 Aug 15;366(Pt 1):35-43.
- 100) Kordis D, Gubensek F. The Bov-B lines found in *Vipera ammodytes* toxic PLA2 genes are widespread in snake genomes. *Toxicon.* 1998 Nov;36(11):1585-90.
- 101) Piskurek O, Austin CC, Okada N. Sauria SINEs: Novel short interspersed retroposable elements that are widespread in reptile genomes. *J Mol Evol.* 2006 May;62(5):630-44.
- 102) Piskurek O, Okada N. Poxviruses as possible vectors for horizontal transfer of retroposons from reptiles to mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Jul 17;104(29):12046-51.
- 103) Kosushkin SA, Borodulina OR, Solov'eva EN, Grechko VV. [A family of short retroposons (Squam1) from squamate reptiles (Reptilia: Squamata): structure, evolution and correlation with phylogeny]. *Mol Biol (Mosk).* 2008 Nov-Dec;42(6):977-89.
- 104) Ikeda N, Chijiwa T, Matsubara K, Oda-Ueda N, Hattori S, Matsuda Y, Ohno M. Unique structural characteristics and evolution of a cluster of venom phospholipase A2 isozyme genes of *Protobothrops flavoviridis* snake. *Gene.* 2010 Aug 1;461(1-2):15-25.
- 105) Zha XD, Liu J, Xu KS. cDNA cloning, sequence analysis, and recombinant expression of akitonin beta, a

C-type lectin-like protein from *Agkistrodon acutus*. Acta Pharmacol Sin. 2004 Mar;25(3):372-7.

106) Valente RH, Guimarães PR, Junqueira M, Neves-Ferreira AG, Soares MR, Chapeaurouge A, Trugilho MR, León IR, Rocha SL, Oliveira-Carvalho AL, Wermelinger LS, Dutra DL, Leão LI, Junqueira-de-Azevedo IL, Ho PL, Zingali RB, Perales J, Domont GB. *Bothrops insularis* venomomics: a proteomic analysis supported by transcriptomic-generated sequence data. J Proteomics. 2009 Mar 6;72(2):241-55.

107) Siigur E, Aaspõllu A, Siigur J. Sequence diversity of *Vipera lebetina* snake venom gland serine proteinase homologs--result of alternative-splicing or genome alteration. Gene. 2001 Jan 24;263(1-2):199-203.

108) Matsumoto K, Hiraiwa N, Yoshiki A, Ohnishi M, Kusakabe M. Tenascin-C expression and splice variant in habu snake venom-induced glomerulonephritis. Exp Mol Pathol. 2002 Jun;72(3):186-95.

109) Leão LI, Ho PL, Junqueira-de-Azevedo Ide L. Transcriptomic basis for an antiserum against *Micrurus corallinus* (coral snake) venom. BMC Genomics. 2009 Mar 16;10:112.

110) Faure G, Choumet V, Bouchier C, Camoin L, Guillaume JL, Monegier B, Vuilhorgne M, Bon C. The origin of the diversity of crotoxin isoforms in the venom of *Crotalus durissus terrificus*. Eur J Biochem. 1994 Jul 1;223(1):161-4.

111) Gong N, Armugam A, Mirtschin P, Jeyaseelan K. Cloning and characterization of the *pseudonajatoxin* b precursor. Biochem J. 2001 Sep 15;358(Pt 3):647-56.

112) Earl ST, Birrell GW, Wallis TP, St Pierre LD, Masci PP, de Jersey J, Gorman JJ, Lavin MF. Post-translational modification accounts for the presence of varied forms of nerve growth factor in Australian elapid snake venoms. Proteomics. 2006 Dec;6(24):6554-65.

113) Peichoto ME, Leme AF, Pauletti BA, Batista IC, Mackessy SP, Acosta O, Santoro ML. Autolysis at the disintegrin domain of patagonfibrase, a metalloproteinase from *Philodryas patagoniensis* (Patagonia Green Racer; Dipsadidae) venom. Biochim Biophys Acta. 2010 Sep;1804(9):1937-42.

114) Ho PL, Soares MB, Maack T, Gimenez I, Puerto G, Furtado MF, Raw I. Cloning of an unusual natriuretic peptide from the South American coral snake *Micrurus corallinus*. Eur J Biochem. 1997 Nov 15;250(1):144-9.

115) Higuchi S, Murayama N, Saguchi K, Ohi H, Fujita Y, Camargo AC, Ogawa T, Deshimaru M, Ohno M. Bradykinin-potentiating peptides and C-type natriuretic peptides from snake venom. Immunopharmacology. 1999 Oct 15;44(1-2):129-35.

116) Junqueira-de-Azevedo Ide L, Ho PL. 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. 2002 Oct 16;299(1-2):279-91.

117) Soares AM, Ticli FK, Marcussi S, Lourenço MV, Januário AH, Sampaio SV, Giglio JR, Lomonte B, Pereira PS. Medicinal plants with inhibitory properties against snake venoms. Curr Med Chem. 2005;12(22):2625-41.

118) Moura-da-Silva AM, Paine MJ, Diniz MR, Theakston RD, Crampton JM. The molecular cloning of a phospholipase A2 from *Bothrops jararacussu* snake venom: evolution of venom group II phospholipase A2's may imply gene duplications. J Mol Evol. 1995 Aug;41(2):174-9.

119) Ward RJ, Monesi N, Arni RK, Larson RE, Paço-Larson ML. Sequence of a cDNA encoding bothropstoxin I, a myotoxin from the venom of *Bothrops jararacussu*. Gene. 1995 Apr 24;156(2):305-6.

120) Lizano S, Lambeau G, Lazdunski M. Cloning and cDNA sequence analysis of Lys(49) and Asp(49) basic phospholipase A(2) myotoxin isoforms from *Bothrops asper*. Int J Biochem Cell Biol. 2001 Feb;33(2):127-32.

121) de Oliveira M, Cavalcante WL, Arruda EZ, Melo PA, Dal-Pai Silva M, Gallacci M. Antagonism of myotoxic and paralyzing activities of bothropstoxin-I by suramin. Toxicol. 2003 Sep 15;42(4):373-9.

122) Núñez V, Arce V, Gutiérrez JM, Lomonte B. Structural and functional characterization of myotoxin I, a

Lys49 phospholipase A2 homologue from the venom of the snake *Bothrops atrox*. *Toxicon*. 2004 Jul;44(1):91-101.

123) Roberto PG, Kashima S, Marcussi S, Pereira JO, Astolfi-Filho S, Nomizo A, Giglio JR, Fontes MR, Soares AM, França SC. Cloning and identification of a complete cDNA coding for a bactericidal and antitumoral acidic phospholipase A2 from *Bothrops jararacussu* venom. *Protein J*. 2004 May;23(4):273-85.

124) Roberto PG, Kashima S, Soares AM, Chioato L, Faça VM, Fuly AL, Astolfi-Filho S, Pereira JO, França SC. Cloning and expression of an acidic platelet aggregation inhibitor phospholipase A2 cDNA from *Bothrops jararacussu* venom gland. *Protein Expr Purif*. 2004 Sep;37(1):102-8.

125) de Albuquerque Modesto JC, Spencer PJ, Fritzen M, Valença RC, Oliva ML, da Silva MB, Chudzinski-Tavassi AM, Guarnieri MC. BE-I-PLA2, a novel acidic phospholipase A2 from *Bothrops erythromelas* venom: isolation, cloning and characterization as potent anti-platelet and inductor of prostaglandin I2 release by endothelial cells. *Biochem Pharmacol*. 2006 Jul 28;72(3):377-84.

126) Murayama N, Saguchi K, Mentele R, Assakura MT, Ohi H, Fujita Y, Camargo AC, Higuchi S, Serrano SM. The unusual high molecular mass of *Bothrops* protease A, a trypsin-like serine peptidase from the venom of *Bothrops jararaca*, is due to its high carbohydrate content. *Biochim Biophys Acta*. 2003 Nov 3;1652(1):1-6.

127) Saguchi K, Hagiwara-Saguchi Y, Murayama N, Ohi H, Fujita Y, Camargo AC, Serrano SM, Higuchi S. Molecular cloning of serine proteinases from *Bothrops jararaca* venom gland. *Toxicon*. 2005 Jul;46(1):72-83.

128) Yonamine CM, Prieto-da-Silva AR, Magalhães GS, Rádis-Baptista G, Morganti L, Ambiel FC, Chura-Chambi RM, Yamane T, Camillo MA. Cloning of serine protease cDNAs from *Crotalus durissus terrificus* venom gland and expression of a functional Gyroxin homologue in COS-7 cells. *Toxicon*. 2009 Aug;54(2):110-20.

129) Costa Jde O, Fonseca KC, Mamede CC, Beletti ME, Santos-Filho NA, Soares AM, Arantes EC, Hirayama SN, Selistre-de-Araújo HS, Fonseca F, Henrique-Silva F, Penha-Silva N, de Oliveira F. Bhalternin: Functional and structural characterization of a new thrombin-like enzyme from *Bothrops alternatus* snake venom. *Toxicon*. 2010 Jun 15;55(7):1365-77.

130) Rodrigues VM, Soares AM, Guerra-Sá R, Rodrigues V, Fontes MR, Giglio JR. Structural and functional characterization of neuwiedase, a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Arch Biochem Biophys*. 2000 Sep 15;381(2):213-24.

131) Assakura MT, Silva CA, Mentele R, Camargo AC, Serrano SM. Molecular cloning and expression of structural domains of bothropasin, a P-III metalloproteinase from the venom of *Bothrops jararaca*. *Toxicon*. 2003 Feb;41(2):217-27.

132) Silva CA, Zuliani JP, Assakura MT, Mentele R, Camargo AC, Teixeira CF, Serrano SM. Activation of alpha(M)beta(2)-mediated phagocytosis by HF3, a P-III class metalloproteinase isolated from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Sep 24;322(3):950-6.

133) Modesto JC, Junqueira-de-Azevedo IL, Neves-Ferreira AG, Fritzen M, Oliva ML, Ho PL, Perales J, Chudzinski-Tavassi AM. Insularinase A, a prothrombin activator from *Bothrops insularis* venom, is a metalloprotease derived from a gene encoding protease and disintegrin domains. *Biol Chem*. 2005 Jun;386(6):589-600.

134) Marcussi S, Bernardes CP, Santos-Filho NA, Mazzi MV, Oliveira CZ, Izidoro LF, Fuly AL, Magro AJ, Braz AS, Fontes MR, Giglio JR, Soares AM. Molecular and functional characterization of a new non-hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom with antiplatelet activity. *Peptides*. 2007 Dec;28(12):2328-39.

135) Bernardes CP, Santos-Filho NA, Costa TR, Gomes MS, Torres FS, Costa J, Borges MH, Richardson M, dos Santos DM, de Castro Pimenta AM, Homs-Brandeburgo MI, Soares AM, de Oliveira F. Isolation and structural characterization of a new fibrin(ogen)olytic metalloproteinase from *Bothrops moojenis* snake venom. *Toxicon*. 2008 Mar 15;51(4):574-84.

-
- 136) Itoh N, Tanaka N, Mihashi S, Yamashina I. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme. *J Biol Chem*. 1987 Mar 5;262(7):3132-5.
- 137) Arocas V, Castro HC, Zingali RB, Guillin MC, Jandrot-Perrus M, Bon C, Wisner A. Molecular cloning and expression of bothrojaracin, a potent thrombin inhibitor from snake venom. *Eur J Biochem*. 1997 Sep 1;248(2):550-7.
- 138) Silva MB, Schattner M, Ramos CR, Junqueira-de-Azevedo IL, Guarnieri MC, Lazzari MA, Sampaio CA, Pozner RG, Ventura JS, Ho PL, Chudzinski-Tavassi AM. A prothrombin activator from *Bothrops erythromelas* (jararaca-da-seca) snake venom: characterization and molecular cloning. *Biochem J*. 2003 Jan 1;369(Pt 1):129-39.
- 139) Sant'Ana CD, Bernardes CP, Izidoro LF, Mazzi MV, Soares SG, Fuly AL, Zingali RB, Magro AJ, Braz AS, Fontes MR, Stábeli RG, Sampaio SV, Soares AM. Molecular characterization of BjussuSP-I, a new thrombin-like enzyme with procoagulant and kallikrein-like activity isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Biochimie*. 2008 Mar;90(3):500-7.
- 140) Bouchier C, Boulain JC, Bon C, Ménez A. Analysis of cDNAs encoding the two subunits of crotoxin, a phospholipase A2 neurotoxin from rattlesnake venom: the acidic non enzymatic subunit derives from a phospholipase A2-like precursor. *Biochim Biophys Acta*. 1991 Mar 26;1088(3):401-8.
- 141) Silveira de Oliveira J, Rossan de Brandão Prieto da Silva A, Soares MB, Stephano MA, de Oliveira Dias W, Raw I, Ho PL. Cloning and characterization of an alpha-neurotoxin-type protein specific for the coral snake *Micrurus corallinus*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Jan 27;267(3):887-91.
- 142) Smith LA, Schmidt JJ. Cloning and nucleotide sequences of crotoxin genes. *Toxicon*. 1990;28(5):575-85.
- 143) Rádis-Baptista G, Oguiura N, Hayashi MA, Camargo ME, Grego KF, Oliveira EB, Yamane T. Nucleotide sequence of crotoxin isoform precursors from a single South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). *Toxicon*. 1999 Jul;37(7):973-84.
- 144) Rádis-Baptista G, Kubo T, Oguiura N, Svartman M, Almeida TM, Batistic RF, Oliveira EB, Vianna-Morgante AM, Yamane T. Structure and chromosomal localization of the gene for crotoxin, a toxin from the South American rattlesnake, *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon*. 2003 Dec;42(7):747-52.
- 145) Rádis-Baptista G, Kubo T, Oguiura N, Prieto da Silva AR, Hayashi MA, Oliveira EB, Yamane T. Identification of crotasin, a crotoxin-related gene of *Crotalus durissus terrificus*. *Toxicon*. 2004 Jun 1;43(7):751-9.
- 146) Oguiura N, Collares MA, Furtado MF, Ferrarezzi H, Suzuki H. Intraspecific variation of the crotoxin and crotasin genes in *Crotalus durissus* rattlesnakes. *Gene*. 2009 Oct 1;446(1):35-40. Epub 2009 Jun 10.
- 147) Leduc M, Bon C. Cloning of subunits of convulxin, a collagen-like platelet-aggregating protein from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Biochem J*. 1998 Jul 15;333 (Pt 2):389-93.
- 148) Guimarães-Gomes V, Oliveira-Carvalho AL, Junqueira-de-Azevedo IL, S Dutra DL, Pujol-Luz M, Castro HC, Ho PL, Zingali RB. Cloning, characterization, and structural analysis of a C-type lectin from *Bothrops insularis* (BiL) venom. *Arch Biochem Biophys*. 2004 Dec 1;432(1):1-11.
- 149) Kassab BH, de Carvalho DD, Oliveira MA, Baptista GR, Pereira GA, Novello JC. Cloning, expression, and structural analysis of recombinant BJcuL, a c-type lectin from the *Bothrops jararacussu* snake venom. *Protein Expr Purif*. 2004 Jun;35(2):344-52.
- 150) Kashima S, Soares AM, Roberto PG, Pereira JO, Astolfi-Filho S, Cintra AO, Fontes MR, Giglio JR, de Castro França S. cDNA sequence and molecular modeling of a nerve growth factor from *Bothrops jararacussu* venomous gland. *Biochimie*. 2002 Jul;84(7):675-80.

-
- 151) Boldrini-França J, Rodrigues RS, Fonseca FP, Menaldo DL, Ferreira FB, Henrique-Silva F, Soares AM, Hamaguchi A, Rodrigues VM, Otaviano AR, Homs-Brandeburgo MI. *Crotalus durissus collilineatus* venom gland transcriptome: analysis of gene expression profile. *Biochimie*. 2009 May;91(5):586-95
- 152) Junqueira de Azevedo IL, Farsky SH, Oliveira ML, Ho PL. Molecular cloning and expression of a functional snake venom vascular endothelium growth factor (VEGF) from the *Bothrops insularis* pit viper. A new member of the VEGF family of proteins. *J Biol Chem*. 2001 Oct 26;276(43):39836-42.
- 153) Junqueira-de-Azevedo Ide L, da Silva MB, Chudzinski-Tavassi AM, Ho PL. Identification and cloning of snake venom vascular endothelial growth factor (svVEGF) from *Bothrops erythromelas* pitviper. *Toxicon*. 2004 Oct;44(5):571-5.
- 154) França SC, Kashima S, Roberto PG, Marins M, Ticli FK, Pereira JO, Astolfi-Filho S, Stábili RG, Magro AJ, Fontes MR, Sampaio SV, Soares AM. Molecular approaches for structural characterization of *Bothrops* L-amino acid oxidases with antiprotozoal activity: cDNA cloning, comparative sequence analysis, and molecular modeling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Apr 6;355(2):302-6.
- 155) Rodrigues RS, da Silva JF, Boldrini França J, Fonseca FP, Otaviano AR, Henrique Silva F, Hamaguchi A, Magro AJ, Braz AS, dos Santos JI, Homs-Brandeburgo MI, Fontes MR, Fuly AL, Soares AM, Rodrigues VM. Structural and functional properties of Bp-LAAO, a new L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Biochimie*. 2009 Apr;91(4):490-501.
- 156) Moura-da-Silva AM, Línica A, Della-Casa MS, Kamiguti AS, Ho PL, Crampton JM, Theakston RD. Jararhagin ECD-containing disintegrin domain: expression in *Escherichia coli* and inhibition of the platelet-collagen interaction. *Arch Biochem Biophys*. 1999 Sep 15;369(2):295-301.
- 157) Fernandez JH, Silva CA, Assakura MT, Camargo AC, Serrano SM. Molecular cloning, functional expression, and molecular modeling of bothrostatin, a new highly active disintegrin from *Bothrops jararaca* venom. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Apr 8;329(2):457-64.
- 158) Della-Casa MS, Junqueira-de-Azevedo I, Butera D, Clissa PB, Lopes DS, Serrano SM, Pimenta DC, Magalhães GS, Ho PL, Moura-da-Silva AM. "Insularin, a disintegrin from *Bothrops insularis* venom: inhibition of platelet aggregation and endothelial cell adhesion by the native and recombinant GST-insularin proteins". *Toxicon*. 2011 Jan;57(1):125-33.
- 159) Junqueira-de-Azevedo Ide L, Pertinhez T, Spisni A, Carreño FR, Farah CS, Ho PL. Cloning and expression of calglandulin, a new EF-hand protein from the venom glands of *Bothrops insularis* snake in *E. coli*. *Biochim Biophys Acta*. 2003 May 30;1648(1-2):90-8.
- 160) Adams MD, Kelley JM, Gocayne JD, Dubnick M, Polymeropoulos MH, Xiao H, Merril CR, Wu A, Olde B, Moreno RF, et al. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science*. 1991 Jun 21;252(5013):1651-6.
- 161) Clouscard-Martinato C, Mulsant P, Robic A, Bonnet A, Gasser F, Hatey F. Characterization of FSH-regulated genes isolated by mRNA differential display from pig ovarian granulosa cells. *Anim Genet*. 1998 Apr;29(2):98-106.
- 162) Ewing B, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res*. 1998 Mar;8(3):186-94.
- 163) Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res*. 1998 Mar;8(3):175-85.
- 164) Huang X, Madan A. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res*. 1999 Sep;9(9):868-77.
- 165) Neiva M, Arraes FB, de Souza JV, Rádís-Baptista G, Prieto da Silva AR, Walter ME, Brigido Mde M, Yamane T, López-Lozano JL, Astolfi-Filho S. Transcriptome analysis of the Amazonian viper *Bothrops atrox* venom gland using expressed sequence tags (ESTs). *Toxicon*. 2009 Mar 15;53(4):427-36.
- 166) Cidade DA, Simão TA, Dávila AM, Wagner G, Junqueira-de-Azevedo IL, Ho PL, Bon C, Zingali RB,

Albano RM. *Bothrops jararaca* venom gland transcriptome: analysis of the gene expression pattern. *Toxicon*. 2006 Sep 15;48(4):437-61.

167) Qinghua L, Xiaowei Z, Wei Y, Chenji L, Yijun H, Pengxin Q, Xingwen S, Songnian H, Guangmei Y. A catalog for transcripts in the venom gland of the *Agkistrodon acutus*: identification of the toxins potentially involved in coagulopathy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Mar 10;341(2):522-31.

168) Juárez P, Wagstaff SC, Sanz L, Harrison RA, Calvete JJ. Molecular cloning of *Echis ocellatus* disintegrins reveals non-venom-secreted proteins and a pathway for the evolution of ocellatusin. *J Mol Evol*. 2006 Aug;63(2):183-93.

169) Francischetti IM, My-Pham V, Harrison J, Garfield MK, Ribeiro JM. *Bitis gabonica* (Gaboon viper) snake venom gland: toward a catalog for the full-length transcripts (cDNA) and proteins. *Gene*. 2004 Aug 4;337:55-69.

170) Siang AS, Doley R, Vonk FJ, Kini RM. Transcriptomic analysis of the venom gland of the red-headed krait (*Bungarus flaviceps*) using expressed sequence tags. *BMC Mol Biol*. 2010 Mar 29;11:24.

171) Jiang Y, Li Y, Lee W, Xu X, Zhang Y, Zhao R, Zhang Y, Wang W. Venom gland transcriptomes of two elapid snakes (*Bungarus multicinctus* and *Naja atra*) and evolution of toxin genes. *BMC Genomics*. 2011 Jan 3;12:1.

172) OmPraba G, Chapeaurouge A, Doley R, Devi KR, Padmanaban P, Venkatraman C, Velmurugan D, Lin Q, Kini RM. Identification of a novel family of snake venom proteins Veficolins from *Cerberus rynchops* using a venom gland transcriptomics and proteomics approach. *J Proteome Res*. 2010 Apr 5;9(4):1882-93.

173) Rokyta DR, Wray KP, Lemmon AR, Lemmon EM, Caudle SB. A high-throughput venom-gland transcriptome for the Eastern Diamondback Rattlesnake (*Crotalus adamanteus*) and evidence for pervasive positive selection across toxin classes. *Toxicon*. 2011 Apr;57(5):657-71.

174) Zhang B, Liu Q, Yin W, Zhang X, Huang Y, Luo Y, Qiu P, Su X, Yu J, Hu S, Yan G. Transcriptome analysis of *Deinagkistrodon acutus* venomous gland focusing on cellular structure and functional aspects using expressed sequence tags. *BMC Genomics*. 2006 Jun 15;7:152.

175) Chatrath ST, Chapeaurouge A, Lin Q, Lim TK, Dunstan N, Mirtschin P, Kumar PP, Kini RM. Identification of novel proteins from the venom of a cryptic snake *Drysdalia coronoides* by a combined transcriptomics and proteomics approach. *J Proteome Res*. 2011 Feb 4;10(2):739-50.

176) Wagstaff SC, Harrison RA. Venom gland EST analysis of the saw-scaled viper, *Echis ocellatus*, reveals novel alpha9beta1 integrin-binding motifs in venom metalloproteinases and a new group of putative toxins, renin-like aspartic proteases. *Gene*. 2006 Aug 1;377:21-32.

177) Wagstaff SC, Sanz L, Juárez P, Harrison RA, Calvete JJ. Combined snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of the ocellated carpet viper, *Echis ocellatus*. *J Proteomics*. 2009 Jan 30;71(6):609-23.

178) Casewell NR, Harrison RA, Wüster W, Wagstaff SC. Comparative venom gland transcriptome surveys of the saw-scaled vipers (*Viperidae: Echis*) reveal substantial intra-family gene diversity and novel venom transcripts. *BMC Genomics*. 2009 Nov 30;10:564.

179) Junqueira-de-Azevedo IL, Ching AT, Carvalho E, Faria F, Nishiyama MY Jr, Ho PL, Diniz MR. *Lachesis muta* (Viperidae) cDNAs reveal diverging pit viper molecules and scaffolds typical of cobra (Elapidae) venoms: implications for snake toxin repertoire evolution. *Genetics*. 2006 Jun;173(2):877-89.

180) Sanz L, Escolano J, Ferretti M, Biscoglio MJ, Rivera E, Crescenti EJ, Angulo Y, Lomonte B, Gutiérrez JM, Calvete JJ. Snake venomomics of the South and Central American Bushmasters. Comparison of the toxin composition of *Lachesis muta* gathered from proteomic versus transcriptomic analysis. *J Proteomics*. 2008 Apr 30;71(1):46-60.

181) Ching AT, Rocha MM, Paes Leme AF, Pimenta DC, de Fátima D Furtado M, Serrano SM, Ho PL, Junqueira-de-Azevedo IL. Some aspects of the venom proteome of the Colubridae snake *Philodryas olfersii*

-
- revealed from a Duvernoy's (venom) gland transcriptome. FEBS Lett. 2006 Aug 7;580(18):4417-22.
- 182) Pahari S, Mackessy SP, Kini RM. The venom gland transcriptome of the Desert Massasauga rattlesnake (*Sistrurus catenatus edwardsii*): towards an understanding of venom composition among advanced snakes (Superfamily Colubroidea). BMC Mol Biol. 2007 Dec 20;8:115.
- 183) Campbell JA, Lamar WW. The Venomous Reptiles of Latin America. Comstock Publishing Associates, Cornell University 1989; Press, Ithaca.
- 184) Rosenfeld G, Kalen EM.[Measurement of the coagulation activity of snake venoms: importance to scientific research and therapeutic application]. Rev Paul Med. 1971 Apr;77(4):149-50.
- 185) Furtado MF, Maruyama M, Kamiguti AS, Antonio LC. Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. Toxicon. 1991;29(2):219-26.
- 186) de Roodt AR, Dolab JA, Galarce PP, Gould E, Litwin S, Dokmetjian JC, Segre L, Vidal JC. A study on the venom yield of venomous snake species from Argentina. Toxicon. 1998 Dec;36(12):1949-57.
- 187) Bauab BA, Junqueira GR, Corradini MC, Silveira PV, Nishioka SA. Clinical and epidemiological aspects of the "urutu" lance-headed viper (*Bothrops alternatus*) bite in a Brazilian hospital. Trop Med Parasitol 1994; 45: 243-245.
- 188) Marunak SL, Acosta de Perez O, Ruiz de Torrent RM, Teibler GP, Koscinczuk P, Sanchez Negrette M. Hemorrhagic, edema-forming, proteolytic and myonecrotic activities of viper venoms of *Bothrops alternatus* (víbora de La Cruz). Acta Physiol. Pharmacol Ther Latinoam 1999; 49: 149-154.
- 189) França FOS, Málaque CMS. Acidente botrópico. In: Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes. (Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr V, eds.) 2003; pp. 72-86, Sarvier/FAPESP, São Paulo.
- 190) Warrell DA. Snakebites in Central and South America: epidemiology, clinical features and clinical management. In: Venomous Reptiles of the Western Hemisphere. (Campbell JA, Lamar WW, eds.). 2004; 2: pp. 709-761, Comstock Publishing Associates/Cornell University Press, Ithaca.
- 191) Gutiérrez JM, Rucavado A, Escalante T, Díaz C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. Toxicon. 2005 Jun 15;45(8):997-1011.
- 192) Nisenbom HE, Seki C, Vidal JC. Phospholipase A2 from *Bothrops alternatus* (víbora de la cruz) venom. Purification and some characteristic properties. Toxicon. 1986;24(3):259-72.
- 193) Nisenbom HE, Perazzo JC, Monserrat AJ, Vidal JC. Contribution of phospholipase A2 to the lethal potency of *Bothrops alternatus* (víbora de la cruz) venom. Toxicon. 1986;24(8):807-17.
- 194) Nisenbom HE, Perazzo JC, Monserrat AJ, Vidal JC. Effect of chemical modification with p-bromophenacyl bromide on the enzymatic and lethal properties of phospholipase A2 from *Bothrops alternatus* (Víbora de la Cruz) venom. Toxicon. 1988;26(12):1137-44.
- 195) Flores CA, Zappellini A, Prado-Franceschi J. Lipoyxygenase-derived mediators may be involved in in vivo neutrophil migration induced by *Bothrops erythromelas* and *Bothrops alternatus* venoms. Toxicon. 1993 Dec;31(12):1551-9.
- 196) Rothschild AM. Chromatographic separation of phospholipase A from a histamine releasing component of Brazilian rattlesnake venom (*Crotalus durissus terrificus*). Experientia. 1967 Sep 15;23(9):741-2.
- 197) Antunes E, Rodrigues-Simioni L, Prado-Franceschi J. Cross-neutralization on the histamine-releasing activity of snake venoms. Acta Physiol Pharmacol Latinoam. 1989;39(4):431-8.
- 198) Moura-da-Silva AM, Laing GD, Paine MJ, Dennison JM, Politi V, Crampton JM, Theakston RD. Processing of pro-tumor necrosis factor-alpha by venom metalloproteinases: a hypothesis explaining local

tissue damage following snake bite. Eur J Immunol. 1996 Sep;26(9):2000-5.

199) Ohler M, Georgieva D, Seifert J, von Bergen M, Arni RK, Genov N, Betzel C. The venomics of *Bothrops alternatus* is a pool of acidic proteins with predominant hemorrhagic and coagulopathic activities. J Proteome Res. 2010 May 7;9(5):2422-37.

200) Ponce-Soto LA, Lomonte B, Gutiérrez JM, Rodrigues-Simioni L, Novello JC, Marangoni S. Structural and functional properties of BaTX, a new Lys49 phospholipase A2 homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops alternatus*. Biochim Biophys Acta. 2007 Apr;1770(4):585-93.

201) Garcia Denegri ME, Acosta OC, Huancahuire-Vega S, Martins-de-Souza D, Marangoni S, Maruñak SL, Teibler GP, Leiva LC, Ponce-Soto LA. Isolation and functional characterization of a new acidic PLA(2) Ba SpII RP4 of the *Bothrops alternatus* snake venom from Argentina. Toxicon. 2010 Aug 1;56(1):64-74.

202) Smolka MB, Marangoni S, Oliveira B, Novello JC. Purification and partial characterization of a thrombin-like enzyme, balterobin, from the venom of *Bothrops alternatus*. Toxicon. 1998 Jul;36(7):1059-63.

203) Selistre-de-Araujo HS, Cominetti MR, Terruggi CH, Mariano-Oliveira A, De Freitas MS, Crepin M, Figueiredo CC, Morandi V. 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. 2005 Oct;38(10):1505-11.

204) Cominetti MR, Ribeiro JU, Fox JW, Selistre-de-Araujo HS. BaG, a new dimeric metalloproteinase/disintegrin from the *Bothrops alternatus* snake venom that interacts with alpha5beta1 integrin. Arch Biochem Biophys. 2003 Aug 15;416(2):171-9.

205) Gay CC, Maruñak SL, Teibler P, Ruiz R, Acosta de Pérez OC, Leiva LC. Systemic alterations induced by a *Bothrops alternatus* hemorrhagic metalloproteinase (baltergin) in mice. Toxicon. 2009 Jan;53(1):53-9. Epub 2008 Oct 18.

206) Stábeli RG, Marcussi S, Carlos GB, Pietro RC, Selistre-de-Araújo HS, Giglio JR, Oliveira EB, Soares AM. Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. Bioorg Med Chem. 2004 Jun 1;12(11):2881-6.

207) Castro HC, Dutra DL, Oliveira-Carvalho AL, Zingali RB. Bothroaltein, a thrombin inhibitor from the venom of *Bothrops alternatus*. Toxicon. 1998 Dec;36(12):1903-12.

208) Valério AA, Corradini AC, Panunto PC, Mello SM, Hyslop S. Purification and characterization of a phosphodiesterase from *Bothrops alternatus* snake venom. J Protein Chem. 2002 Nov;21(8):495-503

209) Ramos OH, Kauskot A, Cominetti MR, Bechyne I, Salla Pontes CL, Chareyre F, Manent J, Vassy R, Giovannini M, Legrand C, Selistre-de-Araujo HS, Crépin M, Bonnefoy A. A novel alpha(v)beta (3)-blocking disintegrin containing the RGD motive, DisBa-01, inhibits bFGF-induced angiogenesis and melanoma metastasis. Clin Exp Metastasis. 2008;25(1):53-64.

210) Vitorino-Cardoso AF, Pereira Ramos OH, Honsi-Brandeburgo MI, Selistre-de-Araujo HS. Insights into the substrate specificity of a novel snake venom serine peptidase by molecular modeling. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2006 Jul;144(3):334-42.

211) Guércio RA, Shevchenko A, Shevchenko A, López-Lozano JL, Paba J, Sous. Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. Proteome Sci. 2006 May 11;4:11.

212) Núñez V, Cid P, Sanz L, De La Torre P, Angulo Y, Lomonte B, Gutiérrez JM, Calvete JJ. Snake venomics and antivenomics of *Bothrops atrox* venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Perú and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards pedomorphism. J Proteomics. 2009 Nov 2;73(1):57-78.

213) Mebs D. [Comparative enzyme studies on snake venoms, with special reference to their casein-splitting proteases]. Hoppe Seylers Z Physiol Chem. 1968 Sep;349(9):1115-25

-
- 214) Queiroz GP, Pessoa LA, Portaro FC, Furtado Mde F, Tambourgi DV. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genus. *Toxicon*. 2008 Dec 15;52(8):842-51.
- 215) Gutiérrez JM, Sanz L, Escolano J, Fernández J, Lomonte B, Angulo Y, Rucavado A, Warrell DA, Calvete JJ. Snake venomomics of the Lesser Antillean pit vipers *Bothrops caribbaeus* and *Bothrops lanceolatus*: correlation with toxicological activities and immunoreactivity of a heterologous antivenom. *J Proteome Res*. 2008 Oct;7(10):4396-408.
- 216) Tashima AK, Sanz L, Camargo AC, Serrano SM, Calvete JJ. Snake venomomics of the Brazilian pitvipers *Bothrops cotiara* and *Bothrops fonsecai*. Identification of taxonomy markers. *J Proteomics*. 2008 Oct 7;71(4):473-85.
- 217) Fox JW, Ma L, Nelson K, Sherman NE, Serrano SM. Comparison of indirect and direct approaches using ion-trap and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for exploring viperid venom proteomes. *Toxicon*. 2006 May;47(6):700-14.
- 218) Correa-Netto C, Teixeira-Araujo R, Aguiar AS, Melgarejo AR, De-Simone SG, Soares MR, Foguel D, Zingali RB. Immunome and venome of *Bothrops jararacussu*: a proteomic approach to study the molecular immunology of snake toxins. *Toxicon*. 2010 Jun 15;55(7):1222-35.
- 219) Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990 Oct 5;215(3):403-10.
- 220) Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2002 Aug;Chapter 2:Unit 2.3.
- 221) Tang J, Vosman B, Voorrips RE, van der Linden CG, Leunissen JA. QualitySNP: a pipeline for detecting single nucleotide polymorphisms and insertions/deletions in EST data from diploid and polyploid species. *BMC Bioinformatics*. 2006 Oct 9;7:438.
- 222) Apweiler R, Bairoch A, Wu CH. Protein sequence databases. *Curr Opin Chem Biol*. 2004 Feb;8(1):76-80.
- 223) Jurka J, Kapitonov VV, Pavlicek A, Klonowski P, Kohany O, Walichiewicz J: Repbase Update, a database of eukaryotic repetitive elements. *Cytogenet Genom Res* 2005, 110:462-467.
- 224) Rice P, Longden I, Bleasby A. EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet*. 2000 Jun;16(6):276-7.
- 225) Escalante T, Rucavado A, Fox JW, Gutiérrez JM. Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. *J Proteomics*. 2011 Aug 24;74(9):1781-94.
- 226) Borgheresi RA, Leroy JM, Yogi A, DosSantos RA, Breno MC, Tostes RC. Pharmacologic and molecular characterization of the vascular ETA receptor in the venomous snake *Bothrops jararaca*. *Exp Biol Med* (Maywood). 2006 Jun;231(6):729-35.
- 227) Takeda S, Takeya H, Iwanaga S. Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Apr 20.
- 228) Mandelbaum FR, Reichel AP, Assakura MT. Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops jararaca* (Jararaca). *Toxicon*. 1982;20(6):955-72.
- 229) Souza DH, Iemma MR, Ferreira LL, Faria JP, Oliva ML, Zingali RB, Niewiarowski S, Selistre-de-Araujo HS. The disintegrin-like domain of the snake venom metalloprotease alternagin inhibits alpha2beta1 integrin-mediated cell adhesion. *Arch Biochem Biophys*. 2000 Dec 15;384(2):341-50.
- 230) Cominetti MR, Terruggi CH, Ramos OH, Fox JW, Mariano-Oliveira A, De Freitas MS, Figueiredo CC, Morandi V, Selistre-de-Araujo HS. Alternagin-C, a disintegrin-like protein, induces vascular endothelial cell growth factor (VEGF) expression and endothelial cell proliferation in vitro. *J Biol Chem*. 2004 Apr 30;279(18):18247-55. Epub 2004 Feb 6.

-
- 231) Mariano-Oliveira A, Coelho AL, Terruggi CH, Selistre-de-Araújo HS, Barja-Fidalgo C, De Freitas MS. Alternagin-C, a nonRGD-disintegrin, induces neutrophil migration via integrin signaling. *Eur J Biochem.* 2003 Dec;270(24):4799-808.
- 232) Cominetti MR, Terruggi CH, Ramos OH, Fox JW, Mariano-Oliveira A, De Freitas MS, Figueiredo CC, Morandi V, Selistre-de-Araujo HS. Alternagin-C, a disintegrin-like protein, induces vascular endothelial cell growth factor (VEGF) expression and endothelial cell proliferation in vitro. *J Biol Chem.* 2004 Apr 30;279(18):18247-55. Epub 2004 Feb 6.
- 233) Ramos OH, Terruggi CH, Ribeiro JU, Cominetti MR, Figueiredo CC, Bérard M, Crepin M, Morandi V, Selistre-de-Araujo HS. Modulation of in vitro and in vivo angiogenesis by alternagin-C, a disintegrin-like protein from *Bothrops alternatus* snake venom and by a peptide derived from its sequence. *Arch Biochem Biophys.* 2007 May 1;461(1):1-6. Epub 2007 Mar 12.
- 234) Durigan JL, Peviani SM, Russo TL, Delfino GB, Ribeiro JU, Cominetti MR, Selistre-de-Araujo HS, Salvini TF. Effects of alternagin-C from *Bothrops alternatus* on gene expression and activity of metalloproteinases in regenerating skeletal muscle. *Toxicon.* 2008 Nov;52(6):687-94.
- 235) Kauskot A, Cominetti MR, Ramos OH, Bechyne I, Renard JM, Hoylaerts MF, Crepin M, Legrand C, Selistre-de-Araujo HS, Bonnefoy A. Hemostatic effects of recombinant DisBa-01, a disintegrin from *Bothrops alternatus*. *Front Biosci.* 2008 May 1;13:6604-16.
- 236) Teixeira CF, Landucci EC, Antunes E, Chacur M, Cury Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2. *Toxicon.* 2003 Dec 15;42(8):947-62.
- 237) Gutiérrez JM, Ownby CL. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A2: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon.* 2003 Dec 15;42(8):915-31.
- 238) Gallacci M, Cavalcante WL. Understanding the in vitro neuromuscular activity of snake venom Lys49 phospholipase A2 homologues. *Toxicon.* 2010 Jan;55(1):1-11.
- 239) Calvete JJ, Borges A, Segura A, Flores-Díaz M, Alape-Girón A, Gutiérrez JM, Díez N, De Sousa L, Kiriakos D, Sánchez E, Faks JG, Escolano J, Sanz L. Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops colombiensis*, a medically important pitviper of the *Bothrops atrox-asper* complex endemic to Venezuela: Contributing to its taxonomy and snakebite management. *J Proteomics.* 2009 Mar 6;72(2):227-40.
- 240) Moura-da-Silva AM, Cardoso DF, Tanizaki MM. Differences in distribution of myotoxic proteins in venoms from different *Bothrops* species. *Toxicon.* 1990;28(11):1293-301.
- 241) Moura-da-Silva AM, Cardoso DF, Tanizaki MM, Mota I. Neutralization of myotoxic activity of *Bothrops* venoms by antisera to purified myotoxins and to crude venoms. *Toxicon.* 1991;29(12):1471-80.
- 242) Andrião-Escarso SH, Soares AM, Rodrigues VM, Angulo Y, Díaz C, Lomonte B, Gutiérrez JM, Giglio JR. Myotoxic phospholipases A(2) in bothrops snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. *Biochimie.* 2000 Aug;82(8):755-63.
- 243) Cogo JC, Lilla S, Souza GH, Hyslop S, de Nucci G. Purification, sequencing and structural analysis of two acidic phospholipases A2 from the venom of *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa). *Biochimie.* 2006 Dec;88(12):1947-59. Epub 2006 Nov 3.
- 244) Andrião-Escarso SH, Soares AM, Fontes MR, Fuly AL, Corrêa FM, Rosa JC, Greene LJ, Giglio JR. Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A2 from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Biochem Pharmacol* 2002, 64:723-732.
- 245) Estevão-Costa MI, Rocha BC, Mudado MA, Redondo R, Franco GR, Fortes- Dias CL. Prospection, structural analysis and phylogenetic relationships of endogenous-phospholipase A2 inhibitors in Brazilian *Bothrops* snakes (Viperidae, Crotalinae). *Toxicon* 2008, 52:122-129.

-
- 246) Zaganelli GL, Zaganelli MG, Magalhães A, Diniz CR, de Lima ME: Purification and characterization of a fibrinogen-clotting enzyme from the venom of jararacuçu (*Bothrops jararacussu*). *Toxicon* 1996, 34:807-819.
- 247) Serrano SM, Hagiwara Y, Murayama N, Higuchi S, Mentele R, Sampaio CA, Camargo AC, Fink E: Purification and characterization of a kinin-releasing and fibrinogen-clotting serine proteinase (KN-BJ) from the venom of *Bothrops jararaca*, and molecular cloning and sequence analysis of its cDNA. *Eur J Biochem* 1998, 251:845-853.
- 248) Zingali RB, Jandrot-Perrus M, Guillin M, Bon C: Bothrojaracin, a new thrombin inhibitor isolated from *Bothrops jararaca* venom: characterization and mechanism of thrombin inhibition. *Biochemistry* 1993, 32:10794-10802.
- 249) Arocas V, Zingali RB, Guillin MC, Bon C, Jandrot-Perrus M: Bothrojaracin: a potent two-site-directed thrombin inhibitor. *Biochemistry* 1996, 35:9083-9089.
- 250) Ferreira SH: A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. *Br J Pharmacol Chemother* 1965, 24:163-169.
- 251) Núñez V, Cid P, Zanz L, de la Torre P, Angulo Y, Lomonte B, Gutiérrez JM, Calvete JJ: Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox* venoms from Colombia and the Amazonian regions of Brazil, Perú and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards paedomorphism. *J Proteomics* 2009, 73:57-78.
- 252) Soares MR, Oliveira-Carvalho AL, Wermelinger LS, Zingali RB, Ho PL, Junqueira-de-Azevedo IL, Diniz MRV: Identification of novel bradykinin- potentiating peptides and C-type natriuretic peptide from *Lachesis muta* venom. *Toxicon* 2005, 46:31-38.
- 253) Alape-Girón A, Flores-Díaz M, Sanz L, Madrigal M, Escolano J, Sasa M, Calvete JJ: Studies on the venom proteome of *Bothrops asper*: perspectives and applications. *Toxicon* 2009, 54:938-948.
- 254) Peichoto ME, Mackessy SP, Teibler P, Tavares FL, Burckhardt PL, Breno MC, Acosta O, Santoro ML: Purification and characterization of a cysteine-rich protein from *Philodryas patagoniensis* snake venom. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2009, 150:79-84.
- 255) Aird SD: Snake venom dipeptidyl peptidase IV: taxonomic distribution and quantitative variation. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2008, 150:222-228.
- 256) Ogawa Y, Mamura Y, Murayama N, Yanoshita R: Characterization and cDNA cloning of dipeptidyl peptidase IV from the venom of *Gloydus blomhoffi brevicaudus*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2006, 145:35-42.
- 257) St. Pierre L, Birrell GW, Earl ST, Wallis TP, Gorman JJ, de Jersey J, Masci PP, Lavin MF: Diversity of toxic components from the venom of the evolutionarily distinct black whip snake, *Demansia vestigiata*. *J Proteome Res* 2007, 6:3093-3107.
- 258) Gasparello-Clemente E, Silveira PF: Fluorometric assay using naphthylamide substrates for assessing novel venom peptidase activities. *Toxicon* 2002, 40:1617-1626.
- 259) Ogawa Y, Kanai-Azuma M, Akimoto Y, Kawakami H, Yanoshita R: Exosome- like vesicles in *Gloydus blomhoffii blomhoffii* venom. *Toxicon* 2008, 51:984-993.
- 260) Aird SD: Snake venom dipeptidyl peptidase IV: taxonomic distribution and quantitative variation. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2008, 150:222-228.
- 261) Kreil G, Haiml L, Suchanek G: Stepwise cleavage of the pro part of promelittin by dipeptidylpeptidase IV. Evidence for a new type of precursor-product conversion. *Eur J Biochem* 1980, 111:49-58.
- 262) Lee VS, Tu WC, Jinn TR, Peng CC, Lin LJ, Tzen JT: Molecular cloning of the precursor polypeptide of mastoparan B and its putative processing enzyme, dipeptidyl peptidase IV, from the black-bellied hornet, *Vespa basalis*. *Insect Mol Biol*. 2007 Apr;16(2):231-7.

-
- 263) Kreil G. Hyaluronidases--a group of neglected enzymes. *Protein Sci.* 1995 Sep;4(9):1666-9.
- 264) Kemparaju J, Girish KS. Snake venom hyaluronidases: a therapeutic target. *Cell Biochem. Funct.* 2006. 24(1), 7-12.
- 265) Pessatti M, Fontana JD, Furtado MF, Guimãraes MF, Zanette LR, Costa WT, Baron M: Screening of *Bothrops* snake venoms for L-amino acid oxidase activity. *Appl Biochem Biotechnol* 1995, 51-52:197-210.
- 266) Du XY, Clemetson KJ: Snake venom L-amino acid oxidase. *Toxicon* 2002, 40:659-665.
- 267) Zuliani JP, Kayano AM, Zaqueo KD, Neto AC, Sampaio SV, Soares AM, Stábéli RG: Snake venom L-amino acid oxidases: some consideration about their functional characterization. *Protein Pept Lett* 2009, 16:908-912.
- 268) Stábéli RG, Marcussi S, Carlos GB, Pietro RC, Selistre-de-Araujo HS, Giglio JR, Oliveira EB, Soares AM: Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. *Bioorg Med Chem* 2004, 12:2881-2886.
- 269) Nascimento JM, Franchi GC Jr, Nowill AE, Collares-Buzato CB, Hyslop S: Cytoskeletal rearrangement and cell death induced by *Bothrops alternatus* snake venom in cultured *Madin-Darby* canine kidney cells. *Biochem Cell Biol* 2007, 85:591-605.
- 270) Fry BG, Wüster W, Kini RM, Brusich V, Khan A, Venkataraman D, Rooney AP: Molecular evolution and phylogeny of elapid snake venom three-finger toxins. *J Mol Evol* 2003, 57:110-129.
- 271) Pawlak J, Kini RM: Unique gene organization of colubrid three-finger toxins: complete cDNA and gene sequences of denmotoxin, a bird-specific toxin from colubrid snake *Boiga dendrophila* (mangrove catsnake). *Biochimie* 2008, 90:868-877.
- 272) Pawlak J, Mackessy SP, Sixberry NM, Stura EA, Le Du MH, Ménez R, Foo CS, Ménez A, Nirthanan S, Kini RM: Irditoxin, a novel covalently linked heterodimeric three-finger toxin with high taxon-specific neurotoxicity. *FASEB J* 2009, 23:534-545.
- 273) Angulo Y, Escolano J, Lomonte B, Gutiérrez JM, Sanz L, Calvete JJ: Snake venomomics of Central American pitvipers: clues for rationalizing the distinct envenomation profiles of *Atropoides nummifer* and *Atropoides picadoi*. *J Proteome Res* 2008, 7:708-719.
- 274) Jia Y, Cantu BA, Sánchez EE, Pérez JC. Complementary DNA sequencing and identification of mRNAs from the venomous gland of *Agkistrodon piscivorus leucostoma*. *Toxicon.* 2008 Jun 15;51(8):1457-66.
- 275) Alape-Girón A, Flores-Díaz M, Sanz L, Madrigal M, Escolano J, Sasa M, Calvete JJ: Studies on the venom proteome of *Bothrops asper*: perspectives and applications. *Toxicon* 2009, 54:938-948.
- 276) Zamunér SR, Cruz-Höfling MA, Corrado AP, Hyslop S, Rodrigues-Simioni L: Comparison of the neurotoxic and myotoxic effects of Brazilian *Bothrops* venoms and their neutralization by commercial antivenom. *Toxicon* 2004, 44:259-271.
- 277) Teixeira C, Cury Y, Moreira V, Picolo G, Chaves F: Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. *Toxicon* 2009, 54:988-997.
- 278) Gutiérrez JM, Rucavado A, Chaves F, Díaz C, Escalante T: Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon* 2009, 54:958-975.
- 279) Pung YF, Wong PT, Kumar PP, Hodgson WE, Kini RM: Ohanin, a novel protein from *king cobra* venom, induces hypolocomotion and hyperalgesia in mice. *J Biol Chem* 2005, 280:13137-13147.
- 280) Pung YF, Kumar SV, Rajagopalan N, Fry BG, Kumar PP, Kini RM: Ohanin, a novel protein from *king cobra* venom and its cDNA and genomic organization. *Gene* 2006, 371:246-256.

-
- 281) Birrell GW, Early STH, Wallis TP, Masci PP, de Jersey J, Gorman JJ, Lavin MF: The diversity of bioactive proteins in *Australian snake* venoms. *Mol Cell Proteomics* 2007, 6:973-986.
- 282) Brown AM, Yatani A, Lacerda AE, Gurrola GB, Possani LD: Neurotoxins that act selectively on voltage-dependent cardiac calcium channels. *Circ Res* 1987, 61:16-19.
- 283) Possani LD, Martin BM, Yatani A, Mochca-Morales J, Zamudio FZ, Gurrola GB, Brown AM: Isolation and physiological characterization of taicatoxin, a complex toxin with specific effects on calcium channels. *Toxicon* 1992, 30:1343-1364.
- 284) Fantini E, Athias P, Tirosh R, Pinson A: Effect of TaiCatoxin (TCX) on the electrophysiological, mechanical and biochemical characteristics of spontaneously beating ventricular cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem* 1996, 160-161:61-66.
- 285) Jeffrey KL, Camps M, Rommel C, Mackay CR: Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signaling and immune responses. *Nat Rev Drug Discov* 2007, 6:391-403.
- 286) Goldbeter A, Pourquié O: Modeling the segmentation clock as a network of coupled oscillations in the Notch, Wnt and FGF signaling pathways. *J Theor Biol* 2008, 252:574-585.
- 287) Gomez C, Ozbudak EM, Wunderlich J, Baumann D, Lewis J, Pourquié O: Control of segment number in vertebrate embryos. *Nature* 2008, 454:335-339.
- 288) Arnér ES, Holmgren A: Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* 2000, 267:6102-6109.
- 289) Arnér ES: Focus on mammalian thioredoxin reductases - important selenoproteins with versatile functions. *Biochim Biophys Acta* 2009, 1790:495-526.
- 290) Valério AA, Corradini AC, Panunto PC, Mello SM, Hyslop S: Purification and characterization of a phosphodiesterase from *Bothrops alternatus* snake venom. *J Protein Chem* 2002, 21:495-503.
- 291) Ogawa Y, Murayama N, Yanoshita R: Molecular cloning and characterization of ecto-5'-nucleotidase from the venoms of *Gloydius blomhoffii*. *Toxicon* 2009, 54:408-412.
- 292) Soto JG, Powell RL, Reyes SR, Wolana L, Swanson LJ, Sanchez EE, Perez JC: Genetic variation of a disintegrin gene found in the American copperhead snake (*Agkistrodon contortrix*). *Gene* 2006, 373:1-7.
- 293) Kordis D, GubenĚek F: The Bov-B lines found in *Vipera ammodytes* toxic PLA2 genes are widespread in snake genomes. *Toxicon* 1998, 36:1585-1590.
- 294) Sanz L, Gibbs HL, Mackessy SP, Calvete JJ: Venom proteomes of closely related *Sistrurus rattlesnakes* with divergent diets. *J Proteome Res* 2006, 5:2098-2112.
- 295) Cocquet J, Chong A, Zhang G, Veitia RA: Reverse transcriptase template switching and false alternative transcripts. *Genomics*. 2006 Jul;88(1):127-31.
- 296) Bauab FA, Junqueira GR, Corradini MC, Silveira PV, Nishioka AS: Clinical and epidemiological aspects of the 'urutu' lance-headed viper (*Bothrops alternatus*) bite in a Brazilian hospital. *Trop Med Parasitol* 1994, 45:243-245.
- 297) Gutiérrez JM, Lomonte B: Efectos locales en el envenenamiento ofídico en América Latina. In *Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes*. Edited by: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad V Jr. São Paulo: Sarvier/FAPESP; 2003:310-323.
- 298) Gutiérrez JM, Rucavado A, Chaves F, Díaz C, Escalante T: Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon* 2009, 54:958-975.

-
- 299) Gutiérrez JM, Escalante T, Rucavado A: Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon* 2009, 54:976-987.
- 300) França FO, Barbaro KC, Fan HW, Cardoso JL, Sano-Martins IS, Tomy SC, Lopes MH, Warrell DA, Theakston RD; Butantan Institute Envenoming by *Bothrops jararaca* in Brazil: association between venom antigenaemia and severity at admission to hospital. Antivenom Study Group. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2003 May-Jun;97(3):312-7.
- 301) Ferreira SH, Bartelt DC, Greene LJ. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Biochemistry.* 1970 Jun 23;9(13):2583-93.
- 302) Ferreira LA, Henriques OB, Lebrun I, Batista MB, Prezoto BC, Andreoni AS, Zelnik R, Habermehl G. A new bradykinin-potentiating peptide (peptide P) isolated from the venom of *Bothrops jararacussu* (jararacuçu tapete, urutu dourado). *Toxicon.* 1992 Jan;30(1):33-40.
- 303) Cintra AC, Vieira CA, Giglio JR. Primary structure and biological activity of bradykinin potentiating peptides from *Bothrops insularis* snake venom. *J Protein Chem.* 1990 Apr;9(2):221-7.
- 304) Fernandez JH, Neshich G, Camargo AC. Using bradykinin-potentiating peptide structures to develop new antihypertensive drugs. *Genet Mol Res.* 2004 Dec 30;3(4):554-63.
- 305) Ianzer D, Santos RA, Etelvino GM, Xavier CH, de Almeida Santos J, Mendes EP, Machado LT, Prezoto BC, Dive V, de Camargo AC. Do the cardiovascular effects of angiotensin-converting enzyme (ACE) I involve ACE-independent mechanisms? new insights from proline-rich peptides of *Bothrops jararaca*. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007 Aug;322(2):795-805.
- 306) Rioli V, Prezoto BC, Konno K, Melo RL, Klitzke CF, Ferro ES, Ferreira-Lopes M, Camargo AC, Portaro FC. A novel bradykinin potentiating peptide isolated from *Bothrops jararacussu* venom using catalytically inactive oligopeptidase EP24.15. *FEBS J.* 2008 May;275(10):2442-54.
- 307) Silva CA, Ianzer DA, Portaro FC, Konno K, Faria M, Fernandes BL, Camargo AC. Characterization of urinary metabolites from four synthetic bradykinin potentiating peptides (BPPs) in mice. *Toxicon.* 2008 Sep 1;52(3):501-7.
- 308) Menin L, Perchuc A, Favreau P, Perret F, Michalet S, Schöni R, Wilmer M, Stöcklin R. High throughput screening of bradykinin-potentiating peptides in *Bothrops moojeni* snake venom using precursor ion mass spectrometry. *Toxicon* 2008 Jun 1;51(7):1288-302.
- 309) Nery AA, Trujillo CA, Lameu C, Konno K, Oliveira V, Camargo AC, Ulrich H, Hayashi MA. A novel physiological property of snake bradykinin-potentiating peptides-reversion of MK-801 inhibition of nicotinic acetylcholine receptors. *Peptides.* 2008 Oct;29(10):1708-15.
- 310) Lameu C, Hayashi MA, Guerreiro JR, Oliveira EF, Lebrun I, Pontieri V, Morais KL, Camargo AC, Ulrich H. The central nervous system as target for antihypertensive actions of a proline-rich peptide from *Bothrops jararaca* venom. *Cytometry A.* 2010 Mar;77(3):220-30.
- 311) Higuchi S, Murayama N, Saguchi K, Ohi H, Fujita Y, da Silva NJ Jr, de Siqueira RJ, Lahlou S, Aird SD. A novel peptide from the ACEI/BPP-CNP precursor in the venom of *Crotalus durissus collilineatus*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2006 Oct;144(2):107-21.
- 312) Evangelista IL, Martins AM, Nascimento NR, Havt A, Evangelista JS, de Norões TB, Toyama MH, Diz-Filho EB, Toyama Dde O, Fonteles MC, Monteiro HS. Renal and cardiovascular effects of *Bothrops marajoensis* venom and phospholipase A2. *Toxicon.* 2010 Jun 1;55(6):1061-70.
- 313) Glusa E, Brauns H, Stocker K. Endothelium-dependent relaxant effect of thrombocytin, a serine proteinase from *Bothrops atrox* snake venom, on isolated pig coronary arteries. *Toxicon.* 1991;29(6):725-32.
- 314) Rocha e Silva, M., Beraldo, W. T. & Rosenfeld, G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and trypsin, *Am. J. Physiol.* 1949. 156,

261-273.

315) Serrano SM, Hagiwara Y, Murayama N, Higuchi S, Mentele R, Sampaio CA, Camargo AC, Fink E: Purification and characterization of a kinin-releasing and fibrinogen-clotting serine proteinase (KN-BJ) from the venom of *Bothrops jararaca*, and molecular cloning and sequence analysis of its cDNA. Eur J Biochem 1998, 251:845-853.

316) Ferreira SH. History of the development of inhibitors of angiotensin I conversion. Drugs. 1985;30 Suppl 1:1-5.

317) Ferreira SH. University discoveries and intellectual property rights: from *Bothrops jararaca* bradykinin potentiating peptides to angiotensin converting enzyme inhibitors. Braz J Med Biol Res. 1994 Aug;27(8):1693-8.

318) Ferreira SH. Angiotensin converting enzyme: history and relevance. Semin Perinatol. 2000 Feb;24(1):7-10.

319) Lewis RJ, Garcia ML. Therapeutic potential of venom peptides. Nat Rev Drug Discov. 2003 Oct;2(10):790-802.

320) Lisy O, Huntley BK, McCormick DJ, Kurlansky PA, Burnett JC Jr. Design, synthesis, and actions of a novel chimeric natriuretic peptide: CD-NP. J Am Coll Cardiol. 2008 Jul 1;52(1):60-8.

321) McKie PM, Cataliotti A, Boerrigter G, Chen HH, Sangaralingham SJ, Martin FL, Ichiki T, Burnett JC Jr. A novel atrial natriuretic peptide based therapeutic in experimental angiotensin II mediated acute hypertension. Hypertension. 2010 Dec;56(6):1152-9.

322) Anderson LA, Dufton MJ. The action of Taiwan cobra venom on methionine enkephalin: a useful assay for oligopeptidase content. Toxicon. 1997 Jul;35(7):1113-23.

323) Anderson L, Bussler B, Martins H, Dufton M. Enkephalin-processing oligopeptidases in cobra venom: inhibition by thiorphan and bestatin reveals co-operative actions. Toxicon. 1998 May;36(5):719-28.

324) Aird SD, da Silva NJ Jr. Comparative enzymatic composition of Brazilian coral snake (*Micrurus*) venoms. Comp Biochem Physiol B. 1991;99(2):287-94.

325) Faiz MA, Falkous G, Harris JB, Mantle D. Comparison of protease and related enzyme activities in snake venoms. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 1996 Jan;113(1):199-204.

326) Jorge da Silva N Jr, Aird SD. Prey specificity, comparative lethality and compositional differences of coral snake venoms. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2001 Mar;128(3):425-56.

327) Porto BN, Telli CA, Dutra TP, Alves LS, Bozza MT, Fin CA, Thiesen FV, Renner MF. Biochemical and biological characterization of the venoms of *Bothriopsis bilineata* and *Bothriopsis taeniata* (Serpentes: Viperidae). Toxicon. 2007 Aug;50(2):270-7.

328) Ogawa Y, Murayama N, Fujita Y, Yanoshita R. Characterization and cDNA cloning of aminopeptidase A from the venom of *Gloydius blomhoffi brevicaudus*. Toxicon. 2007 Jun 15;49(8):1172-81.

329) Vaiyapuri S, Wagstaff SC, Watson KA, Harrison RA, Gibbins JM, Hutchinson EG. Purification and functional characterisation of rhiminopeptidase A, a novel aminopeptidase from the venom of *Bitis gabonica rhinoceros*. PLoS Negl Trop Dis. 2010 Aug 10;4(8):e796.

330) Hung CC, Chiou SH. Fibrinolytic proteases isolated from the snake venom of Taiwan habu: serine proteases with kallikrein-like and angiotensin-degrading activities. Biochem Biophys Res Commun. 2001 Mar 9;281(4):1012-8.

331) al-Joufi AM, Bailey GS. A survey of kininase, tyrosine esterase, kininogenase and arginine esterase activities in some snake venoms. Comp Biochem Physiol Biochem Mol Biol. 1994 Jun;108(2):221-4.

-
- 332) al-Joufi AM, Andrews S, Bailey GS. Kininase activities of some snake venoms. *Immunopharmacology*. 1996 May;32(1-3):163-5.
- 333) Satake M, Murata Y, Suzuki T. Studies on snake venom. XIII. Chromatographic separation and properties of three proteinases from *Agkistrodon halys blomhoffii* venom. *J Biochem*. 1963 Jun;53:438-47.
- 334) Boumrah D, Suckling CJ, Dufton MJ. Characteristics of the peptidase activity contained in Taiwan cobra (*Naja naja atra*) venom. *Toxicon*. 1993 Oct;31(10):1293-303.
- 335) Yamasaki SC, Villarroel JS, Barone JM, Zambotti-Villela L, Silveira PF. Aminopeptidase activities, oxidative stress and renal function in *Crotalus durissus terrificus* envenomation in mice. *Toxicon*. 2008 Sep 1;52(3):445-54.
- 336) Matteucci E, Giampietro O. Dipeptidyl peptidase-4 (CD26): knowing the function before inhibiting the enzyme. *Curr Med Chem*. 2009;16(23):2943-51.
- 337) Walborg EF Jr, Tsuchida S, Weeden DS, Thomas MW, Barrick A, McEntire KD, Allison JP, Hixson DC. Identification of dipeptidyl peptidase IV as a protein shared by the plasma membrane of hepatocytes and liver biomatrix. *Exp Cell Res*. 1985 Jun;158(2):509-18.
- 338) Kettmann U, Humbel B, Holzhausen HJ. Ultrastructural localization of dipeptidylpeptidase IV in the glomerulum of the rat kidney. *Acta Histochem*. 1992;92(2):225-7.
- 339) Darmoul D, Lacasa M, Baricault L, Marguet D, Sapin C, Trotot P, Barbat A, Trugnan G. Dipeptidyl peptidase IV (CD 26) gene expression in enterocyte-like colon cancer cell lines HT-29 and Caco-2. Cloning of the complete human coding sequence and changes of dipeptidyl peptidase IV mRNA levels during cell differentiation. *J Biol Chem*. 1992 Mar 5;267(7):4824-33.
- 340) Dubois V, Van Ginneken C, De Cock H, Lambeir AM, Van der Veken P, Augustyns K, Chen X, Scharpé S, De Meester I. Enzyme activity and immunohistochemical localization of dipeptidyl peptidase 8 and 9 in male reproductive tissues. *J Histochem Cytochem*. 2009 Jun;57(6):531-41.
- 341) Greischel A, Binder R, Baierl J. The dipeptidyl peptidase-4 inhibitor linagliptin exhibits time- and dose-dependent localization in kidney, liver, and intestine after intravenous dosing: results from high resolution autoradiography in rats. *Drug Metab Dispos*. 2010 Sep;38(9):1443-8.
- 342) Greischel A, Binder R, Baierl J. Expression and spatial heterogeneity of dipeptidyl peptidases in endothelial cells of conduct vessels and capillaries. *Biol Chem*. 2011 Mar;392(3):189-98.
- 343) Kameoka J, Tanaka T, Nojima Y, Schlossman SF, Morimoto C. Direct association of adenosine deaminase with a T cell activation antigen, CD26. *Science*. 1993 Jul 23;261(5120):466-9.
- 344) De Meester IA, Kestens LL, Vanham GL, Vanhoof GC, Vingerhoets JH, Gigase PL, Scharpe SL. Costimulation of CD4+ and CD8+ T cells through CD26: the ADA-binding epitope is not essential for complete signaling. *J Leukoc Biol*. 1995 Sep;58(3):325-30.
- 345) Lambeir AM, Durinx C, Scharpé S, De Meester I. Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2003 Jun;40(3):209-94.
- 346) Ansorge S, Nordhoff K, Bank U, Heimbürg A, Julius H, Breyer D, Thielitz A, Reinhold D, Täger M. Novel aspects of cellular action of dipeptidyl peptidase IV/CD26. *Biol Chem*. 2011 Mar;392(3):153-68.
- 347) Ohtsuki T, Tsuda H, Morimoto C. Good or evil: CD26 and HIV infection. *J Dermatol Sci*. 2000 Apr;22(3):152-60.
- 348) Maes M, Scharpe S, De Meester I, Goossens P, Wauters A, Neels H, Verkerk R, De Meyer F, D'Hon dt P, Peeters D, et al. Components of biological variation in prolyl endopeptidase and dipeptidyl-peptidase IV activity in plasma of healthy subjects. *Clin Chem*. 1994 Sep;40(9):1686-91.

-
- 349) Ohkubo I, Huang K, Ochiai Y, Takagaki M, Kani K. Dipeptidyl peptidase IV from porcine seminal plasma: purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence. *J Biochem (Tokyo)*. 1994 Nov;116(5):1182-6.
- 350) Yoshimoto T, Kabashima T, Ito K. [Proline specific peptidases]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*. 1997 Oct;42(14 Suppl):2198-204.
- 351) Tsakalidou E, Anastasiou R, Papadimitriou K, Manolopoulou E, Kalantzopoulos G. Purification and characterisation of an intracellular X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase from *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 4. *J Biotechnol*. 1997 Jan 3;59(3):203-11.
- 352) Ogata S, Misumi Y, Ikehara Y. Primary structure of rat liver dipeptidyl peptidase IV deduced from its cDNA and identification of the NH₂-terminal signal sequence as the membrane-anchoring domain. *J Biol Chem*. 1989 Feb 25;264(6):3596-601.
- 353) Marguet D, Bernard AM, Vivier I, Darmoul D, Naquet P, Pierres M. cDNA cloning for mouse thymocyte-activating molecule. A multifunctional ecto-dipeptidyl peptidase IV (CD26) included in a subgroup of serine proteases. *J Biol Chem*. 1992 Feb 5;267(4):2200-8.
- 354) Misumi Y, Hayashi Y, Arakawa F, Ikehara Y. Molecular cloning and sequence analysis of human dipeptidyl peptidase IV, a serine proteinase on the cell surface. *Biochim Biophys Acta*. 1992 Jul 15;1131(3):333-6.
- 355) Vlasak R, Vilas U, Strobl B, Kreil G. cDNA cloning and expression of secreted *Xenopus laevis* dipeptidyl aminopeptidase IV. *Eur J Biochem*. 1997 Jul 1;247(1):107-13.
- 356) Kabashima T, Ito K, Yoshimoto T. Dipeptidyl peptidase IV from *Xanthomonas maltophilia*: sequencing and expression of the enzyme gene and characterization of the expressed enzyme. *J Biochem*. 1996 Dec;120(6):1111-7.
- 357) Kiyama M, Hayakawa M, Shiroza T, Nakamura S, Takeuchi A, Masamoto Y, Abiko Y. Sequence analysis of the *Porphyromonas gingivalis* dipeptidyl peptidase IV gene. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Mar 4;1396(1):39-46.
- 358) Jobin MC, Martinez G, Motard J, Gottschalk M, Grenier D. Cloning, purification, and enzymatic properties of dipeptidyl peptidase IV from the swine pathogen *Streptococcus suis*. *J Bacteriol*. 2005 Jan;187(2):795-9.
- 359) Jackson EK, Dubinon JH, Mi Z. Effects of dipeptidyl peptidase iv inhibition on arterial blood pressure. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2008 Jan;35(1):29-34.
- 360) Takasawa W, Ohnuma K, Hatano R, Endo Y, Dang NH, Morimoto C. Inhibition of dipeptidyl peptidase 4 regulates microvascular endothelial growth induced by inflammatory cytokines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Oct 8;401(1):7-12.
- 361) Shirakawa J, Fujii H, Ohnuma K, Sato K, Ito Y, Kaji M, Sakamoto E, Koganei M, Sasaki H, Nagashima Y, Amo K, Aoki K, Morimoto C, Takeda E, Terauchi Y. Diet-induced adipose tissue inflammation and liver steatosis are prevented by DPP-4 inhibition in diabetic mice. *Diabetes*. 2011 Apr;60(4):1246-57.
- 362) Yu DM, Yao TW, Chowdhury S, Nadvi NA, Osborne B, Church WB, McCaughan GW, Gorrell MD. The dipeptidyl peptidase IV family in cancer and cell biology. *FEBS J* 2010. 277, 1126-1144.
- 363) Pacheco BP, Crajoinas RO, Couto GK, Davel AP, Lessa LM, Rossoni LV, Girardi AC. (Dipeptidyl peptidase IV inhibition attenuates blood pressure rising in young spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2011. 29, 520-528.
- 364) Chen SJ, Jiaang WT. Current advances and therapeutic potential of agents targeting dipeptidyl peptidases-IV, -II, 8/9 and fibroblast activation protein. *Curr Top Med Chem*. 2011;11(12):1447-63.
- 365) Scheen AJ. [Saxagliptin (Onglyza): new inhibitor of the dipeptidylpeptidase-4 for the oral treatment of

type 2 diabetes]. *Rev Med Liege*. 2010 Sep;65(9):527-32.

366) Terra SG, Somayaji V, Schwartz S, Lewin AJ, Teeter JG, Dai H, Nguyen TT, Calle RA. A Dose-Ranging Study of the DPP-IV Inhibitor PF-734200 Added to Metformin in Subjects With Type 2 Diabetes*. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2011 Jul;119(7):401-7.

367) Bohannon N. Overview of the gliptin class (dipeptidyl peptidase-4 inhibitors) in clinical practice. *Postgrad Med*. 2009 Jan;121(1):40-5.

368) White JR. Alogliptin for the treatment of type 2 diabetes. *Drugs Today (Barc)*. 2011 Feb;47(2):99-107.

369) Scott LJ. Linagliptin: in type 2 diabetes mellitus. *Drugs*. 2011 Mar 26;71(5):611-24.

370) Ahrén B, Schweizer A, Dejager S, Villhauer EB, Dunning BE, Foley JE Mechanisms of action of the DPP-4 inhibitor vildagliptin in man. *Diabetes Obes Metab*, (2011) in press.

371) Bode B. Liraglutide: a review of the first once-daily GLP-1 receptor agonist. *Am J Manag Care* 2011. 17(2 Suppl), S59-70.

372) Unger J. Clinical efficacy of GLP-1 agonists and their place in the diabetes treatment algorithm. *J Am Osteopath Assoc* 2011. 111(2 Suppl 1), eS2-9.

373) Gallwitz B. GLP-1 agonists and dipeptidyl-peptidase IV inhibitors. *Handb Exp Pharmacol* 2011. 203, 53-74.

374) Martin JH, Deacon CF, Gorrell MD, Prins JB. Incretin-based therapies - review of the physiology, pharmacology and emerging clinical experience. *Intern Med J* 2011. 41, 299-307.

375) St Pierre L, Birrell GW, Earl ST, Wallis TP, Gorman JJ, de Jersey J, Masci PP, Lavin MF. Diversity of toxic components from the venom of the evolutionarily distinct black whip snake, *Demansia vestigiata*. *J Proteome Res*. 2007 Aug;6(8):3093-107.

376) Vanderheyden M, Bartunek J, Goethals M, Verstreken S, Lambeir AM, De Meester I, Scharpé S. Dipeptidyl-peptidase IV and B-type natriuretic peptide. *Clin Chem Lab Med* 2009. 47, 248-252.

377) Matsui M, Fowler JH, Walling LL. Leucine aminopeptidases: diversity in structure and function. *Biol. Chem*. 2006. 387(12), 1535-1544.

378) Trenholme KR, Brown CL, Skinner-Adams TS, Stack C, Lowther J, To J, Robinson MW, Donnelly SM, Dalton JP, Gardiner DL. Aminopeptidases of malaria parasites: new targets for chemotherapy. *Infect. Disord. Drug Targets* 2010. 10(3), 217-225.

379) Wilcox SA, Reho T, Higgins PJ, Tominna-Sebald E, McKeown-Longo PJ. Localization of urokinase to focal adhesions by human fibrosarcoma cells synthesizing recombinant vitronectin. *Biochem Cell Biol*. 1996 ;74(6):899-910.

380) Lipscomb WN, Sträter N. Recent Advances in Zinc Enzymology. *Chem Rev*. 1996 Nov 7;96(7):2375-2434.

381) Rawlings ND, Barrett AJ. Structure of membrane glutamate carboxypeptidase. *Biochim Biophys Acta*. 1997 May 23;1339(2):247-52

382) Rawlings ND, Barrett AJ. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res*. 1999 Jan 1;27(1):325-31.

383) Bauvois B, Dauzonne D. Aminopeptidase-N/CD13 (EC 3.4.11.2) inhibitors: chemistry, biological evaluations, and therapeutic prospects. *Med Res Rev*. 2006 Jan;26(1):88-130.

384) Evnouchidou I, Papakryakou A, Stratikos E (2009) A new role for Zn(II) aminopeptidases: antigenic peptide generation and destruction. *Curr. Pharm. Des*. 15(31), 3656-3670.

-
- 385) Haroon N, Inman RD (2010) Endoplasmic reticulum aminopeptidases: biology and pathogenic potential. *Nat. Rev. Rheumatol.* 6(8), 461-467.
- 386) Ramírez M, Prieto I, Alba F, Vives F, Banegas I, de Gasparo M. Role of central and peripheral aminopeptidase activities in the control of blood pressure: a working hypothesis. *Heart Fail.* 2008; 13(3), 339-353.
- 387) Feracci H, Maroux S. Rabbit intestinal aminopeptidase N. Purification and molecular properties. *Biochim Biophys Acta.* 1980 Jul;599(2):448-63.
- 388) Foulon T, Cadel S, Cohen P. Aminopeptidase B (EC 3.4.11.6). *Int J Biochem Cell Biol.* 1999 Jul;31(7):747-50.
- 389) Hopsu VK, Kantonen UM, Glenner GG. A peptidase from rat tissues selectively hydrolyzing N-terminal arginine and lysine residues. *Life Sci.* 1964 Dec;3:1449-53. No abstract available.
- 390) Luan Y, Xu W. The structure and main functions of aminopeptidase N. *Curr Med Chem.* 2007;14(6):639-47.
- 391) Banegas I, Prieto I, Vives F, Alba F, de Gasparo M, Segarra AB, Hermoso F, Duran R, Ramírez M. Brain aminopeptidases and hypertension. *J. Renin-Angiotensin-Aldosterone Sys.* 2006; 7(3), 129-134.
- 392) Tsujimoto M, Goto Y, Maruyama M, Hattori A. Biochemical and enzymatic properties of the M1 family of aminopeptidases involved in the regulation of blood pressure. *Heart Fail. Rev.* 2008; 13(3), 285-291.
- 393) Pleiderer G, Celliers PG. Isolation of an aminopeptidase from kidney particles. *Biochem Z.* 1963 Dec 3;339:186-9.
- 394) Look AT, Ashmun RA, Shapiro LH, Peiper SC. Human myeloid plasma membrane glycoprotein CD13 (gp150) is identical to aminopeptidase N. *J Clin Invest.* 1989 Apr;83(4):1299-307.
- 395) Watt VM, Willard HF. The human aminopeptidase N gene: isolation, chromosome localization, and DNA polymorphism analysis. *Hum Genet.* 1990 Oct;85(6):651-4.
- 396) Hooper KC. The distribution of hypothalamic peptidases in pregnant and non-pregnant dogs. *Biochem J.* 1964 Mar;90(3):584-7.
- 397) Firla B, Arndt M, Frank K, Thiel U, Ansorge S, Täger M, Lendeckel U. Extracellular cysteines define ectopeptidase (APN, CD13) expression and function. *Free Radic Biol Med.* 2002 Apr 1;32(7):584-95.
- 398) Luciani N, Marie-Claire C, Ruffet E, Beaumont A, Roques BP, Fournié-Zaluski MC. Characterization of Glu350 as a critical residue involved in the N-terminal amine binding site of aminopeptidase N (EC 3.4.11.2): insights into its mechanism of action. *Biochemistry.* 1998 Jan 13;37(2):686-92.
- 399) Sjöström H, Norén O, Olsen J. Structure and function of aminopeptidase N. *Adv Exp Med Biol.* 2000;477:25-34.
- 400) Mina-Osorio P, Winnicka B, O'Connor C, Grant CL, Vogel LK, Rodriguez-Pinto D, Holmes KV, Ortega E, Shapiro LH. CD13 is a novel mediator of monocytic/endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol.* 2008 Aug;84(2):448-59.
- 401) Giros B, Gros C, Solhonne B, Schwartz JC. Characterization of aminopeptidases responsible for inactivating endogenous (Met⁵)enkephalin in brain slices using peptidase inhibitors and anti-aminopeptidase M antibodies. *Mol Pharmacol.* 1986 Mar;29(3):281-7.
- 402) Wang LH, Ahmad S, Benter IF, Chow A, Mizutani S, Ward PE. Differential processing of substance P and neurokinin A by plasma dipeptidyl(amino)peptidase IV, aminopeptidase M and angiotensin converting enzyme. *Peptides.* 1991 Nov-Dec;12(6):1357-64.

-
- 403) Lendeckel U, Arndt M, Frank K, Wex T, Ansorge S. Role of alanyl aminopeptidase in growth and function of human T cells (review). *Int J Mol Med*. 1999 Jul;4(1):17-27.
- 404) Ahmad S, Wang L, Ward PE. Dipeptidyl(amino)peptidase IV and aminopeptidase M metabolize circulating substance P in vivo. *J Pharmacol Exp Ther*. 1992 Mar;260(3):1257-61.
- 405) Robertson MJ, Cunoosamy MP, Clark KL. Effects of peptidase inhibition on angiotensin receptor agonist and antagonist potency in rabbit isolated thoracic aorta. *Br J Pharmacol*. 1992 May;106(1):166-72.
- 406) Zini S, Fournie-Zaluski MC, Chauvel E, Roques BP, Corvol P, Llorens-Cortes C. Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Oct 15;93(21):11968-73.
- 407) Menrad A, Speicher D, Wacker J, Herlyn M. Biochemical and functional characterization of aminopeptidase N expressed by human melanoma cells. *Cancer Res*. 1993 Mar 15;53(6):1450-5.
- 408) Fujii H, Nakajima M, Saiki I, Yoneda J, Azuma I, Tsuruo T. Human melanoma invasion and metastasis enhancement by high expression of aminopeptidase N/CD13. *Clin Exp Metastasis*. 1995 Sep;13(5):337-44.
- 409) Carl-McGrath S, Lendeckel U, Ebert M, Röcken C. Ectopeptidases in tumor biology: a review. *Histol Histopathol* 2006; 21(12), 1339-1353.
- 410) Kitamura Y, Watanabe M, Komatsubara S, Sakata Y. [Clinical evaluation of urinary glycyl-prolyl dipeptidyl aminopeptidase in patients with urological disease]. *Hinyokika Kyo*. 1990 Dec;36(12):1391-6.
- 411) Ikeda M, Sumimoto K, Urushihara T, Fukuda Y, Dohi K, Kawasaki T. Prevention of ischemic damage in rat pancreatic transplantation by pretreatment with alpha-tocopherol. *Transplant Proc*. 1994 Apr;26(2):561-2.
- 412) Hashida H, Takabayashi A, Kanai M, Adachi M, Kondo K, Kohno N, Yamaoka Y, Miyake M. Aminopeptidase N is involved in cell motility and angiogenesis: its clinical significance in human colon cancer. *Gastroenterology*. 2002 Feb;122(2):376-86.
- 413) Ishii K, Usui S, Sugimura Y, Yoshida S, Hioki T, Tatematsu M, Yamamoto H, Hirano K. Aminopeptidase N regulated by zinc in human prostate participates in tumor cell invasion. *Int J Cancer*. 2001 Apr 1;92(1):49-54.
- 414) Carl-McGrath S, Lendeckel U, Ebert M, Wolter AB, Roessner A, Röcken C. The ectopeptidases CD10, CD13, CD26, and CD143 are upregulated in gastric cancer. *Int J Oncol*. 2004 Nov;25(5):1223-32.
- 415) Kehlen A, Lendeckel U, Dralle H, Langner J, Hoang-Vu C. Biological significance of aminopeptidase N/CD13 in thyroid carcinomas. *Cancer Res*. 2003 Dec 1;63(23):8500-6.
- 416) Boldt DH, Kopecky KJ, Head D, Gehly G, Radich JP, Appelbaum FR. Expression of myeloid antigens by blast cells in acute lymphoblastic leukemia of adults. The Southwest Oncology Group experience. *Leukemia* 1994;8(12):2118–2126.
- 417) Popnikolov NK, Payne DA, Hudnall SD, Hawkins HK, Kumar M, Norris BA, Elghetany MT. CD13- positive anaplastic large cell lymphoma of T-cell origina diagnostic and histogenetic problem. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124(12):1804–1808.
- 418) Dunphy CH, Gardner LJ, Manes JL, Bee CS, Taysi K. CD30p anaplastic large-cell lymphoma with aberrant expression of CD13: Case report and review of the literature. *J Clin Lab Anal* 2000;14(6):299–304.
- 419) Pulido-Cejudo G, Conway B, Proulx P, Brown R, Izaguirre CA: Bestatin-mediated inhibition of leucine aminopeptidase may hinder HIV infection. *Antiviral Res* 1997, 36:167-177.
- 420) Shimizu T, Tani K, Hase K, Ogawa H, Huang L, Shinomiya F, Sone S. CD13/aminopeptidase N-induced lymphocyte involvement in inflamed joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46(9):2330–2338.

-
- 421) Dan H, Tani K, Hase K, Shimizu T, Tamiya H, Biraa Y, Huang L, Yanagawa H, Sone S. CD13/aminopeptidase N in collagen vascular diseases. *Rheumatol Int* 2003;23(6):271–276.
- 422) Pasqualini, R., et al., 2000. Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. *Cancer Res.* 60, 722–727.
- 423) Bhagwat SV, Lahdenranta J, Giordano R, Arap W, Pasqualini R, Shapiro LH. CD13/APN is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation. *Blood.* 2001 Feb 1;97(3):652-9.
- 424) Sato Y Role of aminopeptidase in angiogenesis. *Biol. Pharm. Bull.* 2004. 27(6), 772-776.
- 425) Mahoney KM, Petrovic N, Schacke W, Shapiro LH. CD13/APN transcription is regulated by the proto-oncogene c-Maf via an atypical response element. *Gene.* 2007 Nov 15;403(1-2):178-87.
- 426) Jia MR, Wei T, Xu WF. The Analgesic Activity of Bestatin as a Potent APN Inhibitor. *Front Neurosci.* 2010 Jun 28;4:50.
- 427) Reinhold D, Bank U, Täger M, Ansorge S, Wrenger S, Thielitz A, Lendeckel U, Faust J, Neubert K, Brocke S. DP IV/CD26, APN/CD13 and related enzymes as regulators of T cell immunity: implications for experimental encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Front. Biosci.* 2008; 13, 2356-2363.
- 428) Ansorge S, Bank U, Heimbürg A, Helmuth M, Koch G, Tadge J, Lendeckel U, Wolke C, Neubert K, Faust J, Fuchs P, Reinhold D, Thielitz A, Täger M (2009) recent insights into the role of dipeptidyl aminopeptidase IV (DPIV) and aminopeptidase N (APN) families in immune functions. *Clin. Chem. Lab. Med.* 47(3), 253-261.
- 429) Danziger RS. Aminopeptidase N in arterial hypertension. *Heart Fail. Rev* (2008) 13(3), 293-298.
- 430) Holz RC, Bzymek KP, Swierczek SI. Co-catalytic metallopeptidases as pharmaceutical targets. *Curr Opin Chem Biol.* 2003 Apr;7(2):197-206.
- 431) Mucha A, Drag M, Dalton JP, Kafarski P (2010) Metallo-aminopeptidase inhibitors. *Biochimie* 92(11), 1509-1529.
- 432) Thielitz A, Ansorge S, Bank U, Tager M, Wrenger S, Gollnick H, Reinhold D. The ectopeptidases dipeptidyl peptidase IV (DP IV) and aminopeptidase N (APN) and their related enzymes as possible targets for the treatment of skin diseases. *Front. Biosci.* 2008. 13, 2364-2375.
- 433) Zhang X, Xu W (2008) Aminopeptidase N (APN/CD13) as a target for anti-cancer agent design. *Curr. Med. Chem.* 15(27), 2850-2865.
- 434) Wickström M, Larsson R, Nygren P, Gullbo J. Aminopeptidase N (CD13) as a target for cancer chemotherapy. *Cancer Sci.* 2011 Mar;102(3):501-8. doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01826.
- 435) Chen H, Noble F, Roques BP, Fournié-Zaluski MC. Long lasting antinociceptive properties of enkephalin degrading enzyme (NEP and APN) inhibitor prodrugs. *J Med Chem.* 2001 Oct 11;44(21):3523-30.
- 436) Thanawala V, Kadam VJ, Ghosh R. Enkephalinase inhibitors: potential agents for the management of pain. *Curr Drug Targets.* 2008 Oct;9(10):887-94.
- 437) Song L, Wilk E, Wilk S, Healy DP. Localization of immunoreactive glutamyl aminopeptidase in rat brain. I. Association with cerebral microvessels. *Brain Res.* 1993 Mar 26;606(2):286-94.
- 438) Song L, Ye M, Troyanovskaya M, Wilk E, Wilk S, Healy DP. Rat kidney glutamyl aminopeptidase (aminopeptidase A): molecular identity and cellular localization. *Am J Physiol.* 1994 Oct;267(4 Pt 2):F546-57.
- 439) Troyanovskaya M, Jayaraman G, Song L, Healy DP. Aminopeptidase-A. I. CDNA cloning and expression and localization in rat tissues. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000 Feb;278(2):R413-24.
- 440) Nagatsu I, Nagatsu T, Yamamoto T, Glenner GG, Mehl JW. Purification of aminopeptidase A in human

serum and degradation of angiotensin II by the purified enzyme. *Biochim Biophys Acta*. 1970 Feb 11;198(2):255-70.

441) Lalu K, Lampelo S, Nummelin-Kortelainen M, Vanha-Perttula T. Purification and partial characterization of aminopeptidase A from the serum of pregnant and non-pregnant women. *Biochim Biophys Acta*. 1984 Sep 25;789(3):324-33.

442) Scherberich JE, Wiemer J, Herzig C, Fischer P, Schoeppe W. Isolation and partial characterization of angiotensinase A and aminopeptidase M from urine and human kidney by lectin affinity chromatography and high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*. 1990 Nov 23;521(2):279-89.

443) Lalu K, Lampelo S, Vanha-Perttula T. Characterization of three aminopeptidases purified from maternal serum. *Biochim Biophys Acta*. 1986 Sep 26;873(2):190-7.

444) Wu Q, Lahti JM, Air GM, Burrows PD, Cooper MD. Molecular cloning of the murine BP-1/6C3 antigen: a member of the zinc-dependent metalloproteinase family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Feb;87(3):993-7.

445) Nanus DM, Engelstein D, Gastl GA, Gluck L, Vidal MJ, Morrison M, Finstad CL, Bander NH, Albino AP. Molecular cloning of the human kidney differentiation antigen gp160: human aminopeptidase A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Aug 1;90(15):7069-73.

446) Hesp JR, Hooper NM. Characterisation of porcine aminopeptidase A: a type II integral membrane protein. *Biochem Soc Trans*. 1995 Nov;23(4):550S.

447) Ofner LD, Hooper NM. The C-terminal domain, but not the interchain disulphide, is required for the activity and intracellular trafficking of aminopeptidase A. *Biochem J*. 2002 Feb 15;362(Pt 1):191-7.

448) Glenner GG, McMillan PJ, Folk JE. A mammalian peptidase specific for the hydrolysis of N-terminal alpha-L-glutamyl and aspartyl residues. *Nature*. 1962 Jun 2;194:867.

449) Migaud M, Durieux C, Viereck J, Soroca-Lucas E, Fournié-Zaluski MC, Roques BP. The in vivo metabolism of cholecystokinin (CCK-8) is essentially ensured by aminopeptidase A. *Peptides*. 1996;17(4):601-7.

450) Marchiò S, Lahdenranta J, Schlingemann RO, Valdembri D, Wesseling P, Arap MA, Hajitou A, Ozawa MG, Trepel M, Giordano RJ, Nanus DM, Dijkman HB, Oosterwijk E, Sidman RL, Cooper MD, Bussolino F, Pasqualini R, Arap W. Aminopeptidase A is a functional target in angiogenic blood vessels. *Cancer Cell*. 2004 Feb;5(2):151-62.

451) Fournie-Zaluski MC, Fassot C, Valentin B, Djordjijevic D, Reaux-Le Goazigo A, Corvol P, Roques BP, Llorens-Cortes C. Brain renin-angiotensin system blockade by systemically active aminopeptidase A inhibitors: a potential treatment of salt-dependent hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 May 18;101(20):7775-80.

452) Bodineau L, Frugière A, Marc Y, Claperon C, Llorens-Cortes C. Aminopeptidase A inhibitors as centrally acting antihypertensive agents. *Heart Fail Rev*. 2008 Sep;13(3):311-9.

453) Bodineau L, Frugière A, Marc Y, Inguibert N, Fassot C, Balavoine F, Roques B, Llorens-Cortes C. Orally active aminopeptidase A inhibitors reduce blood pressure: a new strategy for treating hypertension. *Hypertension*. 2008 May;51(5):1318-25.

454) Alegre Vde S, Barone JM, Yamasaki SC, Zambotti-Villela L, Silveira PF. Lipoic acid effects on renal function, aminopeptidase activities and oxidative stress in *Crotalus durissus terrificus* envenomation in mice. *Toxicon*. 2010 Sep 1;56(3):402-10.

455) Barone JM, Alponi RF, Frezzatti R, Zambotti-Villela L, Silveira PF. Differential efficiency of simvastatin and lipoic acid treatments on *Bothrops jararaca* envenomation-induced acute kidney injury in mice. *Toxicon*. 2011 Jan;57(1):148-56.

456) Nilsson J, Ståhl S, Lundeberg J, Uhlén M, Nygren PA. Affinity fusion strategies for detection, purification,

and immobilization of recombinant proteins. *Protein Expr Purif.* 1997 Oct;11(1):1-16.

457) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 Aug 15;227(5259):680-5.

458) Püschel G, Mentlein R, Heymann E. Isolation and characterization of dipeptidyl peptidase IV from human placenta. *Eur J Biochem.* 1982 Aug;126(2):359-65.

459) Imai K, Hama T, Kato T. Purification and properties of rat brain dipeptidyl aminopeptidase. *J Biochem.* 1983 Feb;93(2):431-7.

460) Umezawa H, Aoyagi T, Ogawa K, Naganawa H, Hamada M, Takeuchi T. Diprotins A and B, inhibitors of dipeptidyl aminopeptidase IV, produced by bacteria. *J Antibiot (Tokyo).* 1984 Apr;37(4):422-5.

461) Raynaud F, Bauvois B, Gerbaud P, Evain-Brion D. Characterization of specific proteases associated with the surface of human skin fibroblasts, and their modulation in pathology. *J Cell Physiol.* 1992 May;151(2):378-85.

462) Juillerat-Jeanneret L, Aubert JD, Leuenberger P. Peptidases in human bronchoalveolar lining fluid, macrophages, and epithelial cells: dipeptidyl (amino)peptidase IV, aminopeptidase N, and dipeptidyl (carboxy)peptidase (angiotensin-converting enzyme). *J Lab Clin Med.* 1997 Dec;130(6):603-14.

463) Hong WJ, Doyle D. Molecular dissection of the NH₂-terminal signal/anchor sequence of rat dipeptidyl peptidase IV. *J Cell Biol.* 1990 Aug;111(2):323-8.

464) David F, Bernard AM, Pierres M, Marguet D. Identification of serine 624, aspartic acid 702, and histidine 734 as the catalytic triad residues of mouse dipeptidyl-peptidase IV (CD26). A member of a novel family of nonclassical serine hydrolases. *J Biol Chem.* 1993 Aug 15;268(23):17247-52.

465) Watanabe Y, Kojima-Komatsu T, Iwaki-Egawa S, Fujimoto Y. Increased excretion of proline-containing peptides in dipeptidyl peptidase IV-deficient rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 1993 Sep;81(3):323-30.

466) Iwaki-Egawa S, Watanabe Y, Kikuya Y, Fujimoto Y. Dipeptidyl peptidase IV from human serum: purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence. *J Biochem.* 1998 Aug;124(2):428-33.