

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA**



**CLONAGEM MOLECULAR DE UM SUBGRUPO DE
METALOPROTEASES DAS GLÂNDULAS DE VENENOS DE
VIPERÍDEOS E ANÁLISE DOS NÍVEIS DOS TRANSCRITOS POR
PCR EM TEMPO REAL**

Nathália de Alencar Cunha Tavares

Recife, setembro de 2009

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA**



**CLONAGEM MOLECULAR DE UM SUBGRUPO DE
METALOPROTEASES DAS GLÂNDULAS DE VENENOS DE
VIPERÍDEOS E ANÁLISE DOS NÍVEIS DOS TRANSCRITOS POR
PCR EM TEMPO REAL**

Nathália de Alencar Cunha Tavares

Orientador: Prof. Dr. Gandhi Rádís Baptista

Recife, setembro de 2009

Tavares, Nathália de Alencar Cunha Tavares

Clonagem molecular de um subgrupo de Metaloproteases das glândulas de venenos de viperídeos e análise dos níveis dos transcritos por PCR em tempo real / Nathália de Alencar Cunha Tavares. – Recife: O Autor, 2009.

53 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Bioquímica e Fisiologia, 2010.

Inclui bibliografia.

1. Metaloprotease 2. Tratamento antitumoral 3. Serpentes-Toxinas 4. Viperídeos-Brasil I. Título.

572.76 CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2010-116

Nathália de Alencar Cunha Tavares

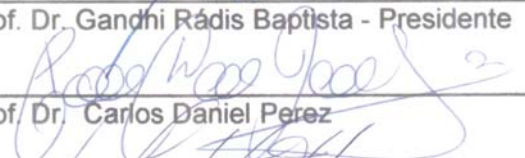
"Clonagem molecular de um subgrupo de metaloproteases das glândulas de veneno de viperídeos e análise dos níveis dos transcritos por PCR em tempo real"

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das exigências
para obtenção do título de Mestre em
Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco

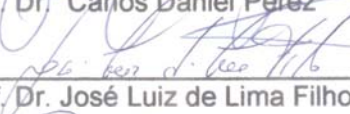
Aprovado por:



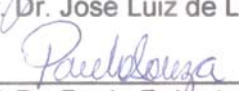
Prof. Dr. Gandhi Rádís Baptista - Presidente



Prof. Dr. Carlos Daniel Perez



Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho



Prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza

Data: 29 / 09 / 2009

À minha mãe, meu eterno exemplo de vida.

“Que eu não esqueça que a subida mais escarpada e mais
à mercê dos ventos, é sorrir de alegria.”

Clarice Lispector

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABELAS.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS	XII
RESUMO.....	XIII
ABSTRACT.....	XIV
INTRODUÇÃO	1
1. Toxinas de serpentes	2
1.1 Toxinas e suas atividades biológicas.....	3
2. Metaloproteases	5
2.1 Metaloproteases de venenos de serpentes (SVMPs).....	6
2.1.1 Classificação das SVMPs	7
3. VLAIPs - Proteínas indutoras de apoptose vascular	10
4. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (PCR em Tempo Real).....	12
OBJETIVOS	14
1. Objetivo Geral.....	15
2. Objetivos específicos	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	16
ARTIGO CIENTÍFICO	23
CONCLUSÕES	52

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, por se fazer presente em cada detalhe do meu dia e não me permitir esquecer a grandeza da vida, em nenhum momento.

À minha mãe, por mais uma etapa cumprida. Obrigada por acreditar em mim, por não medir esforços para que eu possa concretizar os meus sonhos. Obrigada pelo exemplo maravilhoso de vida que me dá todos os dias.

À minha irmã Priscilla, por provocar em mim a vontade de querer vencer sempre.

Ao meu padrasto Del, que em nenhum momento duvidou da minha capacidade e esteve sempre ao meu lado.

A André, por acreditar em mim de forma incondicional, compartilhando comigo todos os momentos, por me encher de alegria e estímulo, quando eu mais precisei.

Ao meu orientador Prof. Dr. Gandhi Rádis, pelo exercício da ciência e, principalmente, pelo exercício da vida. Durante esses anos, eu aprendi o quão importante se tornam os seus sonhos e o quão forte você se torna para ser capaz de torná-los realidade.

À Msc. Juliana Mendes Corrêa, pela colaboração essencial na realização deste trabalho.

À Prof^a Dra. Danyelly Bruneska, pela preocupação, amizade e incentivo. O meu carinho e admiração só crescem a cada dia.

Ao Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho, pela confiança depositada em mim.

Às profas. Cíntia Rocha, Maria da Paz e Elizabeth Chaves, pela preocupação, apoio e auxílio, durante toda essa etapa.

Às minhas “ICs” Klécia e Natália, minhas eternas *bixiguiinhas*, por terem compartilhado comigo todos os momentos no laboratório e tê-los tornado mais fáceis. Aprendi muito nesses anos, sentirei saudades desse convívio diário, do *nosso* jeito bagunçado de trabalhar e da felicidade que esses momentos nos proporcionavam.

Às minhas amigas de toda vida, Anne, Larissa e Lívia, por se fazerem presentes sempre.

Ao meu G-5 (Dáfila, Diogo, Fábio e Monique), pela preocupação constante, pelas conversas intermináveis, pelos momentos só nossos, por *nosso* jeito único de viver e de ser amigos.

Aos meus amigos do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA: Chirley, Conceição, Elaine, Eliane, Erik, Máira, Henrique, Michel, Rafael e, de forma especial, ao meu *cabeça*, Lucas, por toda a ajuda e contribuição indispensáveis, durante essa caminhada, mas, principalmente, pelos tantos momentos de alegria. Obrigada pelas *experiências* maravilhosas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pelo apoio financeiro, para realização desta pesquisa.

A todos os colegas e amigos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

FIGURA 1: DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA ESTRUTURA DAS CLASSES DE METALOPROTEASES DE VENENOS DE SERPENTES. EXTRAÍDO E MODIFICADO DE BJARNASON E FOX, 1994..... 8

FIGURA 2: ESQUEMA DE CLASSIFICAÇÃO DAS SVMPS DE ACORDO COM FOX E SERRANO, 2005. 9

ARTIGO CIENTÍFICO

FIGURE 1: NUCLEOTIDE AND DEDUCED AMINO ACID SEQUENCES OF CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS VAP-LIKE TOXIN (CROTASTATIN, STA) mRNA, PARTIAL CDS (GEN BANK DQ224420). 34

FIGURE 2: SCHEMATIC STRATEGY FOR THE STUDY OF CROTASTATIN-LIKE POLYMORPHISM USING REAL-TIME PCR. 36

FIGURE 3: REPRESENTATIVE AMPLIFICATION (Ct) CURVES FOR ABSOLUTE QUANTIFICATION OF CROTASTATIN-LIKE METALLOPROTEASE TRANSCRIPTS IN THE VENOM GLAND OF SOUTH AMERICAN PIT VIPERS. 38

FIGURE 4: SEQUENCE ALIGNMENT OF VAP1/CROTASTATIN-LIKE METALLOPROTEASES AND THEIR PRINCIPAL STRUCTURAL CHARACTERISTICS. 40

FIGURE 5: DENDROGRAM OF THE SOUTH AMERICAN PIT VIPER VAP1/CROTASTATIN-LIKE HOMOLOGUES AND THE BEST SCORED SNAKE VENOM METALLOPROTEASES TYPE-III MATURE TOXINS (SVMP-III). 41

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1: Proteínas de venenos de serpentes ativadoras do sistema hemostático.....	4
---	----------

ARTIGO CIENTÍFICO

Table 1: Values of tm, ct, and numbers of copy of crotastatin-like transcripts in the venom glands of <i>Bothrops atrox</i> , <i>Crotalus durissus cascavella</i> and <i>Lachesis muta rhombeata</i>	37
---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Descrição
Arg-Gli-Asp	Arginina – glicina – ácido aspártico
Bat	<i>Bothrops atrox</i>
Bjs	<i>Bothrops jararaca</i>
C.atrox	<i>Crotalus atrox</i>
Cdc	<i>Crotalus durissus cascavella</i>
cDNA	DNA complementar
Cdt	<i>Crotalus durissus terrificus</i>
Ct	Ciclo Threshold
DAG	Diacilglicerol
DCD	Aspartato-cisteína-aspartato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
ECD	Glicina-cisteína-aspartato
Kb	Kilobases
kDa	kiloDaltons
Lam	<i>Lachesis muta</i>
µL	Micro litro
mL	Mililitro
MMPs	Metaloproteases de matriz extracelular em mamíferos
NCBI	Centro Nacional para Informações Biotecnológicas (<i>National Center for Biotechnology Information</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RGD	Arginina-Glicina-Asparagina
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
RNase	Ribonuclease
RPM	Rotações por minuto
SAP	Fosfatase alcalina de camarão
SVAT	Toxinas apoptóticas de veneno de serpentes
SVMPs	Metaloproteases de veneno de serpentes
VAP-1 e VAP-2	Proteínas indutoras de apoptose de <i>Crotalus atrox</i>
VEC	Células endoteliais vasculares
VLAIP	Proteína indutora de apoptose vascular de <i>Vipera lebetina</i>

RESUMO

Constituindo fontes ricas de compostos farmacologicamente ativos, com um amplo espectro de atividades biológicas, as toxinas e enzimas presentes nos venenos das famílias *Crotalidae* e *Viperidae* estão associadas a diversas atividades biológicas, como hemorrágica, fibrinolítica, inibidora da agregação plaquetária, proteolítica, neurotóxica e miotóxica. Dentre os constituintes de venenos de serpentes, merece destaque o grupo formado pelas metaloproteases, que compreende uma grande família de toxinas, com aproximadamente 200 membros catalogados, envolvendo uma marcante diversidade de estruturas e funções biológicas.

Em meio a essa diversidade estrutural e funcional, um subgrupo de metaloproteases do tipo PIII, que apresenta atividade indutora de apoptose, vêm sendo alvo de inúmeras pesquisas. Ainda assim, muito pouco se conhece a respeito dessas proteínas. Em torno de doze exemplares dessas metaloproteases, como VAP1 e 2 de venenos de *Crotalus atrox*, foram identificadas. Desde o isolamento e purificação dessas proteínas, toxinas com alta similaridade às VAPs têm sido caracterizadas e purificadas do veneno de outras espécies de Viperídeos, que habitam diferentes lugares na Terra. Baseado no importante papel que essas metaloproteases indutoras de apoptose vascular podem desempenhar na angiogênese, através da inibição do crescimento de células neoplásicas, devido à indução da apoptose das células vasculares que nutrem o tumor, impedindo o crescimento acelerado e descontrolado das células tumorais, nós investigamos a expressão de metaloproteases VAP-like da glândula de venenos de três viperídeos, representantes do território brasileiro.

Por clonagem molecular e reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa, um gene calibrador de *Crotalus durissus terrificus*, homólogo a VAP1, nomeado crotastatin, e demais genes homólogos VAP1/crotastatin-like da glândula de veneno de *Bothrops atrox*, *Crotalus durissus cascavella* e *Lachesis muta rhombeata* foram expressos em diferentes níveis. O batroxstatin, o precursor crotastatin-like, de *B. atrox*, é expresso 87 vezes mais que crotastatin-1, de *C. d. cascavella*, e 7.5 vezes mais que lachestatins, de *L. m. rhombeata*. Além do mais, análises estruturais, *in silico*, das sequências de aminoácidos indicam que batroxstatin-2, crotastatin e lachestatin-1 e -2 apresentam domínios estruturais e sítio de ligação ao metal, iguais aos de VAP1, sendo dessa forma inclusos em um ramo filogenético que compreende as toxinas indutoras de apoptose.

Palavras-chaves: Viperídeos da América do Sul; Metaloproteases; Proteína indutora de apoptose; PCR em tempo real quantitativa (qRT-PCR); Nível de transcritos de toxinas.

ABSTRACT

Being a rich source of pharmacologically active compounds with a broad spectrum of biological activities, toxins and enzymes present in the venoms of Viperidae and Crotalidae families are associated with various biological activities, such as bleeding, fibrinolysis, inhibiting platelet aggregation, proteolytic, myotoxic and neurotoxic. Among the constituents of snake venoms, we should note the group formed by metalloproteases, which includes a large family of toxins, with approximately 200 members cataloged, involving a remarkable diversity of structures and biological functions.

In the midst of this structural and functional diversity, a subgroup of type PIII metalloproteases, which is active inducer of apoptosis, has been the subject of numerous studies. Still, very little is known about these proteins. Around a dozen copies of metalloproteases, as VAP1 and 2 of *Crotalus atrox* venom were identified. Since the isolation and purification of these proteins, toxins with high similarity to VAPs have been characterized and purified from the venom of other species of Vipers, which inhabit different places on Earth. Based on the important role of these metalloproteases that induce vascular apoptosis may play in angiogenesis, by inhibiting the growth of cancer cells due to induction of apoptosis in vascular cells that nourish the tumor, preventing the rapid and uncontrolled growth of tumor cells, we investigated the expression of VAP-like metalloprotease from the venom gland viperids three representatives of the Brazilian territory.

By molecular cloning and quantitative real-time polymerase chain reaction, using as calibrator gene the *Crotalus durissus terrificus* homolog of VAP1, the same VAP1 appointed crotastatin, and other homologous genes VAP1/crotastatin-like the venom gland of *Bothrops atrox*, *Crotalus durissus cascavella* and *Lachesis muta rhombeata* were expressed at different levels. The batroxstatin, the precursor crotastatin-like, *B. atrox*, is expressed 87 times more than crotastatin-1, *C. d. cascavella*, and 7.5 times more than lachestatin, *L. m rhombeata*. Furthermore, structural analysis, in silico, the amino acid sequences indicate that batroxstatin-2, crotastatin and lachestatin-1 and -2 domains have structural and binding site to metal, like those of VAP1, therefore being included in one branch phylogenetic comprising toxins induce apoptosis.

Keywords: South American pit viper; Metalloprotease; Venom apoptosis-inducing protein; Quantitative real-time PCR (qRT-PCR); Toxin transcript level

INTRODUÇÃO

1. Toxinas de serpentes

Os venenos de serpentes são misturas complexas com composição variada, que possuem constituintes orgânicos e inorgânicos (BJARNASON e FOX, 1988). Dentre os compostos orgânicos, destacam-se as proteínas, tóxicas e/ou com altas atividades enzimáticas.

As toxinas formam os compostos principais dos venenos, secreções e outros componentes de uma variedade de animais, plantas e fontes microbianas. As toxinas podem ser usadas para propósitos de defesa ou para lesar os sistemas cardiovasculares e nervosos, causando coagulação do sangue e fibrinólise, migração de células, processos inflamatórios, paralisia, etc.

Constituindo fontes ricas de compostos farmacologicamente ativos, com um amplo espectro de atividades biológicas, as toxinas e enzimas presentes nos venenos das famílias *Crotalidae* e *Viperidae* estão associadas a diversas atividades biológicas, tais como hemorrágica (BJARNASON e FOX, 1994), fibrinolítica, inibidora da agregação plaquetária, proteolítica, neurotóxica e miotóxica (NARVAES, 2007).

Estudos farmacológicos e bioquímicos das peçonhas de serpentes, realizados nas últimas três ou quatro décadas (FOX e SERRANO, 2005), têm mostrado a riqueza de enzimas, toxinas e compostos biologicamente ativos, além da grande diversidade de suas ações.

Os venenos de serpentes, apesar de estudados desde tempos remotos, ainda constituem uma fonte inesgotável de descobertas de novas moléculas ou novas propriedades de moléculas já conhecidas, em função da sua complexidade bioquímica e farmacológica, bem como por sua enorme variabilidade estrutural.

O interesse pelo estudo das características químicas e funcionais de toxinas isoladas de peçonhas ofídicas não é devido somente à sua relevância no envenenamento, mas também à sua possível utilização como valioso instrumento de pesquisa em outras áreas do conhecimento. Consequentemente, numerosas tentativas vêm sendo realizadas, para utilizar esses compostos como ferramentas para pesquisas na área médica.

1.1 Toxinas e suas atividades biológicas

A bradicinina, um peptídeo hipotensor, é produzido pelo veneno da *Bothrops jararaca* (Bj), quando esse é injetado na circulação do sangue de mamíferos. Esse importante peptídeo bioativo está associado ao controle da pressão sanguínea e muitos outros processos fisiológicos e patológicos (IZIDORO, 2007).

Os atributos farmacológicos e moleculares das toxinas de serpentes permitiram não só a descoberta de moléculas endógenas essenciais, associadas ao equilíbrio da pressão sanguínea, como também a identificação da enzima conversora da angiotensina I (ECA), como um alvo para uma droga de tratamento para hipertensão humana. O trabalho com as toxinas Bjs levou ao desenvolvimento do captopril, o primeiro inibidor do sítio ativo da ECA, e uma das drogas de maior sucesso no tratamento da hipertensão (IZIDORO, 2007). Dessa forma, a descoberta da bradicinina foi um dos marcos da toxinologia.

Ainda no tocante aos componentes dos venenos de serpentes, especialmente das famílias *Viperidae*, *Crotalidae* e *Elapidae*, alguns apresentam interação com proteínas da cascata da coagulação e do caminho fibrinolítico (HUTTON *et al.*, 1993). Essas toxinas têm sido indispensáveis para elucidar os complexos mecanismos fisiológicos que regulam a coagulação do sangue e o sistema vascular em mamíferos (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1989), devido à sua potência e efeitos biológicos altamente específicos (YAMAZAKI e MORITA, 2007).

Fontana (1787) foi o primeiro a observar os efeitos que os venenos de serpentes provocavam na coagulação (HUTTON *et al.*, 1993). Através da injeção do veneno de um viperídeo na veia jugular de um coelho, verificou-se que seu sangue coagulava rapidamente, provocando a morte do animal.

Em 1886, Mitchell e Reichert fizeram uma série de interessantes observações sobre os efeitos coagulantes e anticoagulantes desses venenos. Até o momento, são conhecidos mais de 100 diferentes venenos de serpentes que afetam o sistema hemostático de mamíferos, por uma variedade de mecanismos (MARKLAND, 1998).

Os componentes desses venenos podem ser agrupados em diferentes categorias, de acordo com a sua ação hemostática (Tabela 1) (MARKLAND, 1998).

Tabela 1: Proteínas de venenos de serpentes ativadoras do sistema hemostático.

Atividade funcional geral	Atividade biológica específica
Pró-coagulantes	Ativação do fator V Ativação do fator X Ativação do fator IX Ativação de protrombina Coagulação pelo fibrinogênio
Anticoagulantes	Ativação de proteína C Ligação de proteína ao fator IX/X Inibição de trombina Fosfolipase A
Fibrinolíticas	Degradação de fibrinogênio Ativação de plasminogênio
Interação com a parede vascular	Hemorrágicas
Ativação plaquetária	Indutores da agregação plaquetária Inibidores da agregação plaquetária

Algumas dessas proteínas têm potencial utilidade clínica para o tratamento de doenças humanas, como é o caso das trombinas-like, enzimas que apresentaram atividade coagulante *in vitro* e anticoagulante *in vivo*, quando purificadas dos venenos de serpentes (MATSUI *et al.*, 2000)

Stocker e Barlow, em 1976, purificaram, do veneno de *Bothrops atrox*, a batroxobina, uma enzima coagulante, tipo trombina, de massa molecular 37.000 Da, sendo muito utilizada como agente terapêutico, na prevenção e tratamento de desordens trombóticas, infarto do miocárdio, embolia pulmonar e glomerulonefrite (IZIDORO, 2007).

Nas peçonhas de serpentes, existe ainda uma classe de enzimas, as L-aminoácido oxidases, que, particularmente, vem atraindo a atenção da comunidade científica, devido à sua grande versatilidade funcional. Encontradas em altas concentrações em algumas peçonhas, contribuem para o aumento da sua toxicidade, induzindo alterações na função plaquetária, efeitos locais e outros. São capazes de induzir apoptose em diversas linhagens de

células humanas, bem como efeito antimicrobiano, antiparasitário e também anti-HIV (IZIDORO, 2007)

Ainda em relação aos componentes dos venenos de serpentes, as desintegrinas, um grupo de peptídeos que contêm um domínio de reconhecimento para adesão celular Arg-Gly-Asp (RGD) na sua sequência de aminoácidos (BODE *et al.*, 1993), constituem ferramentas importantes nos estudos de adesão celular, envolvendo diferentes receptores e substratos, em diferentes processos fisiológicos (GOULD *et al.*, 1990). As desintegrinas atuam no processo de coagulação sanguínea, como antagonistas dos receptores de fibrinogênio (integrinas GPIIb / IIIa). Acredita-se que as integrinas sirvam como a via comum final, levando à formação de pontes entre as plaquetas e a agregação plaquetária; o bloqueio da integrina GPIIb / IIIa leva à inibição da agregação plaquetária, independentemente do agente estimulante (YAMAZAKI e MORITA, 2007).

Ensaios clínicos sugerem que o bloqueio plaquetário é uma terapia eficaz, para os eventos trombóticos (MATSUI *et al.*, 2000) e reestenose, que frequentemente acompanham a doença cardiovascular e cerebrovascular. Portanto, devido ao seu potencial clínico, um grande número de desintegrinas têm sido isoladas e caracterizadas.

Entre as proteínas bioativas dos venenos de serpentes, com potencial aplicação biomédica, as metaloproteases se apresentam como um dos seus maiores componentes (BJARNASON e FOX, 1995), exercendo importantes atividades biológicas.

2. Metaloproteases

As metaloproteases compõem uma grande família dentro do grupo das hidrolases, que dependem da ligação de um metal (HOOPER, 1994), geralmente o íon zinco, em seu sítio catalítico para exercer suas atividades (MATRISIAN, 1990). Entre as funções fisiológicas dessas enzimas, pode-se destacar a angiogênese, fertilização, fusão de mioblastos, enovelamento protéico e remodelamento tecidual (BORKAKOTI, 1998).

Existem dois tipos principais de proteases nos venenos de serpentes, que são classificados, de acordo com sua estrutura, em serinoprotease e metaloprotease de venenos de serpentes (SVMP - *Snake Venom Metaloproteases*).

2.1 Metaloproteases de venenos de serpentes (SVMPs)

As metaloproteases de veneno de serpentes (SVMPs) são enzimas que possuem domínios, cujo principal efeito é a ruptura do sistema hemostático (HUTTON, 1993). Essas metaloproteases são responsáveis por induzir uma variedade de efeitos tóxicos, como hemorragias, inibição da agregação plaquetária e coagulação sanguínea (MOURA-DA-SILVA *et al.*, 2007). O potencial hemorrágico dessas metaloproteases está associado à sua capacidade de digestão das proteínas presentes na membrana basal do endotélio vascular e na matriz extracelular, como laminina, fibronectina, colágeno tipo IV e proteoglicanas (BARAMOVA, 1994; MATRISIAN, 1992).

Também proteínas envolvidas na cascata de coagulação sanguínea, como o fibrinogênio e o Fator de von Willebrand, apresentam-se como substratos para as metaloproteases, o que contribui para instalação do quadro hemorrágico (IMAI, 1989; KAMIGUTI, 1996). No entanto, já foram descritas SVMPs não hemorrágicas (WILLIS; TU, 1988; TERADA, 1999), que atuam sem o envolvimento da ativação do plasminogênio.

A estrutura primária completa de uma toxina hemorrágica de serpente (*Crotalus atrox*) foi inicialmente descrita em 1989, por SHANNON *et al.* Posteriormente, foram sequenciadas cinco toxinas hemorrágicas (HT-a, -b, -c, -d, e -f) da mesma serpente (HITE *et al.*, 1994), que analisadas em banco de dados, apresentavam homologia com outras proteínas, apenas para o domínio catalítico. A partir desses resultados, todos os estudos sobre os domínios das metaloproteases de serpentes são baseados nas metaloproteases hemorrágicas do veneno de *C. atrox* (HITE *et al.*, 1994).

Análises comparativas das estruturas primárias das SVMPs, hemorrágicas e não hemorrágicas, demonstram que os efeitos hemorrágicos, além de estarem associados à estrutura protéica (TERADA, 1999) destas metaloproteases, podem estar relacionados às modificações pós-traducionais ocorridas nessas peptidases, como o padrão de glicosilação (HITE *et al.*, 1994).

2.1.1 Classificação das SVMPs

As Metaloproteases de veneno de serpentes foram primeiramente classificadas, estruturalmente (Figura 1) por BJARNASON e FOX (1994), em quatro grupos:

- **Classe P-I:** as SVMPs desta classe consistem somente do domínio peptidase, com atividade hemorrágica relativamente fraca. A trimerelisina II de (*Trimeresurus flavoridis*), a atrolisina C (*Crotalus atrox*) e a adamalisina II de *C. adamanteus* são exemplos deste grupo.

- **Classe P-II:** inclui as metaloproteases que possuem um domínio desintegrina adicionado ao C-terminal do domínio catalítico.

- **Classe P-III:** nesta classe, a proteína madura possui um domínio metaloprotease, um domínio desintegrina-like e um domínio rico em cisteína. A trimerelisina I (*Trimeresurus flavoridis*), a atrolisina A (*Crotalus atrox*), a jararagina (*Bothrops jararaca*) e a proteinase HT-a (*Crotalus atrox*) são exemplos muito bem caracterizados desta classe.

Nestas SVMPs, o domínio desintegrina-like contém a sequência XXCD (geralmente SECD) no lugar de RGD, presente nas desintegrinas. As desintegrinas são potentes inibidores da agregação plaquetária, dependentes de fibrinogênio, isso se deve à alta especificidade de ligação das plaquetas ao receptor de superfície para fibrinogênio, a integrina IIb / IIIa.

- **Classe P-IV:** os membros desta classe possuem, em sua estrutura, além dos domínios presentes nas classes P-III, um domínio lectina-like, ligado por pontes dissulfeto. Embora os cDNAs não tenham sido completamente caracterizados, os prováveis membros desta classe são a russelina ou RVV-X (TAKEYA *et al.*, 1992) e carinactivase-1 (CA-1), uma proteína ativadora de protrombina de *Echis carinatus leucogaster*.

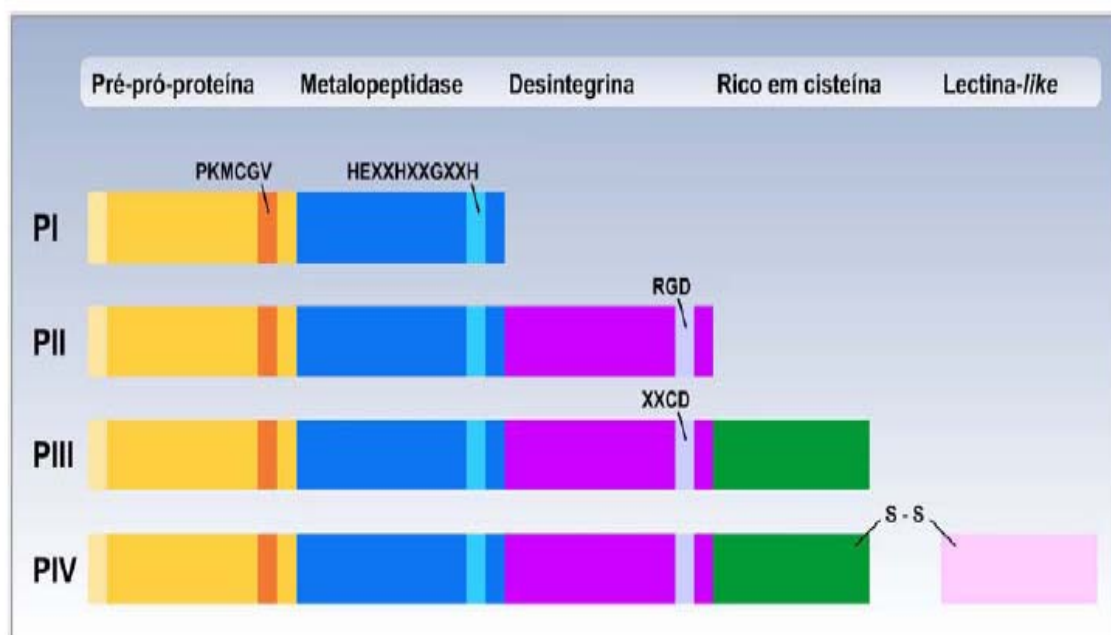


Figura 1: Diagrama esquemático da estrutura das classes de metaloproteases de venenos de serpentes. Extraído e modificado de BJARNASON e FOX, 1994.

A metaloprotease - ou domínio catalítico - é composta por cerca de 215 aminoácidos, com uma atividade endopeptidase dependente de metal, sendo menos conservado que o pró-domínio. Esses fatos sugerem que essa enzima esteja envolvida na duplicação de um gene, que parte de um ancestral comum, e que os domínios dessas metaloproteases tenham sido conservados através do processo de evolução acelerada (PAINE *et al.*, 1992).

Os domínios desintegrina e desintegrina-like podem variar de 41 até 100 resíduos de aminoácidos na sua extensão, contendo pontes dissulfeto. Esse domínio pode ser descrito como um forte ligante de integrinas. Essa ligação pode desencadear interesse pelos efeitos biológicos mediados pelas integrinas, sugerindo várias potenciais aplicações. Muitas desintegrinas são clivadas a partir do precursor PII de SVMP e possuem o motivo RGD (arginina-glicina-aspartato), relevante para integrina beta-3 (alfaIIbeta3, receptor de fibrinogênio e alfaVbeta3, receptor de vitronectina) e ligante da integrina beta-1 (alfa-5beta-1, receptor de fibronectina).

Sequências alternativas, como DCD (aspartato-cisteína-aspartato) ou ECD (glicina-cisteína-aspartato), foram relatadas. Esses domínios foram, então, chamados desintegrina-like (PAINE *et al.*, 1992; HITE *et al.*, 1994).

O domínio rico em cisteína, assim como o domínio desintegrina, possui uma alta densidade de cisteínas. Com aproximadamente 112 resíduos de extensão, está localizado na parte C-terminal do domínio desintegrina, nas SVMPs do tipo PIII. Estudos recentes têm mostrado efeitos biológicos relevantes desse domínio. Um domínio rico em cisteína recombinante de atrolizina A inibiu a agregação de plaquetas humanas induzidas por colágeno (JIA *et al.*, 2000).

Em 2005, Fox e Serrano, desenvolveram um sistema de classificação (Figura 2) ligeiramente modificado do proposto inicialmente para as SVMPs. Nesta versão, observa-se a existência de subclasses dentro das classes PII e PIII que refletem o potencial de transformação proteolítica, bem como a formação de estruturas dimérica.

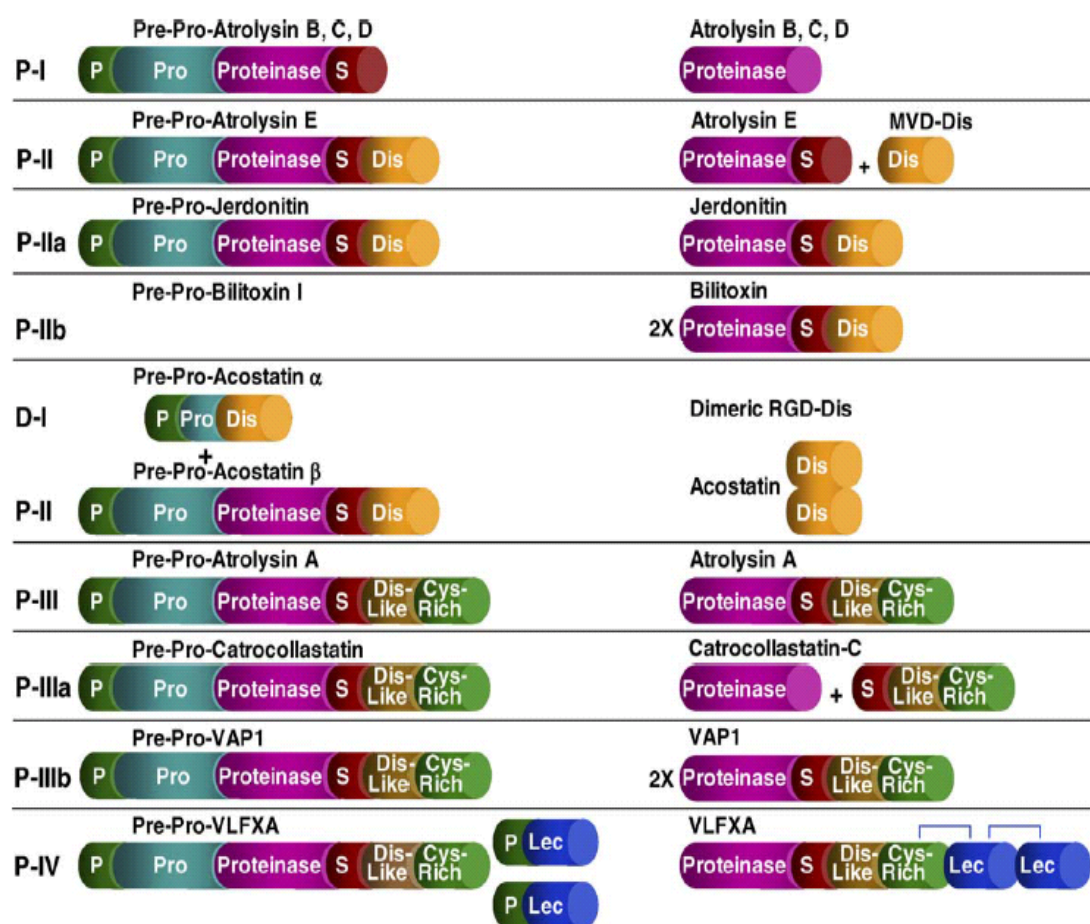


Figura 2: Esquema de classificação das SVMPs de acordo com Fox e Serrano, 2005.

Dentre as SVMPs do tipo PIII, uma atividade biológica tem chamado a atenção. Estudos recentes têm indicado que essas metaloproteases possuem a capacidade de induzir apoptose em células endoteliais.

3. VLAIPs - Proteínas indutoras de apoptose vascular

Em organismos multicelulares, a apoptose, mecanismo que leva à morte programada das células, é essencial para muitos processos fisiológicos, tais como o desenvolvimento normal, o estabelecimento de tolerância imunológica e a degeneração de tecidos. Apresenta, também, papel fundamental em diversos mecanismos, como a angiogênese (ARAKI *et al.*, 1990). Estudos sugerem que o processo apoptótico de células endoteliais vasculares não só regulam a angiogênese, como também promovem a regressão das células vasculares.

Essas células endoteliais são fundamentais na cura de ferimentos, na progressão de tumores e na metástase, devido à sua capacidade de angiogênese (LIU *et al.*, 2000). Apresentam uma parte crítica na homeostase, como coagulação sanguínea, contração dos vasos e controle da permeabilidade vascular. As integrinas das células endoteliais participam na regulação desses processos fisiológicos das células (BROOKS, e MONTGOMERY, 1994; STROMBLAD *et al.*, 1996).

Dessa forma, a possibilidade de impedir a progressão do câncer tem sido alvo de diversos estudos, e a aniquilação de células endoteliais vasculares, recrutadas pelos tumores, para o fornecimento de nutrientes e crescimento, pode constituir a fonte para tal busca (FOLKMAN, 1971).

Na verdade, o rompimento do processo de formação de novos vasos sanguíneos está se tornando um meio médico eficaz, para interromper o crescimento tumoral (ZHONG e BOWEN, 2006). Sua investigação pode ajudar a desenvolver novas terapias e medicamentos.

Até agora, as toxinas da serpente, potencialmente capazes de conter a proliferação das células do endotélio vascular, podem constituir fortes candidatas para o desenvolvimento de drogas anti-angiogênese, no combate ao câncer (RADIS-BAPTISTA, 2005; SWENSON *et al.*, 2007).

Em 1997, foi relatado o isolamento e a purificação de uma proteína do veneno de *Crotalus atrox*, que apresentava a capacidade de induzir apoptose vascular, a denominada VAP-1 (MASUDA *et al.*, 1997). Essa é considerada a primeira proteína indutora de apoptose vascular, sendo uma SVMP, do tipo PIII, com massa molecular de 110 kDa e ponto

isoelétrico de 8,5. Posteriormente, VAP2, proteína monomérica com massa molecular de 55 kDa, que mata, especificamente, células endoteliais vasculares (VECS) em cultura, também foi purificada, do veneno da mesma fonte (MASUDA *et al.*, 1998).

O mecanismo pelo qual VAP1 induz apoptose, em VECS, parece envolver $\alpha 3$ -, $\alpha 6$ -, e β_1 -integrinas, bem como a integrina associado à proteína CD9, uma vez que os anticorpos dirigidos a essas proteínas de membrana inibem a morte celular (ARAKI *et al.*, 2002). Além disso, a ativação das proteínas caspases, acompanhada da fragmentação severa de células é adicionalmente induzida por VAP1 (MARUYAMA *et al.*, 2005).

Com a descoberta das VAPs, outras proteínas, que apresentam a mesma capacidade de induzir a apoptose, passaram a ser clonadas e purificadas. Entre elas, encontra-se uma metaloprotease hemorrágica, halysase, isolada a partir do veneno de serpente *Gloydius halys*, que também induz apoptose, em células endoteliais (YOU *et al.*, 2003). A análise da sequência codificante do cDNA revelou que essa enzima consiste de domínios multifuncionais, incluindo um pró-proteína, um protease, um disintegrin-like e um domínio rico em cisteína. Halysase inibe, fortemente, a proliferação de células endoteliais de veia umbilical de humano, de uma forma dose-dependente.

Recentemente, metaloproteases de veneno de serpente, tais como HV1 (MASUDA, 2001), foram notificadas, por induzir extensa morte celular em células endoteliais vasculares humanas. HV1 foi isolada do veneno de *Trimeresurus flavoridis* e apresenta 85% de similaridade com VAP1.

Outra proteína indutora de apoptose de células endoteliais humanas (VLAIP) também foi purificada, clonada e caracterizada do veneno da *Vipera lebetina*. Essa metaloprotease heterodimérica é uma glicoproteína com massa molecular de aproximadamente 106 kDa (TRUMMAL *et al.*, 2005).

Devido à alta especificidade de seu alvo, as toxinas do veneno das serpentes têm sido cada vez mais usadas como ferramentas farmacológicas e como protótipos para o desenvolvimento de drogas.

Para esse propósito, duas técnicas da biologia molecular vêm sendo utilizadas com maior frequência: a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e a Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real, o que possibilita o desenvolvimento de futuras estratégias na área médica e biomédica.

4. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (PCR em Tempo Real)

A Reação em cadeia da polimerase (PCR) consiste em amplificar cópias de DNA *in vitro*, usando os elementos básicos do processo de replicação natural do DNA. É o método para a rápida amplificação de sequências específicas de DNA. No entanto, apesar de representar um grande avanço na tecnologia do DNA recombinante, a PCR apresenta limitações, quando utilizada como método quantitativo. Isso se deve à dificuldade da quantificação do produto da PCR, pois essa reação origina uma quantidade de produtos semelhantes, independentemente da quantidade inicial do DNA molde presente na reação (KUBISTA *et al.*, 2006).

Essa limitação provocou a necessidade de criação de uma técnica mais específica, para análises quantitativas. Em 1992 Higuchi *et al* introduziram a PCR em tempo real, permitindo a quantificação de fragmentos de DNA e RNA (NOVAIS *et al.*, 2005; KUBISTA *et al.*, 2006; DUSSAULT *et al.*, 2006). A PCR em tempo real realiza a quantificação desses ácidos nucleicos de maneira precisa e altamente reproduzível, pois determina seus valores durante a fase exponencial da reação (NOVAIS *et al.*, 2005). As características relevantes da PCR em tempo real são a rapidez, a especificidade, a sensibilidade e a quantificação. É realizada em um sistema de tubos fechados e não requer manipulação alguma de amostra pós-PCR. Portanto, o potencial de contaminação da PCR no laboratório é reduzido, uma vez que os produtos amplificados podem ser analisados e eliminados sem abertura dos tubos de reação. Esse método permite o uso de um gene de normalização-controle, como β -actina. A análise é efetuada, em tempo real, durante a fase de acumulação do produto (HEID *et al.*, 1996).

A curva de quantificação dos ácidos nucleicos, através da PCR em tempo real, é dividida em 3 fases: a linha basal, em que não há produtos de PCR suficientes para detectar fluorescência, a fase *log* ou exponencial, em que a quantidade de produtos de PCR dobra a cada ciclo, e a fase platô, em que não há mais aumento no número de produtos (WILHELM *et al.*, 2003). O ponto na curva, dentro da fase exponencial, em que a quantidade de fluorescência ultrapassa o sinal da linha basal (em inglês “*background*”), é chamado de valor de ciclo do “*threshold*” (Ct) (DUSSAULT *et al.*, 2006). Esse ponto é de crucial importância, pois permite determinar a concentração de ácidos nucleicos com maior acuidade (WILHELM *et al.*, 2003).

A PCR em tempo real pode ser utilizada para diversas aplicações, tais como: para a quantificação do número de cópias de transgênicos, a identificação de organismos

geneticamente modificados, a detecção e quantificação de patógenos, entre outras. É, também, um sensível método para detecção de ácidos nucleicos, porque permite um alcance dinâmico na quantificação de uma grande quantidade de alvos (HEID *et al.*, 1996). Na PCR em tempo real, existem dois métodos de quantificação: a detecção não-específica e a específica. O método que utiliza *Syber Green*, um fluoróforo com excitação e emissão máxima de 494nm e 521nm (DUSSAULT *et al.*, 2006), que se liga à fita-dupla de DNA, emitindo uma fluorescência verde, detectada pelo sistema de recepção do equipamento (NOVAIS *et al.*, 2005), é o exemplo mais utilizado de detecção não-específica. O *TaqMan*, uma sonda altamente específica para a sequência-alvo, libera fluorescência apenas na presença do produto de PCR de interesse.

A PCR em tempo real baseia-se na detecção dos produtos amplificados de DNA, ligados às moléculas fluorescentes, que aumentam a intensidade da emissão à medida que o produto da PCR acumula-se em cada ciclo (DUSSAULT *et al.*, 2006). A emissão da fluorescência é gravada durante cada ciclo e representa a quantidade do produto amplificado (NOVAIS *et al.*, 2005). A plataforma da PCR, em tempo real, requer um sistema ótico para excitação da fluorescência e outro para a recepção da emissão. As informações adquiridas são transmitidas para *softwares*, que analisam e calculam os dados finais da reação.

Como um protocolo adicional, pós-PCR, da PCR em tempo real, a curva de *melting* pode ser realizada a fim de que as sequências amplificadas sejam caracterizadas (WILHELM *et al.*, 2003). A curva de *melting* é realizada pelo aquecimento lento e gradual do produto amplificado na presença de fluoróforo. À medida que a amostra aquece, a fluorescência decresce rapidamente (AKEY *et al.*, 2001). A curva de *melting* baseia-se no princípio de que cada fita-dupla de DNA apresenta sua temperatura de *melting* (T_m) específica, que é definida como a temperatura em que 50% do DNA fita-dupla torna-se fita simples (ROCHE), coincidindo com o mais acentuado decréscimo do sinal do fluoróforo. Essa fase pode ser identificada mais simples e convenientemente como um pico gerado pela derivação negativa da curva de *melting* (WILHELM *et al.*, 2003).

A curva de *melting* é, primariamente, determinada pelo comprimento e grau do conteúdo de guanina-citosina do DNA fita-dupla (WITTWER *et al.*, 2001) e, realizando a diferença entre diferentes produtos amplificados, têm sido aplicada em diversas análises, como verificação de níveis de expressão de diferentes transcritos. Tal curva também permite identificar a formação de produtos não específicos, bem como de dímeros de *primers*.

OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo, revelar a existência, de genes precursores distintos de metaloproteases indutoras de apoptose vascular, provenientes da glândula de veneno, e seus diferentes níveis de expressão em espécies de viperídeos, representantes da América do Sul.

2. Objetivos específicos

- Sintetizar a primeira fita de cDNA das diferentes espécies de viperídeos representantes da América do Sul;
- Clonar os diferentes cDNAs em vetor plasmidial;
- Caracterizar os clones obtidos por PCR de homologia;
- Analisar quantitativamente os produtos obtidos por meio da técnica de PCR em tempo real;
- Analisar estatisticamente os dados;
- Sequenciar e caracterizar filogeneticamente os homólogos obtidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas

AKEY, J.M., D. SOSNOSKI, *et al.* Melting curve analysis of SNPs (McSNP): a gel-free and inexpensive approach for SNP genotyping. *Biotechniques*, v. 30 (2), p.358-62, 2001.

ARAKI, S., SHIMADA, Y., KAJI, K., HAYASHI, H. Apoptosis of vascular endothelials by fibroblast growth factor deprivation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.168, p.1194-1200, 1990.

ARAKI, S., MASUDA, S., MAEDA, H., YING, M.J., HAYASHI, H. Involvement of specific integrins in apoptosis induced by vascular apoptosis-inducing protein 1. *Toxicon* 40 (5), p.535-42, 2002.

BARAMOVA, E. N., P. COUCKE, *et al.* Evaluation of matrix metalloproteinases and serine proteases activities in three B16 melanoma cell lines with distinct tumorigenic potential. *Anticancer Res.*, v.14, p.841-6, 1994.

BJARNASON, J.; FOX, J.W. Hemorrhagic toxins snake venoms. *Journal Toxicology-Toxin Reviews*, New York, v.7, p.121-209, 1988/89.

BJARNASON, J.B., FOX, J.W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacol Ther.*, v.62, p.325-72, 1994.

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

BODE, W.; GOMIS-RUTH, F.X; STOCKER, W. Astacins, serralsins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the "metzincins". *FEBS Lett.*, v.331, p.134-140, 1993.

BORKAKOTI, N. Matrix metalloproteases: variations on a theme. *Prog. Biophys.Mol.Biol.*, v.70, p.73-94, 1998.

BROOKS, P. C., A. M. MONTGOMERY, *et al.* Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell.*, v.79, p.1157-64, 1994.

DUSSAULT, A-A.; E POULIOT, M. Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. *Biol. Proced. Online.* 8(1): 1-10. 2006.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* 285, 1182-6, 1971.

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

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

GUTIÉRREZ, J.M. & B. LOMONTE. Local tissue damage induced by Bothrops snake venoms, a review. *Em.inst.Butantan.*, v.51, p. 211-223, 1989.

HEID, C.A., J. STEVENS, *et al.* Real time quantitative PCR. *Genome Res.*, v.6, n.10, p.986-94, 1996.

HITE, L.A.; SHANNON, J.D.; BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. cDNA sequence for four snake venom metalloproteinases: Structure, classification, and their relationship to mammalian reproductive proteins. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.308, p.182-191, 1994.

HOOPER, N. M. Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett.*, v.354, p.1-6, 1994.

HUTTON R.A., WARRELL D.A. Action of snake venom components on the haemostatic system. *Blood Reviews* 7:176-189, 1993.

IMAI, K.; TOSHIKI, N.; HISAYOSHI, S.; OWNBY, C.L. Hemorrhagic toxin from the venom of *Agkistrodon bilineatus* (common cantil). *Int. J. Biochem.*, v.21, p. 667-673, 1989.

KAMIGUTI, A.S.; HAY, C.R.M.; ZUZEL, M. Inhibition of collagen-induced platelet aggregation as the result of the cleavage of the $\alpha 2\beta 1$ integrin by the metalloproteinase jararhagin. *Biochem. J.*, v. 320, p. 635-641, 1996.

KUBISTA, M., ANDRADE, J.M., BENGTSSON, M., FOROOTAN, A., JONÁK, J., LIND, K., SINDELKA, R., SJÖBACK, R., SJÖGREEN, B., STRÖMBOM, L., STÅHLBERG, A., ZORIC, N., 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* 27 (2-3), 95-125.

LIU, W., S. A. AHMAD, *et al.* Endothelial cell survival and apoptosis in the tumor vasculature. *Apoptosis.*, v.5, p.323-8, 2000.

ISIDORO, L.F.M. Caracterização bioquímica e funcional de uma nova L -aminooxidase isolada da peçonha da serpente *Bothrops pirajai*, 2007.

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

MARUYAMA, J., H. HAYASHI, *et al.* Severe cell fragmentation in the endothelial cell apoptosis induced by snake apoptosis toxin VAP1 is an apoptotic characteristic controlled by caspases. *Toxicon.*, v.46, p.1-6, 2005.

MASUDA, S., ARAKI, S., YAMAMOTO, T., KAJI, K., HAYASHI, H. Purification of a vascular apoptosis-inducing factor from hemorrhagic snake venom. *Biochem Biophys Res Commun* 235 (1), 59-63, 1997

MASUDA, S., HAYASHI, H., ARAKI, S. Two vascular apoptosis-inducing proteins from snake venom are members of the metalloprotease/disintegrin family. *Eur J Biochem* 253 (1), 36-41, 1998.

MASUDA, S., H. HAYASHI, *et al.* Purification, cDNA cloning and characterization of the vascular apoptosis-inducing protein, HV1, from *Trimeresurus flavoviridis*. *Eur J Biochem.*, v.268, p.3339-45, 2001.

MATRISIAN, LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodelling. *Trends Genet*; 6: 121-25, 1990.

MATRISIAN, L. M. The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays*, v.14, p.455-63, 1992.

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

MOURA-DA-SILVA, A.M., BUTERA, D., TANJONI, I., 2007. Importance of snake venom metalloproteinases in cell biology: effects on platelets, inflammatory and endothelial cells. *Curr Pharm Des.* 13 (28), 2893-905.

NARVAES, L. V. P. Isolamento e caracterização de toxinas do veneno de *Bothrops alcatraz*, 2007.

NOVAIS, C.M. E PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase. *Biotecnologia Ciência & desenvolvimento.* 33:10-3. 2005.

PAINE, M.J.; DESMOND, H. P.; THEAKSTON, R. D. G.; CRAMPTON, J. M. Purification, cloning, and molecular characterization of a high molecular weight metalloprotease, Jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. *J. Biol. Chem.*, v.267, p. 22869-22876, 1992.

RÁDIS-BAPTISTA, G. Integrins, Cancer and Snake Toxins. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases.* 11(3): 217-241, 2005.

Roche Applied Science. www.roche.com. SNP analysis and genotyping using melting curves.

SHANNON, J. D., E. N. BARAMOVA, *et al.* Amino acid sequence of a *Crotalus atrox* venom metalloproteinase which cleaves type IV collagen and gelatin. *J Biol Chem.*, v.264, p.11575-83, 1989.

STROMBLAD, S. E D. A. CHERESH. Integrins, angiogenesis and vascular cell survival. *Chem Biol.*, v.3, p.881-5, 1996.

SWENSON, S., RAMU, S., MARKLAND, F.S.. Anti-angiogenesis and RGD-containing snake venom disintegrins. *Curr Pharm Des.* v.13 (28), p. 2860-71, 2007.

TAKEYA, H.; NISHIDA, S.; MIYATA, T.; KAWADA, S.; SAISAKA, Y.; MORITA, T.; IWANAGA, S. Coagulation factor X activating enzyme from Russell's viper venom (RVV-X). A novel metalloproteinase with disintegrin (platelet aggregation inhibitor) - like and C-type lectin-like domains. *J. Biol. Chem.*, v.267, p.14109-14117, 1992.

TERADA, S.; HORI, J.; FUJIMURA, S.; KIMOTO, E. Purification and amino acid sequence of brevilysin L6, a non-hemorrhagic metalloprotease from *Agkistrodon halys brevicaudus* venom. *J. Biochem.*, v.125, p.64-69, 1999.

TRUMMAL, K., K. TONISMAGI, *et al.* A novel metalloprotease from *Vipera lebetina* venom induces human endothelial cell apoptosis. *Toxicon.*, v.46, p.46-61. 2005.

WILHELM, J. e PINGOUD, A.; Real-time polymerase chain reaction. *Chembiochem.* 4(11):1120-8. 2003.

WILLIS, T. W., TU, A.T. Purification and biochemical characterization of atroxase, a nonhemorrhagic fibrinolytic protease from western diamondback rattlesnake venom. *Biochemistry.*, v.27, p.4769-77, 1988.

WITTEWER, C.T.; HERRMANN, M.G.; GUNDRY, C.N. e. Elenitoba-Johnson, K.S.J. Real-Time Multiplex PCR Assays. *Methods* 25:430–442. 2001.

YAMAZAKI, Y., MORITA, T. Snake venom components affecting blood coagulation and the vascular system: structural similarities and marked diversity. *Curr Pharm Des.* 13 (28), 2872-86, 2007.

YOU, W. K., H. J. SEO. A novel metalloprotease from *Gloydius halys* venom induces endothelial cell apoptosis through its protease and disintegrin-like domains. *J Biochem (Tokyo)*, v.134, p.739-49, 2003.

ZHONG, H., BOWEN, J.P., 2006. Antiangiogenesis drug design: multiple pathways targeting tumor vasculature. *Curr Med Chem.* 13 (8), 849-62.

ARTIGO CIENTÍFICO

Manuscrito publicado na revista *Toxicon*.



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicon



**EXPRESSION OF mRNAs FOR VAP1/CROTASTATIN-LIKE
METALLOPROTEASES IN THE VENOM GLANDS OF THREE SOUTH
AMERICAN PIT VIPERS ASSESSED BY QUANTITATIVE REAL-TIME PCR**

Artigo publicado no periódico Toxicon

Volume 52, Issue 8, 15 December 2008, Pages 897-907.

doi:10.1016/j.toxicon.2008.08.022

N.A.C. Tavares a, J.M. Correia a, M.C. Guarnieri b, J.L. Lima-Filho a, A.R.B. Prieto-da-Silva c, G. Rádis-Baptista a,*

a Department of Biochemistry and Laboratory of Immunopathology Keizo Asami – LIKA, Federal University of Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego 1235, Cidade Universitária, Recife, PE 50670-901, Brazil

b Laboratory of Venomous Animals and Toxins – LAPTx, Federal University of Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego 1235, Cidade Universitária, Recife, PE 50670-901, Brazil

c Molecular Toxinology Laboratory, Butantan Institute, Av. Vital Brazil 1500, São Paulo, SP 05503-900, Brazil

Abstract

Snake venom metalloproteases encompass a large family of toxins, with approximately 200 members already catalogued, which exhibit a diversity of structures and biological functions. From this relatively large number, only a dozen examples of apoptosis-inducing metalloproteases, like VAP1 and 2 from the venom of *Crotalus atrox*, are known. Since most VAP1-like toxins ever characterized were purified from the venom of Viperidae species inhabiting diverse places on earth, we investigate the expression of VAP-like metalloproteases in the venom gland of three representative pit vipers of the Brazilian territory. By molecular cloning and quantitative real-time polymerase chain reaction, using as calibrator gene the *Crotalus durissus terrificus* homolog of VAP1, named crotastatin, it is reported here that VAP1/crotastatin-like homologues in the venom gland of *Bothrops atrox*, *C. d. cascavella* and *Lachesis m. rhombeata* are expressed at different levels. Hence, batroxstatins, the crotastatin-like precursors from *B. atrox*, are expressed 87 times more than crotastatin-1, from *C. d. cascavella*, and 7.5-fold that lachestatins, from *L. m. rhombeata*. Moreover, *in silico* structural analysis of amino acid sequences indicates that batroxstatin-2, crotastatins and lachestatin-1 and -2 which share the archetypal motifs and metal-binding sites of VAP1, are subgrouped in a branch that comprises some apoptosis-inducing toxins.

Keywords: South American pit viper; Metalloprotease; Venom apoptosis-inducing protein; Quantitative real-time PCR (qRT-PCR); Toxin transcript level

1. Introduction

Metalloproteases constitute a large family of biologically active proteins isolated from the venom of diverse Viperidae (Crotalidae and Viperinae) species (Ramos and Selistre-de-Araújo, 2006). Snake venom metalloproteinases (SVMPs) comprise zinc-dependent enzymes of the repolysin family. Fundamentally, the members of such metalloprotease subgroup are structurally classified into four main classes (P-I, P-II, P-III, or P-IV), according to the presence of distinct protein domains. Metalloproteases of P-I class (20–30 kDa) includes enzymes presenting only a metalloproteinase domain; P-II enzymes (30–60 kDa) possess both the metalloproteinase and a disintegrin-like domain; P-III (60–100 kDa) have the two domains of P-II in addition to a cysteine rich domain; and members comprised in P-IV class have all the aforementioned domains linked to a type-C lectin subunit by disulfide bridges ([Hite et al., 1994] and [Bjarnason and Fox, 1995]). Based on proteolytic processing of latent precursor pro-proteinases and the formation of dimeric structures, representative members are further subclassified with the PII and PIII classes (Fox and Serrano, 2005), reflecting the vast modular diversity of SVMPs. Moreover, the proteolytic processing of PII and PIII SVMPs give rise respectively to the disintegrins and disintegrin-like toxins (Calvete et al., 2005).

Snake venom metalloproteases induce severe hemorrhagic disturb – an activity associated in some part to their proteolytic domain (Gutiérrez et al., 2005). However additional data have showed that these enzymes are also responsible for local myonecrosis, skin damage, inflammatory reaction, inhibition of platelet aggregation, and induction of apoptosis in endothelial cells (Ramos and Selistre-de-Araújo, 2006; Moura-da-Silva et al., 2007). This latter effect is particularly worth of note, since one strategy to undermine cancer progression is to target and aniquilate vascular endothelial cells which are recruited by tumor for blood (and nutrient) supply and growth (Folkman, 1971). In fact, the disruption of the process of new blood vessel formation (angiogenesis) is becoming an effective medical management to arrest tumor growth (Zhong and Bowen, 2006). Thus far, snake toxins potentially able to restrain vascular endothelial cell proliferation might constitute promising candidates for the development of anti-angiogenic peptide drugs against cancer ([Rádis-Baptista, 2005] and [Swenson et al., 2007]).

In 1997, Masuda and collaborators reported the purification of the first vascular apoptosis-inducing protein (VAP1) from the hemorrhagic venom of *Crotalus atrox* (Masuda et al., 1997). VAP1 is a disulfide-bridged homodimer P-III SVMP with a molecular mass of 110 kDa and an isoelectric point of 8.5. Thereafter, VAP2, a monomeric protein with a

molecular mass of 55 kDa and an acidic character (pI 4.5), which kills specifically vascular endothelial cells (VECs) in culture, was also purified from the same venom source (Masuda et al., 1998). The mechanism by which VAP1 induces apoptosis in VECs seems to involve α_3 -, α_6 -, and β_1 -integrins, as well as the integrin-associated protein CD9, since antibodies directed to these membrane proteins inhibit cell death (Araki et al., 2002). Moreover, activation of caspase accompanied of severe cell fragmentation is additionally induced by VAP1 (Maruyama et al., 2005).

Since the time that VAP1 and 2 were first purified and cloned, a stepwise increase in the number of reports about the ability of other SVMPs in inducing apoptosis in endothelial cells have been published ([Masuda et al., 2001], [You et al., 2003] and [Wu and Huang, 2003]; [Tanjoni et al., 2005] and [Baldo et al., 2008]). Hence, from the venom of *Trimeresurus flavoviridis* the first identified ortholog of VAP1, named HV1, was purified. HV1 is a homodimeric VAP1-like metalloprotease, with a molecular mass of 110 kDa and showing 85% of similarity with VAP1, capable of inducing extensive cell death in vascular endothelial cells (Masuda et al., 2001). Another example of VAP-like toxin is halysase, from the snake venom of *Gloydus halys*. It belongs to class P-III SVMP with hemorrhagic-inducing properties, and with a strong capacity to inhibit the proliferation of human umbilical vein endothelial cells in a dose-dependent manner. Halyase is another example, in which the inhibition of cell adhesion to extracellular matrix proteins, and the hydrolysis of fibronectin, vitronectin, and type- IV collagen, as well $\alpha_1\beta_1$ and $\alpha_5\beta_1$ integrins, and the α -chain of fibrinogen, contribute to cell death ([You et al., 2003] and [You et al., 2006]). A human endothelial cell apoptosis-inducing protease (VLAIP) was also purified, cloned and characterized from the venom of *Vipera lebetina*. This metalloprotease is a heterodimeric glycoprotein with molecular mass of about 106 kDa. This SVMP hydrolyzes the A α -chain and more slowly the B β -chain of fibrinogen (Trummel et al., 2005).

Albeit this progress, nothing is known until now about VAP-like proteins and their transcripts in the venom and venom glands of a South American pit viper snakes. Therefore, our interest was to verify whether South American rattlesnakes (*C. durissus* sp.) and two other pit vipers, from the genus *Bothrops* and *Lachesis*, inhabiting different geographical regions of Brazil, express VAP1-like genes in their venom glands. By molecular cloning and quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR), we present data in this work that reveal the existence of distinct precursors and variable level of expression of VAP-like metalloprotease in the venom glands of these South American pit vipers.

2. Materials and methods

2.1. Snake specimens

Specimens of three genus of South American pit vipers (Crotalinae subfamily) were from distinct laboratories of Herpetology, in Brazil: *Bothrops atrox*, captured in Serra de Itapipoca (Ceara, CE, Brazil), was from Federal University of the Ceará (Fortaleza, CE, Brazil); *Crotalus durissus terrificus*, captured in Martinópolis (São Paulo, SP, Brazil), was from Butantan Institute (São Paulo, SP, Brazil); *Crotalus durissus cascavella*, captured in the neighborhood of Recife (Pernambuco, PE, Brazil), was from Federal University of Pernambuco (Recife, PE, Brazil), and *Lachesis muta rhombeata*, captured in Igarassu (Pernambuco, PE, Brazil), was from Federal Rural University of Pernambuco (Recife, PE, Brazil). All snakes were adult specimens, caught in the nature, as above mentioned, and maintained in the laboratory for no longer than 1 month. The animals used in this investigation presented no signals of any known reptile disease.

The venom glands were removed from a single specimen of each sampled snake species 3 days after venom extraction, when the maximum level of RNA synthesis is achieved (Rottenberg et al., 1971). Then, the glands were quickly frozen in liquid nitrogen, and stored in deep freezer (at -80 °C) until used.

2.2. Preparation of mRNAs from Viperidae venom glands and first strand cDNA synthesis

Frozen venom glands were finely powdered in a mortar and pestle under liquid nitrogen, and total RNA was purified using the Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. The quality and yield of total RNA were verified by the integrity of 28S and 18S rRNA, through denaturing agarose gel electrophoresis, and spectrophotometrically using the ratio 260/280 nm.

Poly(A⁺)-RNA was purified from total RNA by a complex of oligo(dT)-biotin and streptavidin-MagneSphere paramagnetic particles (PolyAtract system, Promega, Madison, WI, USA). The mRNAs were quantified and used for cDNA synthesis. ImProm-II reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA) was used to prepare the full length cDNA, as follow: mRNA (1.2 µg) from all Viperidae venom glands were mixed with 500 ng oligo-dT primer (Promega, Madison, WI, USA), in a final volume of 14 µl, heated to 70 °C for 10 min,

to disrupt possible secondary structures, and quickly cold on ice. Thereafter, a total of 100 U of reverse transcriptase were combined with 1 mM of each deoxynucleoside triphosphate (dNTPs), 40 U of RNase inhibitor, and RNase-free water to make a final reaction volume of 25 µl. The reverse transcription was conducted at 42 °C for 60 min, and finally heated to 70 °C for 15 min.

2.3. Homology screening-PCR of VAP-like homologue in *Crotalus durissus terrificus* venom gland cDNA library

A *Crotalus durissus terrificus* venom gland cDNA phage library was constructed with the gland tissue of a single adult animal, as described in Radis-Baptista et al. (1999). The library was titrating and pools of approximately 10⁶ plaque forming units (pfu) were used as template in several separated homology screening polymerase chain reactions (HR-PCRs). Each reaction, in a final volume of 50 µl, was constituted by 2.5 U of Platinum Taq DNA polymerase, 2.0 mM of MgCl₂, dNTPs, of 0.2 µM of each forward and reverse primer, in high fidelity PCR buffer (60 mM Tris-SO₄, pH 8.4, 18 mM ammonium sulfate, 2.5 mM MgSO₄). The primers utilized to isolate the *C. d. terrificus* VAP-like toxin cDNA were the SVAT-SE1 (5'-GAACAACAAAGATACTTGAACGCCA-3') and SVAT-AS2 (5'-TGATGTGAATACACCCTACTAA-3'), which correspond exactly to the 5' and 3'-stretch of the encoding nucleotide sequence of mature VAP1 toxin homodomain. The cloned *C. d. terrificus* VAP-like cDNA was sequenced as further described.

2.4. Quantitative real-time PCR analysis

The cloned *C. d. terrificus* VAP-like cDNA, named 'crotastatin' (GenBank accession number DQ224420), encompasses a sequence of 1266 nucleotides (1266 bp), which encodes the three typical SVMPS' protein domains: zinc-dependent metalloprotease (ZnMc superfamily or adamalysin II like subfamily), disintegrin (DISIN superfamily) and cysteine rich domain (ADAM CR superfamily). Based on crotastatin cDNA sequence, the primers SVAT-ASRT1 (5'- TAACTGAGCATTATCATGACTTTTGC-3') and SVAT-SERT2 (5'-ACGGTTACTGCTACAATGGGAA-3') were synthesized (Integrated DNA Technologies – IDT, Coralville, IA, USA) and used in combination with SVAT-SE1 and SVAT-AS2, respectively, in all experiments of quantitative real- time polymerase chain reaction (qRT-PCR). The primer pair SVAT-SE1/SVAT-ASRT1 was used to amplify a sequence of 300 bp

(RT1), which corresponds to the initial 5'-stretch of the zinc-dependent metalloprotease domain of crostastatin and VAP1, while the pair SVAT-SERT2/SVAT-AS2 was to generate an amplicon of 350 bp (RT2), which covers the 3'-terminal cysteine rich domain of crostastatin. The standard curve of crostastatin amplification was constructed by serial dilution of a cDNA solution, which was measured spectrophotometrically at 260 nm.

To convert the number of copies of crostastatin mRNA in the venom glands of all pit vipers used in this work, the following formula was used: number of copies = (amount * 6.022×10^{23})/(length * 1×10^9 * 650). Thus, 1 μ g of 1266 bp double-stranded (ds-) cDNA = 7.32×10^{11} molecules.

The single-stranded cDNA (ss-cDNA) samples of each South American pit viper venom glands (i.e., *B. atrox*, *C. d. cascavella* and *L. m. rhombeata*) were diluted to yield synthesized single-stranded (ss) cDNA equivalent to 0.8 and 0.08 ng of mRNA per reaction (20 μ l). The specific primer pairs were used (SVAT-SE1/SVAT-ASRT1 and SVAT-SERT2/SVAT-AS2). Amplification of crostastatin-like cDNAs were carried out in the Rotor-Gene 3000 operated with its respective software, version 6.0.19 (Corbett Research, Mortlake, Australia). Each reaction consisted of: 1 μ l of ss-cDNA solution (0.8 and 0.08 ng of reverse transcribed messenger RNA), 500 nM of primers, 10 μ l of SYBR Green PCR Core Reagent (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), in a final reaction volume of 20 μ l. Amplification conditions were as follows: 95 °C (30 s), 55 °C (30 s), 72 °C (20 s) in 45 repetitions. Levels of β -actin transcript proved to be stable among the tissues in all reactions of qRT-PCR amplification. Fluorescence was collected at 494– 521 nm during the extension phase.

Specificity of each reaction was ascertained after completion of the amplification protocol. This was achieved by performing the melting procedure (55–90 °C; 1 °C/5 s). Additionally, the melting curves and melting temperature (T_m) were used to discriminate distinct crostastatin-like cDNA precursors. Finally, the PCR products were separated on a 1.8% agarose gel, stained with 0.5 μ g/ml of ethidium bromide, and visualized with an UV transilluminator (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA).

2.5. Data analysis

Threshold and threshold cycle (Ct) values were automatically determined by Rotor Gene 6.0.19 software, using default parameters. The Ct and T_m data were expressed as mean of two or more measurements $\pm$ SEM. The absolute quantification of crostastatin-like in South American pit viper venom glands was done as described by Overbergh et al. (1999). The

values (copy numbers) were normalized to one microgram of messenger RNA. The copy number of molecules was presented as mean of nine measurements $\pm$ SEM. The corresponding real-time PCR efficiencies (E) of cycles in exponential phase were calculated from the given slopes (S) in Rotor Gene 6.0.19 software, according to the equation: $E = 10^{(-1/k)} - 1$. The linearity was expressed as square of Pearson correlation coefficient (R^2).

2.6. Cloning of crotastatin-like cDNAs from the venom gland of *B. atrox*, *C. d. cascavella* and *L. m. rhombeata* pit vipers

Crotastatin-like double-stranded complementary DNA (ds-cDNA) were prepared by reverse transcription coupled to polymerase chain reaction (RT-PCR) as follow: 1.0 μ g of each mRNA pool prepared from snake venom glands of *Bothrops atrox* (Bat), *Lachesis muta rhombeata* (Lam), and *Crotalus durissus cascavella* (Cdc) was separately combined with 1.0 μ g of oligo-dT primer (Promega, Madison, WI, USA) and sterile deionized water (to a total volume of 14 μ l). The RNA and oligo-dT mixture was heated at 70 °C for 10 min, to disrupt possible secondary structures, and then quickly cooled on ice. Thereafter, a total of 100 U of ImProm-II reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA), in reaction buffer, were combined with 1 mM of each deoxynucleoside triphosphate (dNTPs), 40 U of RNase inhibitor, and RNase-free water to make a final reaction volume of 25 μ l. The reverse transcription was conducted at 42 °C for 60 min. The reaction was halted by heat-inactivating the reverse transcriptase at 70 °C for 15 min. The ds-cDNA products were diluted 50-fold and an aliquot of 2 μ l were transferred to a high fidelity PCR mixture, using the primers SVAT-SE and SVAT-AS, as above detailed. The VAP1/crotastatin-like cDNAs were subcloned into pGEM-T Easy Vector System (Promega, Madison, WI, USA), and plasmids of positive clones were sequenced as follows in Section 2.7.

2.7. Nucleotide sequencing, alignment and functional dendrogram

All cloned South American Crotalinae VAP1/crotastatin-like cDNAs were sequenced by the dideoxy chain termination method, using the dye terminator chemistry (DYEnamic ET Dye Terminator kit, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) and the MegaBACE 750 DNA Analysis System (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). Each clone was sequenced twice with both sense and antisense 5'- and 3'-flanking primers and the contig sequence was

assembled with the software SeqMan (Lasergene, DNASTar Inc, Madison, WI, USA). The annotated nucleotide sequences were submitted to Gen Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and received the following sequential accession numbers: EU733631, EU733639, EU733640, EU733641, EU733642, and EU733643.

The crostastatin-like cDNAs were *in silico* translated, and the deduced amino acid sequences were compared against all entries in the GenBank database, using the BLASTp program (Altschul et al., 1997). Multiple sequence alignment was conducted by the ClustalW2 program, available at <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustaw2> (Brooksbank et al., 2003), and the structural characteristics of each predicted protein was manually annotated based on data from the literature.

The dendrogram of the South American pit viper VAP1/crostastatin-like homologues and the best scored snake venom metalloproteases type-III mature toxins (SVMP-III) was inferred using the neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987). The optimal tree with the sum of branch length = 4.19500254 was presented as topology only. The percentage of replicate trees in which the associated toxins clustered together in the bootstrap test (500 replicates) was indicated next to the branches (Felsenstein, 1985). The evolutionary distances were computed using the JTT matrix-based method (Jones et al., 1992), taking the number of amino acid substitutions per site as unit. All positions with alignment gaps and missing data were eliminated for pairwise sequence comparison. There were a total of 423 positions in the final dataset. Phylogenetic analyses were conducted by using the MEGA4 (Tamura et al., 2007). All mature toxins sequences were aligned with MUSCLE3.6 (Edgar, 2004) using groups of amino acid similarity GA, ST, MVLI, KR, EQDN, FWYH, C, P.

3. Results

3.1. Homology screening PCR of crotastatin – a VAP-like metalloprotease from *C. durissus terrificus* venom gland

Homology screening- polymerase chain reaction (HS-PCR) of *C. d. terrificus* snake venom cDNA phage sublibraries, using SVAT oligonucleotides as primers, yielded positive amplicons immediately after the first round of PCR selection. The positive phage clones were separately stored for further analysis, but the products of amplification were subcloned and sequenced. Such HS-PCR product, named crotastatin, is 1266 bp long and its nucleotide sequence shares 98% of identity with the same region of VAP1 cDNA from *Crotalus atrox*, with which it aligns. It codes for a mature toxin of 421 residues of amino acids (97% of similarity with VAP1), with a theoretical molecular mass of approximately 46,500 Da and a pI of 6.4. The deduced protein encompasses the three domains: Zn-metalloprotease, disintegrin and cysteine rich domain (CRD), composed of 206, 77 and 121 residues of amino acids, respectively, and a spacer of 17 residues between the metalloprotease and disintegrin domains – a structure that is typical of P-III family of snake venom metalloproteases (Fig. 1). Crotastatin also presents the Zn^{2+} -binding motif (-HEMGHNLMDH-) – a structural characteristics of members of metzincin family –, as well the ECD-motif, which is part of the disintegrin domain of some metalloproteases (Cidade et al., 2006).

```

1  gaacaacaaagatacttgaacgcaaaaaatacgtgaagcttttcctagttgcggaactac
   E Q Q R Y L N A K K Y V K L F L V A D Y 20
61  ataatgtacttgaaatatggccgcaattttaactgctgtaagaacaagaatgtatgatatt
   I M Y L K Y G R N L T A V R T R M Y D I 40
121 gacaatgttataactccgatttaccatcgtatgaatattcatgtagcactgggtggccta
   D N V I T P I Y H R M N I H V A L V G L 60
181 gaaatttgggtccaacacagataaaaattatcgtgcagtcacatcagcagatgttactttggac
   E I W S N T D K I I V Q S S A D V T L D 80
241 ttatttgcagggtggagagcgacagatttgcgtgagccgcaaaagtcagataatgctcag
   L F A K W R A T D L L S R K S H D N A Q 100
301 ttactcacggggcattaacttcaatggaccaactgcaggacttgggtacttgggcggcata
   L L T G I N F N G P T A G L G Y L G G I 120
361 tgcaatacagatgtattctgcaggaattgttcaggatcatagcaaaatacatgtattgggt
   C N T M Y S A G I V Q D H S K I H D L V 140
421 gcaattgcaatagcccatgaaatgggtcataatctgggcagtgatcatgacaaagatacc
   A I A I A H E M G H N L G M D H D K D T 160
481 tgtacttgcgggactaggccatgtattatggctggggcactaagctgtgaagcttccttt
   C T C G T R P C I M A G A L S C E A S F 180
541 ctgttcagcgattgttagtcagaaagatcatcaggagtttcttattaaaaacatgcctcaa
   L F S D C S Q K D H Q E F L I K N M P Q 200
601 tgcattctcaagaaacccttgaaaacagatgtttgtttcacctgcagtttgtggaaattac
   C I L K K P L K T D V V S P A V C G N Y 220
661 tttgtggaggtgggagaagaatgtgactgtgggcctcctagaacttgtcgagatccatgc
   F V E V G E E C D C G P P R T C R D P C 240
721 tgtgatgctgcaacctgtaaactgagacaaggagcacagtgctgcagaaggactgtgttgt
   C D A A T C K L R Q G A Q C A E G L C C 260
781 gaccaatgcagatttaaggagcaggaacagaatgccgggcagcaaaggatgagtgtagac
   D Q C R F K G A G T E C R A A K D E C D 280
841 atggctgatgtctgcactggccgatctactgaatgtacagatcgcttccaaaggaatgga
   M A D V C T G R S T E C T D R F Q R N G 300
901 caaccatgcaaaaaacaacaacgggttactgctacaatgggaaatgccccatcatggcagac
   Q P C K N N N G Y C Y N G K C P I M A D 320
961 caatgtattgctctcttttgggccaggtgcaactgtgtctcaagatgcatgttttcagttt
   Q C I A L F G P G A T V S Q D A C F Q F 340
1021 aatcgtgagggcaatcattatggctactgcagaaaggaacaaaatacaaaaattgcatgt
   N R E G N H Y G Y C R K E Q N T K I A C 360
1081 gaaccacaagatgtaaaatgtggcaggttatactgcttccctaattcacctgaaaacaag
   E P Q D V K C G R L Y C F P N S P E N K 380
1141 aatccttgcaatatctactattcacccaatgaagataagggaatggttcttctcctgga
   N P C N I Y Y S P N D E D K G M V L P G 400
1201 actaaatgtgcagatggaaaggcctgcagcaacgggcaatgtgttgatgtgaatacaccc
   T K C A D G K A C S N G Q C V D V N T P 420
1261 tactaa
   Y Stop 421

```

Figure 1. Nucleotide and deduced amino acid sequences of *Crotalus durissus terrificus* VAP-like toxin (crotoastatin, Sta) mRNA, partial cds (GenBank accession number [DQ224420](#)). The gene sequence, corresponding to the mature crotoastatin (1266 bp, numbered in the left side of the sequence), codes for a protein of 421 residues with a metalloprotease domain (dark gray box), a disintegrin domain (unlabeled) and the conserved cysteine rich domain (light gray box). The spacer connecting the disintegrin and the CRD is indicated by an underline. The doubled underlined DECD peptide shows the replacement to the typical RGD motif found in most snake venom disintegrins.

3.2. Real-time PCR melting curves reveal polymorphism in crotastatin-like genes

Melting curves can be produced in experiments of quantitative real-time PCR (qRT-PCR). Using this approach, melting temperature (T_m) of each amplicon can be determined, in which the value of T_m denotes the product length and its base composition. The primer pair SVAT-SE1/SVAT-ASRT1, and SVAT-SERT2/SVAT-AS2, that anneal to the 5'-terminal of crotastatin and VAP1 and the 3'-region cysteine rich domain of crotastatin (Fig. 2A), were combined and used to generate the two amplicons (Fig. 2B) and their respective curves of melting. The qRT-PCR product of crotastatin amplification, RT1^{Cdt} and RT2^{Cdt}, have main melting temperatures of 77.85 ± 0.12 ($n = 12$) and 79.95 ± 0.17 ($n = 12$), respectively. Another melting temperature of RT1_b^{Cdt} crotastatin segment is given at 76.46 ± 0.20 , what indicates that at least two genes might be actively expressed. Melting temperatures of crotastatin-like genes were determined for the homologues of crotastatin from the venom gland of *B. atrox*, *C. d. cascavella* and *L. m. rhombeata*, using single-stranded cDNA as template (Table 1). These data reveal that more than two homologous crotastatin-like genes are expressed in the venom gland of *B. atrox* and *L. m. rhombeata*.

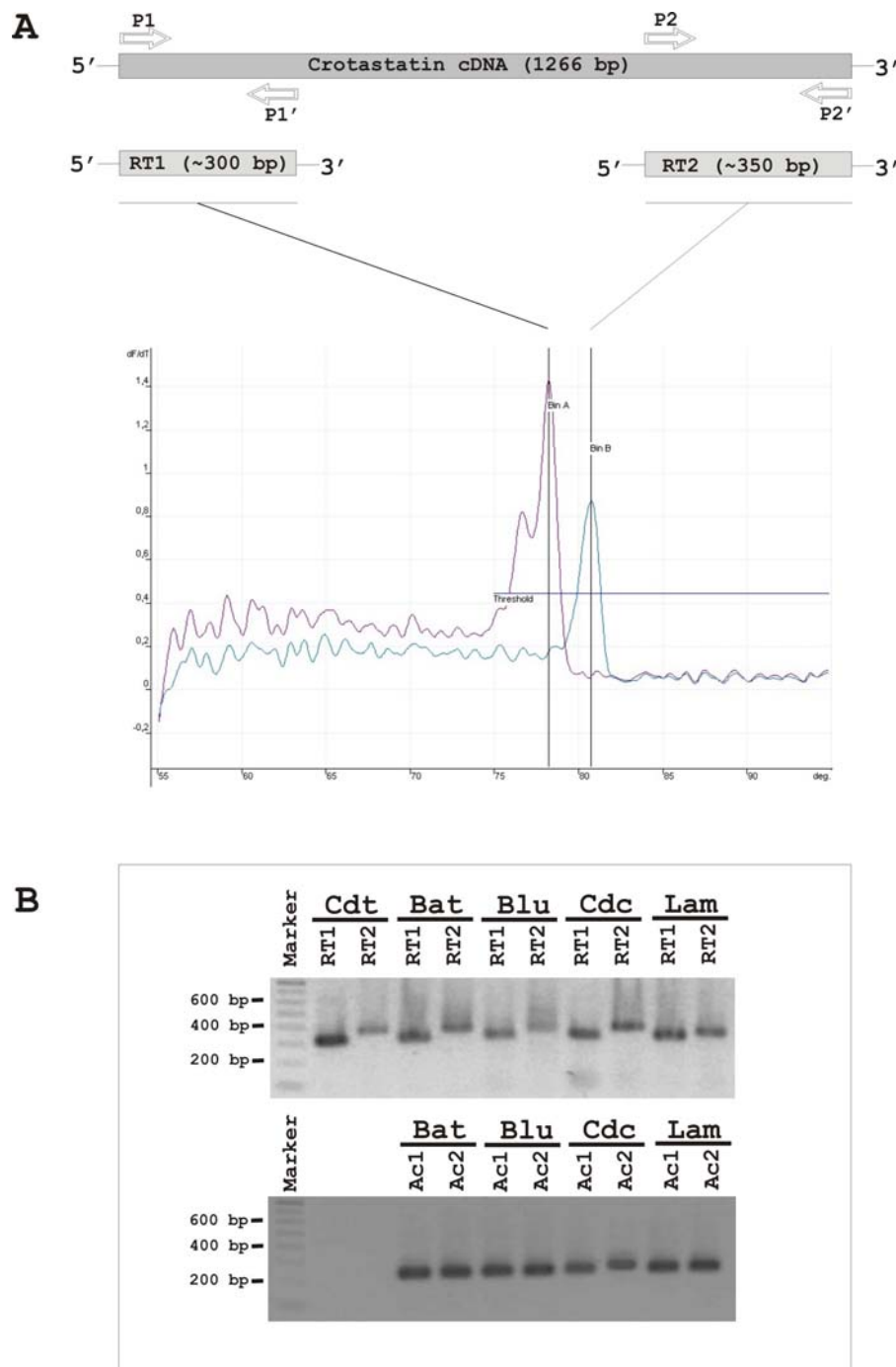


Figure 2. Schematic strategy for the study of crostastatin-like polymorphism using real-time PCR. Specific primers, pairs P1/P1' (SVAT-SE1/SVAT-ASRT1) and P2/P2' (SVAT-RTSE2/SVAT-AS2) were synthesized based on the 5'- and 3'-coding region of the crostastatin gene (GenBank accession number DQ224420), which correspond to part of the conserved metalloprotease and cysteine rich domains. These primer pairs were used to generate standard melting curves (A). The melting curves for three different pool of Viperidae single-stranded cDNAs were compared: *Bothrops atrox* (Bat), *Crotalus durissus cascavella* (Cdc), and *Lachesis muta* (Lam). Blu stands for *Bothrops lutzi*. The real- time PCR products (RT1 and RT2) corresponding to the amplification products of our strategy were separated in 1.8% agarose gel and visualized with ethidium bromide (B). The β -actin amplified fragment (AC1 and AC2) was used for gene normalization and comparison (B).

Table 1.

Values of T_m , Ct, and numbers of copy of crostastatin-like transcripts in the venom glands of *Bothrops atrox*, *Crotalus durissus cascavella* and *Lachesis muta rhombeata*

Crostastatin-like in the venom gland of	$T_m \pm \text{SEM}$	Ct-value (threshold value)		Mean copy number		Mean copy nr/ μg mRNA
		0.8 ng mRNA	0.08 ng mRNA	0.8 ng mRNA	0.08 ng mRNA	
<i>Bothrops atrox</i>	$\text{RT1}^{\text{Bat}} = 77.3$ 3 ± 0.03	$15.63 \pm$ 0.14	$19.50 \pm$ 0.18	1.79×10^1 $^3 \pm 1.01$	3.55×10^1 $^2 \pm 1.20$	3.37×10^1 $^6 \pm 1.11$
	$\text{RT2}_a^{\text{Bat}} = 78.$ 12 ± 0.04					
	$\text{RT2}_b^{\text{Bat}} = 79.$ 90 ± 0.04					
<i>Crotalus durissus cascavella</i>	$\text{RT1}^{\text{Cdc}} = 78.1$ 9 ± 0.03	$22.63 \pm$ 0.46	$26.46 \pm$ 0.46	2.72×10^1 $^1 \pm 1.21$	3.48×10^1 $^0 \pm 1.01$	3.88×10^1 $^4 \pm 1.11$
	$\text{RT2}^{\text{Cdc}} = 79.3$ 3 ± 0.04					
<i>Lachesis muta rhombeata</i>	$\text{RT1}_a^{\text{Lam}} = 76.$ 25 ± 0.10	$17.95 \pm$ 0.07	$21.94 \pm$ 0.25	2.67×10^1 $^2 \pm 1.66$	4.45×10^1 $^1 \pm 1.01$	4.45×10^1 $^5 \pm 1.34$
	$\text{RT1}_b^{\text{Lam}} = 77.$ 56 ± 0.05					
	$\text{RT2}^{\text{Lam}} = 78.$ 71 ± 0.20					

3.3. Quantification of crostastatin-like transcripts in the venom glands of species of *Bothrops*, *Crotalus* and *Lachesis* by qRT-PCR

Since the melting curves reveal that crostastatin-like homologues are being expressed in the venom gland of these three principal genus of South American pit vipers, the absolute quantification of each transcript were conducted. Optimized calibration curves for quantification of crostastatin-like expression were obtained with serial dilution of crostastatin ds-cDNA (3.51×10^{10} copies/ μ l), and the primer pairs SVAT-SE1/SVAT-ASRT1, and SVAT-SERT2/SVAT-AS2, which amplify the segments RT1 and RT2, respectively. A good coefficient of correlation (R^2 -value) and better efficiency (E) were obtained with the amplification curve for RT1 (Fig. 3, insert), where the copy number (concentration) was given according to the following equation: $\text{copy nr} = 10^{(-0.264 * Ct + 12,125)}$ ($R = 0.99$; $R^2 = 0.99$, and $E = 0.84$) InTable 1, the absolute quantification of crostastatin-like genes expression in each venom gland is compared and normalized in terms of total amount of transcripts (messenger RNA, mRNA). From these data, it was verified that *B. atrox* expresses 87 times (3.37×10^{16} copies per μ g mRNA) more crostastatin-like message than *C. d. cascavella* (3.88×10^{14} / μ g mRNA) and 7.5-fold higher than *L. m. rhombeata* (4.45×10^{15} / μ g mRNA). In the venom gland of *L. m. rhombeata* crostastatin ortholog is expressed 11.5-fold in relation to *C. d. cascavella* homologue Fig. 3.

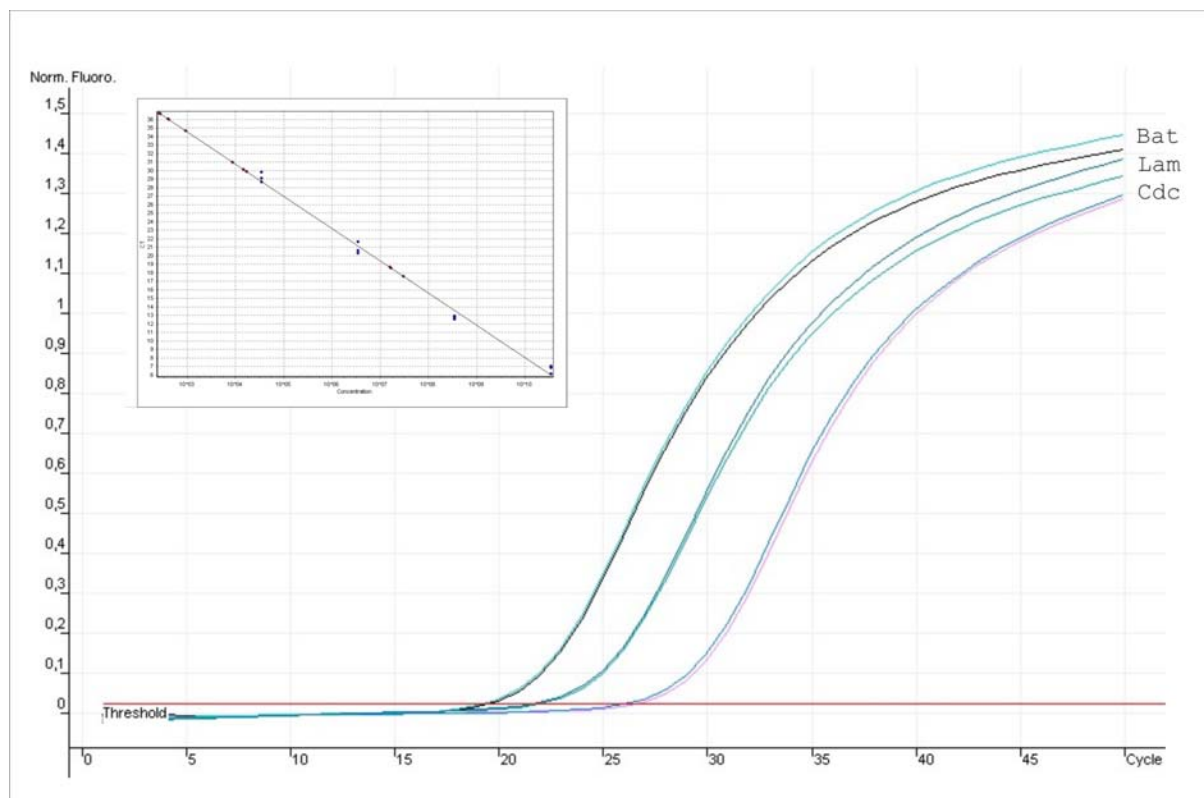


Figure 3. Representative amplification (Ct) curves for absolute quantification of crotoastatin-like metalloprotease transcripts in the venom gland of South American pit vipers. Single-stranded cDNAs of venom glands of *B. atrox*, *C. d. cascavella*, and *L. m. rhombeata*, equivalent to 0.08 ng of mRNA, were utilized for qRT-PCR analysis (see Section 2). In this figure, representative curves of each sample are shown in duplicate. The fluorescence was collected at 494– 521 nm during the extension phase. The inset represents the amplification curve for the fragment RT1, utilized to calculate the copy number of crotoastatin-like transcripts in each venom gland of the three snake species investigated here.

3.4. Cloning, amino acid sequences and functional inference of novel crotoastatin-like metalloprotease genes

Making use of the same 5'- and 3' -flanking primers SVAT-SE1 and SVAT-AS2, employed to retrieve and clone the crotoastatin cDNA from *C. d. terrificus* venom gland, six new cDNA sequences were additionally cloned from the South American pit vipers studied in this work. Three cDNAs were cloned from the venom gland of *B. atrox* (batroxstatin-1, -2, and -3; GenBank accession numbers EU733639, EU733640 and EU733641), two others from *L. m. rhombeata* (lacheostatins-1, and -2; EU733631 and EU733642) and one from *C. d. cascavella* (crotoastatin-1; EU733638). These cDNAs encompass sequences of 1244– 1472 nucleotides, which code for polypeptides sharing between 59% (batroxstatin-1 and -3) and 99% (crotoastatin-1) of similarity with crotoastatin. VAP1 itself shares 97% of similarity with crotoastatin. The deduced amino acid sequences and the primary structures of batroxstatins, crotoastatins and lacheostatins are compared with VAP1 in Fig. 4. Due to the high similarity in their primary structures, most proteins domains, like metal-binding sites and cysteine pairings, are conserved in these crotoastatin/VAP-like P-III SVMs. Easily seen in these sequences are the Ca^{2+} -binding site I, II and III (residues 13, 97 and 204; 216–231; 280–296, respectively), the dimerization motif -QDHSK- (residues 131–135), the Zn^{2+} -binding site -HEMGHNLGMDH- (residues 146–157), the methionine residue of the M-turn (residue 170), and the D-loop (desintegrin ECD/RGD, residues 277–280). The region referred as hADAMS hyper-variable-region (HVR) (residues 374–395) is indeed variable also in these new members of SVMs.

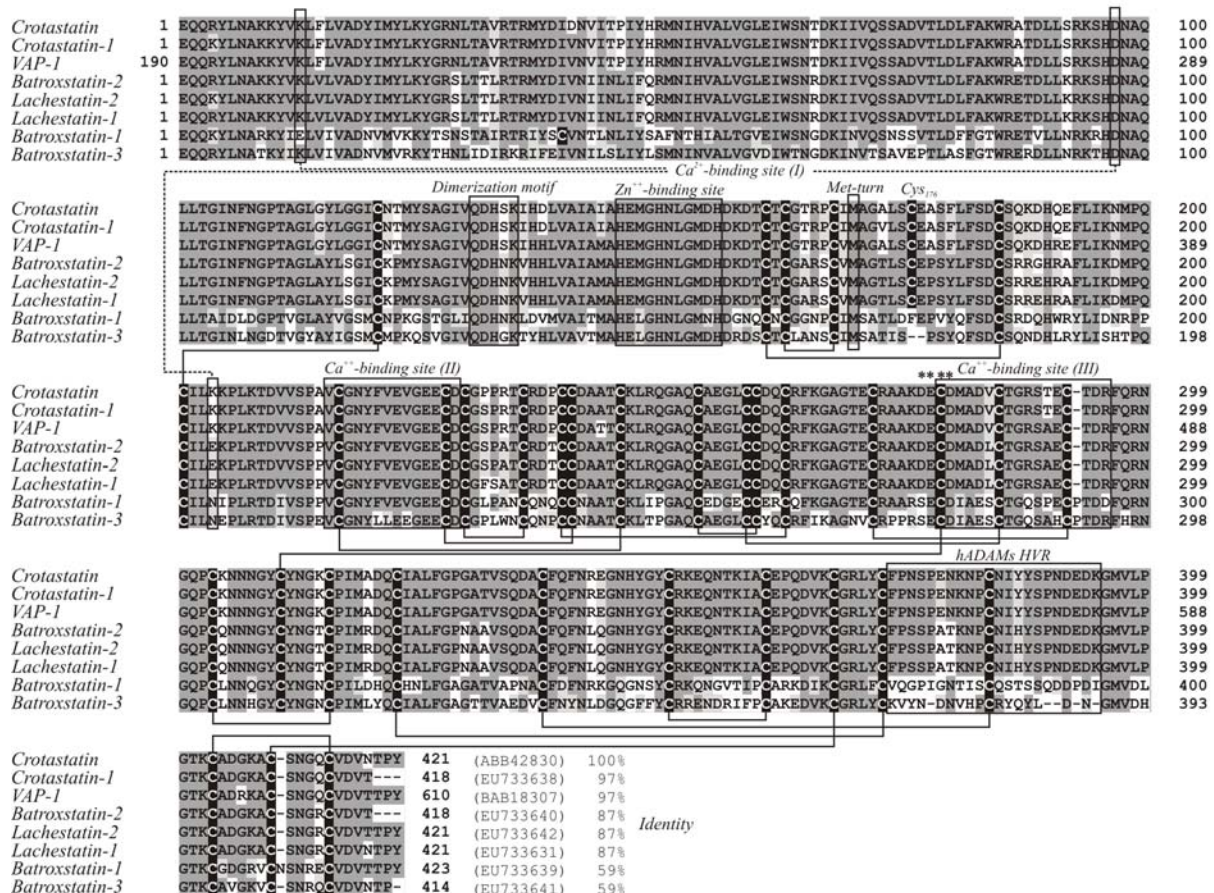


Figure 4. Sequence alignment of VAP1/crotastatin-like metalloproteases and their principal structural characteristics. Batroxstatin-1, -2, and -3 (EU733639, EU733640, and EU733641), crotastatin (ABB42830), crotastatin-1 (EU733638), and lachestatin-1 and -2 (EU733631, and EU733642) were aligned with VAP1 (BAB18307) by using the ClustalW2 and Muscle 3.2 algorithms. Cysteine residues are labeled with black boxes, and whenever possible the S—S bonds are indicated by connecting continuous lines. Conserved amino acids are boxed in dark gray, and non-synonymous mutation are in white boxes. The principal conserved motifs (e.g. the dimerization motif - QDHSK-, and the hADAM HVR), and metal-binding sites the (Ca²⁺-binding sites I, II and III; and the Zn²⁺-binding site) were annotated for comparison, based on the works by Takeda et al. (2006) and Igarashi et al. (2007).

Batroxstatins, crotastatins and lachestatins were also compared against the entire GenBank and the data collected were used to infer the dendrogram presented in Fig. 5. Based on such phylogenetic analysis, a clear branch is observed which includes the predicted amino acid sequences of crotastatin-like homologues (batroxstatin-2, crotastatin-1, lachestatin-1 and -2) and the sequences of mature vascular apoptosis-inducing proteins purified from snake venoms.

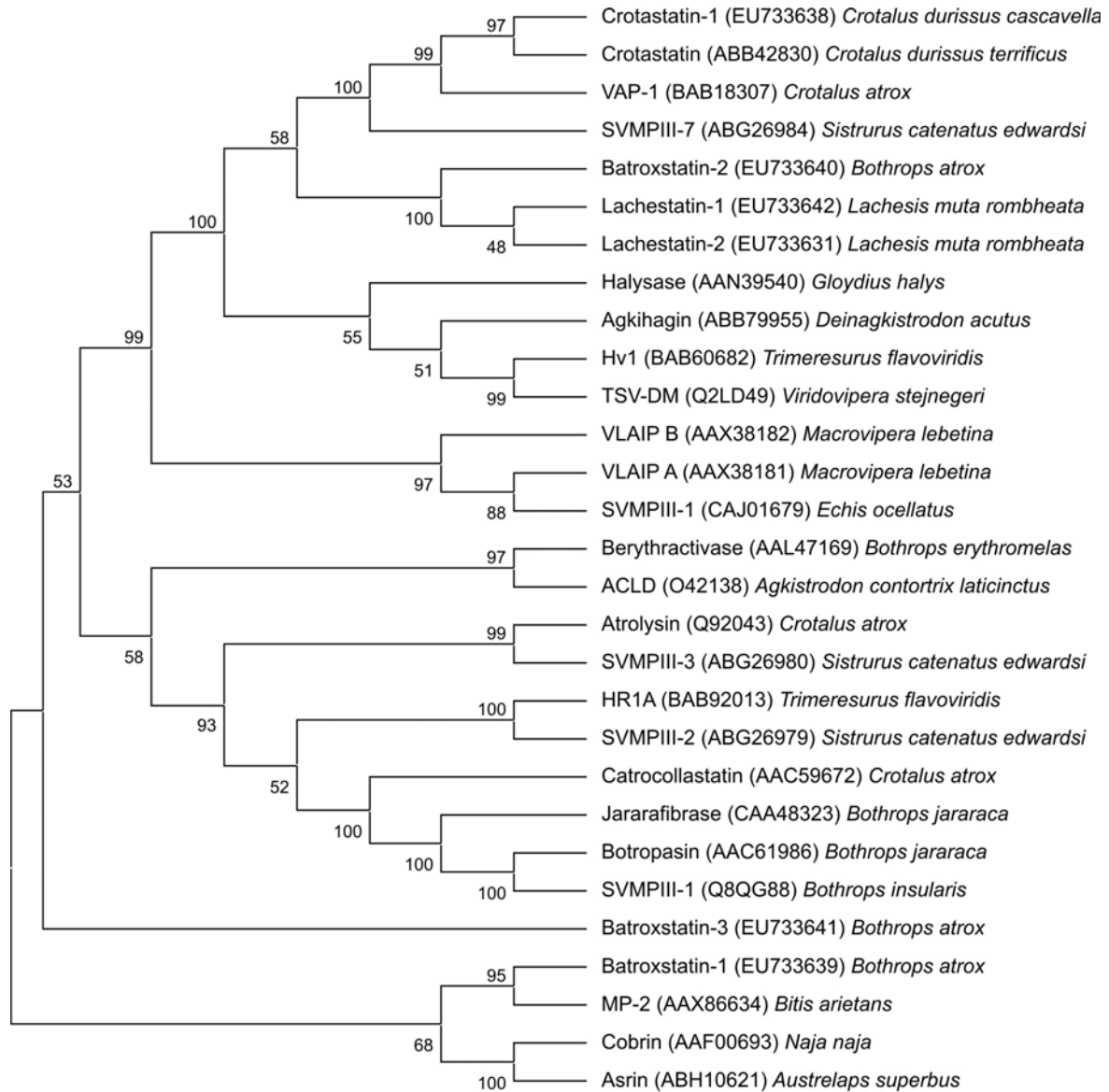


Figure 5. Dendrogram of the South American pit viper VAP1/crotastatin-like homologues and the best scored snake venom metalloproteases type-III mature toxins (SVMP-III). The dendrogram was inferred as detailed in Section 2. The aligned toxins are listed by toxin name, GenBank accession number, and the scientific name of each snake specimen, as follows: ACLD (O42138) *Agkistrodon contortrix laticinctus*; agkihagin (ABB79955) *Deinagkistrodon acutus*; asrin (ABH10621) *Austrelaps superbus*; atrolysin (Q92043) *Crotalus atrox*; batroxstatin-1 (EU733639) *Bothrops atrox*; batroxstatin-2 (EU733640) *Bothrops atrox*; batroxstatin-3 (EU733641) *Bothrops atrox*; berythracivase (AAL47169) *Bothrops erythromelas*; botropasin (AAC61986) *Bothrops jararaca*; catrocollastatin (AAC59672) *Crotalus atrox*; cobrin (AAF00693) *Naja naja*; crotastatin (ABB42830) *Crotalus durissus terrificus*; crotastatin-1 (EU733638) *Crotalus durissus cascavella*; halysase (AAN39540) *Gloydius halys*; HR1A (BAB92013) *Trimeresurus flavoviridis*; Hv1 (BAB60682) *Trimeresurus flavoviridis*; jararafibrase (CAA48323) *Bothrops jararaca*; lachestatin-1 (EU733642) *Lachesis muta rombheata*; lachestatin-2 (EU733631) *Lachesis muta rombheata*; MP-2 (AAX86634) *Bitis arietans*; SVMP-III-1 (CAJ01679) *Echis ocellatus*; SVMP-III-1 (Q8QG88) *Bothrops insularis*; SVMP-III-2 (ABG26979) *Sistrurus catenatus edwardsi*; SVMP-III-3 (ABG26980) *Sistrurus catenatus edwardsi*; SVMP-III-7 (ABG26984) *Sistrurus catenatus edwardsi*; TSV-DM (Q2LD49) *Viridovipera stejnegeri*; VAP1 (BAB18307) *Crotalus*

atrox; VLAIP A (AAX38181) *Macrovipera lebetina*; VLAIP B (AAX38182) *Macrovipera lebetina*. The numbers next to the branches represent the percentage of replicate trees in which the associated toxins clustered together in the bootstrap test.

4. Discussion

Snake venom is a rich source of pharmacologically active compounds with a diverse spectrum of biological activities (Birrell et al., 2007; Yamazaki and Morita, 2007). The components of snake venom have been constantly and inexhaustibly investigated for application in medicine and biotechnology.

Up to date, biochemical information of approximately 200 snake venom metalloproteases is known. From this relatively huge number, only a few of these toxins have been described as vascular apoptosis- inducing protein (VAP). Since VAP1 and VAP1-like toxins have been worldwide purified from the venom of snakes belonging to the Viperidae family, we aimed to investigate whether South American pit vipers also express metalloproteases similar to VAPs. Representative snake species of three main genus of Crotalinae (Viperidae), in Brazil, were chosen for this work: *Crotalus dursissus* (*C. d. terrificus* and *C. d. cascavella*), *Bothrops atrox* and *Lachesis muta rhombeata*. These species inhabit distinct geographical regions of Brazilian territory and their venoms show the usual interspecific and intraspecific variation in toxin composition. Based on the nucleotide sequence of VAP1 (GenBank accession number BAB18307), the primers SVAT-SE1 and SVAT-AS2 (acronym of snake venom apoptosis-inducing toxin) were synthesized and used for the cloning technique of homology screening by polymerase chain reaction (HS-PCR). These primers anneal to the gene segment that encodes the mature form of VAP1 homodomain, starting with the residues EQQR/KY and ending with the hexapeptide DVNTPY. Applying this molecular cloning strategy, a VAP1-like gene sequence was retrieved from a *C. d. terrificus* venom gland phage cDNA library, constructed in 1999 from a single adult specimen of this subspecies of South American rattlesnake (Rádis-Baptista et al., 1999). The *C. d. terrificus* VAP1-like cDNA, i.e. crotastatin, is 1266 nucleotides long and encodes a PIII snake venom metalloprotease of the metzincin family with all three conserved domains: the Zn-metalloprotease, disintegrin and cysteine rich domain (MDC).

The following steps in our investigation were to verify the expression of crotastatin-like genes in the venom gland of the three other South American pit vipers (*B. atrox*, *C. d. cascavella*, and *L. m. rhombeata*). To this aim, we made use of quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). In real-time PCR the amount of product formed is monitored during the course of the reaction by checking the fluorescence of dyes or probes,

which were introduced into the mixture reaction. The fluorescence is proportional to the amount of product formed, and to the number of cycles required to obtain a particular amount of deoxyribonucleotide acid molecules. Assuming that the amplification efficiency is close to a doubling of the number of molecules per amplification cycle, it is possible to calculate the number of DNA molecules of the amplified sequence that were initially present in the sample (Kubista et al., 2006). Real-time PCR has been used for absolute and relative quantification of nucleic acid template molecules (DNA and RNA) in a variety of applications, which include pathogen detection and loads, gene expression analysis, single nucleotide polymorphism and genotyping (Wilhelm and Pingoud, 2003). Consequently, quantitative real-time PCR is also becoming a standard method for measuring and comparing gene expression at the mRNA level ([Ong and Irvine, 2002] and [Dussault and Pouliot, 2006]). In our study of VAP1/crotastatin-like expression using qRT-PCR, we first achieved the melting curve analysis of crotastatin homologues to detect the presence of more than a single gene transcript in the venom glands of *B. atrox*, *C. d. cascavella* and *L. m. rhombeata*. In melting curves, the signal of fluorescence decreases gradually as a result of the melting (separation of the two DNA strands) of the amplicons. At certain temperature (melting temperature, T_m) the fluorescence is maximal and its value is determined, which indirectly reflects the nucleotide composition and product length. The primer pairs that amplify two separated and distinct crotastatin segments, RT1 (300 bp) and RT2 (350 bp) were used (see Section 2 and Fig. 2). Distinct melting temperatures were then observed when pool of positive clones for crotastatin of *C. d. terrificus* cDNA library were used as calibrator template, as well as when single-stranded cDNA pools prepared from the venom glands of *B. atrox*, *C. d. cascavella* and *L. m. rhombeata* were analysed (Table 1). These results confirmed that at least two crotastatin homologues are expressed in the venom glands of each of the three studied species of South American pit vipers.

To achieve the absolute quantification of the level of crotastatin-like transcripts in the pit vipers venom glands, standard curves of threshold were generated using a dilution series of crotastatin cDNA and the primers that amplify the segment RT1 and RT2. The Ct-values (number of amplification cycles required to reach a threshold) of the diluted standard was plotted versus the logarithm of crotastatin cDNA concentration (or copy numbers), so the concentration of an unknown sample could be obtained by the equation $CT = k * \log(N_0) + CT(1)$, and the PCR efficiency ($E = 10^{-1/k} - 1$) calculated by the slope (k). The intercept of the standard curve corresponds to the CT(1) of the diluted standard containing a single target molecule (Kubista et al., 2006). From the standard Ct curves of

crostastatin segments RT1 and RT2, the values of amplification efficiency (E) of 0.87 ($k = -3.78$) and 1.07 ($k = -3.17$) were respectively obtained (calculation not completely shown for RT2). Although the E -value of RT2 is ideal – the value of 1 represents that a doubling of amplification product occurred in each cycle-, the correlation coefficient (R^2) was relatively low ($R^2 = 0.84$). In contrast, the R^2 value for the standard threshold curve of RT1 was sufficient good ($R^2 = 0.99$) to set the equation for calculating the number of copies of crostastatin-like transcripts in the pit vipers venom glands. The formula that best fit the real quantities of transcripts is: $CT = -3.78 * \log(\text{conc}) + 53.86$ or, directly, $\text{Conc} = 10^{(-0.264 * CT + 14.24)}$, where concentration (conc) can be read as ‘copy number’. Using this formula we were able to calculate the amount of crostastatin-like mRNA molecules in the venom gland of each snake species studied here: the higher expression level is observed in *B. atrox* venom gland, where it was calculated to contain 3.37×10^{16} copies per microgram of mRNA. The calculated number of crostastatin-like transcript in *L. m. rhombeata* and *C. d. cascavella* is 4.45×10^{15} and 3.88×10^{14} molecules/ μg mRNA, respectively. So, in relative terms *B. atrox* expresses almost 90 times more crostastatin-like gene than *Crotalus durissus cascavella* and 7.5 times more than *Lachesis muta rhombeata*. In the venom gland of *L. m. rhombeata*, crostastatin-like gene is expressed 11.5 -fold in relation to its ortholog in *C. d. cascavella* (Fig. 3 and Table 1).

These numbers are interesting since they quantitatively reflect a notable difference in the level of VAP1/crostastatin-like mRNA expression in the venom glands of these three snake species, when the venom gland cDNA pools – used as templates – are normalized for microgram of mRNA.

Since all qRT-PCR products were amplified with one of the two SVAT primer pairs (SVAT-SE1/SVAT-RTAS1 for amplicon RT1, and SVAT-RTSE2/SVAT-AS2 for amplicon RT2), we utilized the combination of SVAT-SE1 and SVAT-AS2 to clone the complete crostastatin-like cDNAs. Thus, three novel cDNAs were cloned from the venom gland of *Bothrops atrox* (batroxstatin-1, -2, and -3), two others from *Lachesis muta rhombeata* (lachestatins-1, and -2) and one from *Crotalus durissus cascavella* (crostastatin-1).

These cDNAs encode highly similar metalloproteases, which share the common characteristics of most PIII-class and, particularly, of VAP1 (Fig. 4). Based on the structural analysis of VAP1 (Takeda et al., 2006) and of our crostastatin-like toxins, it is clearly evident the Ca^{2+} -binding site I, II and III, the dimerization motif -QDHSK-, the Zn^{2+} -binding site -HEMGHNLGMDH-, the methionine residue of the M-turn, the D-loop (desintegrin ECD/RGD), and the human ADAMs hyper variable region as well (Fig. 4). Special mention

should be made for the cysteine residues in these sequences: the Cys176 (also indicated in Fig. 4), which corresponds to the Cys365 in VAP1 (Igarashi et al., 2007), has an essential role in the dimerization of each monomer, by which it forms an intermolecular S—S bond in the homodimer. Interestingly, the most divergent batroxstatin-1 and -3 proteins have missed their Cys176, although preserved all the other 34 cysteine residues that might be involved in 17 intrachain S—S bonds. On the other hand, lachestatin-1, beside its 35 cysteine residues, has an additional cysteine at position 40 (Cys40), which might bind to Cys 176, forming 18 intrachain S—S bonds, and consequently might be expressed in the venom as a monomer. The predictive pattern of S—S bonds of these novel crostastatin/VAP-like toxins should be further validated by molecular modeling analysis and by interpretation of physical structural data. However, since VAP1 is a homodimer and VAP2 is a single chain toxin, whose crystal structures were solved by X-Ray diffraction ([Takeda et al., 2006] and [Igarashi et al., 2007]), detailed inferences can be further done for members of SVMPs that is subgrouped here.

In fact, molecular phylogenetic analysis of high scored aligned sequences indicates that batroxstatin-2, crostastatins, and lachestatin-1 and -2 are dicotomically distributed in branches that delimit SVMP members, which in some cases were experimentally proved to be dimeric apoptosis-inducing proteins/toxins (Fig. 5). Evidently, biological assays should be conducted with recombinant or native proteins to ascertain that such VAP1/crostastatin-like can effectively induce apoptosis. Interestingly, even if VAP1/crostastatin-like genes are expressed at different levels in the venom gland of South American pit vipers, and accelerated evolution is a molecular process of diversification of toxin genes, snake species inhabiting geographical regions as diverse as Asia (*Bitis arietans*, *Gloydius halys*, and *Trimerusurus flavoviridis*), North (*Sistrurus c. edwardsi* and *Crotalus atrox*), and South America (*Bothrops atrox*, *Crotalus durissus* and *Lachesis muta*, this work), which have diverged millions of years ago, maintain the expression of highly similar metalloproteases sequences, like vascular endothelial inducing-apoptosis protein (VAP) and crostastatin isoforms. Thus, the recruitment of such gene might contribute in some way to the pool of hemorrhagic toxin responsible for the envenomation and tissue damage caused by Viperidae (vipers and pit vipers) venoms.

Taken together, we present compelling data concerning to the quantitative difference in the expression level of VAP1/Crostastatin-like mRNA in the venom glands of three representative South American pit vipers: *Bothrops atrox*, *Lachesis muta rhombeata* and *Crotalus durissus cascavella*. Moreover, the information present here widen the possibility of investigating the variation of venom composition, particularly of a given subgroup of toxins, using the robust molecular technique analysis of quantitative real-time PCR.

Acknowledgements

We are indebted to The National Brazilian Council for the Scientific and Technological Development (CNPq) for the financial support to this work. We are thankful to the postgraduate students Lucas A. C. Brandão and Rafael L. Guimarães for the technical assistance with the experiments of qRT-PCR, and Taysa A. Vasconcelos and Lidiany A. Linhares for the care with the snake specimens. N.A.C.T. and J.M.C. are, respectively, master and doctoral students supported by fellowships from CNPq. G.R.B. is a member of the Scientific Committee of The National Council for the Scientific and Technological Development (CNPq).

References

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25 (17), 3389–3402.
- Araki, S., Masuda, S., Maeda, H., Ying, M.J., Hayashi, H., 2002. Involvement of specific integrins in apoptosis induced by vascular apoptosis inducing protein 1. *Toxicon* 40 (5), 535–542.
- Baldo, C., Tanjoni, I., Leo' n, I.R., Batista, I.F., Della-Casa, M.S., Clissa, P.B., Weinlich, R., Lopes-Ferreira, M., Lebrun, I., Amarante-Mendes, G.P., Rodrigues, V.M., Perales, J., Valente, R.H., Moura-da-Silva, A.M., 2008. BnP1, a novel P-1 metalloproteinase from *Bothrops neuwiedi* venom: biological effects benchmarking relatively to jararhagin, a P-III SVMP. *Toxicon* 51 (1), 54–65.
- Birrell, G.W., Earl, S.T., Wallis, T.P., Masci, P.P., de Jersey, J., Gorman, J.J., Lavin, M.F., 2007. The diversity of bioactive proteins in Australian snake venoms. *Mol. Cell. Proteomics* 6 (6), 973–986.
- Bjarnason, J.B., Fox, J.W., 1995. Snake venom metalloendopeptidases: reprotlysins. *Methods Enzymol* 248, 345–368.
- Brooksbank, C., Camon, E., Haris, M.A., Magrane, M., Martin, M.J., Mulder, N., O'Donovan, C., Parkinson, H., Tuli, M.A., Apweiler, R., Birney, E., Brazma, A., Henrick, K., Lopez, R., Stoesser, G., Stoeck, P., Cameron, G., 2003. The European Bioinformatics Institutes data resources. *Nucleic Acids Res.* 31, 43–50.
- Calvete, J.J., Marcinkiewicz, C., Monleo' n, D., Esteve, V., Celda, B., Jua' rez, P., Sanz, L., 2005. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. *Toxicon* 45, 1063–1074.

Cidade, D., Wermelinger, L.S., Lo^{bo}-Hajdu, G., Da ^{vila}, A.M., Bom, C., Zingali, R.B., Albano, R.M., 2006. Molecular diversity of disintegrinlike domains within metalloproteinase precursors of *Bothrops jararaca*. *Toxicon* 48, 590–599.

Dussault, A.A., Pouliot, M., 2006. Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. *Biol. Proced. Online* 8, 1–10.

Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 5, 113.

Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783–791.

Folkman, J., 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med* 285, 1182–1186.

Fox, J.W., Serrano, S.M., 2005. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. *Toxicon* 45, 969–985.

Gutiérrez, J.M., Rucavado, A., Escalante, T., Di ^{az}, C., 2005. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon* 45 (8), 997–1011.

Hite, L.A., Jia, L.G., Bjarnason, J.B., Fox, J.W., 1994. cDNA sequences for four snake venom metalloproteinases: structure, classification, and their relationship to mammalian reproductive proteins. *Arch. Biochem. Biophys* 308, 182–191.

Igarashi, T., Araki, S., Mori, H., Takeda, S., 2007. Crystal structures of catrocollastatin/VAP2B reveal a dynamic, modular architecture of ADAM/ adamalysin/reprotolysin family proteins. *FEBS Lett.* 581, 2416–2422.

Jones, D.T., Taylor, W.R., Thornton, J.M., 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput. Appl. Biosci* 8, 275–282.

Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jona' k, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjo' back, R., Sjo' green, B., Stro'mbom, L., Ståhlberg, A., Zoric, N., 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Mol. Aspects Med* 27 (2-3), 95–125.

Maruyama, J., Hayashi, H., Miao, J., Sawada, H., Araki, S., 2005. Severe cell fragmentation in the endothelial cell apoptosis induced by snake apoptosis toxin VAP1 is an apoptotic characteristic controlled by caspases. *Toxicon* 46 (1), 1–6.

Masuda, S., Araki, S., Yamamoto, T., Kaji, K., Hayashi, H., 1997. Purification of a vascular apoptosis-inducing factor from hemorrhagic snake venom. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 235 (1), 59–63.

Masuda, S., Hayashi, H., Araki, S., 1998. Two vascular apoptosis-inducing proteins from snake venom are members of the metalloprotease/ disintegrin family. *Eur. J. Biochem* 253 (1), 36–41.

Masuda, S., Hayashi, H., Atoda, H., Morita, T., Araki, S., 2001. Purification, cDNA cloning and characterization of the vascular apoptosis-inducing protein, HV1, from *Trimeresurus flavoviridis*. *Eur. J. Biochem* 268 (11), 3339–3345.

Moura-da-Silva, A.M., Butera, D., Tanjoni, I., 2007. Importance of snake venom metalloproteinases in cell biology: effects on platelets, inflammatory and endothelial cells. *Curr. Pharm. Des* 13 (28), 2893–2905.

Ong, Y.L., Irvine, A., 2002. Quantitative real-time PCR: a critique of method and practical considerations. *Hematology* 7, 59–67.

Overbergh, L., Valckx, D., Waer, M., Mathieu, C., 1999. Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR. *Cytokine* 11, 305–312.

Rádis-Baptista, G., 2005. Integrins, cancer and snake toxins (mini-review). *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis* 11 (3), 217–241.

Rádis-Baptista, G., Oguiura, N., Hayashi, M.A., Camargo, M.E., Grego, K.F., Oliveira, E.B., Yamane, T., 1999. Nucleotide sequence of crotamine isoform precursors from a single South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). *Toxicon* 37 (7), 973–984.

Ramos, O.H., Selistre-de-Araujo, H.S., 2006. Snake venom metalloproteases structure and function of catalytic and disintegrin domains. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol* 142 (3–4), 328–346.

Rottenberg, D., Bamberger, E.S., Kochva, E., 1971. Studies on ribonucleic acid synthesis in the venom glands of *Vipera palaestinae* (Ophidia, Reptilia). *Biochem. J.* 121, 609–612.

Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425.

Swenson, S., Ramu, S., Markland, F.S., 2007. Anti-angiogenesis and RGD-containing snake venom disintegrins. *Curr. Pharm. Des* 13 (28), 2860–2871.

Takeda, S., Igarashi, T., Mori, H., Araki, S., 2006. Crystal structures of VAP1 reveal ADAMs' MDC domain architecture and its unique C-shaped scaffold. *EMBO J* 25 (11), 2388–2396.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596–1599.

Tanjoni, I., Weinlich, R., Della-Casa, M.S., Clissa, P.B., Saldanha-Gama, R.F., de Freitas, M.S., Barja-Fidalgo, C., Amarante-Mendes, G.P., Moura-da-Silva, A.M., 2005. Jararhagin, a snake venom metalloproteinase, induces a specialized form of apoptosis (anoikis) selective to endothelial cells. *Apoptosis* 10 (4), 851–861.

Trummel, K., Tonismagi, K., Siigur, E., Aaspollu, A., Lopp, A., Sillat, T., Saat, R., Kasak, L., Tammiste, I., Kogerman, P., Kalkkinen, N., Siigur, J., 2005. A novel metalloprotease from *Vipera lebetina* venom induces human endothelial cell apoptosis. *Toxicon* 46 (1), 46–61.

Wilhelm, J., Pingoud, A., 2003. Real-time polymerase chain reaction. *Chembiochem* 4 (11), 1120–1128.

Wu, W.B., Huang, T.F., 2003. Activation of MMP-2, cleavage of matrix proteins, and adherens junctions during a snake venom metalloproteinase-induced endothelial cell apoptosis. *Exp. Cell Res.* 288, 143–157.

Yamazaki, Y., Morita, T., 2007. Snake venom components affecting blood coagulation and the vascular system: structural similarities and marked diversity. *Curr. Pharm. Des* 13 (28), 2872–2886.

You, W.K., Seo, H.J., Chung, K.H., Kim, D.S., 2003. A novel metalloprotease from *Gloydius halys* venom induces endothelial cell apoptosis through its protease and disintegrin-like domains. *J. Biochem* 134, 739–749.

You, W.K., Jang, Y.J., Chung, K.H., Jeon, O.H., Kim, D.S., 2006. Functional roles of the two distinct domains of halysase, a snake venom metalloprotease, to inhibit human platelet aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 339 (3), 964–970.

Zhong, H., Bowen, J.P., 2006. Antiangiogenesis drug design: multiple pathways targeting tumor vasculature. *Curr. Med. Chem.* 13 (8), 849–862.

CONCLUSÕES

Conclusões

- Os diferentes cDNAs, obtidos a partir da glândula de veneno dos viperídeos *Crotalus durissus cascavela*, *Crotalus durissus terrificus* e *Lachesis muta*, foram clonados com sucesso.
- Utilizando a técnica de PCR em tempo real e a dedução de aminoácidos através de ferramentas de bioinformática, foi possível observar que os genes clonados apresentam alta similaridade a outras metaloproteases consideradas indutoras de apoptose vascular.
- Ainda através da técnica de PCR em tempo real pudemos caracterizar e quantificar a expressão diferencial de transcritos por esses homólogos.
- Os genes clonados apresentam significativa importância, por fazerem parte de uma relativa minoria, os indutores de apoptose vascular, e apresentarem uma atividade biológica merecedora de todas as atenções, já que pode vir a ser utilizada como ferramenta terapêutica para o controle do câncer.