

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

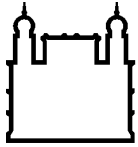
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Biologia Celular e Molecular

**VENÔMICA TRANSLACIONAL: POTENCIAIS CONTRIBUIÇÕES PARA
TERAPÊUTICA ANTIVENENO E BIOPROSPECÇÃO**

CAROLINA ALVES NICOLAU

Rio de Janeiro
Março de 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

CAROLINA ALVES NICOLAU

Venômica translacional: potenciais contribuições para terapêutica antiveneno e bioprospecção

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular

Orientador (es): Prof. Dr. Richard Hemmi Valente

Prof. Dra. Ana Gisele da Costa Neves Ferreira

RIO DE JANEIRO

Março de 2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

N639 Nicolau, Carolina Alves

Venômica translacional: potenciais contribuições para terapêutica antiveneno e bioprospecção / Carolina Alves Nicolau. – Rio de Janeiro, 2016.

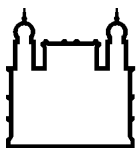
xix, 156 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2016.

Bibliografia: f. 110-132

1. Venômica translacional. 2. Terapêutica antiveneno. 3. *Bothrops jararaca*. 4. Proteopeptidoma. 5. Criptoma. 6. Connectivity map. I. Título.

CDD 615.942



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: CAROLINA ALVES NICOLAU

VENÔMICA TRANSLACIONAL: POTENCIAIS CONTRIBUIÇÕES PARA TERAPÊUTICA ANTIVENENO E BIOPROSPECÇÃO

ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Richard Hemmi Valente

Prof. Dr. Ana Gisele da Costa Neves Ferreira

Aprovada em: 04 / 03 / 2016

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Leila de Mendonça Lima – IOC / FIOCRUZ - **Presidente**

Prof. Dr. Solange Maria de Toledo Serrano - IBU

Prof. Dr. Gilberto Barbosa Domont - UFRJ

Prof. Dr. Rubem Figueiredo Sadok Menna Barreto – IOC / FIOCRUZ

Prof. Dr. André Lopes Fuly - UFF

Rio de Janeiro, 4 de março de 2016.

Aos meus pais Sandra e Henrique Nicolau, por todo amor e apoio incondicional;
À querida tia Hilda (*in memoriam*) por ter me mostrado a minha verdadeira vocação.

AGRADECIMENTOS

- Ao meu orientador, Dr. Richard Hemmi Valente, por ter sido meu “pai científico” durante os oito anos em que me orientou, por toda dedicação, paciência, respeito, confiança, por ter me apoiado e me incentivado em todas as minhas decisões, por todos os ensinamentos científicos e éticos, por me mostrar meios de evoluir por conta própria, pela nossa excelente relação orientador/aluno e, por fim, por saber exatamente o significado do verbo “orientar”. Mesmo que se encerre aqui o meu ciclo formal como estudante, ele sempre será o meu mentor;
- À Dra. Ana Gisele da Costa Neves Ferreira, minha co-orientadora, por me “acolher” durante o doutorado, por estar sempre disposta a dar explicações muito didáticas e detalhadas, por suas ricas contribuições científicas e pela nossa ótima convivência ao longo dos anos;
- Ao Dr. Jonas Perales, chefe do laboratório, por todo carinho, apoio incondicional, pelos ensinamentos como líder e por seus esforços em manter a excelente infraestrutura do laboratório e em defender os interesses e direitos de sua equipe;
- Ao Dr. Jay Fox, meu co-orientador durante o doutorado sanduíche na Universidade de Virginia (EUA), por ter me recebido gentilmente em seu laboratório, por todos os ensinamentos, oportunidades de crescimento profissional e principalmente por todas as discussões sobre Ciência que fizeram com que eu amadurecesse e ampliasse meu senso crítico;
- À Dra. Patricia Cuervo por ter aceitado o convite para revisora desta tese e por suas valiosas contribuições;
- Aos membros da banca examinadora que gentilmente aceitaram este convite, Dra. Leila de Mendonça Lima, Dra. Solange Maria de Toledo Serrano, Dr. Gilberto Barbosa Domont, Dr. Rubem Figueiredo Sadok Menna Barreto e Dr. André Lopes Fuly;
- Ao Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan (SP), pela doação dos venenos utilizados nesta tese;
- Ao Dr. André Teixeira (“Pink”) por estar sempre disposto a ajudar, por sua contribuição nas análises por espectrometria de massas e por todo carinho e amizade dos últimos oito anos;
- Ao Dr. Paulo Carvalho por suas contribuições de extrema valia em análises bioinformáticas;
- Ao Dr. Francisco Gomes Neto por toda sua paciência e calma para ensinar e por sua ajuda de grande importância para solucionar alguns problemas experimentais que ocorreram;
- À Nena Fox, diretora da *Tissue Culture Facility* da Universidade de Virginia, pelo cultivo das células MCF7 utilizadas neste trabalho, pelos ensinamentos, conselhos profissionais e pessoais e por todo carinho;

- À Alyson Prorock e Yongde Bao da *Biomolecular Research Facility* da Universidade de Virginia pelas contribuições valiosas nas análises de expressão gênica por microarranjo;
- À Dra. Ana Maria Moura da Silva por sua colaboração em diferentes projetos com nosso grupo, pelas discussões valiosas sobre os mais diversos temas, pelas cervejas, risadas e por me adotar como uma de suas “filhas científicas”;
- Aos demais colaboradores do Instituto Butantan (Dr. José Portes-Junior, M.Sc. Juliana Lech, M.Sc. Leijiane Ferreira e B.Sc. Michelle Almeida) pelas contribuições experimentais, intelectuais e pela diversão garantida em todos os congressos de Toxinologia;
- Às queridas técnicas do Laboratório de Toxinologia Joelma Saldanha, Monique Nunes e Viviane Tostes por serem essenciais para o bom funcionamento do laboratório, por estarem sempre dispostas a ajudar no que for possível e por serem pessoas maravilhosas as quais eu tenho o prazer de compartilhar a sala e as risadas diariamente;
- À minha grande amiga Giselle Brunoro, pelas risadas intermináveis, as trocas de confidências, os choros de alegria e de tristeza compartilhados, pelas caronas mais divertidas ao som dos melhores clássicos do rock e pop dos anos 80, pelas saídas memoráveis, pelas discussões científicas ou sobre moda, etc.;
- À minha amiga “phyna” Monique Trugilho pelos conselhos, pelo apoio, pelas discussões sobre proteômica ou sobre a vida, pelos desabafo, “destiladas de veneno” e gargalhadas sem fim;
- As queridas Surza Lucia, Luciana Girão, Viviane Bastos por nossos momentos de desabafo, de falar coisas sem sentido, por todas as risadas e por tornarem meus dias muito mais divertidos;
- Aos demais membros do Laboratório de Toxinologia que formam um grupo consistente e de agradável convivência;
- Aos funcionários do Pavilhão Ozório de Almeida, IOC/FIOCRUZ, por todo apoio;
- À Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (PGBCM), incluindo coordenadores e professores, por terem participado da evolução do meu conhecimento acadêmico, além de terem financiado parte de dois congressos internacionais e um curso internacional;
- À Danielle Lobato e à Julimar Ferreira, antiga e atual secretárias da PGBCM, pela disponibilidade em ajudar da melhor forma possível;
- Às Plataformas Tecnológicas de espectrometria de massas e eletroforese bidimensional e fracionamento-RJ, PDTIS/FIOCRUZ, por todo suporte laboratorial;
- À Rede Proteômica do Rio de Janeiro/FAPERJ e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Toxinas (INCTTOX)/CNPq por todo apoio;
- À CAPES pelo financiamento das bolsas de doutorado e doutorado sanduíche através do Edital de Toxinologia;

- Aos meus grandes amores, meus pais Henrique e Sandra Nicolau, pelo amor incondicional, por serem meus maiores incentivadores, por serem meu porto seguro, meus melhores amigos, por me darem força nos momentos de fraqueza, por sempre acreditarem em mim e se esforçarem ao máximo para me dar todo o suporte necessário para a construção da minha carreira;
- Ao meu irmão Felipe Nicolau pelo amor, cumplicidade, incentivo, torcida de sempre e trocas de conhecimentos entre medicina e biologia que foram muito úteis em diversos momentos;
- À minha querida avó Maria Nicolau, por todo amor, apoio e torcida;
- Ao meu querido avô Alberto Nicolau (*in memoriam*) que por ter sido médico e pesquisador da Fundação Oswaldo Cruz entendia como ninguém tudo o que era relacionado à pesquisa, por ter se emocionado com as minhas menores conquistas como se fossem as maiores possíveis, por todo incentivo e pelo orgulho que demonstrava ao ouvir sobre meus trabalhos;
- À minha querida tia Hilda (*in memoriam*), por todo carinho, por ter sido minha avó, minha amiga, por todos os ensinamentos, pelo incentivo e principalmente pela oportunidade de ter convivido 23 anos em sua presença;
- À minha “família C-Ville” principalmente minhas irmãs “phynas” Ana Cláudia Ferreira, Juliana Mota, Maraysa Melo, Natasha Fischer e Raquel Domeniconi e, pelas conversas, trilhas, risadas, saídas, vinhos, cervejas e viagens maravilhosas, sendo essenciais para a minha adaptação nos Estados Unidos;
- Um agradecimento especial aos meus grandes e eternos amigos que fazem parte da minha vida e estão sempre presentes.

“A persistência é o menor caminho do êxito.” Charles Chaplin.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

VENÔMICA TRANSLACIONAL: POTENCIAIS CONTRIBUIÇÕES PARA
TERAPÊUTICA ANTIVENENO E BIOPROSPECÇÃO

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Carolina Alves Nicolau

Além de potencialmente letais, envenenamentos ofídicos frequentemente acarretam elevados índices de morbidade e são reconhecidos pela Organização Mundial da Saúde como uma condição negligenciada de saúde pública. Atualmente, um dos maiores problemas associados ao envenenamento por serpentes é a baixa eficácia dos soros antiofídicos em neutralizar os efeitos tóxicos locais (ex.: hemorragia e necrose). A seleção dos venenos que compõem o *pool* de imunização dos cavalos é uma etapa crucial na produção do soro antiofídico e um dos critérios utilizados é a classificação filogenética das serpentes. Neste contexto, com vistas à possível otimização do soro antiofídico produzido no Brasil, utilizamos a abordagem proteômica *shotgun* para caracterizar os venenos utilizados como antígenos na produção do soro antibotrópico produzido pelo Instituto Butantan. Outros dois venenos que não fazem parte do *pool* também foram analisados. Os resultados proteômicos deste trabalho indicaram que a classificação filogenética (baseada fundamentalmente em características morfológicas das serpentes e análises de DNA mitocondrial) não mostra boa correlação com a composição proteica dos venenos. Como os efeitos do envenenamento estão diretamente relacionados com os componentes proteicos, análises venômicas podem auxiliar na escolha do *pool* de imunização, aprimorando a eficácia do soro antiofídico. O emprego de inibidores toxino-específicos para administração local é uma possível alternativa na busca de terapias antiofídicas mais efetivas. Metalopeptidases (SVMP) são as principais responsáveis pela hemorragia local, sendo sintetizadas na forma de pró-enzimas. Acredita-se que o pró-domínio destas toxinas seja responsável pela modulação de sua atividade catalítica, através de um mecanismo conhecido por *cysteine-switch*. Utilizamos as abordagens de avaliação de formação de complexo em condições nativas e *cross-linking* aliado à espectrometria de massas de alta resolução, para mapearmos a região de interação entre o pró-domínio recombinante (PD-Jar) de jararagina (principal metalopeptidase do veneno de *Bothrops jararaca*) e diferentes metalopeptidases isoladas de venenos botrópicos. Os resultados mostraram que, em concentrações equimolares, PD-Jar foi capaz de interagir com as SVMP da classe PI (BaP1, atroxlisina-I e leucurolisina-a), porém, foi degradado por todas as SVMP estudadas. Desta forma, o uso de PD-Jar na terapia antiveneno pode não ser efetivo; entretanto, pode auxiliar na elucidação do mecanismo de ativação das SVMP. Por outro lado, ainda que os componentes dos venenos possam causar efeitos deletérios significativos, eles também podem apresentar valor terapêutico. Recentemente, observamos que o peptidoma do veneno de *B. jararaca* é significativamente mais complexo do que previamente descrito na literatura. Desta forma, utilizando genômica funcional aliada à abordagem *connectivity map*, triamos o peptidoma por possíveis novas atividades biológicas relevantes. Diversas atividades potenciais, tais como antimalárica, anti-inflamatória e imunossupressora foram detectadas e serão submetidas à etapa de validação complementar. Em resumo, o presente trabalho mostrou a necessidade de estudos venômicos para aperfeiçoar a escolha do *pool* de imunização para a produção do soro antibotrópico, confirmou a interação entre PD-Jar e algumas SVMP-PI e foi mostrado, pela primeira vez, um peptidoma de serpentes significativamente diverso com potencial terapêutico. Esses resultados poderão contribuir para o aprimoramento da terapia antiofídica atual e para a prospecção por novos fármacos para o tratamento de diferentes patologias.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

TRANSLACIONAL VENOMICS: POTENTIAL CONTRIBUTIONS FOR
ANTIVENOM THERAPY AND BIOPROSPECTING

ABSTRACT

DOCTORATE THESIS IN CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY

Carolina Alves Nicolau

Snakebite envenoming induces high levels of morbidity, besides its lethality potential and have been classified as a neglected health condition by the World Health Organization. Currently, the major issue associated to snakebite envenoming is the low efficacy of the antiophidic serum to neutralize the toxic local effects such as hemorrhage and necrosis. One of the most essential steps in antivenom production is the appropriate choice of venoms to compose the horses' immunization pool, which takes into account the phylogenetic classification of snakes. Thus, aiming at improvements in the efficacy of antithrotopic sera produced in Brazil, we used shotgun proteomics to characterize the venoms used as antigens for the antithrotopic serum production by the Butantan Institute. We also analyzed two other venoms not used in the immunization *pool*. The proteomic results indicated that phylogenetic classification (based on morphological features and mitochondrial DNA analysis) does not display good correlation to snake venom composition. Considering that the envenoming effects are directly related to venom proteins, venom analysis may contribute for a more rational design for immunization pool, improving the efficacy of the antiophidic serum. The local administration of toxin-specific inhibitors may represent a good alternative for development of more effective antiophidic therapies. Metalloproteinases (SVMPs), mainly responsible for the local hemorrhage, are synthesized as a pro-enzyme. It is believed that the prodomain of SVMPs is responsible for the modulation of their catalytic activity, through a mechanism known as cysteine-switch. Thus, we used complex formation assays in native conditions and with cross-linking allied to high resolution mass spectrometry, to map the interaction region between a recombinant prodomain (PD-Jar) from jararhagin (major class P-III SVMP from *Bothrops jararaca* venom), and different SVMPs isolated from bothropic venoms. The results indicated that PD-Jar is able to interact, in equimolar concentrations, with class P-I SVMPs (BaP1, atroxlysin-I and leucurolysin-a) but it was degraded by all SVMPs studied. Thus, PD-Jar may not be effective in antivenom therapy; however, it may contribute for the elucidation of the mechanism of activation of SVMPs. On the other hand, besides the dreadful effects of snake venom components, they display a therapeutic potential. Recently, we observed that the *B. jararaca* venom peptidome is far more complex than previously reported in the literature. Thus, using functional genomics associated to connectivity map approach, we screened for novel relevant activities in this peptidome. We identified different potential activities such as antimalarial, anti-inflammatory and immunosuppressive, which will be further validated through biological assays. In summary, in the present work we showed the importance to use venom studies to improve the rational design for immunization *pool* for antithrotopic serum production, we confirmed the interaction between PD-Jar and some SVMP-PI and we showed, for the first time, a significant diverse snake venom peptidome with therapeutic potential. Thus, these results may further contribute for improvements in the antiophidic therapy and for prospecting novel drugs to be applied to the treatment of different pathologies.

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - Envenenamentos ofídicos, epidemiologia e tratamento	2
1.1.1 - Envenenamentos ofídicos, epidemiologia e tratamento no Brasil	3
1.2 - Problemas associados ao tratamento antiofídico.....	4
1.3 - Metalopeptidases de venenos de serpentes: maiores responsáveis pela hemorragia local causada por envenenamento botrópico.....	5
1.4 - Alternativas à terapia antiofídica atual.....	9
1.5 - Venômica – conhecendo a diversidade proteica dos venenos de serpente através de tecnologias proteômica.....	10
1.6 - Venenos de serpentes: efeito patológico x fonte de novos fármacos.....	17
1.7 - <i>Connectivity Map: triagem por atividades biológicas desconhecidas em venenos de serpentes</i>	20
2 – OBJETIVO	23
2.1 - Objetivo geral.....	24
2.2- Objetivos específicos	24
3 - MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 – Material biológico	26
3.2 – Metodologia.....	26
3.2.1 - Venômica de diferentes venenos do gênero <i>Bothrops</i> (Parte 1)	28
3.2.1.1 - Preparo de amostra para 2DE.....	28
3.2.1.2 - Eletroforese bidimensional (2DE) – visualização do perfil proteico	28
3.2.1.3 - Proteômica <i>Shotgun</i>	29
3.2.2 - Avaliação da formação de complexos entre o pró-domínio recombinante de jarararagina (PD-Jar) e diferentes metalopeptidases (SVMP) (Parte 2).....	31
3.2.2.1 - Avaliação da formação de complexo por gel nativo	31
3.2.2.2 - Identificação das bandas dos géis nativos por espectrometria de massas	32
3.2.2.3 - Avaliação da formação de complexo por exclusão molecular	33
3.2.2.4 - Cinética de degradação.....	33
3.2.2.5 - Determinação das regiões de interação dos complexos através de <i>cross-linking</i> e espectrometria de massas.....	33

3.2.3 - Obtenção da amostra do peptidoma de <i>Bothrops jararaca</i> para busca por atividades biológicas (Parte 3).....	35
3.2.3.1 - Fracionamento <i>OFFGEL</i> + Cromatografia de fase reversa (C4-C18 em sequência)	35
3.2.3.1.1 - Fracionamento por <i>OFFGEL</i> com e sem o uso de anfólitos.....	35
3.2.3.1.2 - Avaliação da qualidade do fracionamento por <i>OFFGEL</i> utilizando SDS-PAGE	36
3.2.3.1.3 - Cromatografia de fase reversa (C4 - C18 em sequência).....	36
3.2.3.2 - Veneno bruto + cromatografia de fase reversa (C4 - C18 em sequência)	37
3.2.3.3 - Fracionamento por exclusão molecular e cromatografia de fase reversa (C18) ..	37
3.2.3.3.1 Exclusão molecular.....	37
3.2.3.4 Análise peptidômica	38
3.2.3.5 Análise proteômica	39
3.2.3.6 Genômica funcional e varredura por atividades biológicas.....	40
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO (PARTE 1)	42
4.1 - Análise venômica de sete serpentes do gênero <i>Bothrops</i> medicamente importantes no Brasil: comparação entre composição dos venenos e classificação filogenética	43
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO (PARTE 2)	58
4.2 - Mapeamento da interação entre metalopeptidases de veneno de serpentes e o pró-domínio recombinante de jararagina	59
4.2.1 – Ensaios de formação de complexo	59
4.2.2 - Determinação das regiões de interação entre o PD-Jar e as SVMP-PI	72
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO (PARTE 3)	80
4.3 - Peptidoma de <i>Bothrops jararaca</i> : busca por novas atividades biológicas através da abordagem de <i>connectivity map</i> (C-Map)	81
4.3.1 Obtenção do peptidoma de <i>Bothrops jararaca</i>	81
4.3.2 – Análise proteopeptidômica do veneno de <i>Bothrops jararaca</i>	88
4.3.3 Varredura por potenciais atividades no peptidoma de <i>Bothrops jararaca</i>	92
5 - CONCLUSÕES	105
6 – PERSPECTIVAS	107
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
8 – ANEXOS	133

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1** - Cobertura de sequência da botropasina (SVMP-PIIIa) após análise peptidômica do veneno de *B. jararaca* 8
- Figura 3.1** - Fluxograma resumido das abordagens utilizadas na tese 27
- Figura 4.1** - Avaliação do perfil de sete venenos dos gêneros *Bothrops*, *Bothropoides* e *Rhinocerophis* em géis bidimensionais de 7 cm e intervalo de pH de 4 a 7 e 3 a 10..... 44
- Figura 4.2:** Distribuição de classes proteicas identificadas nos venenos dos três diferentes gêneros através de abordagem proteômica shotgun. 48
- Figura 4.3:** Agrupamento cladístico dos venenos de acordo com a composição proteica. 52
- Figura 4.4:** Análise de componentes principais relacionada à abundância relativa dos componentes proteicos determinada por proteômica *shotgun*..... 53
- Figura 4.5:** Análise de componente principais relacionada ao perfil de eluição dos picos em cromatografia de fase reversa em coluna C18..... 54
- Figura 4.6:** Avaliação da formação de complexo entre PD-Jar e as SVMP por gel nativo a 12% corado por impregnação por prata e por exclusão molecular em coluna Superdex 200 (25 mL) 60
- Figura 4.7A:** Cobertura de sequência do PD-Jar controle (bandas # 1, 2, 12 e 13). 66
- Figura 4.7B:** Cobertura de sequência do PD-Jar com as SVMP-PI (bandas # 11 e 16) que formaram complexo com ele. 67
- Figura 4.8:** Análise da degradação tempo-dependente do PD-Jar por jararagina (SVMP-PIIIa), BaP1, atroxlisina-I ou leucurolisina-a (SVMP-PI)..... 68
- Figura 4.9:** Análise da reação de formação de complexos entre PD-Jar e as SVMP estabilizados por BS₃..... 73
- Figura 4.10:** Espectro de fragmentação (MS/MS) referente aos peptídeos de BaP1 (picos azuis) e PD-Jar (picos vermelhos) ligados cruzadamente pelo reagente BS₃..... 76
- Figura 4.11:** Espectro de fragmentação (MS/MS) referente aos peptídeos de Leucurolisina-a (picos vermelhos) e PD-Jar (picos azuis) ligados cruzadamente pelo reagente BS₃..... 77
- Figura 4.12:** Representação gráfica dos *inter-* e *intra-links* 78
- Figura 4.13:** Comparação entre a reprodutibilidade do fracionamento do veneno de *B. jararaca* por *OFFGEL* no nosso primeiro trabalho (A) (Nicolau 2012) e no presente trabalho (B)..... 81
- Figura 4.14:** Esquema representando a abordagem cromatográfica (C4-C18 em sequência) utilizada para concentração/dessalinização dos *pools* obtidos após fracionamento do veneno por *OFFGEL* ou de 9 mg de veneno de *B. jararaca* sem fracionamento prévio. 82

Figura 4.15: Perfil de eluição dos anfólitos contidos na solução do <i>OFFGEL</i> utilizada na solubilização do veneno para posterior fracionamento	84
Figura 4.16: Comparação da resolução de separação das 24 frações após fracionamento por <i>OFFGEL</i> (24 cm, intervalo de pH de 3 a 10) na presença (painel A) ou ausência (painel B) de anfólitos	85
Figura 4.17: Perfil de eluição do peptidoma abaixo de 3kDa por cromatografia de fase reversa em coluna C18..	86
Figura 4.18: Perfil de eluição do peptidoma abaixo de 10kDa por cromatografia de fase reversa em coluna C18.	87
Figura 4.19: Classes proteicas identificadas no proteoma acima de 10 kDa (Painel A) e 3 kDa (Painel B) de <i>B. jararaca</i>	88
Figura 4.20: Classes proteicas identificadas nos peptidomas abaixo de 10 kDa (Painel A) e abaixo de 3 kDa (Painel B) do veneno de <i>B. jararaca</i>	91
Figura 4.21: Cobertura de sequência da botropasina (SVMP-PIIIa) após análise peptidômica (< 3 kDa e < 10 kDa) do veneno de <i>B. jararaca</i>	92
Figura 4.22: Esquema representativo da abordagem para varredura por atividades biológicas no peptidoma de <i>B. jararaca</i>	93
Figura 4.23: Análise funcional dos genes de MCF7 que foram superexpressos após a incubação destas células com o peptidoma de <i>B. jararaca</i>	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Número de espectros totais normalizados identificados em cada classe proteica nos veneno das espécies dos gêneros <i>Bothrops</i> , <i>Bothropoides</i> e <i>Rhinoceriphis</i>	47
Tabela 4.2 - Identificações, por nanoLC-LTQ/Orbitrap, das proteínas presentes nas bandas excisadas do experimento de formação de complexo avaliado por eletroforese em condições nativas (Figura 4.6).....	64
Tabela 4.3 - Quantificação das frações de veneno de <i>B. jararaca</i> enriquecidas em peptídeos ou proteínas, para os cortes de 3 kDa ou 10 kDa	87
Tabela 4.4 – Lista dos 20 genes considerados mais relevantes (neste trabalho) que foram superexpressos após o tratamento das células MCF7 com o peptidoma de <i>B. jararaca</i>	94
Tabela 4.5 – Lista dos 20 genes considerados mais relevantes (neste trabalho) que foram subexpressos após o tratamento das células MCF7 com o peptidoma de <i>B. jararaca</i>	96
Tabela 4.6 - Lista dos 30 fármacos que apresentaram maior correlação positiva com o peptidoma de <i>B. jararaca</i>	98
Tabela 4.7 - Lista dos 20 genes considerados mais relevantes (neste trabalho) que foram subexpressos após o tratamento das células MCF7 com o veneno de <i>B. jararaca</i>	101
Tabela 4.8 - Lista dos 30 fármacos que apresentaram maior correlação positiva com o veneno de <i>B. jararaca</i>	103

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- 1D-PAGE – *one dimensional polyacrylamide gel electrophoresis* (eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida)
- 2D – LC – *two dimensional liquid chromatography* (cromatografia líquida bidimensional)
- 2D – PAGE – *two dimension polyacrylamide gel electrophoresis* (eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida)
- 2DE – *two dimensional electrophoresis* (eletroforese bidimensional)
- 3FTXs – *three finger toxins* (toxinas de três dedos)
- ADAM - *a disintegrin and metallopeptidase* (metalopeptidase com domínio desintegrina)
- ADAMTS - *a disintegrin and metallopeptidase with thrombospondin motif* (metalopeptidase com domínio desintegrina e motivo de trombospondina)
- AGC – *automatic gain control* (controle automático de ganho)
- AMINOPEP - aminopeptidase
- BCA - *bicinchoninic acid* (ácido bicinchonínico)
- BLAST - *basic local alignment search tool* (ferramenta básica de busca de alinhamento local)
- BPP – *bradykinin potentiating peptide* (peptídeo potenciador de bradicinina)
- BS3-d0 - bis[sulfosuccinimida] suberato-d0
- cDNA – *complementary deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico complementar)
- CHAPS - *3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate*
- CID - *collision-induced dissociation* (dissociação induzida por colisão)
- CLEC – *C-type lectin* (lectina tipo C)
- CLECL – *C-type lectin like* (lectina tipo C-simile)
- C-Map – *connectivity map*
- CNP – *C-type natriuretic peptide* (peptídeo natriurético tipo-C)
- CPLL - *combinatorial hexapeptide ligand library* (biblioteca combinatorial de ligantes hexapeptídeos)
- cRAP - *common repository of adventitious proteins* (repositório comum de proteínas adventícias)
- CRISP – *cysteine rich secretory proteins* (proteínas secretórias ricas em cisteína)
- CYP1A1 - *cytochrome p450 family 1 subfamily A member 1* (citocromo P450 família 1 subfamília A membro 1)
- DB – *data base* (banco de dados)
- DC – *disintegrin-like and cysteine-rich domain* (domínio desintegrina símile e rico em cisteína)
- DIPEP - dipeptidase
- DMEM - *Dulbecco's modified Eagle medium* (meio Eagle modificado por Dulbecco)
- DTT – *dithiothreitol* (ditiotreitól)
- ECA - enzima conversora de angiotensina
- ECTONT – *ecto-5'-nucleotidase*
- EDTA - *ethylenediamine tetraacetic acid* (ácido etilenodiamino tetra-acético)
- ESI - *electrospray ionization* (ionização por eletrospray)
- ESTs - *expressed sequence tags* (etiqueta de sequência expressa)
- FDR - *false discovery rate* (taxa de falsa descoberta)
- FWHM - *full width at half maximum* (largura total do pico na metade de sua altura máxima)
- G6DP - *glucose-6-phosphate dehydrogenase* (glicose-6-fosfato desidrogenase)

GLUTCYC – *glutamiyl cyclase* (glutaminil ciclase)
GLUTPEROX – *glutathione peroxidase* (glutathiona peroxidase)
HCD - *higher energy collisional dissociation* (dissociação induzida por alta energia de colisão)
HEPES - ácido n-(2-hidroxietil)piperazina-n'-2-etanosulfônico
HMOX-1 - *heme oxygenase* (heme oxigenase 1)
HPLC - *high performance liquid chromatography* (cromatografia líquida de alta performance)
HUVECs - *human umbilical vein endothelial cells* (células endoteliais de cordão umbilical)
HYALU – *hyaluronidase* (hialuronidase)
IAA – *iodoacetamide* (iodoacetamida)
IgE - imunoglobulina E
IPG – *Immobilized pH gradient* (Gradiente de pH imobilizado)
K_i - Constante de inibição
kVh – *kilovolt hour*
LAAO – *L- aminoacid oxidase* (L-aminoácido oxidase)
LC - *liquid chromatography* (Cromatografia líquida)
LC-MS/MS - *liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry* (cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas *in tandem*)
LTQ – *linear trap quadrupole* (armadilha linear de íons do tipo quadrupolar)
m/z – razão massa sobre carga
MALDI-TOF – *matrix assisted laser desorption ionization – time of flight* (ionização por dessorção a laser assistida por matriz – tempo de voo)
MCF7 - *Michigan cancer foundation-7*
MMP – *matrix metalloproteinase* (metalopectidase de matriz)
MS – *mass spectrometry* (espectrometria de massas)
MSn - *mass spectrometry in tandem* (espectrometria de massas *in tandem*)
NanoESI – *nano electrospray ionization* (ionização por nanoeletrospray)
NGF – *nerve growth factor* (fator de crescimento de nervo)
NUCLEOB – *nucleobindin protein* (proteína ligadora de cálcio)
p/v – razão peso sobre volume
PCA – *principal components analysis* (análise dos componentes principais)
PDIEST – *phosphodiesterase* (fosfodiesterase)
PLA₂ – *phospholipase a₂* (fosfolipase a₂)
PLB – *phospholipase b* (fosfolipase b)
PMF – *peptide mass fingerprint* (impressão digital de massas peptídicas)
PPIB - *Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B* (peptidil-prolil cis-trans isomerase B)
ppm - partes por milhão
PSM – *peptide-spectrum match* (correspondências espectro-peptídeo)
PTM – *post translational modification* (modificação pós-traducional)
Q- quadrupolo
RP- *reverse Phase* (Fase reversa)
RP-HPLC – *reverse phase high performance liquid chromatography* (cromatografia líquida de fase reversa de alta performance)
SDS – *sodium dodecyl sulfate* (dodecil sulfato de sódio)

SDS-PAGE - *polyacrylamide gel electrophoresis with SDS* (eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida na presença de SDS)

SVMP – *snake venom metalloproteinase* (metalopectidase do veneno de serpente)

SVSP – *snake venom serine peptidase* (serinopectidase do veneno de serpente)

TFA - trifluoroacetic acid (ácido trifluoroacético)

TNF - *tumor necrosis factor* (fator de necrose tumoral)

TOF - *time-of-flight* (tempo-de-vôo)

TRANSF – *transferrin* (transferrina)

Tris – tris (hidroximetil) aminometano

v/v – Razão volume sobre volume

Vh – volt hora

WHO – *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde)

z - carga

Códigos, de uma ou três letras, para ácidos aminados empregados nesta tese.

Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Ácido aspártico	Asp	D
Asparagina	Asn	N
Cisteína	Cys	C
Ácido glutâmico	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

1. INTRODUÇÃO

1.1 Envenenamentos ofídicos, epidemiologia e tratamento

O envenenamento por serpentes é um importante problema de saúde pública que afeta principalmente as áreas rurais de países da Ásia, África e América Latina (Chippaux 1998). Estima-se que ocorram cerca de 2,5 milhões de casos de envenenamento ofídico anualmente; destes, cerca de 100 mil levam ao óbito e 250 mil, a graves sequelas físicas e/ou psicológicas (morbidades) (Gutierrez *et al.* 2010; WHO 2007). Estes números, provenientes de registros hospitalares e estatísticas de atendimento médico, estão provavelmente subestimados, uma vez que a maior parte dos acidentes ofídicos ocorre em áreas rurais, com infraestrutura deficiente. Muitas vítimas não têm acesso a qualquer assistência e, eventualmente, morrem antes de chegar a um hospital, contribuindo para inconsistências no sistema de notificação de acidentes (Chippaux 2008; Kasturiratne *et al.* 2008).

O maior problema associado ao envenenamento ofídico ainda é o elevado número de acidentes que evoluem para danos teciduais permanentes e outras sequelas (Gutierrez *et al.* 2010), gerando impactos psicológicos e socioeconômicos significativos (Gutierrez *et al.* 2006; WHO 2007). Por esta razão, desde 2009 a Organização Mundial de Saúde considera que o envenenamento ofídico constitui uma condição de saúde negligenciada (Gutierrez 2012).

A terapia antiofídica, baseada na administração parenteral de antiveneno, é o único tratamento disponível desde sua introdução, no final do século XIX, até os dias atuais (Calmette 1894; Gutierrez *et al.* 2011). O soro antiofídico é produzido através da imunização de animais domésticos de grande porte, frequentemente o cavalo, devido à facilidade de manuseio do animal e à grande quantidade de soro obtida após o sangramento. O animal pode ser imunizado com uma mistura (*pool*) de venenos de uma mesma espécie ou de espécies diferentes, originando soros mono- ou poliespecíficos, respectivamente (WHO 2010).

A escolha dos venenos que deverão compor o *pool* de imunização é uma das etapas mais críticas para determinar a eficácia final do soro antiofídico. Por isso, alguns critérios prévios devem ser obedecidos: (i) delimitação da região geográfica em que o soro será utilizado; (ii) identificação das espécies de maior relevância médica (*i.e.*, responsáveis pelo maior número de casos de envenenamento e/ou pelos casos mais graves) na região em que o soro será utilizado; (iii) análise da variabilidade da composição proteica entre as espécies de relevância médica selecionadas (Gutierrez *et al.* 2010).

1.1.1 Envenenamentos ofídicos, epidemiologia e tratamento no Brasil

No Brasil, estima-se a ocorrência de cerca de 30 mil casos de acidentes por mordedura de serpentes anualmente, sendo as regiões Norte, Nordeste e Sudeste as mais afetadas (Ministério-da-Saúde 2014). O gênero *Bothrops* (família Viperidae) é responsável por cerca de 90% dos casos de envenenamento no país (cerca de 70% destes causados pela espécie *Bothrops jararaca*), seguido pelos gêneros *Crotalus* (7,7%), *Lachesis* (1,4%) e *Micrurus* (0,4% - família Elapidae) (Ministério-da-Saúde 2014).

O gênero *Bothrops* (família Viperidae) apresenta uma grande variabilidade na composição proteica de seus venenos. Essa variabilidade composicional pode se refletir diretamente na reatividade com o antissoro e na eficácia do mesmo. Esse problema é particularmente comum em serpentes do gênero *Bothrops*, já que elas são bastante diversas em aspectos morfológicos e habitat, sendo encontradas por toda a América Latina (Carrasco *et al.* 2012). Devido à grande diversidade encontrada neste gênero, as relações filogenéticas (que muitas vezes são utilizadas como critério para seleção dos venenos do *pool* de imunização) dentro desse grupo não são bem compreendidas e revisões são frequentemente sugeridas.

Baseados em análises morfológicas e em sequências de DNA mitocondrial, Wuster e colaboradores (Wüster *et al.* 2002) propuseram uma classificação reconhecendo os gêneros *Bothrops* e *Bothrocophias* como independentes. Posteriormente, Castoe e colaboradores sugeriram que *Bothrops*, *Bothrocophias* e *Bothriopsis* seriam gêneros independentes (Castoe e Parkinson 2006). Recentemente, uma nova classificação propôs que o gênero *Bothrops* fosse desmembrado em três gêneros independentes: *Bothropoides* (antigo grupo “jararaca/neuwiedi”), *Rhinocerophis* (antigo “alternatus”) e *Bothrops* (antigo “jararacussu/atrox”) (Fenwick *et al.* 2009) (Wüster *et al.* 2002). Essa classificação foi posteriormente questionada e a permanência de *Bothrocophias* como gênero independente, assim como a junção de *Bothriopsis*, *Bothropoides* e *Rhinocerophis* no gênero *Bothrops*, foi sugerida (Carrasco *et al.* 2012). Contudo, com o surgimento de metodologias de sequenciamento de DNA para análises cladísticas, é possível que novas classificações sejam sugeridas no futuro.

Seguindo a classificação de Fenwick e colaboradores, diversas espécies classificadas nos gêneros *Bothropoides*, *Rhinocerophis* e *Bothrops* estão envolvidas no envenenamento por mordedura de serpentes, contribuindo para os elevados números de incidentes reportados no Brasil (Ministério-da-Saúde 2001). Dessa forma, a complexidade do grupo *Bothrops* e a relevância dessas espécies para a saúde pública justificam a necessidade de estudos

comparativos sobre a composição dos venenos das espécies mais relevantes no Brasil, assim como estudos de reatividade desses venenos com o antissoro. Esses estudos podem contribuir para melhorias no racional utilizado para embasar a escolha dos venenos que compõem o *pool* de imunização para produção do antissoro.

O Brasil é autossuficiente na produção de soro antiofídico, realizada, majoritariamente, por institutos governamentais, tais como o Instituto Butantan (SP), o Instituto Vital Brazil (RJ), a Fundação Ezequiel Dias (MG) e o Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (PR). O tratamento dos envenenamentos por serpentes do gênero *Bothrops*, responsáveis por cerca de 90% dos casos no Brasil (Ministério-da-Saúde 2001), é realizado através do uso de antissoro produzido por imunização de cavalos com o veneno de cinco espécies (*Bothrops jararaca*, *Bothrops neuwiedi*, *Bothrops alternatus*, *Bothrops moojeni* e *Bothrops jararacussu*). Contudo, algumas espécies de importância médica no país não fazem parte do *pool* de imunização; este é o caso da *Bothrops atrox*, espécie responsável pela maioria dos acidentes na região Amazônica (Calvete *et al.* 2011).

1.2 Problemas associados ao tratamento antiofídico

Embora o soro antiofídico seja eficaz em neutralizar os efeitos sistêmicos do envenenamento (hemorragia generalizada, coagulopatia, falência renal etc.), ele é parcialmente eficaz em neutralizar seus graves efeitos locais (hemorragia local, mionecrose, edema e degeneração da junção neuromuscular). Essa eficácia parcial é provavelmente devida à ação extremamente rápida das toxinas e ao desencadeamento de efeitos secundários no organismo da vítima (Chippaux e Goyffon 1998; Gutierrez *et al.* 1998; Gutierrez *et al.* 2006; Warrell 1992), tais como liberação de mediadores inflamatórios (citocinas, óxido nítrico, metalopeptidases de matriz), que não são efetivamente neutralizados pelo antiveneno (Clissa *et al.* 2006; Mourada-Silva *et al.* 1996; Petricevich *et al.* 2000; Rucavado *et al.* 2002).

Outros fatores podem contribuir para a dificuldade de neutralização dos efeitos locais: (i) danos na microcirculação causados pelas toxinas de veneno podem dificultar a distribuição dos anticorpos no tecido danificado (Battellino *et al.* 2003; Farsky *et al.* 1999); (ii) toxinas importantes na fisiopatologia local do envenenamento podem ser pouco imunogênicas em cavalos, resultando na produção de anticorpos neutralizantes com títulos insuficientes ou na geração de anticorpos de baixa afinidade; (iii) administração de imunoglobulinas íntegras ou de seus fragmentos mono- (Fab) ou divalentes (F(ab')₂). Neste último caso, a escolha deverá

ser feita em função das propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas das imunoglobulinas e de seus fragmentos, em contraposição à composição do veneno a ser neutralizado. Por exemplo, se a maior parte das toxinas do veneno tem baixa massa molecular (*e.g.*, neurotoxinas dos venenos de serpentes da família Elapidae), elas são introduzidas na corrente sanguínea e rapidamente atingem seus alvos moleculares. Neste caso, a utilização do fragmento F(ab) é mais conveniente; por apresentar massa molecular menor (cerca de 50 kDa), com maior velocidade de dispersão, as toxinas seriam alcançadas e neutralizadas mais rapidamente. No caso de venenos hemorrágicos (família Viperidae), suas principais toxinas possuem alta massa molecular e permanecem por mais tempo na circulação. Desta forma, imunoglobulinas íntegras (cerca de 150 kDa) ou seus fragmentos F(ab')₂ (cerca de 100 kDa) são mais recomendados para neutralização destas moléculas, pois apresentam menor velocidade de dispersão, com maior meia-vida (Gutierrez *et al.* 2003; WHO 2010).

Outro problema associado à terapia antiofídica são as reações adversas, imediatas ou tardias, que podem ocorrer devido à administração de imunoglobulinas de cavalos. A reação imediata, iniciada até 12 horas após a administração do soro, pode ser do tipo anafilática ou anafilactóide e é caracterizada pela hipersensibilidade às proteínas oriundas do cavalo (Chippaux e Goyffon 1998). A resposta imediata anafilática ocorre em pacientes previamente sensibilizados com soro de cavalo e envolve a participação de IgE anti-cavalo. Esta se liga à superfície dos mastócitos, ativando-os e, conseqüentemente, gerando a liberação de mediadores inflamatórios por essas células. Nas reações do tipo anafilactóide, ocorre a desgranulação de mastócitos via ativação de sistema complemento, sem a participação de IgE (Lucke e Thomas 1983; Netzel 1986). A reação tardia, também conhecida por “doença do soro” ou “doença do complexo imune”, ocorre em até três semanas após a administração do soro e é causada pela geração de anticorpos contra o antissoro. Esses anticorpos formam complexos imunes que se depositam nos vasos sanguíneos, acarretando alguns sintomas característicos, como febre, urticárias, adenopatia, entre outros (Chippaux e Goyffon 1998). Portanto, é evidente a necessidade de aprimoramento da terapia antiofídica atual, buscando-se a neutralização efetiva dos efeitos locais do envenenamento e minimizando as reações adversas causadas pela administração do soro antiofídico.

1.3 Metalopeptidases de venenos de serpentes: maiores responsáveis pela hemorragia local causada por envenenamento botrópico

As metalopeptidases de veneno de serpentes (*Snake Venom MetalloPeptidases* - SVMP) são as principais responsáveis pela síndrome hemorrágica característica do envenenamento por

serpentes da família Viperidae (Gutierrez *et al.* 2005), principalmente do gênero *Bothrops*, o qual abrange a maioria das espécies responsáveis pelo envenenamento ofídico no Brasil (Ministério-da-Saúde 2001). Além da atividade hemorrágica, causada por danos à microvasculatura, as SVMP também possuem atividades como fibrinogenolítica, fibrinolítica, apoptótica, ativadora de protrombina e de fator X e inibidora da agregação plaquetária (Fox e Serrano 2005).

As SVMP são enzimas zinco-dependentes que pertencem à subfamília das Reprolisinas, família M12 das metalopeptidases, juntamente com as ADAM (*A Disintegrin and Metalloproteinase*, e ADAMTS (*ADAM with ThromboSpondin motifs*) (Bjarnason e Fox 1995). Esta família tem como característica principal a presença de um motivo (HEXGHXXGXXHD) conservado no sítio catalítico (Hite *et al.* 1994; Hite *et al.* 1992). Embora as ADAM/ADAMTS sejam as proteínas filogeneticamente mais próximas, uma das funções principais das SVMP é a degradação de componentes da membrana basal, função tradicionalmente realizada pelas metalopeptidases de matriz (MMP, família M10) em processos fisiológicos normais. Apesar das SVMP e as MMP apresentarem sítios catalíticos similares, seus domínios não catalíticos são diferentes, razão pela qual são classificadas em famílias diferentes (Takeda *et al.* 2011).

As SVMP foram agrupadas em 3 classes (PI a PIII), de acordo com seus domínios funcionais. Com os avanços dos estudos sobre SVMP, as classes PII e PIII foram subdivididas (Fox e Serrano 2005; Fox e Serrano 2008). A classe PI é representada pelas enzimas que contêm somente o domínio metalopeptidase, o qual apresenta a sequência HEXXHXXGXXHD no sítio catalítico, conservada em todas as metalopeptidases de veneno de serpentes (Hite *et al.* 1994). A classe PII, basicamente representada por um domínio metalopeptidase acrescido de um domínio desintegrina (Bjarnason e Fox 1994), foi subdividida em PIIa a PIIe. A subclasse PIIa corresponde a uma PII que sofreu processamento proteolítico, liberando uma metalopeptidase tipo PI e uma desintegrina; as PIIb apresentam os domínios metalopeptidase e desintegrina unidos por uma região espaçadora; as PIIc representam as PIIb em sua forma dimérica; as PIIId, apesar de possuírem sequência homóloga às PII, ainda não tiveram seu domínio metalopeptidase identificado no veneno, sendo esta subclasse representada apenas por desintegrinas diméricas; as PIIe são representadas por desintegrinas heterodiméricas, provavelmente originadas pela associação de um produto de um gene codificante para desintegrina com um domínio desintegrina originado por processo proteolítico. O grupo das PIII também foi subdividido nesta nova classificação em PIIIa a PIIIId. A subclasse PIIIa é

representada pelo domínio metalopeptidase acrescido de um domínio desintegrina símile e um rico em cisteína; a subclasse PIIIb consiste nas PIIIa que sofreram processos proteolíticos liberando um domínio metalopeptidase e os domínios desintegrina símile e rico em cisteína unidos; as PIIIc consistem nas PIIIa em sua forma dimérica. Por último, as PIIId (previamente denominadas PIV) possuem uma estrutura semelhante às PIIIa, acrescida de dois domínios de lectina tipo-C unidos ao domínio rico em cisteína por pontes dissulfeto.

Moura-da-Silva e colaboradores demonstraram uma grande diversidade de cDNAs codificando SVMP no veneno de *Bothrops neuwiedi*, principalmente no grupo das PII, onde foi detectado uma subclasse, até então não descrita em outros trabalhos. Essa subclasse, denominada de PIIx, é composta por uma combinação do domínio catalítico do grupo PIII com um domínio desintegrina (sequência RGD), além de possuir cisteínas extras na porção C-terminal. Esse resultado aumenta o número de possibilidades de mecanismos envolvidos na geração de diversidade desta classe de toxinas, sugerindo que a atual classificação das SVMP tenha que, eventualmente, ser novamente revista (Moura-da-Silva *et al.* 2011).

As SVMP são sintetizadas na glândula do veneno na forma de zimogênio (pré-pro-proteinase) e sofrem processamento proteolítico, gerando as formas biologicamente ativas (Fox e Serrano 2005). A região “pré” é representada pelo peptídeo sinal e contém 18 aminoácidos, em sua maioria hidrofóbicos, atuando como marcador para secreção (Ramos e Selistre-de-Araujo 2006). A estrutura primária do pró-domínio é composta por aproximadamente 200 aminoácidos e apresenta uma região conservada (PKMCGVT). Acredita-se que esta região conservada seja a responsável por modular a atividade das SVMP através de um mecanismo chamado *cysteine-switch*, já descrito para MMP e ADAM. Tal mecanismo consiste na ligação entre o grupamento tiol da cisteína do pró-domínio ao metal Zn^{2+} do sítio catalítico do domínio metalopeptidase, mantendo a SVMP em sua forma inativa (zimogênio) no interior da glândula dos venenos das serpentes (Loechel *et al.* 1999; Ramos *et al.* 2003; Wart e Birkedal-Hansen 1990). Após a clivagem do pró-domínio do sítio catalítico da SVMP, esta se torna ativa. Esta hipótese foi sustentada por um trabalho de Grams e colaboradores (Grams *et al.* 1993), no qual foi detectada a atividade inibitória ($K_i = 3 \mu M$) de um peptídeo sintético (PKMCGV-NH₂) frente à adamalisina II, uma SVMP isolada do veneno de *Crotalus adamanteus*. Portes-Junior e colaboradores (Portes-Junior *et al.* 2014) recentemente estudaram o processamento e ativação de SVMPs através de: (1) produção de um pró-domínio recombinante de jararagina (SVMP-PIIIa presente no veneno de *B. jararaca*); (2) produção de anticorpo policlonal contra esse pró-domínio; (3) análises proteômicas do veneno e da

glândula em diferentes estágios de produção de veneno; (4) diferentes ensaios imunoquímicos. O pró-domínio recombinante, denominado PD-Jar, foi produzido utilizando *primers* contendo nucleotídeos que codificam o N-terminal do pró-domínio de botropasina, uma SVMP-PIIIa de *B. jararaca* que apresenta 95% de identidade sequencial com jararagina, e o C-terminal do pró-domínio de jararagina. Isto foi feito pois a sequência depositada para o pró-domínio de jararagina está incompleta em sua porção N-terminal. A clonagem foi feita em vetor pAE, com expressão em *Escherichia coli*. Utilizando um anticorpo policlonal anti-PD-Jar, em associação com análises proteômicas e imunoquímicas, foi possível confirmar a presença de pró-domínio em extratos de glândula de veneno de *B. jararaca* ao longo de todo o ciclo de produção do veneno, assim como no veneno coletado diretamente do lúmen durante o pico de produção. Embora o mecanismo de ativação das SVMP seja desconhecido, os autores sugeriram que o processamento das SVMP começa nas vesículas secretórias e continua no lúmen da glândula, onde a maioria das enzimas está ativada. Neste trabalho, também foi reportada a presença de pró-domínio íntegro nos venenos (Portes-Junior *et al.* 2014). Adicionalmente, em um trabalho prévio do nosso grupo, identificamos peptídeos naturais da região de pró-domínio de metalopeptidases no peptidoma de *Bothrops jararaca* (Nicolau 2012)(Figura 1.1).

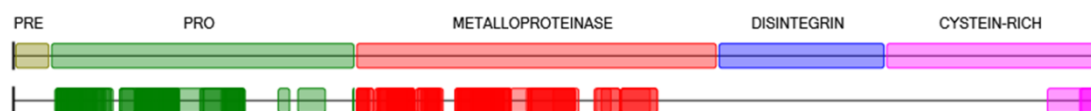


Figura 1.1: Cobertura de sequência da botropasina (SVMP-PIIIa) após análise peptidômica do veneno de *Bothrops jararaca*. Os peptídeos foram identificados através da abordagem *OFFGEL* + dessalinização em microcoluna C18 (Zip-Tip) + nanoLC-MS/MS (Nicolau 2012). A figura foi gerada utilizando o programa Caititu (Carvalho *et al.* 2008).

A presença desses peptídeos no veneno indica uma degradação do pró-domínio após a ativação das metalopeptidases, o que pode estar relacionado a um mecanismo de regulação para prevenir uma eventual reativação das SVMP. Entretanto, esta hipótese não está comprovada e peptídeos oriundos do pró-domínio poderiam, eventualmente, exercer uma função de inibição temporária das SVMP até a inoculação do veneno nas presas/vítimas (Portes-Junior *et al.* 2014). Portanto, a elucidação do mecanismo de ativação/controle das metalopeptidases pode auxiliar no desenvolvimento de um tratamento mais eficaz de neutralização da hemorragia local gerada por elas.

1.4 Alternativas à terapia antiofídica atual

Para minimizar alguns dos problemas associados à terapia antiofídica utilizada atualmente, a Organização Mundial de Saúde publicou diretrizes de produção, controle e manutenção da qualidade dos antivenenos (WHO 2010). Algumas medidas sugeridas para reduzir os riscos da administração de antivenenos, aprimorando sua eficácia, incluem: (i) uso do menor número possível de espécies para produção do *pool* de imunização, sem comprometer a eficácia do antiveneno; (ii) produção de um soro toxino-específico, reduzindo a quantidade de anticorpos irrelevantes produzidos contra proteínas não tóxicas. O tratamento toxino-específico poderia basear-se no uso de toxinas recombinantes como imunógenos, na síntese de anticorpos ou no emprego de inibidores específicos para as toxinas mais relevantes dos venenos de interesse.

O potencial uso de inibidores específicos vem sendo bastante explorado no caso de SVMP e de miotoxinas com estrutura de fosfolipase A₂ de venenos de serpentes. Estas toxinas são as principais responsáveis pela hemorragia e mionecrose locais características do envenenamento causado por serpentes da família Viperidae (Gutierrez e Lomonte 2013; Moura-da-Silva *et al.* 2007).

Existem animais naturalmente imunes aos venenos de serpentes (Domont *et al.* 1991), resultado da presença de proteínas séricas com propriedades antiofídicas, que são transmitidas hereditariamente (Perales *et al.* 1986). Essas proteínas são capazes de se ligar efetivamente a toxinas importantes para o desenvolvimento da fisiopatologia do envenenamento, neutralizando-as e ensejando sua remoção do organismo do hospedeiro (Neves-Ferreira *et al.* 2015). Inibidores naturais de metalopeptidases de venenos de serpentes já foram isolados do plasma de serpentes (Valente *et al.* 2001; Yamakawa e Omori-Satoh 1992) e de mamíferos (Catanese e Kress 1992; Farah *et al.* 1996; Jurgilas *et al.* 2003; Neves-Ferreira *et al.* 2000) e têm sido extensivamente caracterizados. O objetivo desta linha de pesquisa é eventualmente contribuir para a minimização dos efeitos locais através da coadministração do soro hiperimune tradicional e moléculas inibitórias inspiradas em proteínas antiofídicas endógenas (Gutierrez *et al.* 2007).

Além dos inibidores naturais referidos acima, pró-domínios das próprias metalopeptidases podem fornecer informações importantes acerca de estruturas moleculares potencialmente capazes de inibir sua atividade tóxica. Além do peptídeo sintético (PKMCGV-NH₂) que inibiu a atividade da adamalisina II (Grams *et al.* 1993), a administração local de um peptídeo inibidor de metalopeptidase de matriz inibiu completamente a hemorragia e dermonecrose local gerada pelo veneno de *Bothrops asper* (Rucavado *et al.* 2000), desde que injetado nos

primeiros minutos após a inoculação de veneno. Desta forma, parece razoável imaginar que o uso de pró-domínios recombinantes de SVMP para a eventual modulação *in situ* da atividade hemorrágica das SVMP poderia representar um tratamento toxino-específico viável a ser explorado em conjunto com a soroterapia convencional.

1.5 Venômica: conhecendo a diversidade proteica dos venenos de serpente através de tecnologias proteômicas

Com a sistematização das análises venômicas e antivenômicas (Calvete *et al.* 2007), houve uma melhor caracterização da composição dos venenos de serpentes (Calvete 2011; 2013), assim como a identificação de epítomos conservados entre toxinas de uma mesma classe (Calvete *et al.* 2009; Gutierrez *et al.* 2009). Sendo assim, foi possível determinar que um antissoro é capaz de neutralizar efeitos de venenos de outras espécies, além das que compõem o *pool* de imunização. Logo, a importância de análises venômicas e antivenômicas foi rapidamente incorporada no racional de desenvolvimento de antissoros, indicando a possibilidade da geração de um soro pan-específico combinando diferentes famílias proteicas para a produção do *pool* de imunização (Calvete *et al.* 2011; Gutierrez *et al.* 2011; Pla *et al.* 2012).

Os primeiros estudos de caracterização de venenos de serpentes utilizaram técnicas bioquímicas clássicas, como eletroforeses uni- e bidimensionais, cromatografias (usando diferentes propriedades físico-químicas, como hidrofobicidade e volume molecular), análise de ácidos aminados e sequenciamento pela química de Edman. Através destes estudos bioquímicos, foi possível determinar que cerca de 90% do peso seco dos venenos de serpentes é composto por proteínas e peptídeos (Chippaux e Goyffon 1991; Markland 1998). Além disso, análises estruturais, por cristalografia de raios-X e ressonância magnética nuclear, aliadas a diversos ensaios biológicos, forneceram conhecimento acerca da relação estrutura-função das toxinas presentes nos venenos de serpentes, permitindo associar os sintomas do envenenamento ofídico a determinadas proteínas e peptídeos (Fox e Serrano 2008). Por outro lado, algumas questões relacionadas à composição geral dos venenos (*e.g.*, variabilidades inter e intra-espécies e sinergia entre diferentes classes de toxinas), permaneceram pouco exploradas. Com o advento da proteômica no final dos anos 90, algumas dessas questões começaram a serem respondidas.

O termo proteoma foi criado em 1994 por Marc Wilkins, que o definiu como o conjunto de todas as proteínas expressas (incluindo suas isoformas) por um organismo ou célula específica, em um determinado momento, sob determinada condição (Wilkins *et al.* 1996).

Por bastante tempo, a eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2D-PAGE) acoplada à espectrometria de massas foi a abordagem mais utilizada na caracterização proteômica de qualquer amostra biológica (Oliveira *et al.* 2014). Na Toxinologia, o uso da tecnologia proteômica para analisar venenos de serpentes se disseminou rapidamente e diversos estudos começaram a ser realizados, tendo como motivação principal o desenvolvimento e/ou aprimoramento dos soros antiofídicos.

O termo venômica foi atribuído originalmente à estratégia de caracterização proteômica dos venenos de serpentes criada pelo grupo do Dr. Juan Calvete (Calvete *et al.* 2007; Juárez *et al.* 2004). Posteriormente, passou a designar qualquer análise proteômica de venenos de serpentes, independente da abordagem analítica utilizada (Calvete *et al.* 2007). A metodologia clássica de Calvete e cols. consistia na cromatografia de fase reversa (RP-HPLC) e o sequenciamento N-terminal pela química de Edman, combinados com eletroforese unidimensional e análise por espectrometria de massas através de PMF (*Peptide mass fingerprint*) das proteínas não identificadas pelo sequenciamento N-terminal. Essa abordagem não é muito eficiente para identificação de proteínas pouco abundantes ou para quantificação de classes proteicas nos venenos de serpentes, pois cada pico eluído na C18 pode representar uma mistura de famílias de proteínas. Entretanto, é bastante útil para caracterização das variabilidades quali-quantitativas inter- e intraespécies e para determinação de padrões proteicos e imunológicos mais amplos, que podem auxiliar em estudos de ecologia e evolução das serpentes e no aprimoramento da terapia antiofídica.

Desde a publicação do primeiro trabalho em venômica de serpentes (Fox *et al.* 2002), os venenos têm sido caracterizados utilizando estratégias denominadas *bottom up*. Esse tipo de abordagem consiste na caracterização das proteínas através da análise de seus peptídeos gerados enzimaticamente (Zhang *et al.* 2013). Em geral, três tipos de abordagens *bottom up* são frequentemente utilizadas em venômica de serpentes: i) as que utilizam 2D-PAGE como método de fracionamento das proteínas previamente à sua tripsinização e identificação por espectrometria de massas (Birrell *et al.* 2006; Birrell *et al.* 2007; Earl *et al.* 2006; Guercio *et al.* 2006; Juárez *et al.* 2004; Jurado *et al.* 2007; Pierre *et al.* 2007; Risch *et al.* 2009; Serrano *et al.* 2005; Viala *et al.* 2015); ii) as que submetem o veneno bruto à digestão trípica em solução, seguida da análise dos peptídeos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (abordagem do tipo *shotgun*) (Chapeaurouge *et al.* 2015; Chatrath *et al.* 2011; Fox *et al.* 2006; OmPraba *et al.* 2010; Ziganshin *et al.* 2015); iii) a estratégia “venômica” original de Calvete e cols. (Calvete *et al.* 2007; Fernandez Culma *et al.* 2014; Juárez *et al.* 2004;

Laustsen *et al.* 2015; Lomonte *et al.* 2014; Lomonte *et al.* 2014; Saviola *et al.* 2015) (para referências mais antigas, ver revisões (Calvete 2013; Fox e Serrano 2008; Valente *et al.* 2014). Até o início de 2014, venenos de 184 espécies de serpentes haviam sido caracterizados, 79 dos quais utilizando esta última estratégia (Valente *et al.* 2014). Posteriormente, e até a escrita desta tese, já foram caracterizados os venomas de mais 19 espécies de serpentes (Ali *et al.* 2015; Fernandez Culma *et al.* 2014; Fernandez *et al.* 2015; Gay *et al.* 2015; Gocmen *et al.* 2015; Jimenez-Charris *et al.* 2015; Laustsen *et al.* 2015; Lomonte *et al.* 2014; Reeks *et al.* 2016; Tan *et al.* 2015) (Malih *et al.* 2014; Rusmili *et al.* 2014; Salazar-Valenzuela *et al.* 2014; Tan *et al.* 2015), sendo 7 utilizando a estratégia “venômica” (Juárez *et al.* 2004) (Calvete *et al.* 2007).

Para aprofundar a caracterização proteômica de diversos venenos, alguns investigadores utilizaram abordagens complementares. Por exemplo, em 2004, Li e colaboradores compararam os proteomas de *Naja naja atra* e de *Agkistrodon halys*, utilizando: (i) tripsinização em solução seguida de análise por LC-MS/MS; (ii) SDS-PAGE seguido de tripsinização *in gel* das proteínas e análise por LC-MS/MS; (iii) cromatografia de exclusão molecular e análise das frações abaixo de 10 kDa por LC-MS/MS; (iv) fracionamento de cadeias polipeptídicas maiores que 10 kDa por 2D-PAGE, seguido de digestão *in gel* e análise por MALDI-TOF MS (Li *et al.* 2004). Já o proteoma do veneno de *Naja kaouthia* foi analisado através da combinação de fracionamento por 2D-PAGE e identificação por LC-MS/MS, além da digestão em solução do veneno bruto, seguida de análise por cromatografia bidimensional (cromatografias de troca catiônica forte e fase reversa) e espectrometria de massas (2D-LC-MS/MS) (Kulkeaw *et al.* 2007). Estratégias múltiplas também foram utilizadas na caracterização do proteoma do veneno de *Bothrops insularis*, a saber: (i) 2D-PAGE, tripsinização e identificação por MALDI-TOF/MS e LC-ESI MS; (ii) digestão em solução do veneno bruto e identificação por LC-MS e MALDI-TOF/TOF MS/MS, seguida de sequenciamento *de novo*; (iii) tripsinização da fração do veneno menor que 10 kDa e identificação por LC-MS/MS (Valente *et al.* 2009). Em 2011, Zelanis e colaboradores (Zelanis *et al.* 2011) utilizaram uma abordagem baseada em quantificação com marcação isotópica (iTRAQ) para avaliar mudanças quantitativas nas toxinas dos venenos de *Bothrops jararaca* durante a transição de neonatas à adultas e mostraram uma mudança em um perfil rico em SVMP-PIII para SVMP-PI. Por fim, Ali e colaboradores (Ali *et al.* 2013) caracterizaram o proteoma do veneno de *Bungarus sindanus* e *Naja naja* utilizando três diferentes métodos prévios à identificação por LC-MS/MS: (i) 1D-PAGE e tripsinização no

gel das bandas reveladas; (ii) 2D-PAGE e tripsinização no gel dos *spots*; (iii) digestão em solução do veneno bruto.

Uma visão panorâmica dos trabalhos em venômica, antivenômica e transcriptômica de serpentes foi publicada em 2013, enfatizando as contribuições para a determinação de perfis ecológicos e imunológicos que eventualmente pudessem se traduzir em melhorias na terapia antiofídica tradicional (Calvete 2013). Mais recentemente, uma revisão metodológica detalhada de todos os trabalhos de caracterização de proteomas e peptidomas de venenos de serpentes também foi publicada (Valente *et al.* 2014). Apesar da grande variedade de abordagens proteômicas utilizadas em venômica, em geral, os grupos proteicos identificados são os mesmos, reconhecidamente os mais abundantes: metalopeptidases, serinopeptidases, L-aminoácido oxidases, fosfolipases A₂, neurotoxinas, desintegrinas, lectinas tipo-C e tipo-C similares, peptídeos potenciadores de bradicinina, miotoxinas, proteínas secretórias ricas em cisteína, fatores de crescimento de nervo e de endotélio vascular, cistatinas e inibidores de proteases do tipo Kunitz. Limitações do poder de resolução dos métodos de pré-fracionamento, além da baixa sensibilidade de detecção de alguns espectrômetros de massas e da dificuldade de interpretação (pelas ferramentas bioinformáticas) do grande volume de dados gerados, e a escassez de informações sobre genomas de serpentes (apenas um completamente sequenciado) (Vonk *et al.* 2013), podem ser fatores determinantes na identificação recorrente das classes proteicas mais abundantes (Zelanis *et al.* 2010).

Buscando a caracterização mais aprofundada da complexidade dos venenos em termos de diversidade em proteínas e peptídeos, nosso grupo implementou uma abordagem que permitiu o estudo simultâneo do proteoma e do peptidoma (proteo-peptidoma) do veneno de *Bothrops jararaca* (Nicolau 2012). A amostra do veneno foi pré-fracionada por focalização isoeletrica *OFFGEL*, seguida da identificação dos peptídeos (naturais da amostra e gerados por tripsinização) por espectrometria de massas de alta resolução. Através desta abordagem proteo-peptidômica, foram identificadas 38 classes de proteínas, incluindo classes menos abundantes, como ecto-5'-nucleotidases, fosfodiesterases, hialuronidases, aminopeptidases A, transferrinas e glutatona peroxidases, até então raramente identificadas por análises venômicas.

Nos últimos três anos, com os avanços em instrumentação e ferramentas bioinformáticas e com a publicação dos primeiros rascunhos de genomas de serpentes (Castoe *et al.* 2013; Castoe *et al.* 2011; Vonk *et al.* 2013), alguns grupos de proteínas menos abundantes (*e.g.*, hialuronidases, fosfolipases B, fosfodiesterases, ecto-5'-nucleotidases e aminopeptidases) em

venenos de serpentes passaram a ser identificados com muito mais frequência em análises venômicas.

Outra estratégia venômica bastante promissora foi empregada para analisar o veneno de *Crotalus adamanteus* (Margres *et al.* 2013), utilizando combinação de diferentes abordagens: (i) digestão tríplica do veneno bruto e análise por LC/MS^E; (ii) cromatografia por exclusão molecular, digestão tríplica em solução e análise por LC-MS/MS; (iii) cromatografia de fase reversa, digestão tríplica em solução, análise por LC-MS/MS e sequenciamento pela química de Edman. A identificação das proteínas e peptídeos foi realizada através da análise dos espectros MS/MS contra um banco de dados criado através da tradução *in silico* do transcriptoma da glândula deste mesmo veneno. Essa combinação de estratégias proteômicas e identificação utilizando um banco de dados de transcriptoma permitiu a identificação de alguns grupos de proteínas menos abundantes, tais como hialuronidases, fosfodiesterases e fosfolipases B.

Na chamada “estratégia proteotranscriptômica”, dados proteômicos obtidos através da abordagem venômica tradicional são utilizados para checar a qualidade de dados transcriptômicos (Calvete 2014). Ela foi empregada na análise da variabilidade da composição dos venenos de *Bothrops jararaca* provenientes das regiões Sul e Sudeste (Goncalves-Machado *et al.* 2015). Além da identificação de proteínas menos abundantes, os autores puderam definir assinaturas moleculares geográficas, tanto do proteoma quanto do transcriptoma das populações analisadas. Estas “assinaturas populacionais” sugerem que o ancestral de *B. insularis* originou-se da população de *B. jararaca* do Sudeste, enquanto que a população de *B. jararaca* do Sul pode, evolutivamente, ter compartilhado alguns genes de toxinas conservados em *B. jararacussu*.

Diversos outros trabalhos já aliaram análises proteômicas e transcriptômicas para estudar a composição e a variabilidade de venenos de serpentes (Wagstaff, 2009; Valente, 2009; Ombrapa, 2010; Chatrath, 2011; Rodrigues, 2012; Aird, 2013; Paiva, 2014). Através destas análises, foi possível a descoberta das famílias das veficolinas no veneno de *Cerberus rynchops* (Ombrapa, 2010) e fosfolipases B e 3FTXs (*three finger toxins*) no veneno de *Drysdalia coronoides* (Chatrath, 2011). Dados proteômicos e transcriptômicos são complementares e, juntos, podem fornecer informações importantes sobre a evolução das serpentes e a influência de fatores pós-transcricionais, como clivagem de RNAm e *splicing* alternativo, e pós-traducionais, como glicosilações e fosforilações, na composição dos venenos. Rokyta e colaboradores (Rokyta, 2015) recentemente analisaram a influência de

fatores pós-transcricionais na variabilidade entre venenos de serpentes utilizando análises proteômicas e transcritômicas de dez espécies pertencentes às famílias Viperidae, Elapidae e Colubridae. Através da análise da correlação entre a abundância de transcritos e a abundância de toxinas ortólogas, eles concluíram que é mínima a influência de fatores pós-transcricionais na variabilidade de venenos de serpentes. Dessa forma, essa variabilidade provavelmente está mais relacionada a eventos de duplicação gênica, neofuncionalização e modificações pós-traducionais. Além disso, a variabilidade na composição proteica de venenos de serpentes é bastante influenciada por fatores como filogenia (Tu 1977; Tu 1991), distribuição geográfica (Alape-Giron *et al.* 2008; Gibbs *et al.* 2009; Menezes *et al.* 2006), idade (Guercio *et al.* 2006; Saldarriaga *et al.* 2003), sexo (Menezes *et al.* 2006) e dieta (Barlow *et al.* 2009; Daltry *et al.* 1996; Gibbs *et al.* 2009).

Recentemente, utilizando a abordagem CPLL (*combinatorial hexapeptide ligand library*), foi reportada uma grande diversidade molecular no proteoma do veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Foram identificados 28 grupos de proteínas, incluindo CRISP, fosfolipase B e VEGF, reportadas nesse veneno pela primeira vez (Melani *et al.* 2015). A abordagem CPLL consiste na equalização entre proteínas mais abundantes e menos abundantes do veneno através de adsorção do veneno em uma matriz sólida, composta por *beads* conjugadas com hexapeptídeos gerados por química combinatória. Consequente, ocorre uma diminuição do intervalo dinâmico da amostra e enriquecimento das proteínas menos abundantes no sobrenadante (Boschetti e Giorgio Righetti 2008); (Guerrier *et al.* 2006). Após a etapa de enriquecimento, as proteínas ligadas e não ligadas à matriz sólida foram submetidas à tripsinização, seguido de focalização isoeletrica *in gel*, extração dos peptídeos tripsínicos e análise por LC-MS/MS. Para a identificação das proteínas e peptídeos, foram utilizadas estratégias de PSM (*Peptide-Spectrum Match*), quantificação espectral e sequenciamento *de novo*.

Com o avanço das tecnologias analíticas e das ferramentas de bioinformática, a abordagem *top-down* tende a se mostrar cada vez mais atraente e acessível para análises venômicas. Essa abordagem consiste em analisar proteínas intactas diretamente por cromatografia de fase reversa acoplada à espectrometria de massas, facilitando bastante a identificação de modificações pós-traducionais e proteoformas (Ahlf *et al.* 2013). O termo “proteoforma” é utilizado para designar todas as formas moleculares na qual o produto de um único gene pode ser encontrado, incluindo variações genéticas, *splicing* alternativo de RNA e modificações pós-traducionais (Smith e Kelleher 2013). Recentemente, os venenos de *Ophiophagus hannah*

e *Vipera anatolica* foram analisados por uma combinação de estratégias *bottom-up* e *top-down* (Gocmen *et al.* 2015; Petras *et al.* 2015). Em conjunto, essas abordagens permitem uma caracterização extensiva da grande diversidade de proteoformas presentes nos venenos de serpentes.

Embora muitos avanços tenham sido realizados em relação aos proteomas de venenos de serpentes, seus peptidomas ainda são muito pouco explorados. Desde a descoberta dos peptídeos potenciadores de bradicinina (BPP) na década de 70 (Ferreira *et al.* 1970), quase todos os estudos de caracterização de peptidoma de venenos de serpentes identificaram exclusivamente BPPs (Favreau *et al.* 2006; Ianzer *et al.* 2004; Li *et al.* 2004; Menin *et al.* 2008; Munawar *et al.* 2011; Olamendi-Portugal *et al.* 2008; Pimenta *et al.* 2007; Quinton *et al.* 2005; Valente *et al.* 2009; Wermelinger *et al.* 2005; Zelanis *et al.* 2010). A exceção foi um trabalho extenso de caracterização dos peptidomas de três serpentes do gênero *Bothrops*, que permitiu a identificação de peptídeos pertencentes às classes metalopeptidase, serinopeptidase e L-aminoácido oxidase, além da presença majoritária de BPP (Tashima *et al.* 2012). Neste trabalho, os autores sugeriram que os processos de liofilização/ressolubilização aumentam a complexidade do peptidoma dos venenos de serpentes devido ao desequilíbrio causado à “proteostase” do veneno e, conseqüentemente, a atividade de peptidases endógenas sobre outros componentes. Dessa forma o peptidoma representaria um degradoma. Recentemente, foi reportada a presença de pouco mais de 120 peptídeos de diferentes classes proteicas (*e.g.*, L-aminoácido oxidase, fosfolipase A₂ e 3FTX) nos peptidomas dos venenos de duas espécies (*Bungarus multicinctus* e *Bungarus fasciatus*) da família Elapidae (Ziganshin *et al.* 2015).

A falta de informação sobre o peptidoma de venenos de serpentes provavelmente se deve à dificuldade das ferramentas bioinformáticas em interpretar os dados oriundos de análises peptidômicas, que normalmente geram espectros de massas bastante complexos e pouco informativos. Alguns fatores contribuem para essa complexidade dos dados: (i) ausência de parâmetros que auxiliem as ferramentas de busca, como a especificidade da enzima de clivagem (ii) presença de peptídeos grandes, eventualmente impactando negativamente a eficiência de fragmentação; (iii) necessidade do sequenciamento *de novo* (manual ou automático) para identificação de muitos dos peptídeos. Entretanto, utilizando a abordagem proteopeptidômica previamente descrita (Nicolau 2012), nosso grupo identificou peptídeos oriundos de 19 classes proteicas diferentes no peptidoma de *Bothrops jararaca*. Esta grande diversidade, pela primeira vez reportada em peptidomas de venenos de serpentes, mesmo na presença de inibidores de proteases, gerou a hipótese de que estes peptídeos poderiam exercer

alguma função biológica. Ou seja, mais do que um mero “degradoma”, o peptidoma poderia representar também um “criptoma”.

Um criptoma é definido como um conjunto de peptídeos (criptídeos) originados por processos proteolíticos e que apresentam função similar ou completamente diferente de suas moléculas precursoras (Autelitano *et al.* 2006). Os peptídeos potenciadores de bradicinina (BPP) são um exemplo clássico de criptídeos de venenos de serpentes (Pimenta e Lebrun 2007). Os BPP são oriundos da clivagem de uma molécula precursora maior, composta por sete sequências de BPP, um peptídeo rico em histidina e glicina (pHpG) e um peptídeo natriurético tipo-C na região C-terminal que, após clivagem, apresentam atividade vasodilatadora (Murayama *et al.* 1997). Sendo assim, o peptidoma dos venenos de serpentes pode encerrar atividades biológicas desconhecidas, hipótese que, sem dúvida, merece ser explorada de maneira sistemática.

Análises venômicas, em geral, têm fornecido informações importantes acerca de sua composição proteica e de diversidade quali-quantitativa. Estas análises podem contribuir para: (i) estudos sobre a evolução das serpentes e das toxinas presentes em seus venenos; (ii) estudos sobre a ecologia das serpentes; (iii) um maior conhecimento acerca da fisiopatologia do envenenamento ofídico; (iv) o aprimoramento da escolha dos venenos do *pool* de imunização utilizado na produção do soro antiofídico; (v) a descoberta de moléculas com potencial uso terapêutico.

1.6 Venenos de serpentes: efeito patológico x fonte de novos fármacos

Os venenos de serpentes são compostos por uma mistura complexa de biomoléculas que têm por funções primárias imobilizar, matar e digerir suas presas. Em vítimas humanas, consideradas “presas acidentais”, acarretam patologias graves que podem comprometer principalmente os sistemas hemostático e nervoso (Chippaux *et al.* 1991).

As patologias decorrentes do envenenamento ofídico estão diretamente associadas à presença e à quantidade relativa de determinadas classes proteicas nos venenos. O envenenamento causado por serpentes da família Viperidae, por exemplo, apresenta um quadro hemorrágico característico como consequência da grande quantidade de metalopeptidases presentes em seus venenos (Fox e Serrano 2009; Moura-da-Silva *et al.* 2008). Em contrapartida, serpentes da família Elapidae apresentam em sua composição uma maior quantidade de neurotoxinas, sendo os distúrbios neurológicos os sintomas majoritários do envenenamento (Kini 2002). De modo interessante, existe também uma variabilidade de alvos moleculares de toxinas

pertencentes a uma mesma classe. Já foi reportado na literatura que as metalopeptidases, além de seus efeitos hemorrágicos, também inibem a agregação plaquetária e apresentam atividades pró-apoptótica e fibrinolítica (Fox e Serrano 2005). Outro exemplo conhecido de toxina multifuncional são as 3FTX que, apesar de estruturalmente semelhantes, podem exercer funções bastante distintas, atuando como neurotoxinas, cardiotoxinas, inibidores de canais iônicos, inibidores de agregação plaquetária, entre outras (Kini e Doley 2010). Essa variabilidade funcional entre proteínas pertencentes a uma mesma classe é resultado de fatores como duplicação e neofuncionalização gênica, mutações pontuais não sinônimas, modificações pós-traducionais e processamentos proteolíticos diversos, entre outros (Calvete *et al.* 2007; Fox e Serrano 2008; Nakashima *et al.* 1995; Serrano *et al.* 2005; Zelanis *et al.* 2010). Estes fenômenos tornam os venenos de serpentes amostras biológicas bastante complexas, dificultando a determinação da contribuição individual de cada classe proteica para a fisiopatologia do envenenamento.

Por outro lado, devido à alta seletividade/afinidade das toxinas por seus alvos moleculares, assim como a variabilidade de alvos moleculares existentes, toxinas de venenos de serpentes são modelos potenciais para o desenvolvimento de fármacos. Em geral, as toxinas de venenos de serpentes podem atuar nos sistemas neuromuscular (receptores colinérgicos e muscarínicos) e cardiovascular (inibidores da enzima conversora de angiotensina, desintegrina, peptídeos natriuréticos e proteínas pro- e anticoagulantes) (King 2011). De fato, diversos medicamentos já foram desenvolvidos com base em toxinas de venenos de serpentes. O exemplo mais conhecido é o anti-hipertensivo Captopril (Cushman *et al.* 1977), desenvolvido a partir de um peptídeo potenciador de bradicinina (BPP) presente no veneno de *Bothrops jararaca*.

Além de anti-hipertensivos, existem medicamentos aprovados e comercialmente disponíveis para o tratamento de síndromes coronarianas agudas, desenvolvidos a partir de inibidores do receptor de integrina $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ presentes nos venenos de *Echis carinatus* (Aggrastat) e *Sistrurus mliarius barbour* (Integrilin) (O'Shea e Tchong 2002), e desordens trombóticas, como derrame e embolia pulmonar (Defibrase), desenvolvidos a partir de uma serinopeptidase presente no veneno de *Bothrops atrox* (Fox e Serrano 2007; Harvey 2014; King 2011; Koh *et al.* 2006; Lei *et al.* 2011; McCleary e Kini 2012). Destaca-se, também, o desenvolvimento de diversos testes diagnóstico para desordens relacionadas à coagulação sanguínea, tais como a determinação dos níveis das proteínas C e S (Protac) (Stocker *et al.* 1988), de protrombina

(Ecarin) (Weinger *et al.* 1980) e de inibidores de trombina (Reptilase) (Funk *et al.* 1971; Sharp *et al.* 1968).

Além dos medicamentos e testes diagnósticos comercialmente disponíveis, diversos fármacos estão atualmente em fase clínica de testes (Harvey 2014; King 2011): *Alfimeprase*, um recombinante análogo de uma metalopeptidase do grupo PI do veneno de *Agkistrodon contortrix* desenvolvido para tratamento de doenças arteriais oclusivas; *Ancrod (Viprinex)*, desenvolvido a partir de uma serinopeptidase do veneno de *Agkistrodon rhodostom* para tratamento de derrame isquêmico e agudo; *Cenderitide (CD-NP)*, desenvolvido a partir de um peptídeo natriurético tipo-C de *Dendroaspis angusticeps* para tratamento de insuficiência cardíaca e renal; *RPI-MN*, desenvolvido a partir de modificações em uma neurotoxina (α -*cobratoxin*) do veneno de *Naja sp.* para tratamento de HIV (Fenard *et al.* 1999); *RPI-78M*, também desenvolvido a partir de α -*cobratoxin* para tratamento de esclerose múltipla (Dhanak *et al.* 2010; Reid 2007); *Agkisacutacin*, desenvolvido a partir de uma lectina tipo-C do veneno de *Deinagkistrodon acutus* para tratamento de hemorragia pós-operatória.

Além das atividades anticoagulante, pró-coagulante, antiplaquetária e vasodilatadora, que geralmente são utilizadas no desenvolvimento de fármacos, existem atividades ainda pouco exploradas em venenos de serpentes. Já foi reportada a propriedade analgésica em venenos de serpentes. O veneno de *Naja kaouthia* é usado desde 1930 em medicina alternativa para tratar a dor em pacientes com câncer e era considerado mais potente que a morfina (Vonk *et al.* 2011). A atividade analgésica também já foi descrita nos venenos de *Ophiophagus hannah* (Pu *et al.* 1995), *Crotalus durissus terrificus* (Giorgi *et al.* 1993), *Dendroaspis polylepis polylepis* (Diochot *et al.* 2012). O peptídeo analgésico (crotalfina) do veneno de *Crotalus durissus terrificus* está em fase pré-clínica no Brasil (Cury *et al.* 2005). Aparentemente, a atividade analgésica pode ser induzida por diferentes vias, como receptores opióides e canais iônicos sensíveis a ácido (Harvey 2014).

A atividade antiparasitária contra *Trypanosoma sp.*, *Leishmania sp.* e *Plasmodium sp.* já foi reportada em venenos de diferentes espécies e em seus componentes isolados (Castillo *et al.* 2012; Ciscotto *et al.* 2009; Deolindo *et al.* 2005; Franca *et al.* 2007; Guillaume *et al.* 2004; Izidoro *et al.* 2006; Passero *et al.* 2008; Quintana *et al.* 2012; Tempone *et al.* 2001; Zieler *et al.* 2001). Também já é conhecida a atividade antibacteriana de alguns venenos sobre diversas bactérias Gram-positivas e -negativas (Ciscotto *et al.* 2009; Paramo *et al.* 1998; Santamaria *et al.* 2005; Stabeli *et al.* 2004). Além destas atividades, também existem estudos explorando o

potencial antitumoral dos venenos de serpentes (Jain e Kumar 2012; Minea *et al.* 2005; Minea *et al.* 2010; Vyas *et al.* 2013). Acredita-se que a atividade antitumoral dos venenos esteja parcialmente relacionada à atividade de sua enzima L-aminoácido oxidase (Costa *et al.* 2014; Guo *et al.* 2015; Zhang *et al.* 2003). O peróxido de hidrogênio liberado por ela poderia induzir estresse oxidativo e, conseqüentemente, iniciar o processo de apoptose em células tumorais (Suhr e Kim 1996). Embora o mecanismo pelo qual a L-aminoácido oxidase induz apoptose em células tumorais não seja conhecido, acredita-se que elas sejam capazes de se ligar preferencialmente à superfície de células tumorais. Desta forma, o acúmulo de peróxido de hidrogênio liberado pela sua ação ativaria as vias de apoptose (Ande *et al.* 2006).

Com os avanços no conhecimento acerca da composição e função dos venenos de serpentes, incluindo a descoberta de novas moléculas e a elucidação dos mecanismos de ação das toxinas, é possível que novas atividades biológicas com potencial terapêutico sejam descobertas nos venenos, o que pode contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos contra doenças não relacionadas com a fisiopatologia do envenenamento.

1.7 *Connectivity Map*: triagem por atividades biológicas desconhecidas em venenos de serpentes

Em geral, os venenos de serpentes e seus componentes são testados de maneira dirigida quanto a um grupo de atividades biológicas pré-estabelecidas, tais como capacidade de induzir hipotensão, hemorragia, edema, neurotoxicidade ou miotoxicidade (Fox 2010). Conseqüentemente, outras atividades biológicas eventualmente presentes nos venenos de serpentes permanecem desconhecidas.

Uma alternativa promissora para a identificação de novas atividades biológicas em venenos de serpentes é a utilização da plataforma do *Connectivity Map* (C-Map). O C-Map realiza uma varredura "às cegas" por atividade(s) biológica(s), permitindo o estabelecimento de conexões funcionais entre doenças, perturbações genéticas e ação de drogas. Essa metodologia se utiliza de um grande banco de dados contendo padrões de expressão gênica induzidos pelo tratamento de uma determinada linhagem celular com diversas drogas/ biomoléculas bem caracterizadas (estrutural- e funcionalmente) (Lamb 2007; Lamb *et al.* 2006). Em um experimento de C-Map, uma cultura da mesma linhagem celular usada para construir a biblioteca é tratada com uma amostra desconhecida (*e.g.*, sintética, isolada de amostras biológicas ou uma mistura complexa). Em seguida, o RNA mensageiro das células em cultura é extraído para análise de expressão através de microarranjo e as alterações quali-

quantitativas, observadas no transcriptoma das culturas tratadas versus as não tratadas, são comparadas com os perfis de expressão que compõem o banco de dados. Como estes foram gerados por drogas com atividades biológicas definidas, pode-se inferir, indiretamente, a presença de atividades similares na amostra de interesse.

Recentemente, o grupo do Dr. Jay Fox avaliou a eficácia do C-Map no campo da Toxinologia (Aramadhaka *et al.* 2013). Uma linhagem celular de câncer de mama (MCF7), a mais utilizada na criação da biblioteca do C-Map, foi tratada com o veneno do lagarto *Heloderma suspectum* e com a droga antidiabetes *Byetta* desenvolvida a partir de um peptídeo isolado deste mesmo veneno (Furman 2012). Os genes diferencialmente expressos das células tratadas com o veneno ou com *Byetta* apresentaram uma alta correlação positiva com drogas antidiabetes clássicas, como troglitazona e metformina, presentes no banco de dados do C-Map, confirmando a eficácia do método em identificar atividades desconhecidas presentes nas amostras.

Dessa forma, a abordagem do C-Map aplicada aos venenos de serpentes, assim como a suas subfrações ou componentes isolados, pode indiretamente revelar atividades biológicas potenciais que, se confirmadas por ensaios biológicos, podem auxiliar no desenvolvimento de drogas e/ou novas terapias.

Diante do cenário de desafios e oportunidades discutido anteriormente, no presente trabalho empregamos diversas estratégias “ômicas”, principalmente proteômicas, para abordar questões relevantes relacionadas ao aprimoramento da terapia antiofídica tradicional e ao potencial terapêutico dos venenos de serpentes. Do ponto de vista didático, a tese foi dividida em três partes, cada qual procurando abordar uma das temáticas acima apresentadas.

Parte 1: Otimização do *pool* de venenos utilizados como antígenos na produção de soro antiofídico.

Utilizando proteômica *shotgun*, caracterizamos a variabilidade dos venenos de sete espécies do gênero *Bothrops*, incluindo as utilizadas no *pool* de imunização para produção do soro antibotrópico do Instituto Butantan. Os resultados moleculares obtidos foram comparados com a classificação filogenética vigente, baseada em critérios morfológicos e análise de DNA mitocondrial, e com os resultados de reatividade cruzada disponíveis.

Parte 2: Desenvolvimento de eventual tratamento toxino-específico para reduzir os graves efeitos locais do envenenamento

Baseados na hipótese de regulação das metalopeptidases de venenos de serpentes pelo mecanismo de *cysteine-switch*, avaliamos a formação de complexo entre o pró-domínio recombinante de jararagina (PD-Jar) e diferentes metalopeptidases de serpentes. Utilizamos ensaios de formação de complexo, abordagem de *cross-linking* e espectrometria de massas de alta resolução para confirmação e determinação das regiões de interação entre o PD-Jar e diferentes SVMP.

Parte 3: Bioprospecção do peptidoma do veneno de *Bothrops jararaca*

Considerando a eventual presença de um criptoma no peptidoma do veneno de *Bothrops jararaca*, realizamos uma varredura “às cegas” em busca de potenciais atividades biológicas nesta amostra biológica empregando a abordagem de *connectivity map*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar venenos de serpentes, visando contribuir para melhorias na terapia antiofídica atual e para a descoberta de novas atividades biológicas com potencial terapêutico.

2.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar o proteoma dos venenos que compõem o *pool* de imunização para a produção do soro antiofídico produzido pelo Instituto Butantan, além do veneno de outras duas espécies relevantes para a saúde pública no Brasil;
2. Avaliar a correlação entre a composição dos venenos e sua classificação filogenética;
3. Avaliar a formação de complexo entre o pró-domínio recombinante da jararagina e a própria jararagina (SVMP – classe PIIIa) e outras SVMP da classe PI e determinar a região de interação entre eles;
4. Desenvolver e implementar uma abordagem simplificada para caracterização do proteopeptidoma do veneno de *Bothrops jararaca* e para obtenção de quantidades de peptídeos naturais (peptidoma) suficientes para realização de ensaios biológicos;
5. Realizar uma varredura por novas atividades similares a drogas conhecidas no peptidoma de *B. jararaca* através de genômica funcional e da abordagem de *connectivity map*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material biológico

Os venenos liofilizados de *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops alternatus*, *Bothrops neuwiedi*, *Bothrops atrox* e *Bothrops cotiara* foram cedidos pelo Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan. A autorização de acesso ao patrimônio genético para estes venenos foi emitida sob o número 010578/2014-5. O pró-domínio recombinante de jararagina, clonado em vetor de expressão pAE e expresso em *E. coli* cepa BL21 (DE3), foi cedido pelo Dr. José Portes-Júnior, do Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan. As metalopeptidases da classe PI atroxlisina-I e leucurolisina-a foram purificadas e fornecidas pelo Dr. Eladio Oswaldo Flores Sanchez, da Fundação Ezequiel Dias (MG). A metalopeptidase do grupo PI BaP1 foi purificada e cedida pelo Dr. José Maria Gutierrez, Instituto Clodomiro Picado, Costa Rica. Jararagina, uma metalopeptidase da classe PIII, foi purificada do veneno de *B. jararaca* pela Dra. Surza Lucia Gonçalves da Rocha, Laboratório de Toxinologia/IOC-Fiocruz, seguindo a metodologia pré-estabelecida na literatura (Paine *et al.* 1992). As células de câncer de mama do tipo MCF7 (HTB022) obtidas da *American Type Culture Collection* (Manassas, VA, EUA), foram cultivadas pela Dra. Nena Fox na *Tissue Culture Facility, University of Virginia* (EUA).

3.2 Metodologia

A metodologia da tese está resumida no fluxograma da figura 3.1.

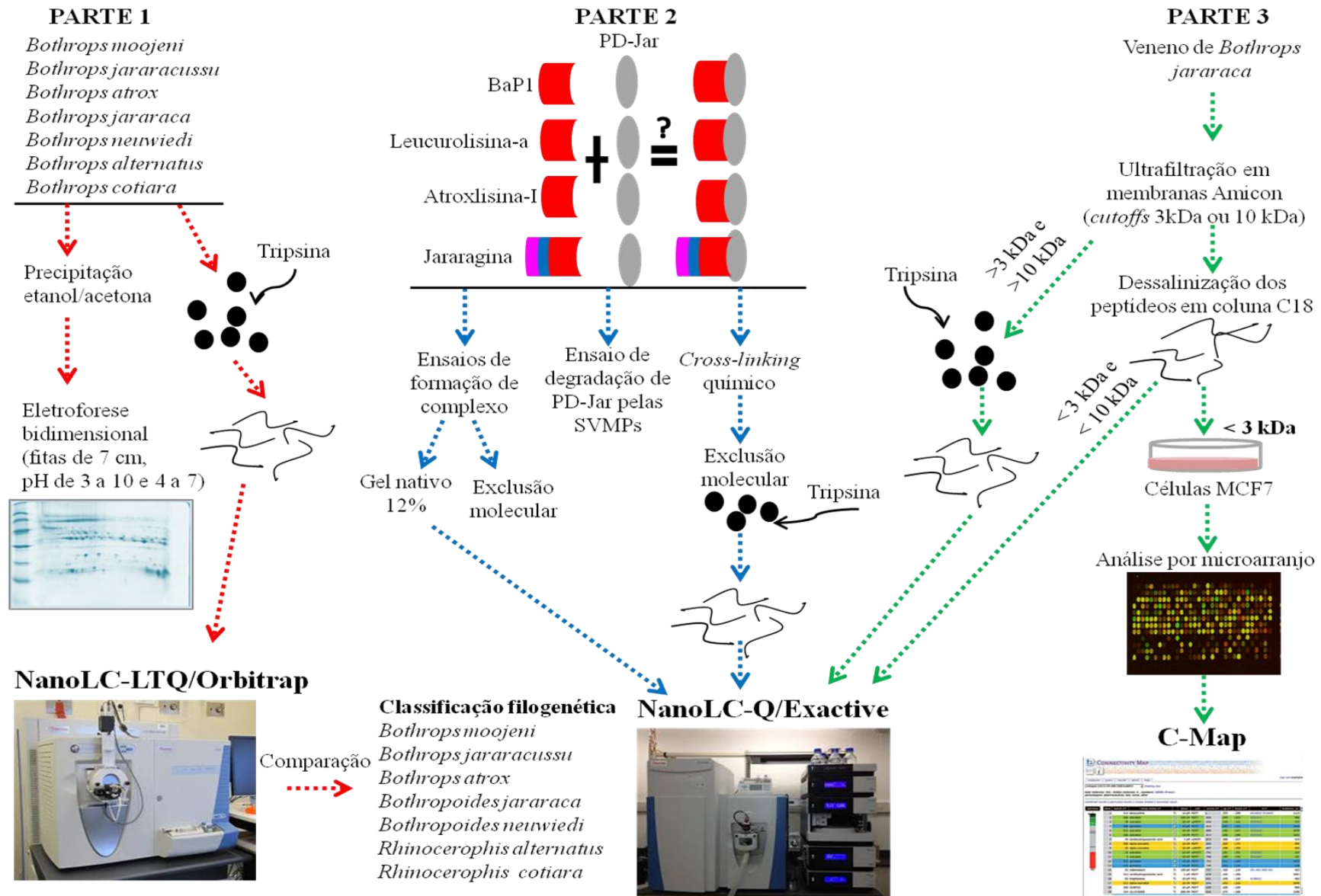


Figura 3.1: Fluxograma resumido das abordagens utilizadas na tese: As setas vermelhas representam a parte 1 da tese, que foi composta por análise proteômica *shotgun* e análise do perfil eletroforético em géis bidimensionais dos venenos de sete espécies do gênero *Bothrops*, seguido de comparação da composição proteica com uma classificação filogenética (Fenwick, 2009). As setas azuis representam a segunda parte da tese, composta pela análise da formação de complexos entre o pró-domínio recombinante de jararagina (PD-Jar) e metalopeptidases das classes PI (BaP1, atroxlisina-I e leucurolisina-a) e PIII (jararagina), seguida da determinação das regiões de interação por *cross-linking* químico e espectrometria de massas de alta resolução. As setas verdes representam a terceira parte da tese, que consiste no desenvolvimento e implementação de uma abordagem simplificada para obtenção do proteoma e do peptidoma (proteo-peptidoma) do veneno de *Bothrops jararaca*, seguido da varredura “às cegas” por novas atividades biológicas no peptidoma deste veneno, através de análises por microarranjo e *connectivity map*.

3.2.1 Venômica de diferentes venenos do gênero *Bothrops* (Parte 1)

3.2.1.1 Preparo de amostra para 2DE

Inicialmente, 1 mg de cada veneno (*Bothrops atrox*, *Bothrops alternatus*, *Bothrops cotiara*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops neuwiedii* e *Bothrops jararaca*) foi dissolvido em 200 μ L de solução de 0,4 M de bicarbonato de amônio com 8 M de ureia e as proteínas foram quantificadas utilizando o sistema Qubit (Invitrogen), seguindo o protocolo do fabricante. Após a dosagem, sessenta microgramas de cada veneno foram precipitados por etanol/acetona, seguindo as etapas: (1) adição de 4 volumes de etanol 100 % para cada volume inicial de amostra e agitação leve no vortex; (2) adição de 4 volumes de acetona 100 % para cada volume inicial de amostra e agitação leve no vortex; (3) incubação por 16 h a -20 °C; (4) centrifugação a 16.000 g por 15 min a 4 °C e remoção do sobrenadante; (5) lavagem do precipitado com solução aquosa contendo 40 % de etanol e 40 % de acetona, com agitação no vortex; (6) centrifugação a 16.000 g por 15 min a 4 °C e remoção do sobrenadante; (7) repetição dos passos 5 e 6 por duas vezes ou mais; (8) secagem do precipitado ao ar livre até o solvente orgânico evaporar totalmente. Todas as soluções foram mantidas no gelo, salvo quando indicado diferentemente.

3.2.1.2 Eletroforese bidimensional (2DE) – visualização do perfil proteico

O precipitado foi solubilizado em 130 μ L de solução de reidratação de amostra [8 M de ureia, 2 % de CHAPS (p/v), 10 mM de Tris base, 100 mM de ditiotreitol, 1 % de anfólitos (v/v) pH 3 a 10 ou 4 a 7 e 0,002 % de azul de bromofenol (v/v)] por 16 h, a 4 °C, com agitação orbital leve. Após a solubilização, as amostras foram centrifugadas a 17.530g, por 10 min, sendo

aplicados 125 μL de amostra por gel de focalização isoeletrica. Foram usadas fitas de gel de 7 cm de comprimento e intervalos de pH de 3 a 10 não-linear e de 4 a 7 linear. O fracionamento na primeira dimensão foi realizado no equipamento IPGphor III, a 20 °C, e limite de corrente de 50 μA por fita. As condições elétricas de corrida utilizadas foram: 30 V por 12 h; 200 V por 1 h; 500 V por 1 h; 1.000 V por 1 h; de 1.000 V a 3.500 V em 30 min; 3500 V por 21.000 Vh (para fitas com intervalo de pH 4-7) ou 18.000 Vh (intervalo de pH 3-10). Após a focalização, as fitas de gel foram submetidas à etapa de equilíbrio com tampão SDS, redução com DTT e alquilação com iodoacetamida, de acordo com a literatura (Görg *et al.* 2004). Posteriormente, cada fita foi posicionada sobre um gel de poliacrilamida 15 %T (Laemmli 1970) e selada com agarose 0,5 % (p/v) em 25 mM de Tris, 192 mM de glicina, 0,1 % de SDS (p/v) aquecida a 80°C. As corridas foram feitas no sistema Mini Protean II (Biorad, EUA), com as seguintes condições elétricas: 2 mA/gel por 30 minutos, seguido de 10 mA/gel pelo tempo que a frente de migração atingisse o final do gel, aumentado em 15%. Os padrões de massa molecular utilizados foram fosforilase b (97 kDa), albumina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor tripsínico de soja (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa)(GE Healthcare, EUA). Os géis foram corados por Coomassie G 250 coloidal (Rabilloud e Charmont 2000).

3.2.1.3 Proteômica *Shotgun*

Foram utilizadas duas replicatas (oriundas de duas pesagens independentes) de cada veneno das sete espécies estudadas. Em cada replicata, um miligrama de veneno bruto foi dissolvido em 200 μL de solução para tripsinização em solução (0,4 M de bicarbonato de amônio contendo 8 M de ureia). As soluções de veneno foram diluídas 10 vezes e 2 μL foram utilizados para quantificação proteica pelo Qubit (Invitrogen, EUA). Posteriormente, volumes da solução original, equivalentes a 50 μg de cada veneno, foram secos por centrifugação à vácuo (*SpeedVac*, Thermo Scientific, EUA), ressuspensos em 20 μL de solução de tripsinização e incubados com 5 μL de 100 mM ditiotreitol em água, por 3 h, a 37 °C. Em seguida, as amostras foram incubadas com 5 μL de 400 mM de iodoacetamida por 15 min à temperatura ambiente, protegidas da luz, e diluídas com 130 μL de água para uma concentração final de 1 M de uréia. Foram adicionados 5 μL de uma solução de tripsina porcina a 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, em 50 mM de ácido acético (V511 - Promega, EUA), seguido de incubação por 22 h a 37 °C e 45 min a 56 °C. As reações foram interrompidas adicionando 20 μL de ácido fórmico a 10 % (v/v) (q.s.p. 1%). Os digestos tripsínicos foram dessalinizados em microcolunas empacotadas no laboratório com resina Poros R2 (Life Technologies, EUA),

sendo eluídos em 70% de acetonitrila com 0,1 % de ácido trifluoroacético e secos no *SpeedVac*. As amostras foram então ressuspensas em 40 μL de ácido fórmico 1 % (v/v), submetidas a 10 min de banho ultrassônico e diluídas 10 vezes em ácido fórmico 1 % (v/v) para análise por espectrometria de massas.

Cada uma das 14 amostras geradas (7 venenos em duplicata técnica) foi analisada em triplicata técnica por nanoLC-MS/MS. Os peptídeos tripsínicos foram submetidos à cromatografia de fase reversa acoplada à espectrometria de massas de alta resolução. Para cada amostra, 4 μL de peptídeos tripsínicos dessalinizados foram inicialmente aplicados em uma pré-coluna de 2 cm de comprimento (100 μm de diâmetro interno) empacotada com matriz Magic C18 AQ, com 200 Å de tamanho de poro e 5 μm de diâmetro de partícula (Michrom Bioresources, EUA). A mesma matriz da pré-coluna foi utilizada no empacotamento de uma coluna cromatográfica analítica (modelo PicoFrit, New Objective, EUA), com as seguintes características: 75 μm de diâmetro interno, 30 cm de comprimento, ponta *laser-pulled* de 15 μm de diâmetro interno. A cromatografia foi realizada no instrumento EASY-nLC II (Thermo Scientific, EUA). As amostras foram injetadas na pré-coluna a um fluxo de 2 $\mu\text{L}/\text{min}$, enquanto que a separação cromatográfica foi realizada a 200 nL/min. A fase móvel A consistiu de 0,1 % (v/v) de ácido fórmico em água e a fase móvel B, de 0,1 % (v/v) de ácido fórmico em acetonitrila. O gradiente realizado foi: 2 a 40 % de B durante 162 min, 40-80% de B em 4 min, 80% de B por 2 min. Os peptídeos eluídos foram diretamente introduzidos no espectrômetro de massas LTQ/Orbitrap XL (Thermo, EUA), acoplado a uma fonte de ionização do tipo *nanoelectrospray*. O spray foi gerado com 1,9 kV, com temperatura do capilar de entrada ajustada para 200 °C e voltagem das lentes do tubo em 100 V. Os espectros de MS1 foram adquiridos no analisador Orbitrap (300 a 1.700 m/z) a uma resolução de 60.000 (para m/z de 445,1200). Para cada espectro, os dez íons mais intensos foram selecionados para fragmentação por CID (sinal mínimo requerido de 10.000; janela de isolamento de 2,5 m/z ; energia de colisão de 35%; ativação de Q de 0,25 e tempo de ativação de 30 ms), seguido de aquisição do MS2 no analisador *trap* linear. A opção de exclusão dinâmica foi habilitada, seguindo os seguintes parâmetros: contagem de repetição = 1; duração da repetição = 30 s; tamanho da lista de exclusão = 500; duração da exclusão = 45 s e largura da massa de exclusão = 10 ppm. A opção de rejeição de estado de carga foi habilitada para cargas não assinaladas ou para aquelas iguais a um.

Após a análise, os espectros de massas foram extraídos utilizando o programa Raw Xtractor (versão 1.9.9.2) (McDonald *et al.* 2004). Todos os espectros MS/MS foram analisados

utilizando o programa ProLuCID (versão 1.3.1) (Xu *et al.* 2006). O ProLuCID foi configurado para realizar uma busca contra um banco de dados construído com a) 43.692 entradas de proteínas contidas no banco de dados do NCBI não redundante de 29 de abril de 2012, que satisfizes os segundos critérios de busca: “*serpentes OR snakes OR snake OR venom OR venoms OR bothrops OR bothriopsis OR bothrocophias OR rhinocerophis OR bothropoides*” e b) as sequências reversas destas 43.692 entradas, para possibilitar a estimativa da taxa de falsas descobertas utilizando a estratégia de *target/reverse decoy* (Elias e Gygi 2007; Elias e Gygi 2010). A busca assumiu a tripsina como enzima de digestão e foi realizada aceitando inicialmente apenas peptídeos semi-tripsínicos, 600 ppm de erro para íons-fragmento, 70 ppm para íons precursores e carbamidometilação de cisteína como modificação fixa. O programa Scaffold 4.0.4. (Proteome Software Inc., EUA) foi utilizado para filtrar as identificações confiáveis de peptídeos e proteínas por MS/MS. A identificação de peptídeos foi aceita se a probabilidade no programa Peptide Prophet (Keller *et al.* 2002) fosse maior que 99%. A identificação de proteínas foi aceita se fosse possível estabelecer uma probabilidade maior que 99% e com identificação de pelo menos 2 peptídeos e apresentando taxa de falsa descoberta (FDR - *false discovery rate*) de peptídeos e proteínas menor ou igual a 1. As probabilidades para proteína foram calculadas pelo programa Protein Prophet (Nesvizhskii *et al.* 2003). Proteínas que apresentaram peptídeos similares e não puderam ser diferenciadas somente a partir da análise dos espectros MS/MS foram agrupadas para satisfazer o princípio da máxima parcimônia (Zhang *et al.* 2007). Proteínas que compartilharam um número significativo de peptídeos foram agrupadas em *clusters*.

3.2.2 Avaliação da formação de complexos entre o pró-domínio recombinante de jarararagina (PD-Jar) e diferentes metalopeptidases (SVMP) (Parte 2)

3.2.2.1 Avaliação da formação de complexo por gel nativo

Inicialmente, o PD-Jar foi incubado com cada metalopeptidase do grupo PI (BaP1, atroxlisina-I e leucurolisina-a) e com a jararagina (metalopeptidase do grupo PIII) na proporção de 1:1 (mol/mol) em tampão contendo 50 mM de Tris com 150 mM de NaCl e 5 mM de MgCl₂ por 15 min a 25 °C. Posteriormente, a reação foi interrompida com tampão de amostra Laemmli (Laemmli 1970) (sem SDS e sem agente redutor) “duas vezes” concentrado e as amostras (2 µg de complexo PD-Jar + SVMP-PI e 3,3 µg de complexo PD-Jar + SVMP-PIII) foram aplicadas em gel nativo utilizando sistema Mini-Protean II (BioRad Laboratories). Os géis de empilhamento e separação foram preparados a 4 %T e 12 %T, respectivamente. As

corridas foram feitas a 200 V constantes por aproximadamente 45 min e os géis foram revelados por impregnação por prata (Rabilloud *et al.* 1994).

3.2.2.2 Identificação das bandas dos géis nativos por espectrometria de massas

As bandas foram excisadas, tripsinizadas (Gharahdaghi *et al.* 1999), dessalinizadas como descrito a seguir e analisadas por nanoLC MS/MS (LTQ/Orbitrap). Em resumo, os peptídeos tripsínicos foram aplicados em microcolunas ZipTip C18, sendo eluídos em 80 µL de 70 % (v/v) de acetonitrila em 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético. As amostras foram secas no *SpeedVac* e ressuspensas em 10 µL de ácido fórmico 1% (v/v). Quatro microlitros de cada amostra foram submetidos à nanocromatografia acoplada à espectrometria de massas, como descrito na seção 3.2.1.3, salvo que a coluna tinha 12 cm de comprimento e o gradiente de eluição foi de 2 - 60 % de B durante 38 min.

Os dados brutos gerados foram analisados pelo programa PEAKS (Ma *et al.* 2003) versão 7.5, aceitando 15 ppm de erro para massa do precursor e 0,6 Da para a massa dos fragmentos. Os dados foram inicialmente analisados considerando os seguintes parâmetros: tripsina como enzima de clivagem, desamidação de asparagina ou glutamina (+0,98 Da), desidratação/perda neutra de água (-18,01 Da), oxidação de histidina, triptofano ou metionina (+15,99 Da), piroglutâmico a partir de glutamina (-17,03 Da) ou de ácido glutâmico (-18,01 Da) como modificações pós-traducionais variáveis, carbamidometilação (+57,02) como modificação fixa e máximo de três modificações pós-traducionais variáveis por peptídeo. Posteriormente, procedeu-se à busca utilizando a ferramenta PEAKS DB, seguindo os mesmos parâmetros estabelecidos na análise *de novo*, porém, aceitando o máximo de três modificações pós-traducionais por peptídeo e máximo de duas clivagens perdidas. Todas as buscas foram realizadas contra um banco de dados contendo: a) sequências no formato FASTA das SVMP maduras (botropasina, jararagina, BaP1, atroxlisina-I e leucurolisina-a) e do PD-Jar; b) banco de dados do proteoma de *Escherichia coli*, obtido do Uniprot *Proteomes* e contendo 4.915 entradas (para evitar a utilização de um banco de dados excessivamente reduzido, possibilitando o cálculo do FDR); c) banco de dados cRAP (*common Repository of Adventitious Proteins*) disponível em <http://www.thegpm.org/crap/>.

Os resultados confiáveis foram filtrados de forma a manter a taxa de falsa descoberta (False Discovery Rate – FDR) abaixo de 1% (tanto para peptídeos quanto para proteínas). Apenas proteínas contendo no mínimo três peptídeos únicos foram reportadas nos resultados.

3.2.2.3 Avaliação da formação de complexo por exclusão molecular

Os experimentos de formação de complexo foram realizados como descrito na seção 3.2.2.1. Partindo de 15 µg de PD-Jar, as reações foram em duas razões estequiométricas: 1:1 e 2:1 (mol/mol) de PD-jar para metalopeptidase. Após a incubação, 100 µL de cada reação e dos controles (PD-jar e metalopeptidases) foram injetados na coluna Superdex 200 HR 10/30 com *loop* de 200 µL e fluxo de 0,5 mL/min. O eluente utilizado foi o mesmo usado para dissolver as amostras (50 mM de Tris com 150 mM de NaCl e 5 mM de MgCl₂, pH 7,0).

3.2.2.4 Cinética de degradação

Para avaliar se as metalopeptidases eram capazes de degradar o pró-domínio, incubamos os complexos e os controles (PD-jar e metalopeptidases) na razão molar de 1:1 por diferentes tempos (0, 5, 15, 30 min, 1h, 3h) a 25°C. Em seguida, as amostras foram misturadas (v/v) com tampão de amostra Laemmli (Laemmli 1970) 2x concentrado, na presença ou na ausência de 20 mM de ditioneitol (em substituição ao β-mercaptoetanol da receita original). As amostras foram então analisadas por SDS-PAGE a 12%T, utilizando-se os seguintes padrões de massa molecular: [fosforilase b (97 kDa), albumina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor tripsínico de soja (20,1 kDa) e α-lactalbumina (14,4 kDa)]. As corridas foram feitas a 200 V constantes por aproximadamente 45 min e os géis foram revelados por impregnação por prata (Rabilloud *et al.* 1994).

3.2.2.5 Determinação das regiões de interação dos complexos através de *cross-linking* e espectrometria de massas

Para mapear as regiões de interação entre PD-Jar e as metalopeptidases (BaP1, atroxlisina-I, leucurolisina-a e jararagina), utilizamos a técnica de ligações cruzadas (*cross-linking*), que estabiliza as interações não covalentes entre as proteínas que formam complexo, seguida de digestão enzimática e análise por espectrometria de massas de alta resolução dos peptídeos ligados. O PD-Jar (20 µg) e as metalopeptidases foram incubados na proporção de 1:1 (mol/mol) em tampão 20 mM de HEPES [ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etanosulfônico], pH 7,5 por 15 min à temperatura ambiente. Posteriormente, os complexos foram tratados com 10 mM do agente de *cross-linking* BS3-d0 (bis[sulfosuccinimida] suberato-d0) por 90 min, à temperatura ambiente. Após a reação de *cross-linking*, as reações foram interrompidas com bicarbonato de amônio para uma concentração final de 20 mM. Para avaliar a eficácia das reações de *cross-linking*, 20 µL da reação dos complexos e seus controles foram analisados em géis de poliacrilamida, tanto em condições desnaturantes e

reduzidas, quanto em condições nativas. Os géis foram corados por impregnação por prata (Rabilloud *et al.* 1994). Os complexos covalentemente estabilizados por *cross-linking* foram purificados por exclusão molecular em coluna Superdex 200 HR 10/30, equilibrada com 20 mM de HEPES (pH 7,5). Coletou-se aproximadamente 1,5 mL de complexo PD-Jar-metalopeptidase purificado, que foi posteriormente seco completamente no *SpeedVac* e ressuspensão em 80 µL de 400 mM de bicarbonato de amônio contendo 8 M de ureia. Subsequentemente, os complexos foram reduzidos com 20 µL de ditioneitol (100 mM) por 3 h a 37 °C e alquilados com 20 µL de iodoacetamida (400 mM) por 15 min, à temperatura ambiente, na ausência de luz. Foram adicionados 30 µL de TFA 5 % (v/v - concentração final de 1%) e os complexos foram dessalinizados em microcolunas empacotadas com 10 µL de resina Poros 20 R1 (capacidade de ligação de 5 µg/µL) (Life Technologies, EUA). Após a eluição com 80 µL de TFA 0,1% em acetonitrila aquosa a 80%, as amostras foram totalmente secas no *SpeedVac* e dissolvidas em 32 µL de 50 mM de bicarbonato de amônio. Para a digestão enzimática, utilizamos uma solução de 0,2 µg/µL de tripsina em ácido acético, na proporção de 1:50 (p/p) de enzima e incubamos a 37 °C por 20 h. A reação enzimática foi interrompida com TFA 10% (v/v) para uma concentração final de 1%. Em seguida, os peptídeos foram dessalinizados em microcolunas preparadas no laboratório de 10 µL de resina Poros 20 R2 (capacidade de ligação de 10µg/µL). Os peptídeos foram eluídos em 60 µL de 0,1 % de TFA em 70 % de acetonitrila aquosa, totalmente secos em *SpeedVac*, ressuspensos em 60 µL de ácido fórmico 1% e submetidos à nanoLC MS/MS. Cada amostra foi analisada em quadruplicata técnica. Para cada replicata técnica, 4 µL de peptídeos dessalinizados foram inicialmente aplicados em uma pré-coluna de 2 cm (100 µm de diâmetro interno) empacotada com matriz Magic C18 AQ com poro de 200 Å e diâmetro da partícula de 5 µm (Michrom Bioresources, EUA). A coluna de separação, gentilmente cedida pelo Dr. Fabricio K. Marchini da FIOCRUZ-PR tinha 75 µm de diâmetro interno e 30 cm de comprimento, tendo sido empacotada em tubulação com ponta (do tipo *laser-pulled*) de cerca de 4 µm de diâmetro interno. Para esta coluna, utilizou-se uma matriz cromatográfica ReproSil-Pur C18 AQ com poros de 120 Å e partículas de 1,9 µm de diâmetro (Dr. Maisch GmbH, Germany). A cromatografia foi realizada no instrumento DIONEX ULTIMATE 3000 RSLCnano (Thermo Scientific, EUA), utilizando as mesmas condições gerais descritas no item 3.2.2.2, salvo que desta vez o gradiente foi de 2-50 % B (ao invés de 2-40 %). Os peptídeos eluídos foram diretamente introduzidos no espectrômetro de massas Q Exactive Plus Orbitrap (Thermo, EUA). A voltagem da fonte foi configurada para 1,9 kV, a temperatura do capilar de entrada foi ajustada para 250 °C e a voltagem das lentes para 60 V. Os espectros de MS1 (300 a 1.800

m/z) foram adquiridos em modo *profile*, com 1 *microscan* e resolução de 70.000 para m/z 200 (FWHM, *full width at half maximum*), controle automático de ganho (AGC) e tempo de injeção limitados a 1×10^6 e 100 ms, respectivamente. Para cada espectro MS1, até seis íons mais intensos foram submetidos à fragmentação por HCD (*higher-energy collision dissociation*), no modo *stepped*, com energias de colisão de 30 % e 40 %. Os precursores foram isolados em janelas de 3,0 m/z , com deslocamento (*offset*) de 0,5 m/z para direita. A faixa de aquisição dos espectros de MS/MS foi de 200 a 2.000 m/z , mas com primeiro valor fixo em 200 m/z ; resolução de 35.000, AGC de 5×10^5 e tempo máximo de injeção de 100 ms. A opção de exclusão dinâmica foi ajustada para 60 s e o modo de rejeição do estado de carga foi habilitado para picos com cargas não assinaladas ou para aqueles com $z = 1$ e $z = 2$. Os dados brutos gerados pelo espectrômetro de massas foram interpretados utilizando o software *Spectrum Identification Machine for Crosslinked Peptides* (SIM-XL, disponível em <http://patternlabforproteomics.org/sim-xl>) (Lima *et al.* 2015), utilizando como banco de dados as sequências em formato FASTA do PD-Jar e das SVMP maduras. Os parâmetros utilizados na análise foram *score* mínimo de 2,5 para *interlinks* e 3 para *intralinks*, seguido de validação manual dos candidatos a *cross-links*. Os espectros de *cross-linking* considerados confiáveis seguiram os seguintes critérios: (i) presença de íons diagnóstico (222,1; 239,2 e 305,2 m/z) nos espectros de *cross-linking*, que são descritos como íons fragmento oriundos de um rearranjo da cadeia lateral de lisina com o braço espaçador do *linker* (BS³) (Iglesias *et al.* 2010; Lima *et al.* 2015); (ii) boa cobertura de sequência dos peptídeos de *cross-linking*; (iii) distribuição de erro dos íons-fragmento entre 5 e 10 ppm; (iv) boa relação de intensidade sinal/ruído. Os resultados considerados confiáveis após a análise no SIM-XL foram submetidos ao programa Xinet (Combe *et al.* 2015) para representação gráfica dos *cross-links*.

3.2.3 Obtenção da amostra do peptidoma de *Bothrops jararaca* para busca por atividades biológicas (Parte 3)

3.2.3.1 Fracionamento OFFGEL + Cromatografia de fase reversa (C4-C18 em sequência)

3.2.3.1.1 Fracionamento por OFFGEL com e sem o uso de anfólitos

O veneno de *Bothrops jararaca* (16 mg) foram dissolvidos em 16 mL de solução OFFGEL [7 M de ureia, 2 M de tioureia, 60 mM de ditiotreitol, 4,8% (v/v) de glicerol e 1 % (v/v) de anfólitos (pH 3-10)]. Em seguida, 3,6 mL foram aplicados em fitas de gel de focalização

isoelétrica de alta resolução (24 poços) e intervalo de pH 3-10 (foram utilizadas 4 fitas, perfazendo um total de 14,4 mg de veneno processados). As amostras foram fracionadas no equipamento *OFFGEL* 3100 (Agilent Technologies), seguindo as recomendações do fabricante. Após o fracionamento, frações equivalentes das 4 fitas foram unidas, gerando 24 amostras (cada uma representando um *pool* de 4 amostras). O procedimento descrito acima foi feito também na ausência de anfólitos na solução *OFFGEL*.

3.2.3.1.2 Avaliação da qualidade do fracionamento por *OFFGEL* utilizando SDS-PAGE

Para avaliar a qualidade do fracionamento por *OFFGEL* (com ou sem anfólitos), 12 μ L de cada uma das 24 frações foram analisados por eletroforese unidimensional no sistema Mini Protean II (Bio-Rad), utilizando gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) em condições redutoras. Os géis de empilhamento e separação foram preparados a 4 %T e 15 %T, respectivamente (Laemmli 1970). Para cada 12 μ L de amostra, foram utilizados 3 μ L de tampão de amostra cinco vezes concentrado. As amostras foram aquecidas a 100 °C por 5 min, resfriadas, centrifugadas a 16.000 g por 5 min e todo seu conteúdo foi aplicado nos géis. Os padrões de massa molecular foram fosforilase b (97 kDa), albumina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor tripsínico de soja (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa) da GE Healthcare. A condição elétrica utilizada na corrida foi de 200 V constantes por aproximadamente 1 h. As bandas foram reveladas por impregnação por prata (Rabilloud *et al.* 1994). Após a análise por SDS-PAGE, os volumes remanescentes foram reunidos em quatro novos *pools*: *POOL* A (frações 1 a 6), *POOL* B (frações 7 a 12), *POOL* C (frações 13 a 18) e *POOL* D (frações 19 a 24). Os *pools* foram dosados por *2D-Quant kit* seguindo o manual do fabricante (GE Healthcare) e submetidos à concentração/dessalinização por cromatografia de fase reversa.

3.2.3.1.3 Cromatografia de fase reversa (C4 - C18 em sequência)

Considerando que cada *pool* proveniente do *OFFGEL* (A-D, com ou sem anfólitos) continha uma mistura de peptídeos e proteínas, desenvolvemos uma metodologia para concentração/dessalinização das frações peptídica e proteica em separado. Para isto, foram utilizadas cromatografias de fase reversa em colunas C4 [300 Å, 5 μ m, 10 mm x 25 cm (Vydac, EUA)] e C18 [100 Å, 10 μ m, 10 mm x 25 cm (Kromasil, EUA)], utilizando o sistema cromatográfico LC-10AS (Shimadzu, Japão). As colunas foram utilizadas em série (C4 seguida de C18) em parte do equilíbrio pré-injeção e durante o carregamento da amostra e a lavagem pré-eluição. Em seguida, as colunas foram desacopladas e o material adsorvido em

cada uma delas foi eluído separadamente. Nesta abordagem, espera-se que os componentes de maior massa molecular (*i.e.*, proteínas) fiquem retidos na coluna C4, enquanto que peptídeos (menores) deverão permear a primeira coluna, ficando retidos apenas na C18. Inicialmente, cada coluna foi equilibrada separadamente com 3 volumes de coluna (aproximadamente 60 mL) de fase móvel A [ácido trifluoroacético 0,1% (v/v) em água]. Após o equilíbrio inicial, as duas colunas (C4-C18) foram equilibradas com mais dois volume totais de coluna (80 mL) a um fluxo de 3 mL/min. Cada *pool* foi injetado em 100% de fase móvel A por 13 min, seguido de lavagem nesta mesma condição até 60 min. Em seguida, as colunas foram desconectadas e eluídas separadamente. As proteínas ligadas à coluna C4 foram eluídas com um pulso de 90 % de B durante 21 min e os peptídeos foram eluídos da C18 com um pulso de 60 % de B também durante 21 min. Após as eluições, as colunas foram lavadas separadamente com 5 volumes de coluna com 100 % de B, reconectadas e reequilibradas por 16 h (*overnight*) com 100 % de A a um fluxo de 0,3 mL/min, antes da injeção dos demais *pools*. Os peptídeos eluídos na C18 foram liofilizados e suas quantidades estimadas por pesada seca.

3.2.3.2 Veneno bruto + cromatografia de fase reversa (C4 - C18 em sequência)

Nove miligramas de veneno bruto de *Bothrops jararaca*, em 9 mL de água MilliQ contendo 0,1 % (v/v) de ácido trifluoroacético, foram injetados (3 injeções de 3 mg cada) diretamente nas colunas C4 e C18 previamente equilibradas e conectadas conforme descrito acima (seção 3.2.3.1.3). As condições de equilíbrio e eluição foram as mesmas descritas acima (seção 3.2.3.1.3). Após eluição, os peptídeos foram liofilizados e sua quantidade estimada por pesada seca.

3.2.3.3. Fracionamento por exclusão molecular e cromatografia de fase reversa (C18)

3.2.3.3.1 Exclusão molecular

Alíquotas de 40 mg do veneno de *Bothrops jararaca* foram solubilizados em 40 mL de água gelada (0 a 1 °C) e fracionadas por exclusão molecular utilizando membranas Amicon (Millipore, EUA) com *cutoffs* de 3 ou 10 kDa. Para cada processamento, 40 mL de veneno foram distribuídos em 4 tubos Amicon, com capacidade para até 15 mL cada, para evitar a saturação das membranas com grande quantidade de proteína. As etapas de centrifugação foram realizadas a 4 °C e 4.500 g, totalizando cerca de 1 h. Os peptídeos menores que 3 ou 10 kDa foram recuperados no *flow-through* (aproximadamente 9 mL por tubo) e as proteínas ficaram concentradas em 1 mL. Os *flow-throughs* dos 4 tubos foram unidos, gerando

aproximadamente 36 mL de solução, contendo peptídeos menores que 3 kDa, ou 36 mL, contendo peptídeos menores que 10 kDa. Os experimentos foram realizados em duplicata técnica, para ambos os *cutoffs*. Todas as etapas foram realizadas a 4 °C para minimizar a geração artefactual de peptídeos oriundos de proteólise.

3.2.3.4 Análise peptidômica

Os *pools* de peptídeos abaixo de 3 kDa ou abaixo de 10 kDa, e suas duplicatas, foram dessalinizados por cromatografia de fase reversa em coluna C18 (vide seção 3.2.3.1.3) previamente equilibrada com aproximadamente 60 mL de fase móvel A. Para cada *pool*, foram feitas 9 injeções de no máximo 4 mL cada (utilizando um loop de 5 mL), com lavagem de 2 volumes de coluna com 100 % de fase móvel A entre cada injeção. Após a última injeção, os peptídeos foram eluídos com um pulso de 60 % de fase móvel B, como descrito anteriormente. Foram retirados 150 µL das soluções eluídas de peptídeos (abaixo de 3 kDa e abaixo de 10 kDa) para posterior análise por espectrometria de massas; os volumes restantes foram liofilizados por 16 h. Os 150 µL de cada *pool* foram totalmente secos no *SpeedVac*, sendo ressuspensos em 20 µL de ácido fórmico 1 % (v/v) em água. As replicatas de cada condição (peptídeos < 3kDa e < 10 kDa) foram analisadas em triplicata técnica por nano-LC-MS/MS. Utilizaram-se 2 µL de amostra para cada corrida e as condições cromatográficas foram as mesmas descritas na seção 3.2.2.5. Os peptídeos eluídos foram diretamente introduzidos no espectrômetro de massas Q Exactive Plus Orbitrap (Thermo, EUA). A voltagem da fonte foi configurada para 1,9 kV, a temperatura do capilar de entrada foi ajustada para 250 °C e a voltagem das lentes para 60 V. Os espectros de MS1 (300 a 1.500 *m/z*) foram adquiridos em modo *profile*, com 1 *microscan* e resolução de 70.000 para *m/z* 200 (FWHM, *full width at half maximum*), controle automático de ganho (AGC) e tempo de injeção limitados a 1×10^6 e 100 ms, respectivamente. Para cada espectro MS1, até doze íons mais intensos foram submetidos à fragmentação por HCD (*higher-energy collision dissociation*), no modo *stepped*, com energias de colisão de 25, 35 e 45 %. Os precursores foram isolados em janelas de 3,0 *m/z*, com deslocamento (*offset*) de 0,5 *m/z* para direita. Os espectros de MS/MS (200 a 2.000 *m/z*) foram adquiridos no modo centróide, com 1 *microscan*, resolução de 17.500, AGC de 5×10^5 e tempo máximo de injeção de 100 ms. A opção de exclusão dinâmica foi ajustada para 60 s e nenhum estado de carga foi rejeitado. Os dados brutos gerados no espectrômetro de massas foram diretamente analisados no software comercial PEAKS (Ma *et al.* 2003) versão 7 (Bioinformatics Solutions Inc., Canada).

Inicialmente, os dados brutos foram submetidos à correção dos valores de m/z do íon precursor, seguidos dos processos de obtenção da centroide do pico, desconvolução de carga e *deisotoping*. Em seguida os parâmetros gerais de busca estipulados para análise foram: 5 ppm de limite de tolerância da massa dos íons precursores e 0,01 Da para os íons-fragmento, sem definição de enzima de clivagem.

Os dados foram inicialmente analisados pela ferramenta *de novo*, capaz de interpretar os espectros de MS/MS sem auxílio de um banco de dados. As seguintes modificações variáveis (máximo de 3 por peptídeo) foram consideradas: desamidação de asparagina ou glutamina (+0,98 Da), desidratação/perda neutra água (-18,01 Da), oxidação de histidina, triptofano ou metionina (+15,99 Da), piroglutâmico a partir de glutamina (-17,03 Da) ou de ácido glutâmico (-18,01 Da). Posteriormente, procedeu-se à busca contra um banco de dados, utilizando a ferramenta PEAKS DB, nas seguintes condições: massa monoisotópica do precursor, aceitando as mesmas modificações pós-traducionais selecionadas para a ferramenta *de novo*. Todas as buscas foram realizadas contra um banco de dados criado a partir do Uniprot, específico para a taxonomia *Serpentes* (Taxon id # 8570) de 16 de abril de 2014, contendo 55.516 entradas; foram também adicionadas 115 entradas do banco cRAP (*common Repository of Adventitious Proteins*) disponível em <http://www.thegpm.org/crap/>.

Por último, os dados foram analisados através da ferramenta PEAKS PTM (Han *et al.* 2011), considerando 477 modificações pós-traducionais variáveis adicionais além daquelas descritas acima e aceitando o máximo de duas modificações variáveis por peptídeo. Todas as buscas foram realizadas contra um sub-banco de dados composto apenas pelas sequências das proteínas identificadas pelo PEAKS DB. Os resultados confiáveis foram filtrados de forma a manter a taxa de falsa descoberta (*False Discovery Rate* – FDR) abaixo de 1% (tanto para peptídeos quanto para proteínas).

3.2.3.5 Análise proteômica

As duplicatas das amostras concentradas contendo proteínas acima dos *cutoffs* de 3 ou 10 kDa (seção 3.2.3.3.1) foram diluídas dez vezes e quantificadas pelo método do ácido bicinchonínico (Protocolo). Cada amostra (100 µg) foi totalmente seca no *SpeedVac* e submetida à tripsinização e dessalinização como descrito na seção 3.2.1.3. Os digestos tripsínicos foram então ressuspensos em 100 µL de ácido fórmico 1% (v/v). Cada replicata foi analisada em triplicata técnica por nanoLC-MS/MS. A análise por espectrometria de massas seguiu o protocolo detalhado anteriormente (seção 3.2.3.4), com as seguintes modificações:

injeção de 4 µL de peptídeos dessalinizados; fragmentação por HCD realizada com uma única energia de colisão normalizada de 30%; AGC de 5×10^4 e tempo máximo de injeção de 50 ms. A função de rejeição de estado de carga foi habilitada para picos com cargas não determinadas ou igual a 1.

Os dados gerados foram analisados através do software PEAKS 7, seguindo os mesmos parâmetros utilizados nas análises peptidômicas (seção 3.2.3.4), com as seguintes modificações: (1) tripsina como enzima de clivagem, carbamidometilação (+57,02) como modificação pós-traducional fixa; (2) inclusão da acetilação de lisina ou N-terminal (+42,01) nas modificações variáveis (na análise pelo PEAKS DB); (3) máximo de 2 clivagens perdidas (nas análises do PEAKS DB e PTM); (4) máximo de 3 modificações pós-traducionais (PTM) por peptídeo. A identificação dos peptídeos e proteínas foi realizada contra o mesmo banco de dados utilizado na análise peptidômica, aceitando-se uma taxa de falsas descobertas (FDR) menor que 1% para peptídeos e proteínas.

3.2.3.6 Genômica funcional e varredura por atividades biológicas

As células de câncer de mama (MCF7) foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), contendo 0,01 mg/mL de insulina bovina e 10 % de soro fetal bovino em placas de seis poços (85,20 mm x 127,80 mm). Após as células atingirem 80% de confluência, elas foram tratadas com o veneno de *Bothrops jararaca* em uma concentração final de 5 µg/mL ou com o peptidoma obtido deste veneno (900 µg/ mL) em 1 mL de meio de cultura. As concentrações foram escolhidas com base na maior quantidade capaz de gerar alteração na expressão gênica das células mantendo-as viáveis. Em seguida, as células foram incubadas por 6 h a 37 °C. Após a incubação, o RNA total foi extraído utilizando o kit RNeasy mini (Quiagen, Cat.no. 74104) e o cDNA foi produzido seguindo as instruções do fabricante (*GeneChip WT plus reagent kit*, Affymetrix,). O cDNA foi fragmentado, marcado e hibridizado em chip HgGene ST v2 (lot. 4265888, Ref. 902112, Affimetric, EUA). As amostras foram hibridizadas ao chip por aproximadamente 16 h, lavadas e marcadas com corante fluorescente utilizando o equipamento *Affymetrix's Fluidics Station 450* (P/N 00-0079, Affymetrix, Santa Clara, CA) e o kit *GeneChip Hybridization, Wash and Stain* (P/N 900720, Affymetrix). As análises por microarranjo foram realizadas utilizando um chip por amostra, totalizando seis chips (duplicatas de células tratadas e não-tratadas). A análise de expressão gênica foi realizada utilizando o software (GeneChip Operating, Affymetrix, Santa Clara, CA) para determinar as diferenças na expressão de genes entre as células não tratadas (controles) e as células tratadas, com o veneno ou com o peptidoma. Foram utilizados os

parâmetros padrão do programa. Os genes considerados diferencialmente expressos (sub ou superexpressos) apresentaram um *fold change* de pelo menos 1,5 (para mais ou para menos). Os genes diferencialmente expressos foram submetidos a análises ontológicas e de mapeamento por vias de sinalização, utilizando os programas Gene Ontology e DAVID (Huang da *et al.* 2009; Huang da *et al.* 2008). Além disso, as listas de genes sub e superexpressos foram submetidas ao software *Connectivity map* (C-Map) (Lamb 2007; Lamb *et al.* 2006) (disponível em <http://www.broadinstitute.org/cmap/#>) para uma varredura por atividades biosemelhantes a fármacos. Esta varredura foi realizada comparando-se os perfis de expressão gênica das células MCF7 tratadas com o veneno ou com o peptidoma de *B. jararaca* com os perfis de expressão gênica desta mesma linhagem celular tratada com fármacos conhecidos. Cada gene diferencialmente expresso identificado por microarranjo é representado por um código de sonda, específico para o modelo de chip utilizado. Como utilizamos o chip HgGene ST v2 e a biblioteca do C-Map foi gerada utilizando o chip HgU133A, a correspondência entre os diferentes códigos foi feita utilizando uma ferramenta disponível em <https://www.affymetrix.com/user/login.jsp?toURL=/analysis/netaffx/export.affx>.

Após a comparação dos perfis de expressão gênica, o C-Map gerou uma lista de fármacos que apresentaram o maior valor (*score*) de correlação positiva: quanto mais próximo de 1, maior a correlação positiva entre a amostra e o fármaco presente no banco de dados do C-Map.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

(PARTE 1)

4.1 Análise venômica de sete serpentes do gênero *Bothrops* medicamente importantes no Brasil: comparação entre composição dos venenos e classificação filogenética

No presente trabalho, avaliamos a composição de sete venenos botrópicos importantes para a saúde pública no Brasil, utilizando proteômica *shotgun*. Dentre as serpentes utilizadas nesse trabalho, cinco (*Bothrops jararacussu*, *Bothrops moojeni*, *Bothropoides jararaca*, *Bothropoides neuwiedi* e *Rhinocerothis alternatus*) compõem o *pool* de imunização utilizado para produção do soro antitetrápico disponibilizado pelo Instituto Butantan. As outras duas espécies (*Bothrops atrox* e *Rhinocerothis cotiara*) não fazem parte do *pool*, mas foram incluídas neste estudo para avaliarmos a reatividade cruzada do soro. Para estudar a relação entre a composição proteica dos venenos e a classificação filogenética das espécies estudadas, os dados proteômicos obtidos foram comparados com a classificação filogenética sugerida por Fenwick (Fenwick *et al.* 2009) para avaliar a relação entre composição proteica e classificação filogenética das espécies estudadas. Vale ressaltar que esta classificação (também utilizada nesta parte da tese) ainda não foi amplamente aceita pela comunidade científica, de forma que muitos autores ainda preferem adotar a nomenclatura tradicional do gênero *Bothrops*.

Primeiramente, objetivando a visualização da complexidade dos proteomas a serem estudados, os sete venenos foram submetidos à eletroforese bidimensional em fitas de gel de 7 cm e intervalos de pH de 3 a 10 e 4 a 7, seguido de coloração por Coomassie G-250 coloidal (Figura 4.1).

Através das imagens dos géis foi possível observar que no gênero *Bothrops*, os venenos de *B. moojeni* e *B. jararacussu* apresentaram *spots* (manchas) intensos na região básica e, aparentemente, uma maior complexidade em número de *spots* visualizados quando comparados ao veneno de *B. atrox*. Este último, por sua vez, apresentou um maior número de *spots* detectados na região de maior massa molecular (entre 97 e 45 kDa) no lado ácido. No grupo *Bothropoides* (*Bothropoides jararaca* e *Bothropoides neuwiedi*), os perfis dos venenos não apresentaram diferenças visíveis no intervalo de pH de 4 a 7.

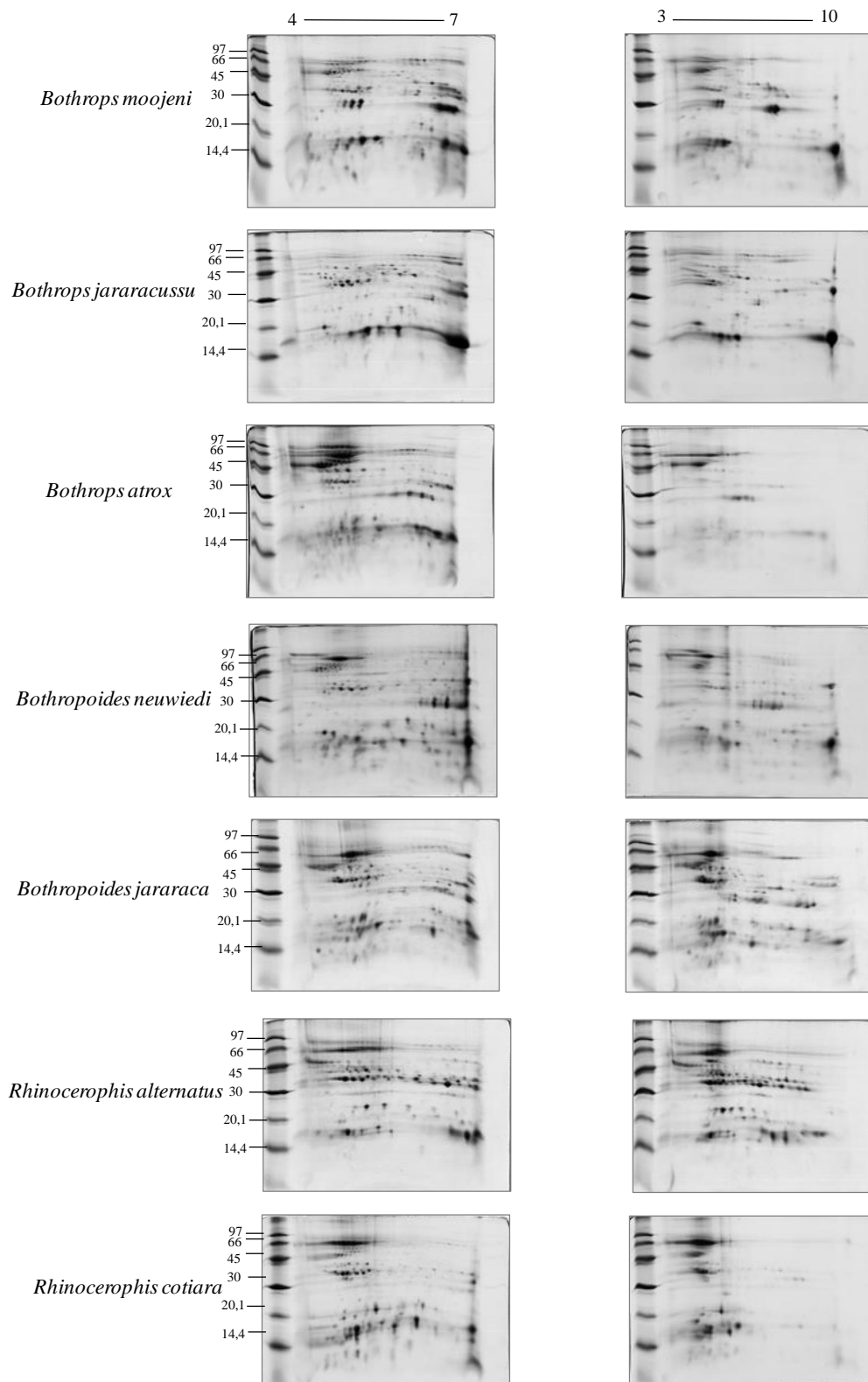


Figura 4.1: Avaliação do perfil de sete venenos dos gêneros *Bothrops*, *Bothropoides* e *Rhinocerophis* em géis bidimensionais de 7 cm e intervalo de pH de 4 a 7 e 3 a 10. Foram adicionados 60 µg de cada veneno por fita de gel (1ª dimensão). Na segunda dimensão foram utilizados géis a 15% que foram corados por Coomassie G 250 coloidal. As imagens foram obtidas pelo programa LabScan 6.0 (GE Healthcare, EUA).

Entretanto, analisando os géis no intervalo de pH de 3 a 10, é possível observar que o veneno de *Bothropoides neuwiedi* apresenta *spots* mais intensos na região básica, enquanto que *Bothropoides jararaca* apresenta maior diversidade de *spots* na região ácida e de alta massa molecular do gel. No grupo *Rhinocerothis*, através das imagens dos géis no intervalo de pH de 3 a 10, é mais evidente a maior concentração de *spots* na região ácida do gel no veneno de *R. cotiara*, enquanto que no veneno de *R. alternatus* os *spots* se apresentaram mais distribuídos ao longo de todo o intervalo de pH.

Os perfis eletroforéticos obtidos para os venenos analisados serviram exclusivamente para dar uma ideia geral da complexidade de cada veneno. Por isso, optamos pela utilização de fitas de gel de baixa resolução (7 cm). A variabilidade observada entre venenos de serpentes é, em parte, devida à presença de proteoformas, que geralmente estão representadas nos géis bidimensionais por *spots* de massa molecular e pontos isoelétricos muito próximos. A presença de proteoformas geralmente está associada a processos de *splicing* alternativo de RNAm, mutações pontuais e/ou modificações pós-traducionais que ocorrem em uma proteína, originando diferentes formas moleculares oriundas de um mesmo gene (proteoformas) (Smith e Kelleher 2013). A 2D-PAGE ainda é a técnica mais apropriada para se obter uma visualização geral da complexidade de qualquer amostra biológica devido a possibilidade de observação de *spots* relacionados à proteoformas.

Alguns trabalhos em venômica de serpentes do gênero *Bothrops* utilizaram eletroforese bidimensional (2D-PAGE) com fitas de gel de alta resolução (18 a 24 cm) e intervalo de pH 3 a 10 como método de fracionamento prévio à espectrometria de massas. Serrano e colaboradores (Serrano *et al.* 2005) utilizaram 2D-PAGE aliada à nanoLC-MS/MS para analisar a composição dos venenos de diferentes espécies do gênero *Bothrops* (*B. jararaca*; *B. cotiara*; *B. moojeni*; *B. neuwiedi*; *B. alternatus*; *B. jararacussu*), além do veneno de *Crotalus atrox*. As regiões dos géis que apresentavam maior variabilidade entre os venenos analisados tiveram os *spots* analisados por espectrometria de massas. As proteínas identificadas nos *spots* analisados pertenciam às famílias conhecidamente mais abundantes em venenos da família Viperidae tais como: metalopeptidases (SVMP), serinopeptidases (SVSP), fosfolipases A₂ (PLA₂), L-aminoácido oxidase (LAAO) e lectina tipo-C (CLEC). Posteriormente, Guércio e colaboradores (Guercio *et al.* 2006) identificaram, em venenos de serpentes da espécie *Bothrops atrox*, representantes do fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF), do fator de crescimento de nervo (NGF) e da proteína secretória rica em cisteína (CRISP), além das classes proteicas previamente identificadas pelo trabalho de Serrano e cols. em 2005. A

abordagem 2D-PAGE aliada à identificação por espectrometria de massas também foi aplicada a serpentes pertencentes a outros gêneros das famílias Viperidae e Elapidae (Birrell *et al.* 2006; Birrell *et al.* 2007; Earl *et al.* 2006; Juárez *et al.* 2004; Jurado *et al.* 2007; Pierre *et al.* 2007; Risch *et al.* 2009; Viala *et al.* 2015).

Apesar de a eletroforese bidimensional fornecer informações importantes acerca da variabilidade proteica presente em amostras biológicas (Oliveira *et al.* 2014), essa técnica apresenta algumas limitações tais como: (i) baixa resolução na focalização de proteínas muito ácidas (pI menor que 3,5), muito básicas (pI maior que 12), pouco abundantes ou muito hidrofóbicas; (ii) dificuldade de automação da técnica (iii) baixa recuperação dos peptídeos tripsínicos durante a etapa de extração para posterior análise por espectrometria de massas (Görg *et al.* 2004). Uma das maiores limitações do uso da 2D-PAGE em análises venômicas de serpentes é a falta de identificação das classes proteicas menos abundantes nos venenos. Um dos fatores que pode contribuir para esta limitação é que o corante Coomassie G, que é o mais utilizado para corar os géis bidimensionais, detecta proteínas até o intervalo de 8 a 10 nanogramas (Miller *et al.* 2006). Por outro lado, uma análise por nanoLC-LTQ/Orbitrap permite boa detecção de picogramas de analito (Yates *et al.* 2009), permitindo a detecção de proteínas menos abundantes na amostra.

Por isso, após a visualização da complexidade dos sete venenos, realizamos uma análise venômica dos mesmos por proteômica *shotgun*, que consiste na digestão em solução das proteínas seguida de análise direta por espectrometria de massas (nanoLC-LTQ/Orbitrap). Os resultados foram apresentados na forma de contagem espectral (*spectral count*) por grupo proteico, ou seja, quantos espectros MS/MS foram identificados para cada grupo (tabela 4.1) Através da análise dos dados (2 replicatas biológicas x 3 replicatas técnicas = 6 análises /amostra) foi possível identificar 15 classes proteicas, incluindo metalopeptidases dos grupos PI, PII e PIII (SVMP PI-PIII); fosfolipase A₂ (PLA₂); serinopeptidases (SVSP); lectina tipo-C (CLEC) e tipo-C símile (CLECL); L-aminoácido oxidase (LAAO) e fator de crescimento de nervo (NGF) (Figura 4.2)

Tabela 4.1: Número de espectros totais normalizados identificados em cada classe proteica nos veneno das espécies dos gêneros *Bothrops*, *Bothropoides* e *Rhinoceriphis*.

Classes proteicas	<i>B. moojeni</i>	<i>B. atrox</i>	<i>B. jararacjussu</i>	<i>B. jararaca</i>	<i>B. neuwiedi</i>	<i>R. alternatus</i>	<i>R. cotiara</i>
Lectina tipo C (CLEC)	5	8	152	0	81	0	0
Lectina tipo C-símile (CLECL)	77	223	15	663	117	185	83
Proteína secretória rica em cisteína (CRISP)	31	40	38	39	45	31	52
Ecto-5'-nucleotidase (ECTONT)	23	23	68	29	34	30	57
Glutaminil ciclase (GLUTCYC)	16	17	17	12	18	11	13
Hialuronidase (HYALU)	3	5	0	3	0	4	12
L-aminoácido oxidase (LAAO)	257	268	259	290	382	187	347
Fator de crescimento de nervo (NGF)	5	5	10	7	6	5	12
Fosfodiesterase (PDIEST)	28	27	30	36	27	19	2
Fosfolipase A ₂ (PLA ₂)	115	63	443	86	193	25	10
Fosfolipase B (PLB)	41	28	30	23	33	30	44
Metalopeptidase PI (SVMP-PI)	337	109	26	104	322	45	76
Metalopeptidase PII (SVMP-II)	213	123	78	255	320	95	176
Metalopeptidase PIII (SVMP-PIII)	392	799	349	804	498	513	649
Serinopeptidase (SVSP)	192	153	212	318	202	72	229
Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)	3	0	0	50	9	0	0
Actina	0	0	0	0	0	0	5
TOTAL	1738	1891	1727	2719	2287	1252	1762

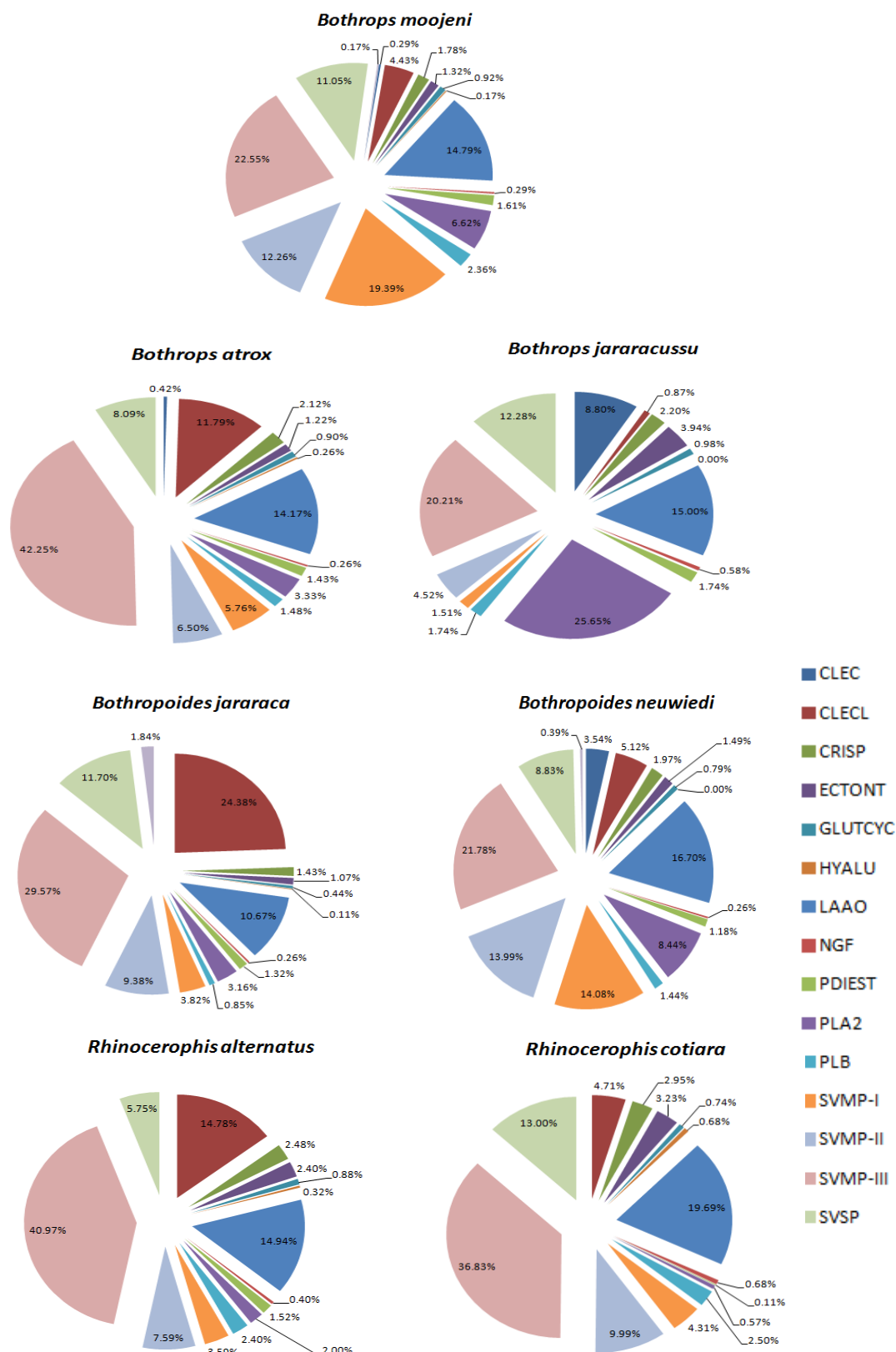


Figura 4.2: Distribuição de classes proteicas identificadas nos venenos dos três diferentes gêneros através de abordagem proteômica *shotgun*. Cada amostra de veneno foi preparada em duplicata e a análise por espectrometria de massas foi realizada em triplicata para cada replicata de veneno (total de 6 análises por veneno). Os dados representam o número total de espectros normalizados no programa Scaffold: 4.738 (*B. moojeni*); 4.891 (*B. atrox*); 4.727 (*B. jararacussu*); 2.719 (*B. jararaca*); 2.287 (*B. neuwiedi*); 4.767 (*R. cotiara*); 4.252 (*R.*

alternatus). SVMP-I, -II e -III (metalopeptidases do veneno de serpentes dos grupos PI, PII e PIII); PLA2 (fosfolipase A₂); SVSP (serinopeptidase do veneno de serpentes); CLEC (Lectina tipo-C); CLECL (lectina tipo-C símile); LAAO (L-amino ácido oxidase); NGF (fator de crescimento de nervo); HYALU (hialuronidase); VEGF (fator de crescimento endotelial vascular); CRISP (proteínas secretórias ricas em cisteínas); PDIEST (fosfodiesterase); ECTONT (ecto-5'-nucleotidase); PLB (fosfolipase B) e GLUTCYC (glutaminil ciclase).

Sabe-se da literatura que, em serpentes da família Viperidae, a classe proteica mais abundante nos venenos é a das metalopeptidases, que representou cerca de 50% dos espectros identificados nos venenos estudados, com exceção do veneno de *B. jararacussu*, no qual correspondeu a somente 26% do total de espectros identificados. Este resultado está de acordo com estudos prévios que indicaram que este veneno é o que possui uma composição proteica mais dissimilar dentro do gênero *Bothrops* (Kashima *et al.* 2004). A grande representatividade do grupo das fosfolipases A₂ no veneno de *B. jararacussu* (25,7% do total de espectros identificados) sugere que esta espécie possa ter relação filogenética mais próxima com o gênero *Crotalus*, que apresenta venenos tipicamente mais neurotóxicos do que hemorrágicos (Correa-Netto *et al.* 2010; Kashima *et al.* 2004). O grupo das fosfolipases A₂ também teve uma representação significativa no veneno de *B. moojeni* (6,6 %) quando comparado aos demais: *B. atrox* (3,3 %), *B. jararaca* (3,2 %), *R. alternatus* (2,0 %) e *R. cotiara* (0,6 %). Interessantemente, os venenos com maior contribuição de fosfolipases A₂ também foram os que tiveram o menor número de espectros identificados para metalopeptidase do grupo III, principal responsável pela hemorragia característica de envenenamentos por serpentes do gênero *Bothrops*, sugerindo que os venenos de *B. jararacussu*, *B. moojeni* e sejam menos hemorrágicos que os demais. O grupo das lectinas tipo-C símile teve uma representação significativa nos venenos de *B. jararaca*, *R. alternatus* e *B. atrox* e os grupos das serinopeptidases e das L-aminoácido oxidases tiveram uma distribuição similar em todos os venenos analisados.

Todas as classes proteicas sabidamente abundantes nos venenos de serpentes do gênero *Bothrops* foram identificadas neste trabalho. Adicionalmente, o uso da abordagem *shotgun* nanoESI-LTQ/Orbitrap permitiu a identificação de componentes pouco abundantes, raramente detectados através de abordagens venômicas; por isso, muitos ainda não haviam sido detectados nos venenos analisados. Fosfodiesterase, ecto-5' nucleotidase, fosfolipase B, NGF e glutaminil ciclase, foram identificados em todos os venenos analisados, e pela primeira vez nos venenos de *B. atrox*, *B. jararaca*, *R. alternatus* e *R. cotiara*. Dentre as classes menos abundantes identificadas, só a glutaminil ciclase e o NGF já haviam sido previamente

detectados nos venenos de *B. jararaca* (Fox *et al.* 2006) e *B. atrox* (Guercio *et al.* 2006), respectivamente, através de abordagens venômicas. No entanto, o NGF e a hialuronidase, identificados nos venenos de *B. atrox*, *B. jararaca*, *R. alternatus* e *R. cotiara*, já haviam sido reportados em análises transcriptômicas da glândula de veneno de *B. jararacussu* (Kashima *et al.* 2004) e *Bothropoides pauloensis* (Rodrigues *et al.* 2012). A identificação de actina (não mostrada no gráfico devido ao baixo número de espectros identificados), com apenas cinco espectros, no veneno de *R. cotiara* sugere que a presença desta classe proteica no veneno possa estar relacionada à contaminação do veneno com células da glândula durante a extração do veneno e que, devido à alta sensibilidade da metodologia utilizada, foi possível sua detecção e identificação. Vale ressaltar que a falta de identificação de componentes menos abundantes em um veneno utilizando abordagens proteômicas não significa, necessariamente, que estes não estejam presentes na amostra, mas que talvez estejam em uma concentração abaixo da capacidade de detecção da metodologia empregada.

Considerando a variabilidade na composição proteica entre os grupos foi possível observar que: (i) O gênero *Bothrops* apresentou as maiores diferenças na composição proteica, principalmente em relação à abundância das metalopeptidases PIII, fosfolipases A₂, lectinas tipo-C e lectinas tipo C-símile; (ii) no gênero *Bothropoides* houve um maior número de identificações de espectros associados a metalopeptidases PI e PII e à identificação de lectina tipo C no veneno de *Bothropoides neuwiedi* - entretanto as lectinas tipo C-símile representaram um percentual significativamente maior no veneno de *Bothropoides jararaca* (24,4 %) em relação ao veneno de *Bothropoides neuwiedi* (5,1 %); (iii) no gênero *Rhinocerophis*, as principais diferenças foram a identificação de um maior número de espectros associados a serinopeptidases e L-amino ácido oxidases no veneno de *Rhinocerophis cotiara* e de lectinas tipo C-símile no veneno de *Rhinocerophis alternatus*. Apesar das diferenças nos venomas entre espécies agrupadas em um mesmo grupo filogenético, o perfil proteico do veneno de *Bothrops atrox* e *Rhinocerophis alternatus* foi muito similar, assim como os de *Bothrops moojeni* e *Bothropoides neuwiedi*.

Os resultados de *shotgun* foram publicados em conjunto com análises de reatividade cruzada e neutralização dos venenos, cujos experimentos foram realizados por colaboradores do grupo da Dra. Ana Maria Moura da Silva, do Instituto Butantan (Sousa *et al.* 2013) (ANEXO 1).

No artigo, as espécies utilizadas na tese, com exceção da *Bothrops moojeni*, foram agrupadas em dendrogramas construídos com base nas abundâncias relativas das diferentes classes de proteínas. As estimativas de quantidade foram feitas com base em contagens espectrais

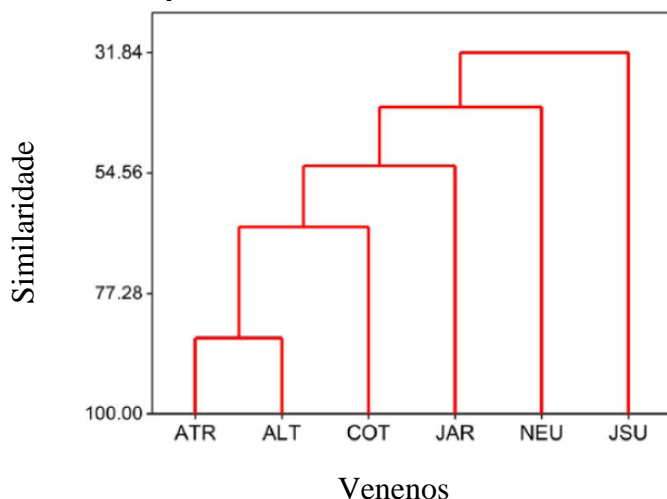
determinadas por proteômica *shotgun* (figura 4.3A) e também em valores de absorvância (em mAU a 214 nm) dos picos proteicos majoritários de veneno, detectados e um determinado intervalo de tempo, em coluna de fase reversa (figura 4.3B). Através do dendrograma construído com os dados de venômica *shotgun* foi possível observar que os venenos mais similares foram os das espécies *Rhinocerophis alternatus* e *Bothrops atrox*, que aparentemente formariam um grupo filogenético independente. Os venenos de *Bothrops neuwiedi* e *Bothrops jararacussu* apresentaram menor similaridade com os demais. Entretanto, o dendrograma construído com os dados de eluição cromatográfica (experimento realizado pelos colaboradores do Instituto Butantan) mostrou uma forte similaridade entre os venenos de *Rhinocerophis alternatus* e *Bothropoides jararaca*, assim como entre *Bothrops atrox* e *Rhinocerophis cotiara*. Os venenos de *B. jararacussu* e *B. neuwiedi* foram os que apresentaram uma menor correlação com os demais venenos, sendo o de *B. jararacussu* o mais distinto, em concordância com o dendrograma montado a partir da contagem espectral dos grupos proteicos identificados em cada veneno.

Além disso, também foi realizada a análise dos componentes principais ou *Principal Components Analysis* (PCA), que mostrou quais as classes proteicas que mais contribuíram para variabilidade observada entre os venenos analisados e, conseqüentemente, para o agrupamento das espécies. Os resultados das análises de PCA foram representados na forma de *loading plot* e *score plot*.

O primeiro gráfico mostra a relação entre as variáveis, representadas pela concentração relativa de cada classe proteica identificada por *shotgun*. O *score plot* representa a relação entre as amostras (venenos analisados). A análise por PCA mostrou que as metalopeptidases do grupo PIII e as lectinas tipo C-símbiles seguidas pelas fosfolipases A₂ e as lectinas tipo C, foram as classes proteicas que mais contribuíram para o agrupamento dos venenos (figura 4.4A). O gráfico de *score plot* (figura 4.4B) é outra forma de representação da árvore filogenética apresentada na figura 4.3. Através dele é possível observar quais classes proteicas mais contribuíram para o agrupamento dos venenos. A similaridade entre os venenos de *R. alternatus* e *B. atrox* é explicada pelos altos valores de metalopeptidases PIII e lectinas tipo C-símbile e baixos valores de fosfolipases A₂ e lectinas tipo C, que são refletidos pela posição destes venenos no gráfico de *score plot* em relação à direção dos vetores correspondentes as classes proteicas no gráfico de *loading plot*. O veneno de *R. cotiara* apresentou padrões similares para os grupos das metalopeptidases PIII, fosfolipases A₂ e lectinas tipo C, baixos valores para lectinas tipo C-símbile e altos para L-amino ácido oxidase. Em contraste, *B.*

jararaca apresentou valores baixos para L-amino ácido oxidase e altos para lectinas tipo C-símile. Os venenos de *B. neuwiedi* e *B. jararacussu* apresentaram um padrão oposto dos demais com altos valores para fosfolipases A₂ e lectinas tipo C e baixos para metalopeptidases PIII, o que justifica a maior distância destes venenos em relação aos demais.

A - Abundância relativa por contagem espectral



B - Perfil de eluição na C18

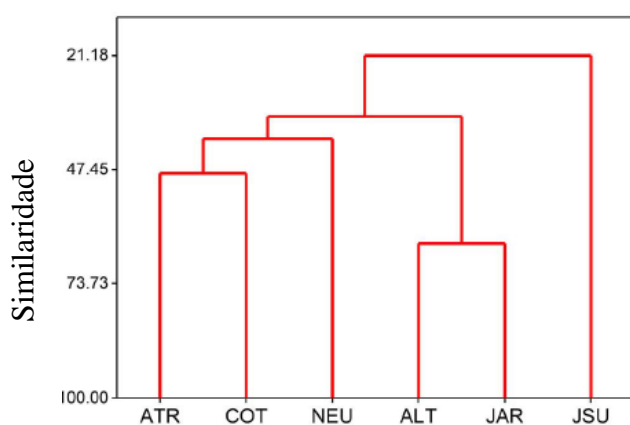


Figura 4.3: Agrupamento cladístico dos venenos de acordo com a composição proteica. Os venenos de *Bothrops atrox* (ATR), *Rhinocerophis alternatus* (ALT), *Rhinocerophis cotiara* (COT), *Bothropoides jararaca* (JAR), *Bothropoides neuwiedi* (NEU) e *Bothrops jararacussu* (JSU) foram agrupados hierarquicamente de acordo com o número total de espectros (*Spectral Counts*) normalizados identificados por classe proteica (A) ou por absorvância máxima (mAU) a 214 nm dos picos majoritários de veneno eluídos em determinado intervalo de tempo em coluna de fase reversa (B). Foi utilizada a distância mínima Euclidiana entre um item em um cluster e um item em outro cluster (vizinho mais próximo) através do software Minitab 16.

A análise de PCA dos perfis de eluição cromatográficos mostrou que o grupo das metalopeptidases do grupo PIII foi o componente que mais contribuiu para o agrupamento dos venenos em dois grupos (*B. jararaca* / *R. alternatus* e *B. atrox* / *R. cotiara*), sendo

representado pelas frações eluídas após 160 min. Em seguida vieram os grupos fosfolipases A₂ e grupo PI das metalopeptidases (figura 4.4).

Vale ressaltar que todas as análises de agrupamento dos venenos foram realizadas pelo Dr. Pedro Peixoto, colaborador do Instituto de Matemática e Estatística da Universidade de São Paulo, através do software Minitab 16.

Abundância relativa por contagem espectral

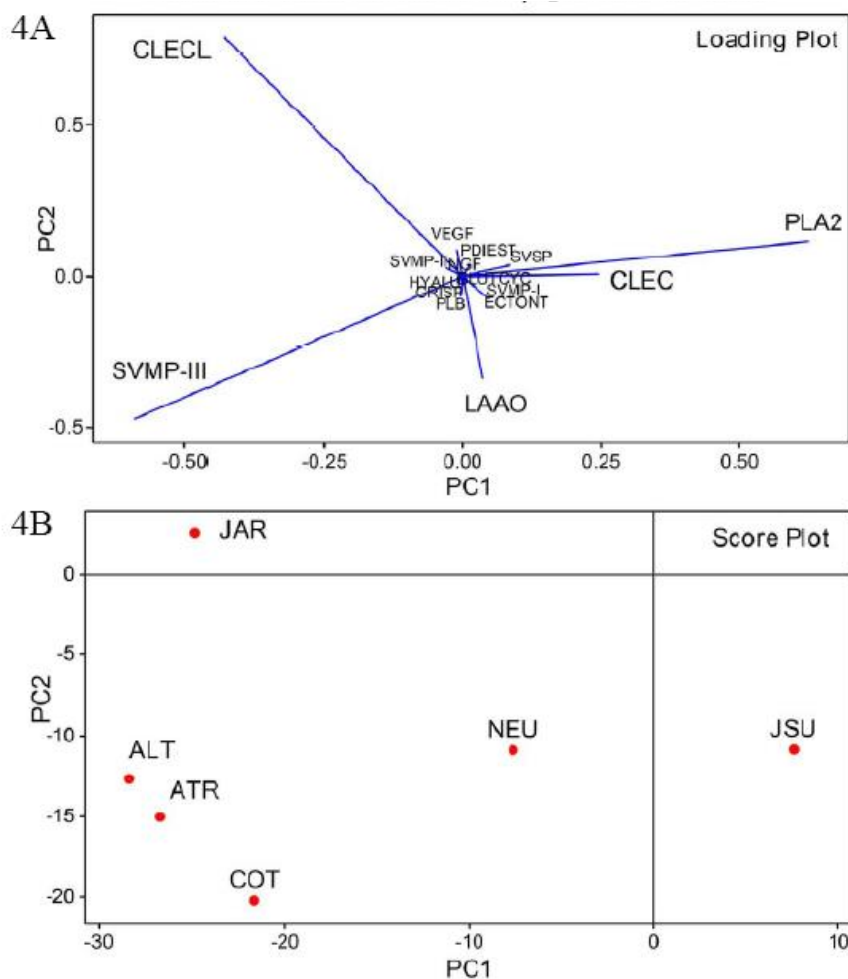


Figura 4.4: Análise de Componentes Principais relacionada à abundância relativa dos componentes proteicos determinada por proteômica *shotgun*. *Loading* e *Score plots* dos venenos de *Bothrops atrox* (ATR), *Rhinocerosphis alternatus* (ALT), *Rhinocerosphis cotiara* (COT), *Bothropoides jararaca* (JAR), *Bothropoides neuwiedi* (NEU) e *Bothrops jararacussu* (JSU) de acordo com o número total de espectros (*Spectral Counts*) normalizados identificados por classe proteica. As análises de PCA foram baseadas em matriz de covariância e todos os cálculos foram feitos no software Minitab 16. SVMP-I, -II e -III (metalopeptidases do veneno de serpentes dos grupos PI, PII e PIII); PLA2 (fosfolipase A₂); SVSP (serinopeptidase do veneno de serpentes); CLEC (Lectina tipo C); CLECL (lectina tipo C-símile); LAAO (L-amino ácido oxidase); NGF (fator de crescimento de nervo); HYALU (hialuronidase); VEGF (fator de crescimento endotelial vascular); CRISP (proteínas

secretórias ricas em cisteínas); PDIEST (fosfodiesterase); ECTONT (ecto-5'-nucleotidase); PLB (fosfolipase B) e GLUTCYC (glutaminil ciclase).

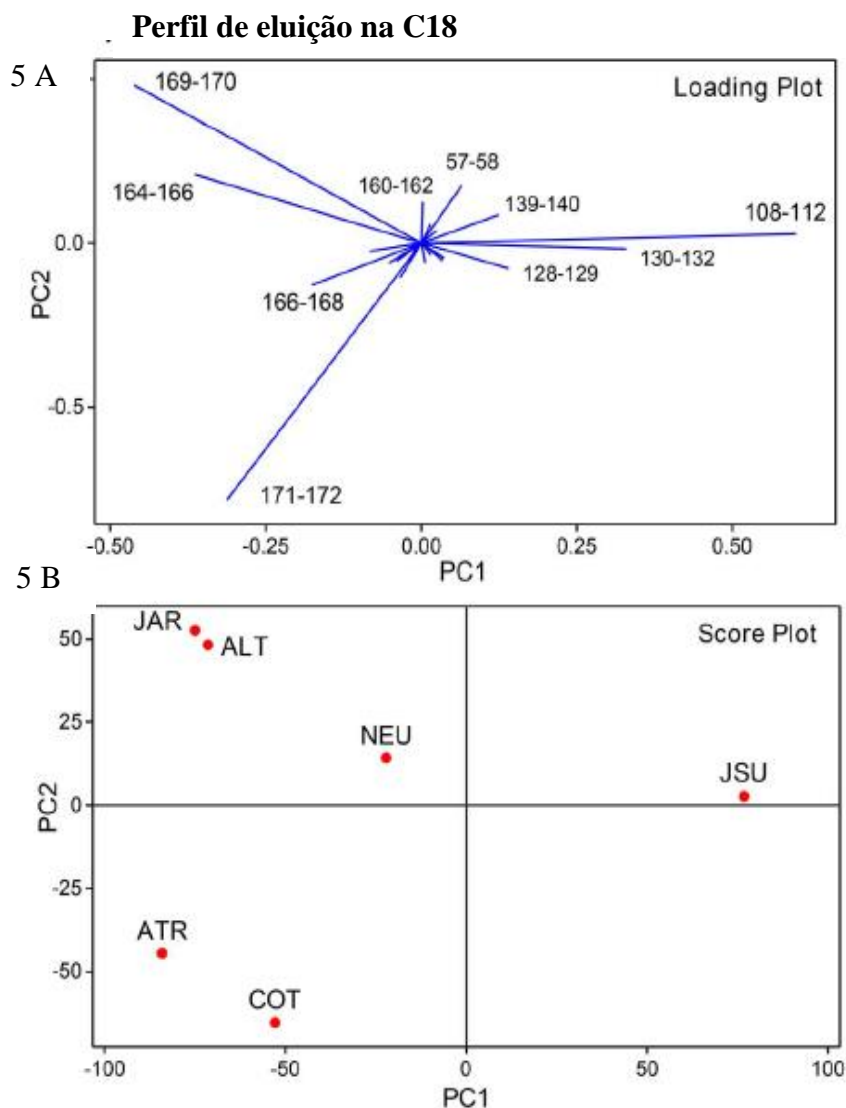


Figura 4.5: Análise de Componente Principal relacionada ao perfil de eluição dos picos em cromatografia de fase reversa em coluna C18. Loading e Score plots dos venenos de *Bothrops atrox* (ATR), *Rhinocerocephis alternatus* (ALT), *Rhinocerocephis cotiara* (COT), *Bothropoides jararaca* (JAR), *Bothropoides neuwiedi* (NEU) e *Bothrops jararacussu* (JSU) de acordo com a absorvância máxima (mAU) a 214 nm em intervalos definidos de eluição em cromatografia de fase reversa em coluna C18. As análises de PCA foram baseadas em matriz de covariância e todos os cálculos foram feitos no software Minitab 16.

Os dendrogramas e PCAs gerados pela contagem espectral e pelo perfil de eluição dos venenos em coluna C18 foram bastante distintos, pois não existe correlação direta entre número de espectros identificados por espectrometria de massas para cada classe proteica e absorvância à 214 nm dos picos cromatográficos, uma vez que cada pico cromatográfico pode representar uma mistura de famílias de proteínas. Entretanto, ambos resultados evidenciaram

uma ausência de relação entre composição dos venenos e a classificação filogenética de Fenwick (Fenwick *et al.* 2009). Vale ressaltar que, um estudo mais aprofundado utilizando um maior número de espécies, análises quantitativas de componentes isolados e sequências completas de proteínas dos venenos seriam determinantes para sustentar a fraca conexão entre composição e filogenia, baseada principalmente em análises de DNA mitocondrial e características morfológicas. Entretanto, nossos resultados estão de acordo com a literatura como pode ser observado na discussão a seguir.

De acordo com os valores de PC1, os venenos de *B. atrox*, *R. alternatus*, *R. cotiara* e *B. jararaca* claramente representariam um grupo oposto ao do veneno de *B. jararacussu*, onde o primeiro grupo apresentou valores negativos significativos de PC1 para SVMP-PIII, enquanto que o veneno de *B. jararacussu* apresentou uma polarização em direção à presença de PLA₂ e SVMP-PI. O mesmo padrão de polarização dessas toxinas tem sido associado à serpentes que apresentam características pedomórficas (adultas apresentando características de serpentes jovens) em seus venenos (primeiro grupo) e àquelas que sofreram variações ontogenéticas (*B. jararacussu*, no presente trabalho) (Alape-Giron *et al.* 2008; Calvete *et al.* 2011; Guercio *et al.* 2006; Nunez *et al.* 2009; Saldarriaga *et al.* 2003). O veneno de *B. neuwiedi* foi agrupado mais próximo ao de *B. jararacussu*, porém apresentou valores negativos de PC1 menores, contrário ao que foi observado para *B. jararacussu*. Este dado sugere que, aparentemente, o veneno de *B. neuwiedi* conservou um fenótipo pedomórfico (relacionado ao seu conteúdo de SVMP), mas pode ter sofrido alterações ontogenéticas (devido ao seu maior conteúdo de PLA₂ quando comparado com a maioria das serpentes do grande gênero *Bothrops*), como observado em *B. jararacussu* ou *B. atrox* da Colômbia.

A ausência de correlação entre composição dos venenos e classificação filogenética já foi apontada na literatura, principalmente enfatizando a variabilidade intragênero (Angulo *et al.* 2008; Fernandez *et al.* 2010; Mackessy 2008). Gibbs e colaboradores (Gibbs *et al.* 2013) não identificaram correlação entre a variabilidade na composição dos venenos *Sistrurus spp.* e as análises filogenéticas vigentes. Eles sugeriram que a dieta poderia ser um fator determinante na variabilidade da composição dos venenos. Uma grande variabilidade na composição e toxicidade dos venenos também foi reportada em cascavéis (*rattlesnakes*) do complexo *Crotalus viridis/oreganus* (Mackessy 2010) e nas espécies *Crotalus durissus* e *Crotalus simus* das Américas Central e do Sul (Calvete *et al.* 2007). Nestas últimas espécies, as diferenças na composição estavam relacionadas à conservação de características comuns a cascavéis

neonatas da América Central, *Crotalus simus* da América do Sul e subespécies de *Crotalus durissus*, representando um clássico exemplo de pedomorfismo (Calvete *et al.* 2007).

A conservação de características pedomórficas durante a dispersão da espécie *Bothrops atrox* da América Central para a região Amazônica do Brasil (Calvete *et al.* 2011) é a responsável pela alta concentração de metalopeptidases do grupo PIII, principal responsável pela toxicidade do veneno de *Bothrops sp* (Moura-da-Silva *et al.* 2007). Características pedomórficas não são conservadas no veneno da espécie *Bothrops jararacussu*, que é composto majoritariamente por fosfolipases A₂ miotóxicas enzimaticamente inativas (Moura-da-Silva *et al.* 1990), conseqüentemente, sendo menos tóxico. Acredita-se que a ausência de características pedomórficas conservadas no veneno de *B. jararacussu* possa estar relacionada ao seu grande tamanho e sua capacidade de inocular grande quantidade de veneno nas presas/vítimas.

Um dos objetivos deste estudo foi aprofundar o conhecimento acerca da composição dos venenos de algumas das principais serpentes brasileiras. Estes dados, quando analisados conjuntamente aos ensaios de reatividade e neutralização frente ao soro antibotrópico produzido no Instituto Butantan (realizados em colaboração pelo grupo da Dra. Ana Maria Moura da Silva - ANEXO 1 desta tese), poderiam ser utilizados como subsídio para o aprimoramento da produção deste bioinsumo de relevância médica fundamental. Os ensaios de reatividade mostraram que as metalopeptidases do grupo PIII são as mais antigênicas em venenos de serpentes do complexo *Bothrops*, enquanto que as metalopeptidases do grupo PI, as serinopeptidases e as fosfolipases A₂ apresentam baixa reatividade frente ao soro antiofídico. Proteínas de baixa massa molecular como desintegrinas e peptídeos potenciadores de bradicinina (BPP) também são pouco antigênicos. Além disso, foi possível observar uma reatividade cruzada entre toxinas pertencentes à mesma classe proteica nos diferentes venenos, incluindo os que não fazem parte do *pool* de imunização para a produção do soro antibotrópico, como o veneno de *B. atrox*. Entretanto, devido à grande complexidade dos venenos de serpentes, é difícil avaliar a eficácia de neutralização dos soros antiofídicos frente aos componentes menos abundantes e/ou que não são reconhecidos pelos soros. Esse fato pode ser uma consequência da baixa imunogenicidade desses componentes em cavalos ou de sua baixa concentração relativa, insuficiente para induzir títulos de anticorpos suficientes para neutralização das respectivas atividades.

Em suma, este trabalho mostrou uma grande variabilidade na composição proteica entre venenos pertencentes a serpentes oriundas de três gêneros (ou de apenas um, *Bothrops*,

dependendo qual classificação é adotada), indicando que não existe correlação entre composição e as análises filogenéticas adotadas atualmente. Apesar da variabilidade de composição, também foi possível observar que o antissoro reconhece e neutraliza as mesmas classes proteicas nos venenos, mesmo os que não fazem parte do *pool* de imunização. Logo, os resultados deste trabalho podem contribuir para mudanças nos critérios de seleção dos venenos que comporão o *pool* de imunização em cavalos. Por exemplo, poderia-se selecionar um menor número de espécies cujos venenos contenham o maior número possível de classes proteicas antigênicas e imunogênicas. No caso do soro antitoxêmico, tal mudança na escolha dos venenos que venham a compor o *pool* de imunização poderia gerar um soro antitoxêmico mais eficiente e pan-específico.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO (PARTE 2)

4.2 Mapeamento da interação entre metalopeptidases de veneno de serpentes e o pró-domínio recombinante de jararagina

4.2.1 – Ensaios de formação de complexo

Considerando a identificação de peptídeos da região de pró-domínio de metalopeptidases no peptidoma do veneno de *B. jararaca* em trabalho anterior (Nicolau 2012) e os resultados obtidos por Portes-Junior em 2014 (Portes-Junior *et al.* 2014), estabelecemos uma colaboração com o grupo da Dra. Ana Maria Moura da Silva (Instituto Butantan, SP) para aprofundar o conhecimento acerca do mecanismo de modulação da atividade das SVMP pelo pró-domínio. Para isso, realizamos dois estudos: (1) determinação da região de interação entre o as SVMP e o pró-domínio recombinante de jararagina (PD-Jar) produzido pelo Dr. José Antônio Portes-Junior (Instituto Butantan, SP); (2) avaliação da capacidade inibitória do PD-Jar e de um peptídeo de pró-domínio [contendo parte da sequência conservada PKMCGVT e sintetizado pelo nosso grupo a partir de uma sequência peptídica identificada no peptidoma de *B. jararaca* (Nicolau 2012)] frente às atividades catalíticas e tóxicas de SVMP. Os ensaios de determinação da região de interação entre SVMP e PD-Jar serão discutidos abaixo.

Inicialmente, verificamos a capacidade de formação de complexo do PD-Jar (22 kDa) recombinante com as metalopeptidases jararagina (SVMP-PIIIa, 52 kDa), BaP1 (SVMP-PI pouco hemorrágica, 23 kDa), atroxlisina-I (SVMP-PI hemorrágica, 23 kDa) e leucurolisina-a (SVMP-PI não hemorrágica, 23 kDa) através de incubação em solução, por 15 minutos, à temperatura ambiente, e avaliação da formação de complexo por eletroforese em condições nativas e cromatografia de exclusão molecular (Figura 4.6).

As metalopeptidases BaP1 e leucurolisina-a apresentam pontos isoelétricos básico (8,50) e próximo ao neutro (6,86), respectivamente. Por isso, em pH 6,8 (pH do tampão de amostra e do gel de empilhamento da eletroforese) estas SVMP terão carga positiva ou neutra e, portanto, não sofrerão migração eletroforética. A atroxlisina-I (pI 5,86), por sua vez, apresentará carga líquida negativa neste pH, sendo capaz de migrar normalmente em direção ao anodo. Durante a etapa de centrifugação prévia à eletroforese, entretanto, a atroxlisina-I sofreu precipitação, fazendo com que a quantidade aplicada no gel fosse menor do que a ideal (1 µg) e a banda de atroxlisina-I controle na figura 4.6 aparecesse fracamente corada.

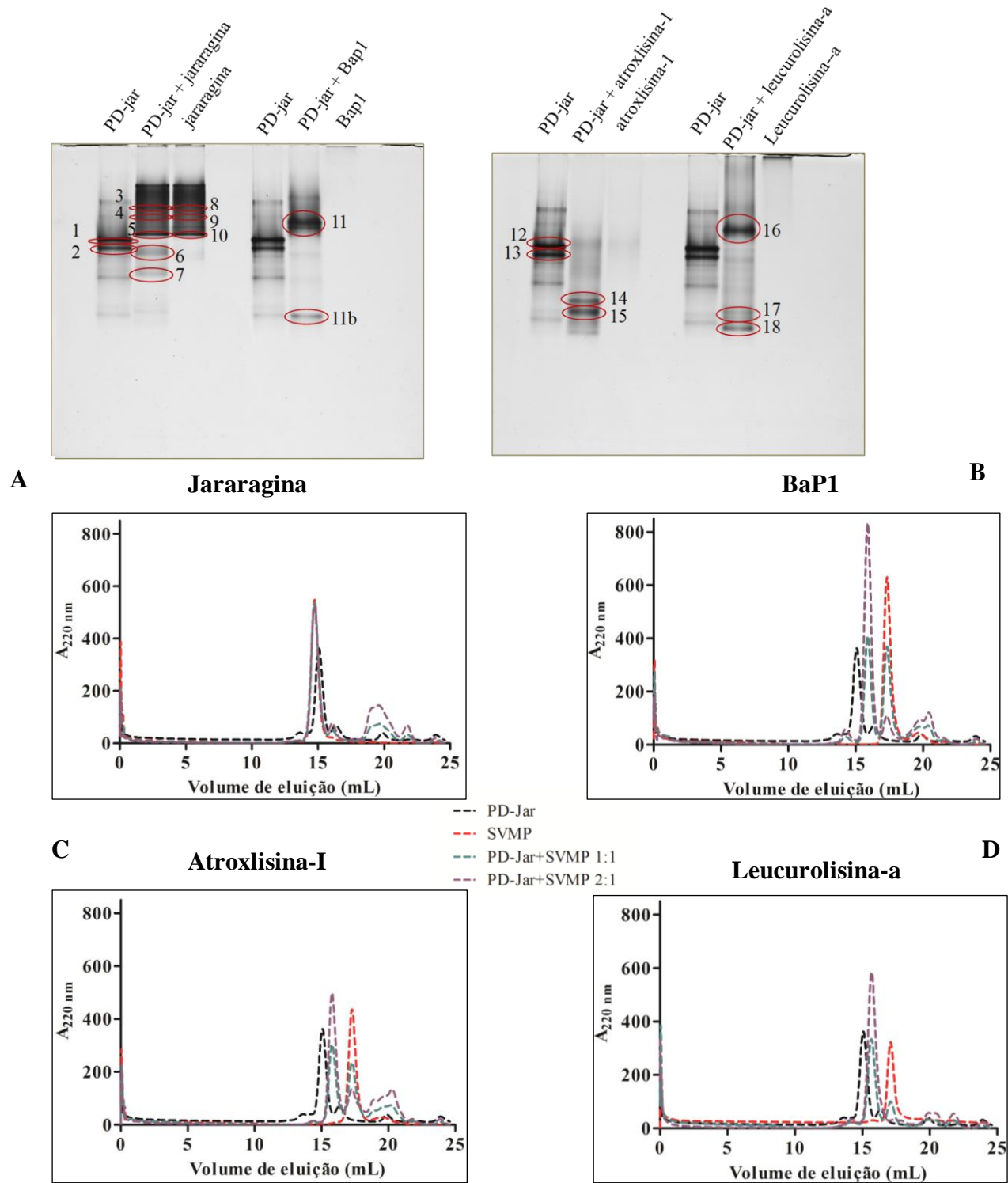


Figura 4.6: Avaliação da formação de complexo entre PD-Jar e as SVMP por gel nativo a 12% corado por impregnação por prata e por exclusão molecular em coluna Superdex 200 (25 mL). Para a análise por gel nativo, as proteínas foram incubadas em uma razão molar de 1:1 por 15 min a 25 °C. Os círculos vermelhos indicam as bandas que foram excisadas, tripsinizadas e analisadas por nanoESI-LTQ/Orbitrap, e identificadas pelo programa PEAKS 7 para confirmação da formação dos complexos. Na cromatografia de exclusão molecular, as amostras foram incubadas seguindo o descrito para análise em gel nativo, mas adicionando a razão molar 2:1 de PD-Jar para SVMP. Cada cromatograma representa a sobreposição de 4 corridas: PD-Jar controle, SVMP controle, PD-Jar + SVMP (1:1) e PD-Jar + SVMP (2:1).

Para os ensaios com BaP1 e leucurolisina-a, foi possível observar um perfil eletroforético distinto entre a raia contendo PD-Jar controle e PD-Jar incubado com as SVMP, o que pode indicar formação de complexo entre estas moléculas (Figura 4.6, bandas # 11 e 16, respectivamente). Entretanto, em ambos casos, houve aparecimento de bandas de menor intensidade e maior mobilidade eletroforética, que podem representar produtos de degradação do PD-Jar (bandas # 11b, 17 e 18). No caso da SVMP atroxlisina-I, embora tenha ocorrido uma alteração do perfil eletroforético da raia referente a PD-Jar+atroxlisina quando comparada ao controle de atroxlisina sozinha, duas bandas mais intensas (# 14 e 15) e com perfis de migração semelhantes às bandas # 11b, 17 e 18 foram visualizadas exclusivamente na primeira. Isto pode ser um indício de que, assim como BaP1 e leucurolisina-a, a atroxlisina-I pode estar degradando parcialmente o PD-Jar. Pela análise do padrão de bandas da amostra (PD-Jar+jararagina), não é possível determinar se houve formação de complexo entre as duas moléculas. Por outro lado, a não visualização das bandas de PD-Jar e o surgimento de novas bandas pouco intensas (# 6 e 7) na raia de (PD-Jar+jararagina) podem indicar degradação de PD-Jar por jararagina e/ou a formação minoritária de complexo entre elas.

Através da análise de formação de complexo por exclusão molecular, foi possível observar que PD-Jar (22 kDa) apresentou aproximadamente o mesmo volume de eluição que jararagina (52 kDa). Sendo assim, é possível que PD-Jar esteja dimerizando através de ligação entre suas cisteínas livres (na sequência PKMCGVT). No cromatograma de interação entre PD-Jar e jararagina, (Figura 4.6A) foi possível observar que os picos de interação (nas razões molares de 1:1 e 2:1 PD-Jar:SVMP) se sobrepõem ao pico de jararagina controle, sem aumento da área do pico referente a jararagina. A única mudança observada foi o aumento, dependente da quantidade de PD-Jar utilizada, das áreas dos picos eluídos por volta dos 20 mL, sugerindo que a jararagina tenha degradado o PD-Jar. Além disso, assim como nos dados gerados na análise em gel nativo, nenhuma evidência de formação de complexo entre PD-Jar e jararagina foi observada. Entretanto, parece evidente que o PD-Jar forma complexo com todas as SVMP de classe PI testadas. Nestes casos, os dados indicaram que o PD-Jar interagiria com cada SVMP em sua forma monomérica. Além disso, apenas na razão molar de 2:1 PD-Jar:SVMP-PI é que houve completa depleção das SVMP em suas formas livres, indicando que nem todas as moléculas de PD-Jar recombinante estavam biologicamente ativas (Figura 4.6B, 4.6C e 4.6D). Por último, assim como no caso da SVMP-PIII jararagina, as SVMP-PI também parecem degradar o PD-Jar, sendo que atroxlisina-I (Figura 4.6 C) aparentemente foi mais

ativa que BaP1 (Figura 4.6B), enquanto leucurolisina-a (Figura 4.6D) apresentou menor atividade proteolítica dentre as SVMP-PI.

É interessante observar que atroxlisina-I, que aparentemente gerou maior degradação de PD-Jar, é uma SVMP-PI hemorrágica, enquanto que a leucurolisina-a, que gerou uma degradação muito menor que as demais, é uma SVMP-PI não hemorrágica. O fator responsável pela diferença de toxicidade entre SVMP-PI hemorrágicas e não hemorrágicas ainda não foi completamente elucidado, porém alguns estudos apontam que diferenças em determinantes estruturais, como regiões de maior ou menor flexibilidade próximas ao sítio catalítico (Watanabe *et al.* 2003), diferença em sítios de clivagem preferenciais (Paes Leme *et al.* 2011) e substratos (Herrera *et al.* 2015) sejam os responsáveis por essas diferenças. Embora dados da literatura apontem para a falta de correlação entre as atividades proteolítica e hemorrágica das SVMP-PI, é possível que alguns desses mecanismos citados também contribuam para diferenças nas atividades proteolíticas das SVMP-PI.

Para confirmar a presença dos complexos, excisamos as bandas numeradas na Figura 4.6, fizemos tripsinização *in gel* e analisamos por espectrometria de massas nanoESI-LTQ/Orbitrap os peptídeos tripsínicos extraídos. A identificação destes peptídeos foi feita utilizando a ferramenta PEAKS 7. A tabela 1 mostra as identificações das bandas, a cobertura de sequência das proteínas identificadas e o número de peptídeos (totais e únicos) identificados para cada proteína.

Segundo a análise por espectrometria de massas, só foi possível confirmar a formação de complexo de PD-Jar com BaP1 e leucurolisina-a (bandas 11 e 16, respectivamente), com identificação de um número significativo de peptídeos provenientes tanto de PD-Jar quanto das SVMP (Tabela 4.2).

Embora, por exclusão molecular, a atroxlisina-I tenha aparentemente formado complexo com PD-Jar, não foi possível confirmar essa hipótese através da análise das bandas por MS/MS. De qualquer forma, é possível inferir que as bandas # 14 e 15, geradas após a incubação do PD-Jar com atroxlisina-I, possam corresponder ao pico de eluição em cerca de 20 mL, tratando-se então de produtos de degradação do PD-Jar. Corroborando esta hipótese, a presença de atroxlisina-I não foi detectada em nenhuma das duas bandas, mas o PD-Jar foi identificado com 73% e 76% de cobertura de sequência nas bandas # 14 e 15, respectivamente. Através da identificação das bandas referentes ao PD-Jar incubado com jararagina, também não foi possível confirmar a formação de complexo, o que reforça o resultado obtido por exclusão molecular. As bandas # 3, 4 e 5 também estão presentes no

controle de jararagina (bandas # 8, 9 e 10). Além disso, estas bandas apresentaram uma cobertura de sequência significativa (72 a 82%) para jararagina e/ou botropasina e baixa cobertura de sequência para o PD-Jar, o que indica que os peptídeos associados ao PD-Jar foram oriundos de contaminação com as amostras controle de PD-Jar que foram injetadas previamente. A identificação de botropasina é esperada, pois a metodologia utilizada para purificação de jararagina (Paine *et al.* 1992) co-purifica estas duas SVMP que apresentam 95% de identidade sequencial.

Nas bandas # 6 e 7, as SVMP foram identificadas com um número significativamente menor de peptídeos quando comparadas às demais bandas (# 3, 4 e 5). Embora os peptídeos das SVMP possam ser oriundos de uma contaminação e, conseqüentemente, as bandas # 6 e 7 possam representar produtos de degradação do PD-jar, o aumento no número de peptídeos associados ao PD-Jar não foi significativo. Por isso, não foi possível afirmar se essas bandas são, de fato, produtos de degradação de PD-Jar ou resultantes da formação minoritária de complexo. Entretanto, as bandas 11b, 14, 15, 17 e 18 provavelmente indicam produtos de degradação de PD-Jar, pois além de um número expressivo de peptídeos associados ao PD-Jar, apresentaram uma redução significativa de peptídeos associados às SVMP.

Tabela 4.2: Identificações, por nanoLC-LTQ/Orbitrap, das proteínas presentes nas bandas excisadas do experimento de formação de complexo avaliado por eletroforese em condições nativas (Figura 4.6).

Bandas	Identificações	Cobertura de sequência	Peptídeos	Peptídeos únicos
1	PD-Jar	84%	41	41
2	PD-Jar	76%	30	30
3	Jararagina	82%	72	9
	Botropasina	79%	75	12
	PD-Jar	46%	6	6
4	Jararagina	75%	50	5
	Botropasina	69%	50	5
	PD-Jar	57%	9	9
5	Botropasina	72%	59	9
	PD-Jar	24%	3	3
6	Botropasina	53%	30	4
	PD-Jar	46%	6	6
7	PD-Jar	67%	15	15
	Jararagina	28%	14	4
8	Jararagina	74%	56	5
	Botropasina	75%	60	9
9	Jararagina	61%	46	5
	Botropasina	62%	47	6
10	Botropasina	69%	51	7
11	PD-Jar	68%	21	21
	BaP1	87%	28	27
11b	PD-Jar	68%	21	21
	BaP1	37%	5	5
12	PD-Jar	83%	46	46
13	PD-Jar	83%	36	36
14	PD-Jar	73%	23	23
15	PD-Jar	76%	25	25
16	PD-Jar	70%	21	21
	Lecurolisina-a	72%	23	15
17	PD-Jar	73%	19	19
	Leucurolisina-a	27%	6	4
18	PD-Jar	68%	16	16

Um dado interessante foi a identificação da sequência completa conservada de pró-domínio de SVMP (*i.e.*, PKMCGVT) nas bandas dos controles de PD-Jar (bandas # 1, 2, 12 e 13) (Figura 4.7 A) e a cobertura apenas parcial (*i.e.*, PK) desta sequência nas bandas (# 11 e 16) referentes aos complexos (Figura 4.7 B). Esta observação pode sugerir que, no zimogênio das SVMP, esta região poderia um sítio preferencial de clivagem, permitindo a ativação da metalopeptidase. De fato, já foi reportado que matrixinas são ativadas através da clivagem de uma região do pró-domínio próxima à cisteína. Isto desestabilizaria a ligação entre a cisteína e o zinco do sítio catalítico da enzima, liberando o pró-domínio e a enzima ativa (Woessner e Nagase 2000). A cobertura de sequência das proteínas identificadas nas demais bandas (# 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11b, 14, 15, 17 e 18) identificadas no gel nativo (figura 4.6) está representada no ANEXO 2 desta tese.

A

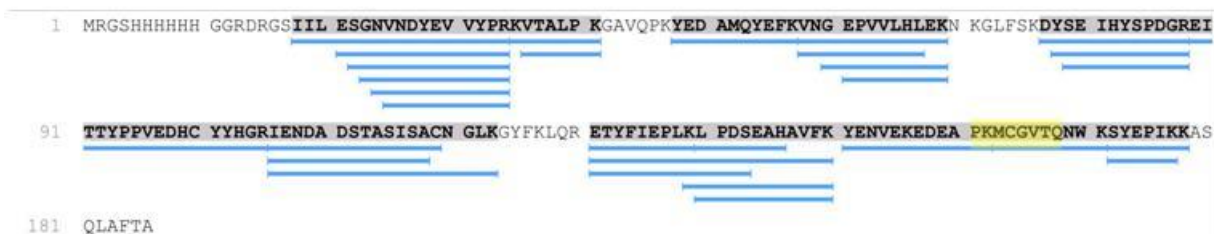
Banda 1

PD-Jar



Banda 2

PD-Jar



Banda 12

PD-Jar



Banda 13

PD-Jar

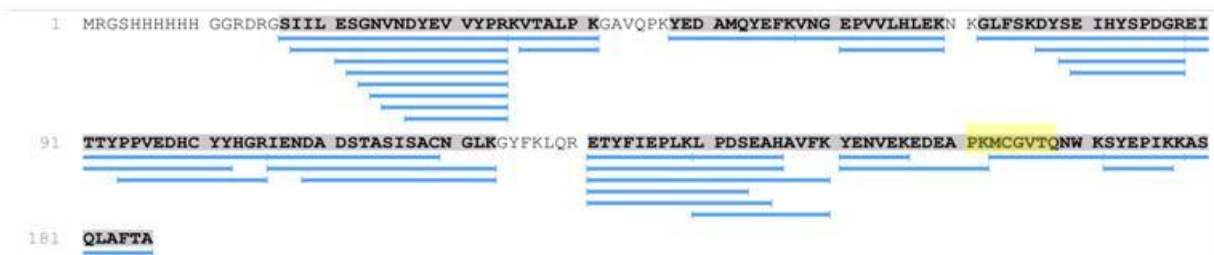


Figura 4.7A: Cobertura de seqüência do PD-Jar controle (bandas # 1, 2, 12 e 13). As coberturas de seqüência foram obtidas no programa PEAKS 7.5. Listras azuis correspondem aos peptídeos identificados pelo PEAKS DB e a seqüência conservada do pró-domínio de SVMP está destacada em amarelo.

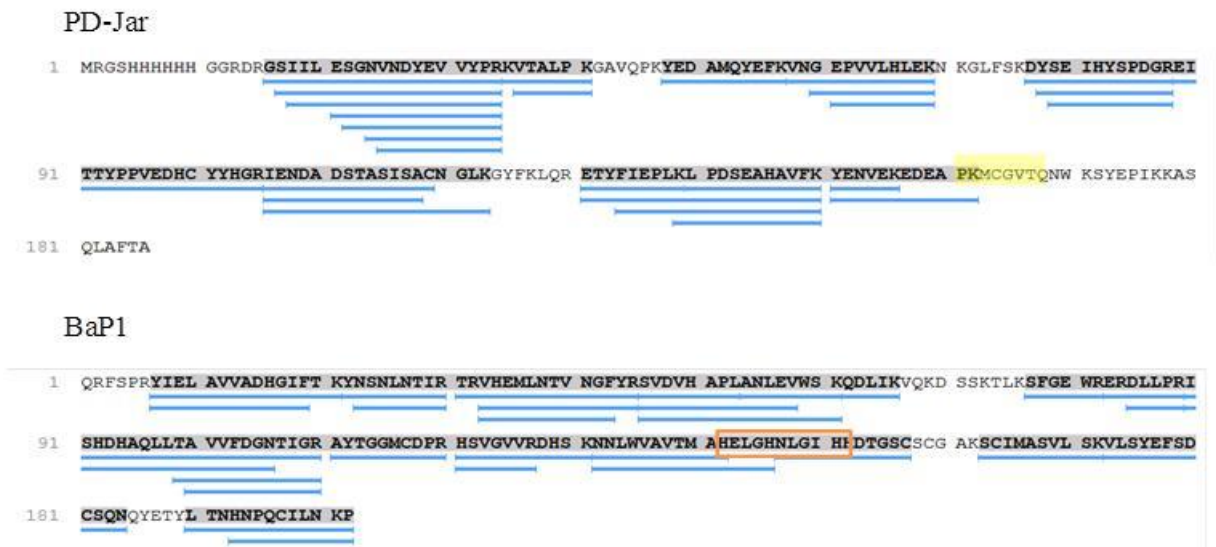
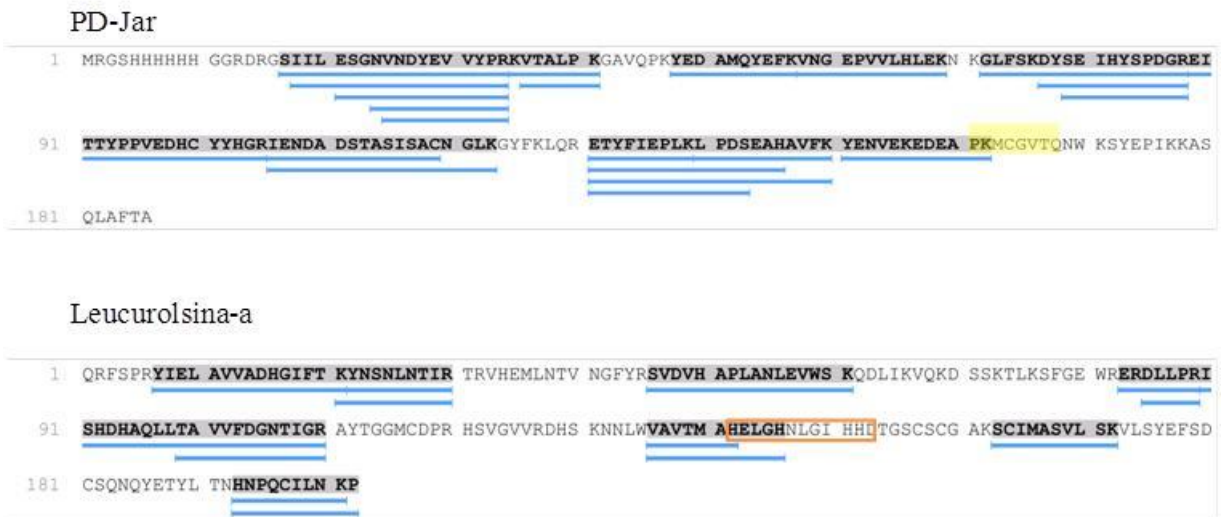
B**Banda 11****Banda 16**

Figura 4.7B: Cobertura de sequência do PD-Jar com as SVMP-PI (bandas # 11 e 16) que formaram complexo com ele. As coberturas de sequência foram obtidas no programa PEAKS 7.5, onde as listras azuis correspondem aos peptídeos identificados pelo PEAKS DB. A sequência conservada do pró-domínio de SVMP está destacada em amarelo e o retângulo laranja destaca a região do sítio catalítico das SVMP.

Para confirmar a degradação do PD-Jar pelas SVMP, realizamos ensaios de degradação tempo-dependente do PD-Jar adicionando, ao final dos tempos de reação, tampão de amostra desnaturante e redutor ou apenas desnaturante. Posteriormente, submetemos as amostras à análise por SDS-PAGE a 12% (Figura 4.8).

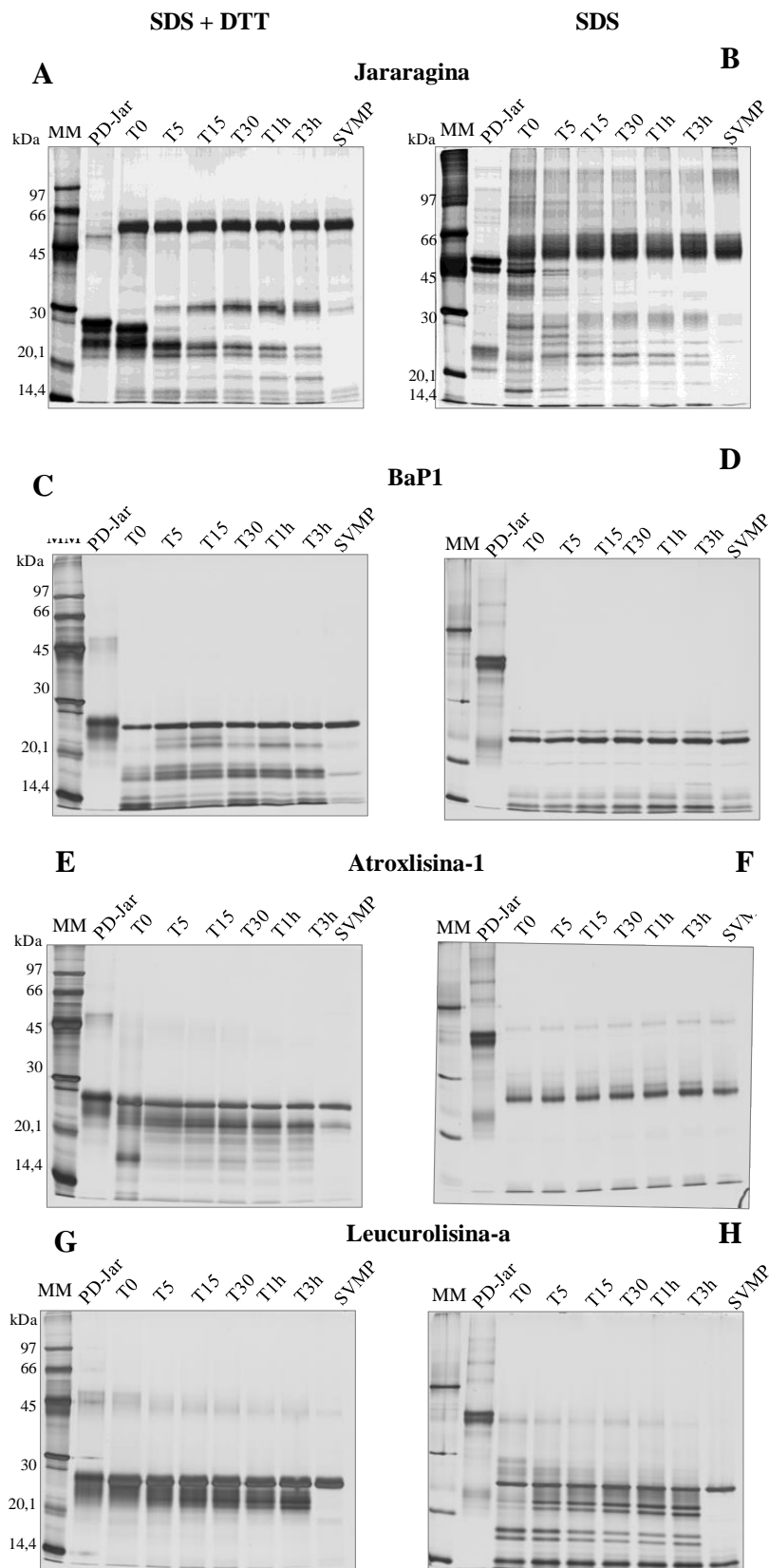


Figura 4.8: Análise da degradação tempo-dependente do PD-Jar por jararagina (SVMP-PIIIa), BaP1, atroxlisina-I ou leucurolisina-a (SVMP-PI). O PD-Jar foi incubado com as SVMP (na razão molar de 1:1) a 25 °C por diferentes tempos (0, 5 min, 15 min, 30 min, 1 h e 3 h) e as amostras analisadas por SDS-PAGE 12% em condições redutoras (A,C,E,G) e não redutoras (B,D,F,H).MM – Massa molecular

Algumas observações gerais podem ser feitas a partir da análise dos géis: (1) o PD-Jar na ausência de agente redutor (DTT) se dimeriza, provavelmente via interação de suas cisteínas livres, formando bandas de cerca de 45 kDa; (2) tanto na presença quanto na ausência de DTT, é possível observar que não existe uma única banda de PD-Jar, podendo indicar a presença de formas truncadas do PD-Jar, moléculas de PD-Jar enoveladas incorretamente ou produtos de autólise; (3) todas as SVMP foram capazes de degradar o PD-Jar em menor ou maior escala; (4) ao interromper a reação com tampão Laemmli (Laemmli 1970) na ausência de DTT, a degradação do PD-Jar visualizada nos géis foi mais intensa, indicando que apenas a presença de SDS, sem fervura, não é suficiente para inibir a atividade catalítica das SVMP .

No caso da jararagina, quando a reação foi interrompida com tampão desnaturante e redutor (Figura 4.8A) foi possível observar um menor número de bandas associadas a degradação do PD-Jar do que quando utilizado somente tampão desnaturante (Figura 4.8B). Além disso, é possível observar um aumento gradual de uma banda de aproximadamente 30 kDa, que pode corresponder a jararagina-C. A jararagina-C representa os domínios não catalíticos (desintegrina e rico em cisteína) da jararagina provavelmente gerados por autólise desta (Usami *et al.* 1994). Além disso, Moura-da-Silva e colaboradores sugeriram que a jararagina-C permanece ligada a jararagina por ponte dissulfeto (Moura-da-Silva *et al.* 2003). Isto explica o aumento tempo-dependente da intensidade da banda que pode corresponder a jararagina-C e seu aparecimento somente na presença de agente redutor (Figura 4.8A). Entretanto, a intensidade da banda majoritária de jararagina não diminuiu ao longo do tempo, por isso, essa banda também poderia corresponder a um produto de degradação de PD-Jar que na presença de agente redutor sofreu uma linearização e migrou no gel de forma anômala.

Com relação às SVMP-PI, aparentemente a BaP1 e a atroxlisina-I mostraram maior atividade proteolítica sobre o PD-Jar (Figuras 4.8C e 4.8E). Entretanto, quando as reações foram interrompidas com tampão desnaturante foi impossível visualizar bandas associadas ao PD-Jar, o que indica que houve uma degradação tempo-dependente significativa do PD-Jar por essas SVMP-PI e que tal degradação não foi interrompida após a adição do tampão desnaturante (Figuras 4.8D e 4.8F). Já foi reportado na literatura que a atividade proteolítica da atroxlisina-I sobre a caseína é inibida por DTT (Sanchez *et al.* 2010). Dessa forma, mesmo com a significativa atividade proteolítica da atroxlisina-I sobre o PD-Jar, essa atividade foi inibida após a adição de DTT, sendo possível observar nos géis somente os produtos de degradação do PD-Jar gerados de forma tempo-dependente (Figura 4.8E).

Entre BaP1 e atroxlisina-I a primeira parece ter gerado uma degradação mais extensa do PD-Jar (Figuras 4.8C e 4.8E), o que pode estar relacionado com uma maior atividade proteolítica da BaP1 ou uma maior suscetibilidade da atroxlisina-I à inativação com agentes redutores. Dessa forma a inibição da atividade catalítica da atroxlisina-I seria mais eficiente após a adição do tampão redutor.

A leucurolisina-a, por sua vez, gerou uma degradação do PD-Jar mais sutil do que as demais SVMP-PI (Figura 4.8G). Isto também pode estar relacionado a uma inibição eficiente da sua atividade proteolítica pelo DTT, uma vez que já foi reportado que o β -mercaptoetanol, que também é um agente redutor, é capaz de inibir 62% de sua atividade proteolítica (Bello *et al.* 2006). Entretanto, mesmo com a interrupção da reação somente com tampão desnaturante, foi possível observar bandas de degradação do PD-Jar (Figura 4.8H), o que indica que a leucurolisina-a apresenta menor atividade proteolítica sobre o PD-Jar do que BaP1 e atroxlisina-I. Além disso, é possível observar que a leucurolisina-a, em condições não redutoras, apresenta uma banda de baixa massa molecular (em torno de 14 kDa) que pode representar um produto de autólise (figura 4.8H).

Os resultados de formação de complexo mostraram que o PD-Jar parece interagir com a BaP1 e a leucurolisina-a (figura 4.6). Entretanto, ele é degradado por todas as SVMP testadas em maior ou menor escala (Figura 4.8). Esse fato pode ocorrer como um mecanismo de regulação das próprias enzimas que, após serem ativadas, degradam o pró-domínio para evitar uma inativação futura. Entretanto, alguns ensaios preliminares realizados pelo grupo da Dra. Moura da Silva mostraram que tanto o PD-Jar quanto o peptídeo ENVEKEDEAPKMCG-NH₂ (PepSint - sintetizado pelo Dr. Francisco Gomes-Neto em nosso laboratório) foram capazes de inibir totalmente as atividades fibrinolítica [14:1 (mol/mol) PD-Jar para SVMP e 200:1 (mol/mol) PepSint para SVMP] e hemorrágica [9:1 (mol/mol) PD-Jar para SVMP e 500:1 (mol/mol) PepSint para SVMP] da jararagina. Considerando que a jararagina degrada extensivamente o PD-Jar e não formou complexo nas razões molares de 1:1 e 2:1, existe a possibilidade da inibição observada nos ensaios acima ser decorrente do fato de PD-Jar estar agindo como um substrato preferencial para jararagina, ao invés de um inibidor. Para confirmar se o PD-Jar é apenas um substrato ou se ele também pode ser um inibidor das SVMP, o próximo experimento será avaliar se há degradação de PD-Jar quando utilizamos as mesmas razões molares dos ensaios acima descritos. Por outro lado, foram geradas proteínas recombinantes de mesma massa molecular que PD-Jar e nas mesmas condições (vetor de

expressão, cauda de histidina etc.), as quais, quando testadas nestes mesmos ensaios, foram incapazes de gerar inibição das atividades fibrinolítica e hemorrágica de jararagina (Moura da Silva, A.M. - comunicação pessoal). Este dado pode indicar que o PD-Jar é realmente um inibidor específico das SVMP e/ou que essas proteínas recombinantes não são substrato para as SVMP. Embora já tenha sido reportado na literatura a inibição da atividade proteolítica de ADAM 10 pelo seu pró-domínio recombinante (Moss *et al.* 2007), talvez o PD-Jar não seja o modelo ideal para desenvolvimento de inibidores específicos de SVMP para uso local. Porém, pode no mínimo ser explorado para elucidação do mecanismo de ativação das SVMP-PI.

No caso do PepSint, este poderia ser promissor para o desenvolvimento de um inibidor efetivo de jararagina, uma vez que este foi sintetizado com uma amida no C-terminal e por isso pode ser mais resistente a proteólise pelas SVMP. Obviamente, isto também deverá ser confirmado através incubações com SVMP e determinação da integridade estrutural do peptídeo por espectrometria de massas.

Vale ressaltar que um dos principais fatores responsáveis pela hemorragia local é o acúmulo das SVMP-PIII na membrana basal da microvasculatura, provavelmente ligadas via seu domínio DC (desintegrina símile e rico em cisteína), o que induz uma degradação extremamente rápida dos componentes da membrana basal e, conseqüentemente, o desenvolvimento rápido de hemorragia local (Baldo *et al.* 2010; Herrera *et al.* 2015). Logo, o peptídeo sintético contendo parte da região conservada do pró-domínio pode ser um bom modelo para o desenvolvimento de um inibidor específico de SVMP, de forma a minimizar os efeitos locais do envenenamento causado por *B. jararaca* e outras espécies.

Embora tenhamos observado a degradação do PD-Jar por todas as SVMP, ainda foi possível observar formação de complexo de PD-Jar com BaP1 e leucurolisina-a. Para tentar determinar a região de interação entre estes, utilizamos as técnicas de *cross-linking* químico e espectrometria de massas de alta resolução. Além disso, também analisamos as demais SVMP que aparentemente não formaram complexos para verificar se o uso de um agente estabilizador (reagente de *cross-linking*) poderia indicar uma formação minoritária de complexos PD-Jar + jararagina e/ou PD-Jar + atroxlisina-I.

4.2.2 Determinação das regiões de interação entre o PD-Jar e as SVMP-PI

Para determinar a região de interação entre o PD-Jar e as SVMP, utilizamos a técnica de *cross-linking* químico que consiste na estabilização do complexo não covalente através de reação com um reagente químico, no caso o BS³-d0 (bis[sulfosuccinimidyl] suberate-d0). O grupo funcional NHS-éster do BS³-d0 homobifuncional (braço espaçador 11.4 Å) reage principalmente com aminas primárias (ϵ -amino de lisina e N-terminal da proteína) espacialmente próximas (Rappsilber 2011; Sinz 2006) e, em menor escala, com cadeias laterais de serina. Inicialmente o PD-Jar foi incubado com cada uma das SVMP (razão molar 1:1) por 15 minutos à temperatura ambiente (25 °C). Posteriormente, o BS³ foi adicionado e, após 90 min, o equivalente a 20 μ L dos complexos e dos controles foram separados para avaliação da qualidade da reação por gel nativo e SDS-PAGE a 15% (Figura 4.9).

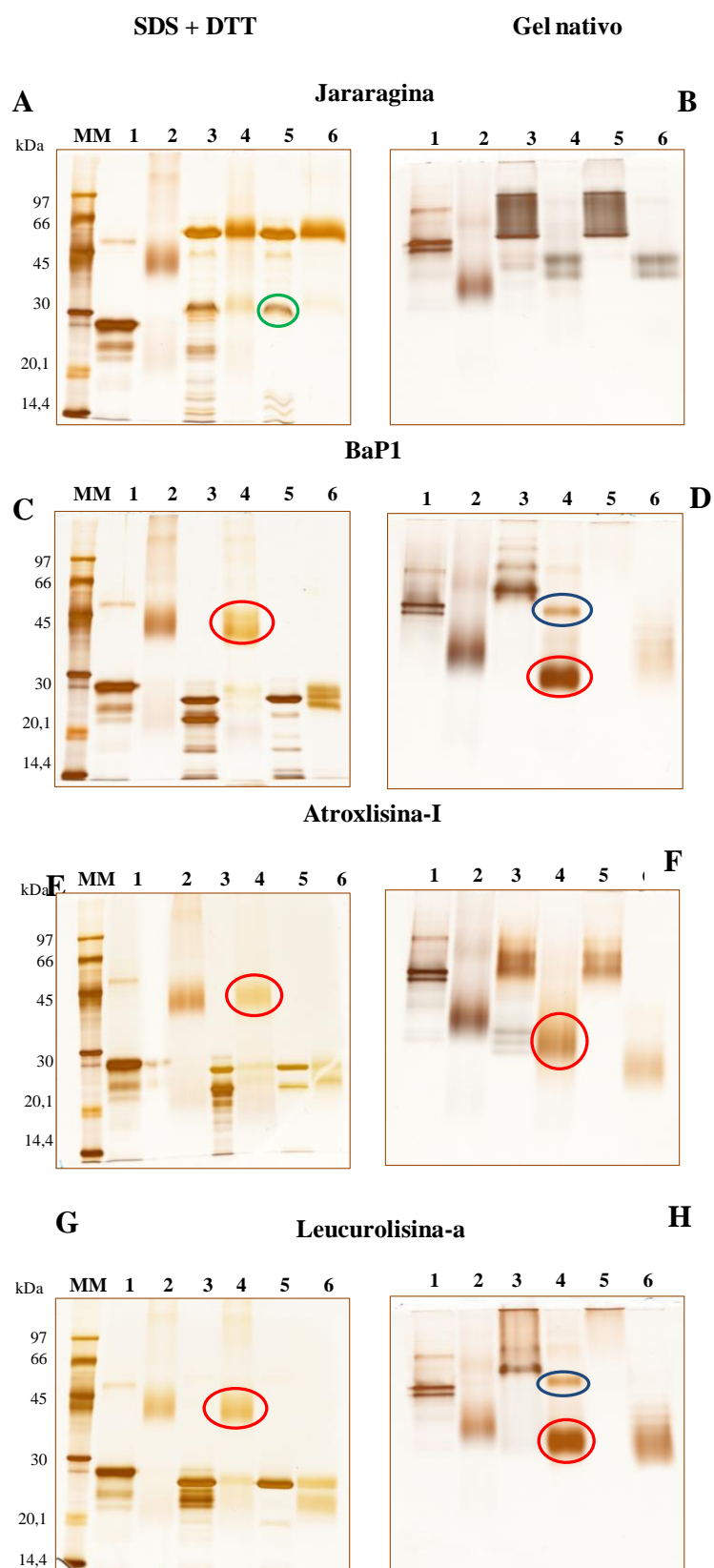


Figura 4.9: Análise da reação de formação de complexos entre PD-Jar e as SVMP estabilizados por BS³. SDS-PAGE 15 % sob condições desnaturantes e redutoras (Painéis C, E e G) e em gel nativo (Painéis B,D,F e H). MM – Massa molecular; 1 – PD-Jar; 2 – PD-Jar + BS³; 3 - PD-Jar + SVMP; 4 – PD-Jar + SVMP + BS³; 5 – SVMP; 6 – SVMP + BS³.O círculo verde indica uma banda que pode corresponder a jararagina-C; os círculos vermelhos indicam possíveis bandas de complexo e os azuis, complexos já confirmados através de gel nativo e identificação por espectrometria de massas (Figura 4.6).

Através das imagens dos géis SDS-PAGE, novamente nenhuma evidência de formação de complexo entre PD-Jar e jararagina foi observada. Por outro lado, é possível observar a presença de uma banda de cerca de 30 kDa (destacada com um círculo verde) na jararagina controle (raia 5), que desaparece quando o reagente de *cross-linking* foi adicionado à reação (raia 6). Este resultado pode indicar que o BS³ estabilizou covalentemente a ligação da jararagina-C com a jararagina, o que reforçaria a hipótese previamente sugerida por Moura-da-silva e colaboradores (Moura-da-Silva *et al.* 2003).

Assim como observado no ensaio de degradação (Figura 4.6), o PD-Jar foi degradado após incubação com todas as SVMP (Figura 4.9, raias 3, SDS+DTT). Entretanto, ao incubar os complexos com BS³ (Figura 4.9, raias 4, SDS+DTT), os produtos de degradação mostraram menor mobilidade eletroforética (destacado com um círculo vermelho), sugerindo a formação de ligações covalentes entre eles. O padrão de migração das bandas do PD-Jar + BS³ e PD-Jar + SVMP-PI + BS³ são bastante similares, não sendo possível afirmar se houve formação de complexo entre o PD-Jar e as SVMP-PI pela imagem dos géis SDS-PAGE. Isto pode ter ocorrido devido ao PD-Jar e as SVMP-PI possuírem massa molecular muito próxima (cerca de 20 kDa) e do PD-Jar formar dímero como previamente mostrado (Figura 4.6). Dessa forma, os complexos [PD-Jar + PD-Jar] e [PD-Jar + SVMP-PI] estabilizados com BS³ poderiam apresentar padrões de migração muito semelhantes.

Por isso, também analisamos a eficiência da reação de *cross-linking* por gel nativo. Pela imagem do gel nativo da reação do PD-Jar com jararagina (Figura 4.9, gel B), também não é possível verificar se houve formação de complexo, pois aparentemente não houve diferença entre as bandas de [PD-Jar + jararagina + BS³] (raia 4) e [jararagina + BS³] (raia 6). Entretanto, no caso das SVMP de classe PI (Figura 4.9, géis D, F, H), é possível observar bandas de complexo [PD-Jar + SVMP-PI + BS³] (raias 4) com perfis de migração diferentes dos controles [PD-Jar + BS³] (raia 2) e [SVMP-PI + BS³] (raia 6). A banda referente ao PD-Jar incubado com atroxlisina-I e BS³ (raia 4, gel F) foi similar à identificada no primeiro ensaio de formação de complexo (Figura 4.6), posteriormente confirmado como produto de degradação por espectrometria de massas (Tabela 4.2). Isto provavelmente indica formação de reações cruzadas entre os produtos de degradação do PD-Jar por ação do BS³.

Nas raias referentes ao PD-Jar incubado com BaP1 (Figura 4.9, gel D, raia 4) ou leucurolisina-a (Figura 4.9, gel H, raia 4) e BS³, houve formação de duas bandas. O perfil das

bandas de menor intensidade (assinaladas com um círculo azul) é semelhante ao das bandas 11 e 16 identificadas como complexo ([PD-Jar + BaP1] e [PD-Jar + leucurolisina-a]) no gel nativo (Figura 4.6). Entretanto, as bandas de maior intensidade (assinaladas com círculo vermelho), equivalentes às bandas 11b e 18 de degradação do PD-Jar observadas no primeiro ensaio de formação de complexo em gel nativo (Figura 4.6), foram significativamente mais intensas. Considerando que utilizamos para as reações de *cross-linking* vinte vezes mais de cada proteína (PD-Jar e SVMP) do que no primeiro ensaio (Figura 4.6) e que após a adição do BS³ as amostras são incubadas por mais 90 min (além dos 15 min iniciais de reação), é possível que tenha ocorrido uma degradação mais extensa do PD-Jar e que esses produtos tenham se complexado na presença de BS³, gerando uma banda de degradação de maior intensidade.

Para confirmar a formação de *cross-linking* entre o PD-Jar e as SVMP, após a reação com BS³, os complexos foram purificados por cromatografia de exclusão molecular, dessalinizados e tripsinizados para análise por espectrometria de massas de alta resolução (nanoLC-MS/MS). Os dados oriundos da espectrometria de massas foram analisados utilizando o programa SIM-XL (Lima *et al.* 2015) dentro da suite de programas *PatternLab for Proteomics* (Carvalho *et al.* 2016).

Considerando que através dos resultados previamente mostrados o PD-Jar só parece formar complexo claro com BaP1 e leucurolisina-a, estes foram estabilizados covalentemente com BS³, analisados por espectrometria de massas e os resultados interpretados pelo programa SIM-XL. Os espectros de fragmentação dos peptídeos de *cross-linking* entre PD-Jar e BaP1 (Figura 4.10) mostraram melhor qualidade do que os de PD-Jar com leucurolisina-a (Figura 4.11).

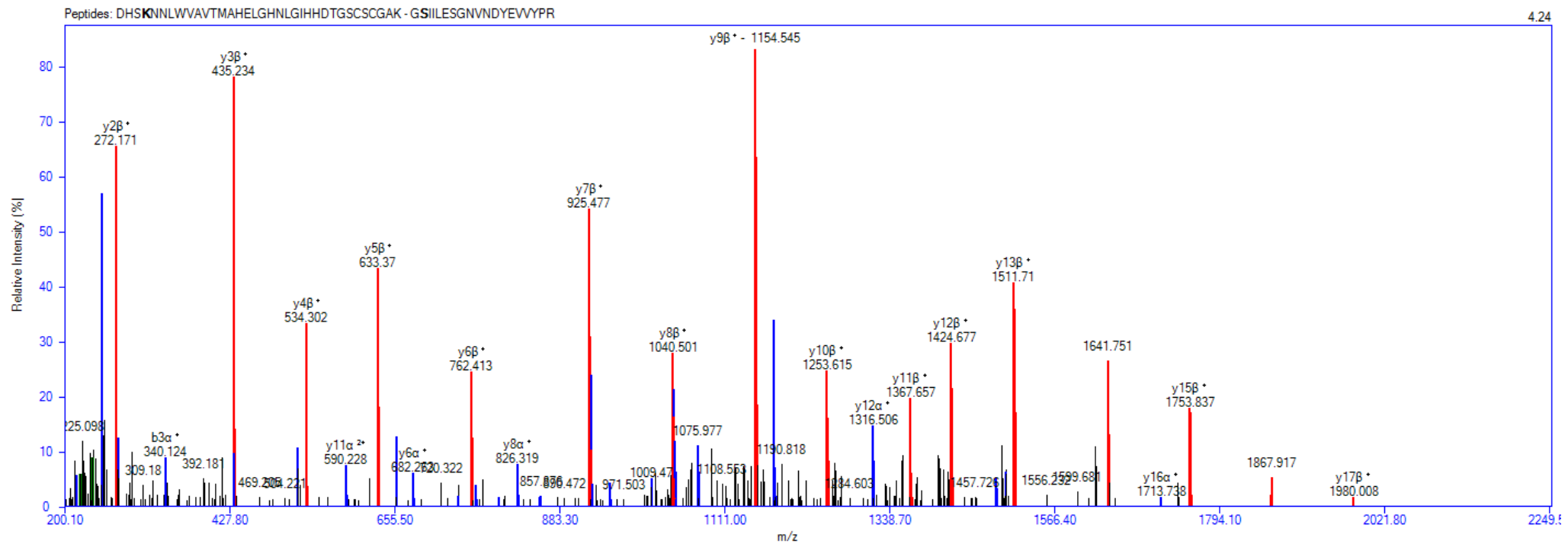
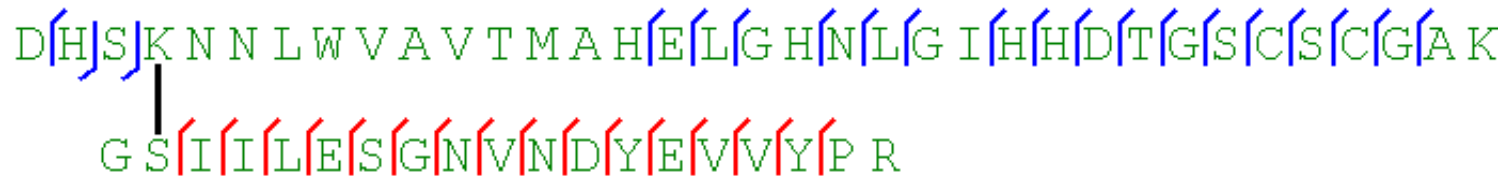


Figura 4.10: Espectro de fragmentação (MS/MS) referente aos peptídeos de BaP1 (picos azuis) e PD-Jar (picos vermelhos) ligados cruzadamente pelo reagente BS³. Essa figura foi gerada pelo programa SIM-XL (Lima *et al.* 2015). O programa representa em azul os íons-fragmento provenientes do peptídeo alfa (mais longo), enquanto que os íons-fragmento do peptídeo beta são representados em vermelho.

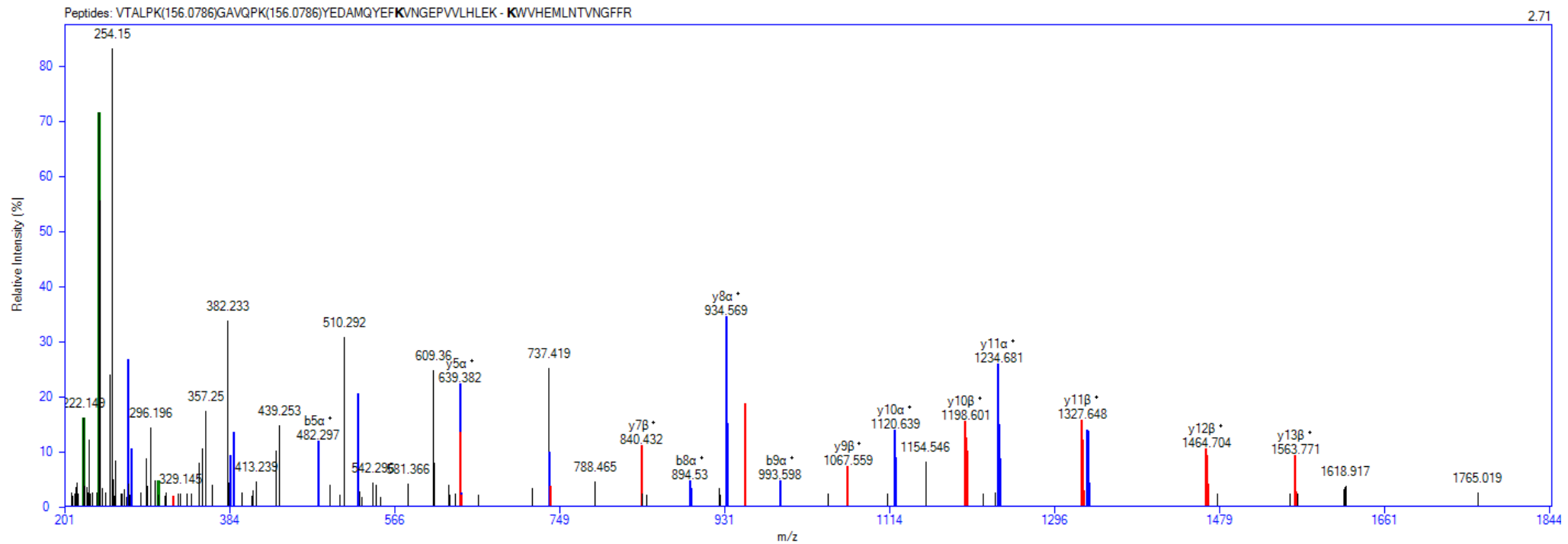


Figura 4.11: Espectro de fragmentação (MS/MS) referente aos peptídeos de Leucurolisina-a (picos vermelhos) e PD-Jar (picos azuis) ligados cruzadamente pelo reagente BS³. Essa figura foi gerada pelo programa SIM-XL (Lima *et al.* 2015). O programa representa em azul os íons-fragmento provenientes do peptídeo alfa (mais longo), enquanto que os íons-fragmento do peptídeo beta são representados em vermelho

Os dados gerados pelo SIM-XL foram submetidos ao programa xiNET (Combe *et al.* 2015) para visualização gráfica dos *cross-links* inter e intra-proteínas (Figura 4.12).

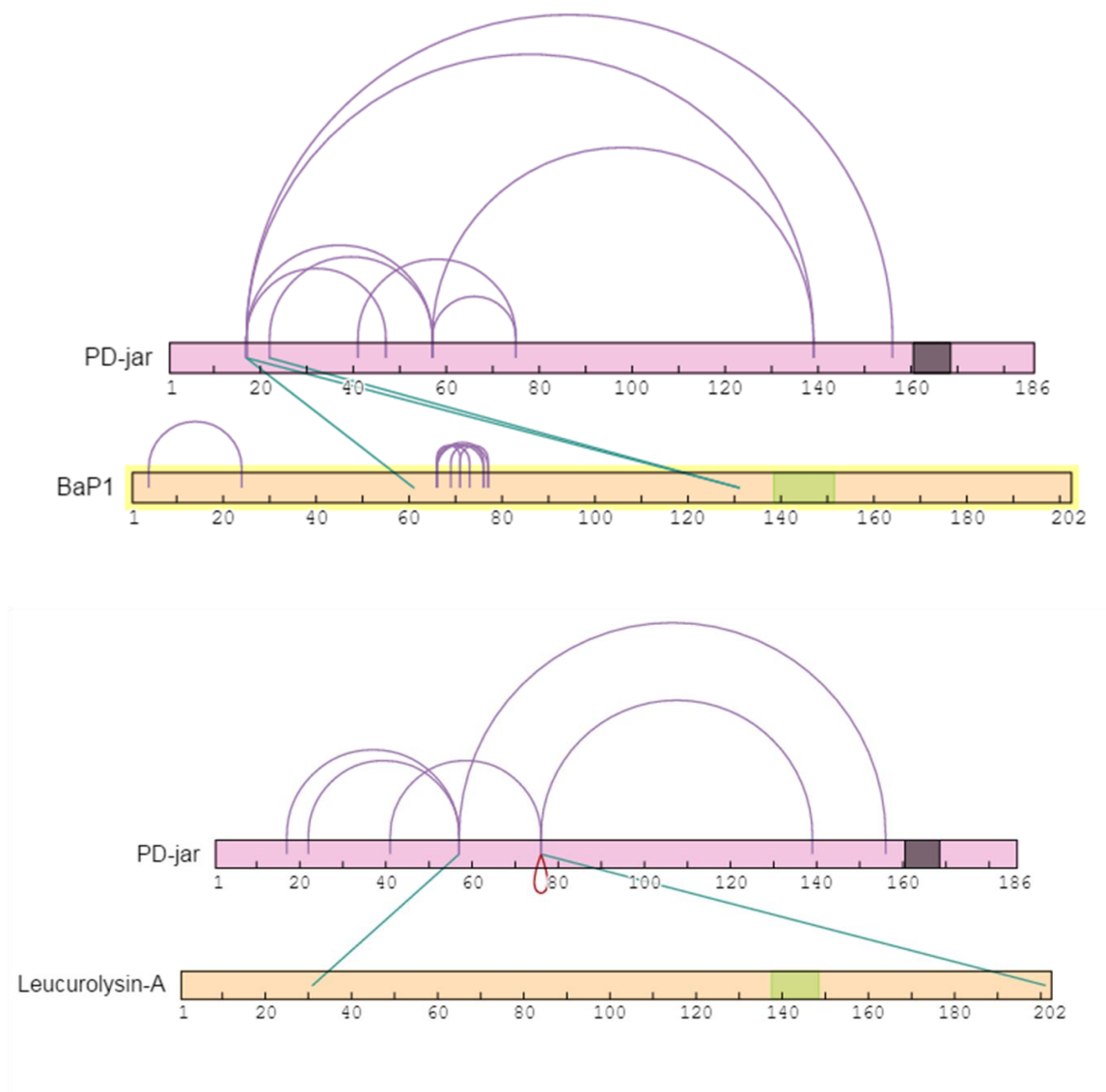


Figura 4.12: Representação gráfica dos *inter-* e *intra-links*. A figura foi gerada no programa xiNET (Combe *et al.* 2015) com os dados de espectrometria de massas analisados no programa SIM-XL (Lima *et al.* 2015). A região destacada em roxo escuro no PD-Jar indica a região conservada (PKMCGVT) do pró-domínio de SVMP; a região destacada em verde no domínio metalopeptidase representa o sítio catalítico; os *intra-links* estão representados em lilás; os *cross-links* estão representados em azul.

Através da análise de *cross-linking*, o resultado da BaP1 foi o mais informativo. Pela análise dos *cross-links* entre PD-Jar e BaP1, foi possível observar que dois *interlinks* foram localizados próximos à região do sítio catalítico da BaP1. A análise dos *intra-links* de PD-Jar, que pode fornecer informações acerca da estrutura da proteína, mostrou que a região que

reagiu com a BaP1 provavelmente está espacialmente próxima à região conservada do pró-domínio, o que pode ser uma evidência para a hipótese do *cysteine-switch* em SVMP. No caso da leucurolisina-a, embora os *intralinks* identificados no PD-Jar indiquem que a interação com a SVMP se deu em uma região espacialmente próxima à sequência conservada do *cysteine-switch*, outras análises serão necessárias para confirmação da região de interação.

Com base no exposto, serão necessários novos ensaios de *cross-linking*, utilizando diferentes razões molares (2:1 PD-Jar para SVMP, por exemplo) e diferentes enzimas para digestão dos complexos, buscando otimizar a identificação de peptídeos de *cross-linking*, que geralmente são maiores e muitas vezes não são bem fragmentados/sequenciados por espectrometria de massas. Além disso, estudos de modelagem molecular utilizando as estruturas cristalinas de BaP1 (Watanabe *et al.* 2003), leucurolisina-a (Ferreira *et al.* 2009) e botropasina (que apresenta 95.5% de identidade com jararagina) (Muniz *et al.* 2008) serão essenciais para determinação das regiões de interação entre o PD-Jar e as SVMP.

Em resumo, os resultados desta parte do trabalho mostraram que o pró-domínio recombinante de jararagina (PD-jar) é capaz de formar complexo com as SVMP-PI BaP1, atroxlisina-I e leucurolisina-a, sendo a razão molar de 2:1 (PD-Jar:SVMP-PI) a ideal para completa depleção de SVMP na forma livre. Porém, todas as SVMP testadas foram capazes de degradar o PD-Jar em maior ou menor escala. Através da análise de *cross-linking* entre PD-Jar e BaP1, foram identificados peptídeos de *cross-linking* próximos da região do sítio catalítico das metalopeptidases e da sequência conservada do pró-domínio, o que pode ser uma evidência para o mecanismo do *cysteine-switch* nas SVMP. Mais estudos ainda são necessários para determinar se PD-Jar é um bom modelo para o desenvolvimento de inibidores específicos de SVMP, pois aparentemente ele está funcionando preferencialmente como substrato das SVMP. Entretanto, ele pode ser explorado para elucidação do mecanismo de ativação e controle das SVMP.

Vale ressaltar que esses resultados iniciais, em conjunto com os dados de inibição de atividade de jararagina pelo peptídeo sintético ENVEKEDEAPKMCG-NH₂, podem abrir novos caminhos para gerar fármacos que auxiliem na minimização dos efeitos locais decorrentes do envenenamento, em especial a hemorragia.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

(PARTE 3)

4.3 Peptidoma de *Bothrops jararaca*: busca por novas atividades biológicas através da abordagem de *connectivity map* (C-Map)

4.3.1 Obtenção do peptidoma de *Bothrops jararaca*

Para avaliar se o peptidoma de *Bothrops jararaca* poderia também representar um criptoma, inicialmente utilizamos a mesma abordagem proteopeptidômica previamente estabelecida (Nicolau 2012) para obtenção das 24 frações do proteopeptidoma e realizamos um SDS-PAGE para verificar se a resolução da separação havia sido a mesma das análises anteriores (Figura 4.13).

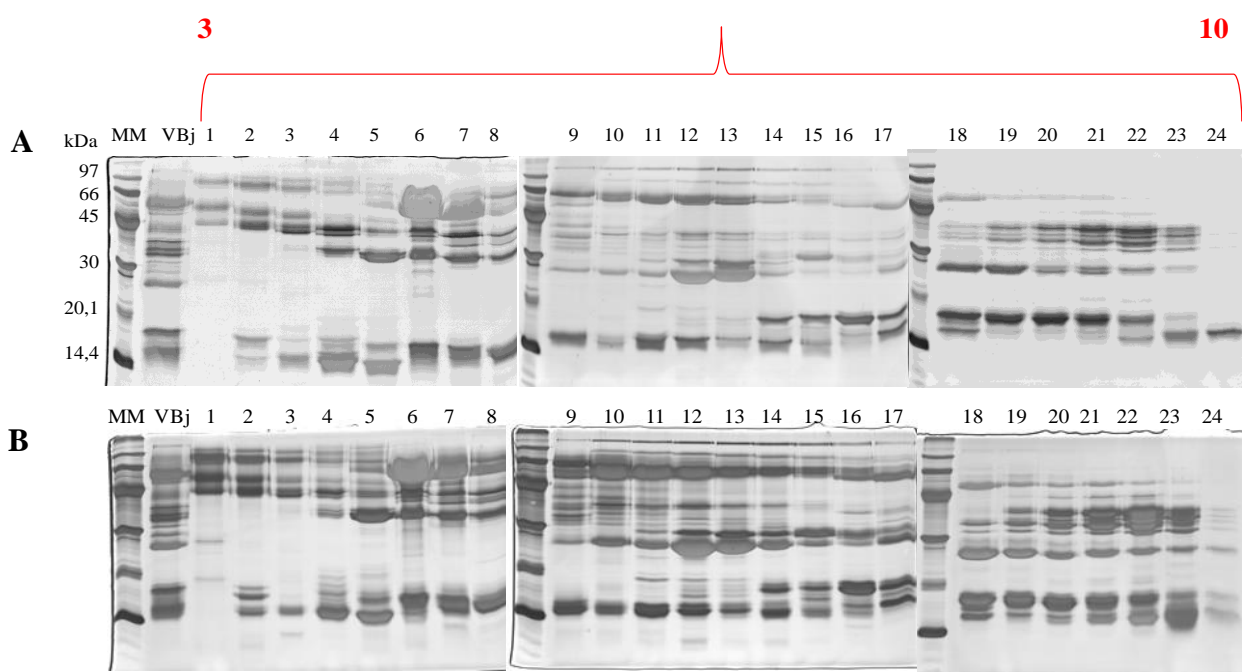


Figura 4.13: Comparação entre a reprodutibilidade do fracionamento do veneno de *B. jararaca* por OFFGEL no nosso primeiro trabalho (A) (Nicolau 2012) e no presente trabalho (B). SDS-PAGE a 15% revelado por impregnação por prata das amostras recuperadas em solução após o fracionamento por OFFGEL no intervalo de pH de 3 a 10 e 24 poços. MM – padrões de massa molecular; VBj – solução de *B. jararaca* antes do fracionamento por OFFGEL.

Posteriormente, as 24 frações (cada fração em quadruplicata técnica, produto de 4 corridas de OFFGEL) foram unidas em *pools* para que obtivéssemos uma quantidade de peptídeos naturais suficiente para purificar. Os *pools* A (frações 1 a 6), B (frações 7 a 12), C (frações 13 a 18) e D (frações 19 a 24), foram submetidos à cromatografia de fase reversa utilizando duas colunas semi-preparativas (C4 e C18) em sequência. Idealmente as proteínas se ligariam na coluna C4, os peptídeos na coluna C18 e, os componentes do tampão das amostras passariam direto pelas colunas e em seguida, as proteínas e os peptídeos seriam eluídos separadamente (Figura 4.14).

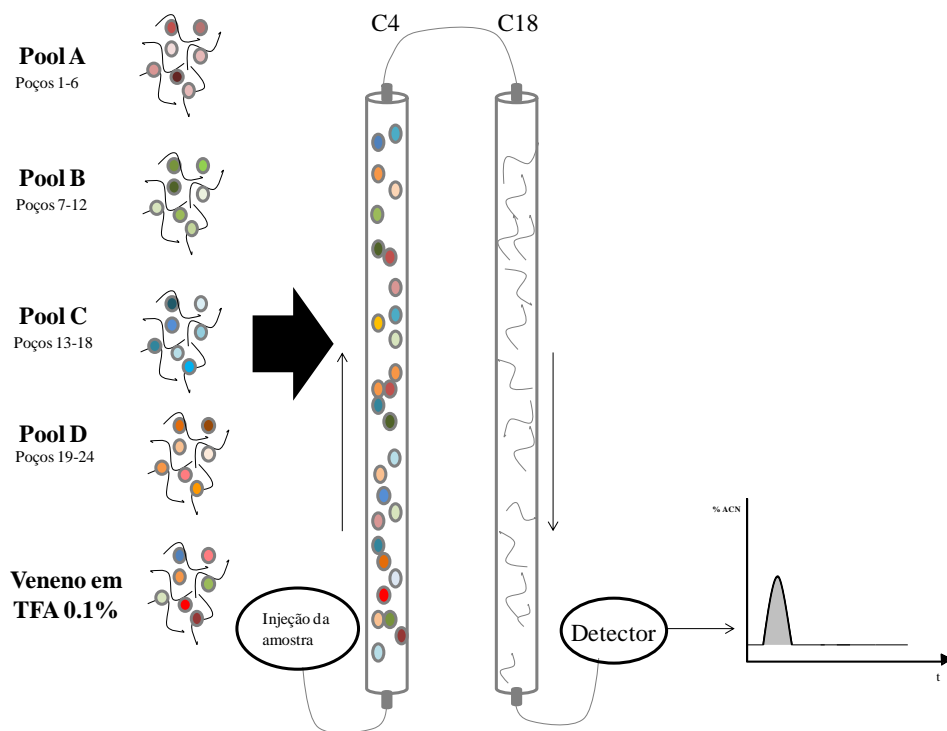
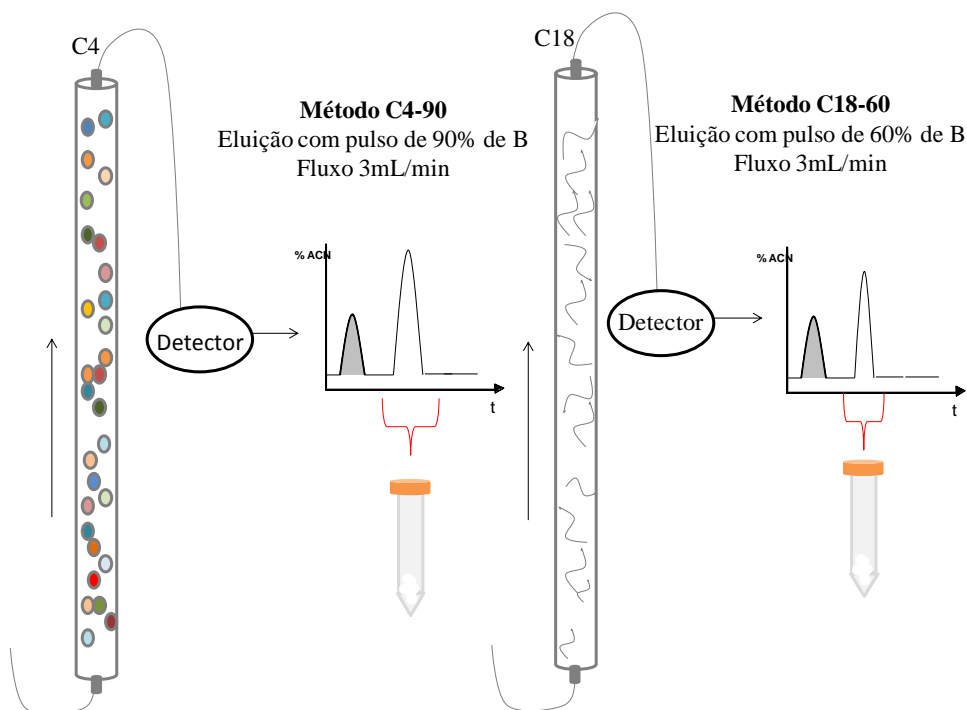
A**B**

Figura 4.14: Esquema representando a abordagem cromatográfica (C4-C18 em seqüência) utilizada para concentração/dessalinização dos *pools* obtidos após fracionamento do veneno por *OFFGEL* ou de 9 mg de veneno de *B. jararaca* sem fracionamento prévio. O painel A representa a injeção da amostra nas colunas C4 e C18 conectadas, em seqüência, e a ligação das proteínas na coluna C4 e dos peptídeos na coluna C18. O Painel B representa a eluição das proteínas e peptídeos separadamente com pulsos de 90% e 60% de fase móvel B (0,1% de TFA em acetonitrila), respectivamente.

Entretanto, não foi possível purificar os peptídeos na coluna C18, uma vez que os anfólitos presentes na solução de *OFFGEL* possuem características físico-químicas muito semelhantes a peptídeos, incluindo absorção de luz UV, gerando a saturação do detector e um aumento na linha de base que tornou inviável a separação de *pools* de peptídeos contendo anfólitos. A figura 4.15 mostra o perfil de eluição dos anfólitos contidos na solução *OFFGEL* utilizada para solubilizar as amostras. É possível observar a eluição de diferentes picos, o que sugere que os anfólitos tenham hidrofobicidades diferentes, assim como peptídeos em geral (Figura 4.15).

Anfólitos são ácidos poliamínicos e policarboxílicos alifáticos que apresentam diferentes valores de pK e pI (Righetti e Drysdale 1974). Além de suas propriedades anfotéricas, são carreadores, ou seja, são ótimos condutores de corrente elétrica (Sebastiano *et al.* 2006). Desde a implementação das fitas de gel com gradiente imobilizado de pH (Gorg *et al.* 1988), sua propriedade condutora e, conseqüentemente, estabilizadora da corrente elétrica ao longo de toda a fita de gel é importante na focalização isoelétrica e por isso os anfólitos ainda são utilizados nos tampões de amostra. Além disso, os anfólitos presentes nos tampões de amostra auxiliam na solubilização desta, sem interferir no gradiente imobilizado de pH na fita. Entretanto, algumas características dos anfólitos podem interferir na purificação de peptídeos: (i) geralmente apresentam massa molecular entre 300 e 1000 Da, apesar de alguns anfólitos apresentarem massa molecular de 1000 a 5000 Da (mesmo intervalo de massa da maioria dos peptídeos naturais); (ii) apresentam propriedades ópticas que podem interferir em reações colorimétricas de dosagem de proteína e de atividades biológicas; (iii) anfólitos podem formar ligações com peptídeos, uma vez que já foi reportado na literatura que anfólitos podem se ligar irreversivelmente a proteínas, provavelmente através de ligações de hidrogênio (Bauman, 1975). Tendo em vista essas limitações, optamos por realizar um fracionamento por *OFFGEL* seguindo exatamente as condições prévias, porém, na ausência de anfólitos.

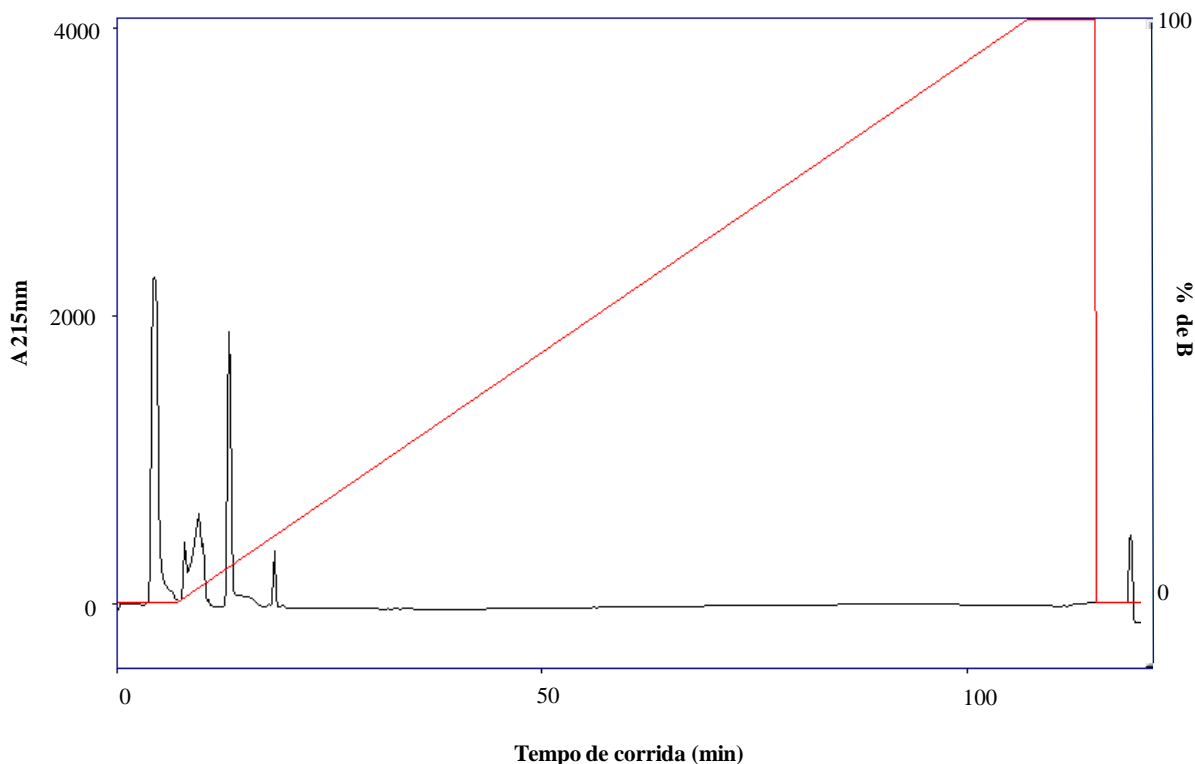


Figura 4.15: Perfil de eluição dos anfólitos contidos na solução do *OFFGEL* utilizada na solubilização do veneno para posterior fracionamento. Duzentos microlitros da solução *OFFGEL* [7 M de uréia, 2 M de tiouréia, 60 mM de ditiotretitol, 4,8% (v/v) de glicerol e 1 % (v/v) de anfólitos (pH de 3 a 10)] com 20% de fase móvel B (0,1% de TFA em acetonitrila) foram aplicados na coluna semi-preparativa C18 com um gradiente de 10 a 100 % de fase móvel B em 100 min.

Através da comparação entre os géis SDS-PAGE das 24 frações obtidas após o fracionamento na presença ou ausência de anfólitos, foi possível observar algumas diferenças no padrão de distribuição das bandas principalmente nos poços correspondentes às regiões mais ácidas (1 a 8) e básicas (18 a 24) (Figura 4.16). Entretanto, mesmo na ausência de anfólitos é possível verificar uma boa resolução de separação.

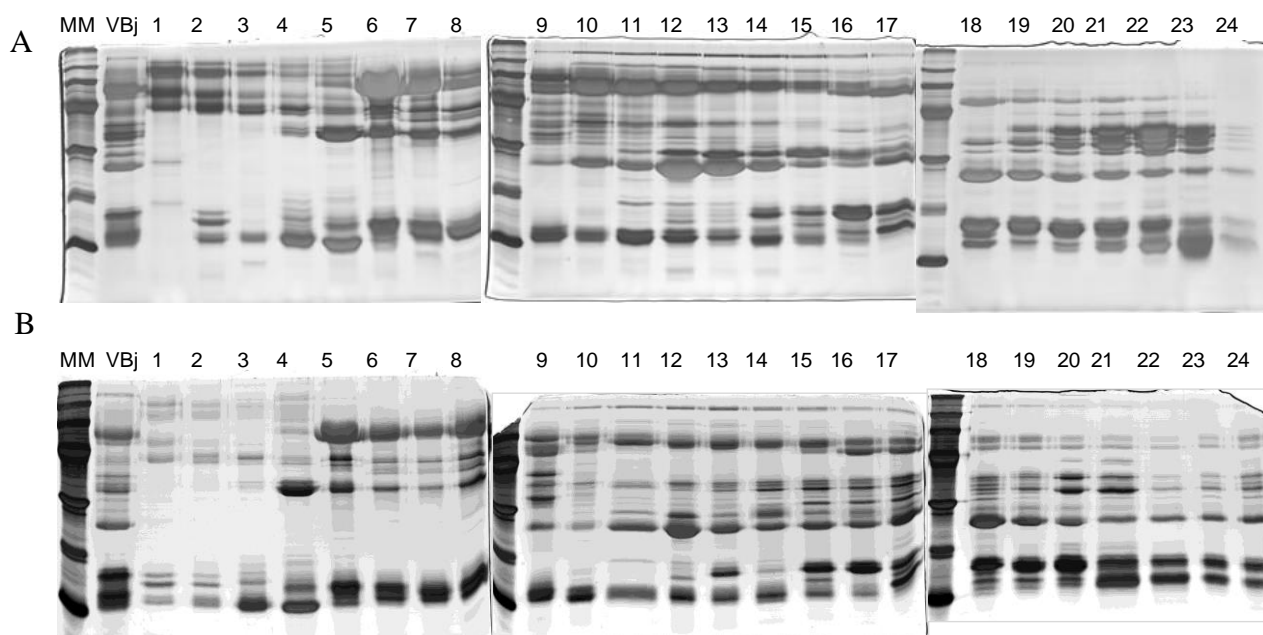


Figura 4.16: comparação da resolução de separação das 24 frações após fracionamento por *OFFGEL* (24 cm, intervalo de pH de 3 a 10) na presença (painel A) ou ausência (painel B) de anfólitos. Foram utilizados géis SDS-PAGE a 15% corados por impregnação por prata. MM – padrão de massa molecular; VBj – solução de veneno de *B. jararaca* em tampão *OFFGEL*, na presença ou ausência de anfólitos.

Por isso, dividimos as 24 frações em 4 *pools* (A – D), como previamente descrito, e submetemos cada *pool* ao fracionamento por cromatografia de fase reversa (C4 - C18 em sequência). Além dos 4 *pools*, também purificamos 9 mg (3 corridas de 3 mg) de veneno bruto de *B. jararaca* dissolvido em 0,1% de TFA em água (Figura 4.14). Após a eluição dos peptídeos em 60% do eluente B, as amostras foram liofilizadas e a quantidade de peptídeo foi estimada pelo método de “pesada seca”. Entretanto, só conseguimos estimar a quantidade de peptídeos purificados a partir do veneno bruto e do *pool* A de *OFFGEL* (sem anfólito), que originaram 0,3 mg e 0,5 mg de peptídeos, respectivamente. Os outros *pools* (B-D) provavelmente apresentavam uma quantidade significativamente menor de peptídeos e, por isso, não conseguimos mensurá-los pelo método da “pesada seca”.

Considerando que as etapas de identificação por espectrometria de massas de amostras oriundas pós-fracionamento por *OFFGEL* são significativamente laboriosas e consomem muito tempo de máquina e que a purificação dos peptídeos pela abordagem C4-C18 apresentou um baixo rendimento de peptídeos para posteriores análise biológicas, optamos por implementar uma abordagem simplificada para o fracionamento rápido do proteopeptidoma de *B. jararaca* partindo de grandes quantidades de veneno. Esta abordagem consistiu no fracionamento de 40 mg de veneno de *B. jararaca* em membranas de exclusão

molecular (Amicon) de *cut-offs* (cortes) de 3 ou 10 kDa, seguido de purificação dos peptídeos, que passaram direto pelos poros da membrana, em coluna de C18. Os picos eluídos com pulso de 60% da fase móvel B (Figuras 4.17 e 4.18) foram coletados, 150 μ L foram separados para análise por nano-LC-MS/MS (Q/Exactive Plus) e o restante foi liofilizado. A quantidade de peptídeos purificada foi estimada por “pesada seca” e as proteínas que permaneceram concentradas acima dos valores de *cutoff* foram quantificadas pelo método do ácido bicinchonínico (BCA). Para cada 40 mg de veneno, obtivemos aproximadamente 1 mg de peptídeos (Tabela 4.3).

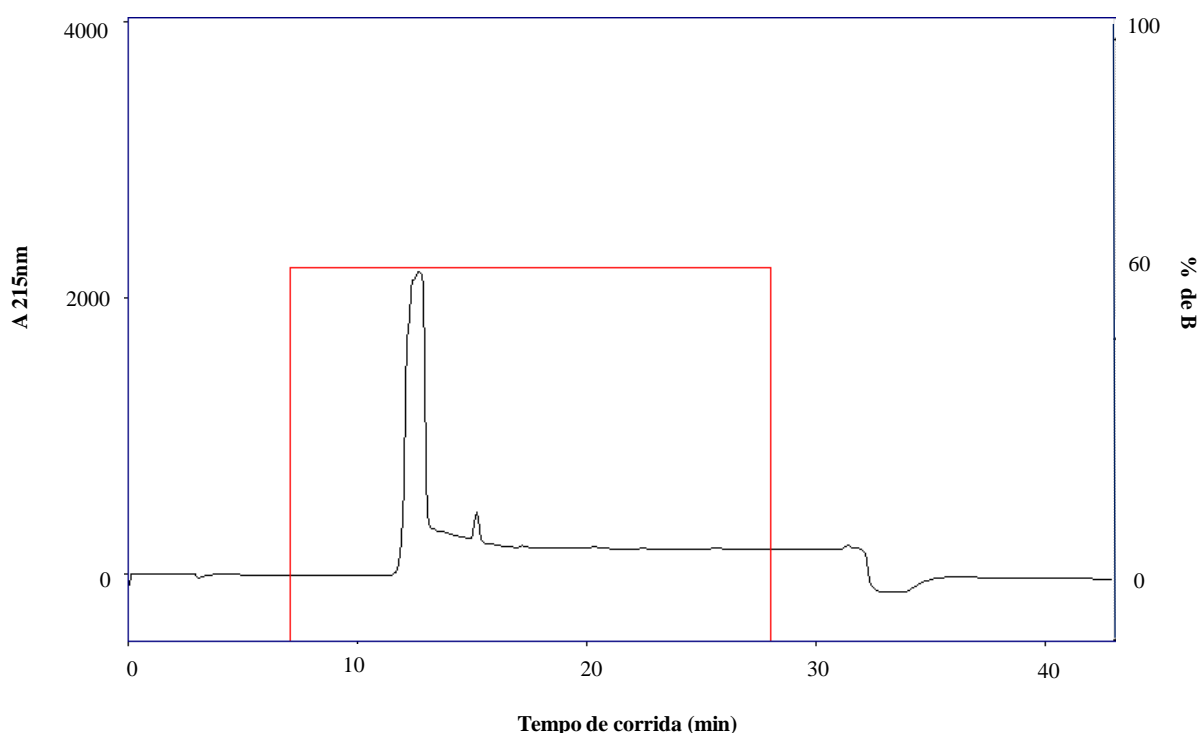


Figura 4.17: Perfil de eluição do peptidoma abaixo de 3kDa por cromatografia de fase reversa em coluna C18. Os peptídeos foram eluídos com um pulso de 60% de fase móvel B (0,1% de TFA em ácido fórmico).

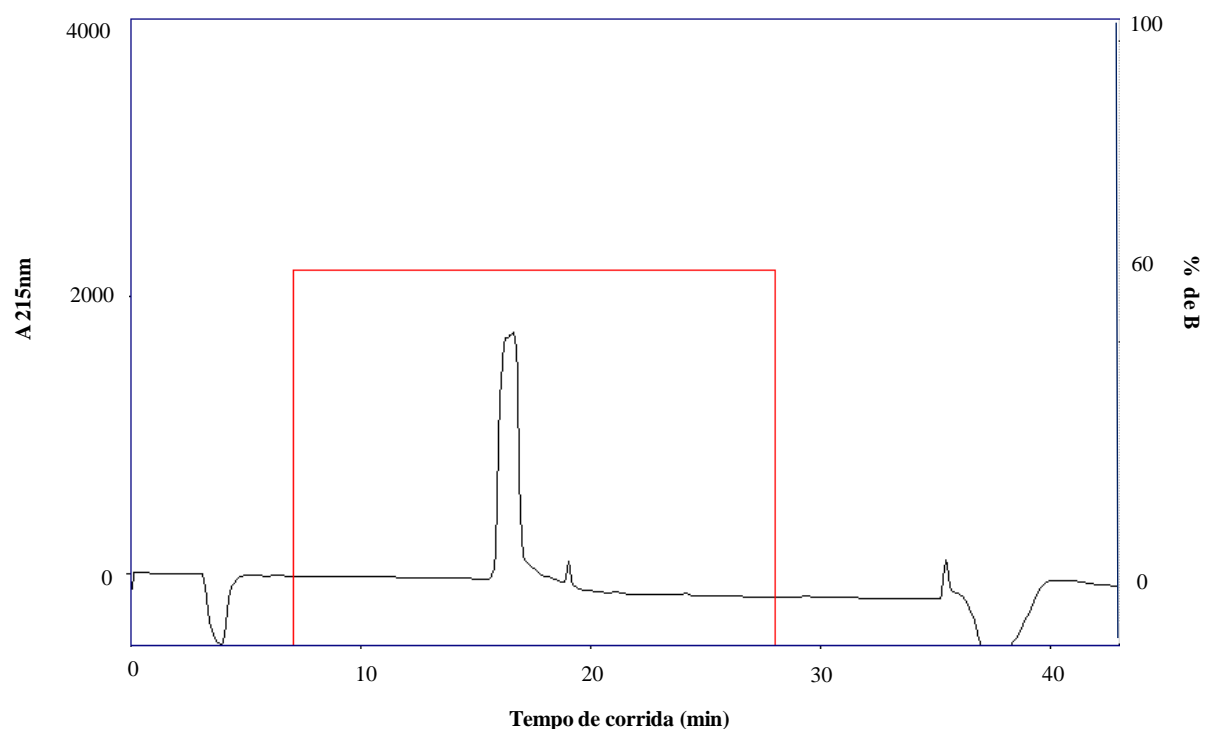


Figura 4.18: Perfil de eluição do peptidoma abaixo de 10kDa por cromatografia de fase reversa em coluna C18. Os peptídeos foram eluídos com um pulso de 60% de fase móvel B (0,1% de TFA em ácido fórmico).

Tabela 4.3 - Quantificação das frações de veneno de *Bothrops jararaca* enriquecidas em peptídeos ou proteínas, para os cortes de 3 kDa ou 10 kDa.

Composição ^a	Fração ^b	Quantidade (mg) ^b
Proteínas	3 kDa	22,5 ± 0,71 ^c
	10 kDa	24,5 ± 0,71
Peptídeos	3 kDa	0,98 ± 0,06
	10 kDa	1,31 ± 0,03

a - As frações enriquecidas em proteínas foram recolhidas no volume retido acima da membrana e aquelas contendo peptídeos, do filtrado. As frações peptídicas foram posteriormente concentradas e dessalinizadas por cromatografia de fase reversa C₁₈.

b - A quantidade de proteína foi estimada pelo método do ácido bicinchonínico e a quantidade de peptídeo foi avaliada pelo método de pesada seca.

c - Todas as análises foram feitas em duplicata e os dados estão reportados como média e desvio-padrão da média.

Os peptídeos liofilizados foram estocados a - 20 °C e posteriormente enviados para a Universidade da Virgínia (EUA) para varredura por atividades biológicas (realizada durante período de doutorado sanduíche no exterior, de junho a setembro de 2015). Os proteopeptidomas obtidos após o fracionamento por 3 kDa e 10 kDa foram analisados por LC-MS/MS (nano-LC-Q/Exactive).

4.3.2 – Análise proteopectidômica do veneno de *B. jararaca*

Para caracterizar os componentes presentes no proteoma e no peptidoma do veneno de *B. jararaca*, os peptídeos tripsínicos e naturais foram submetidos à nanocromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (Q/Exactive). A identificação dos peptídeos e proteínas foi realizada através do software PEAKS 7.5 utilizando uma taxa de falsa descoberta menor que 1% para *PSM* e peptídeos.

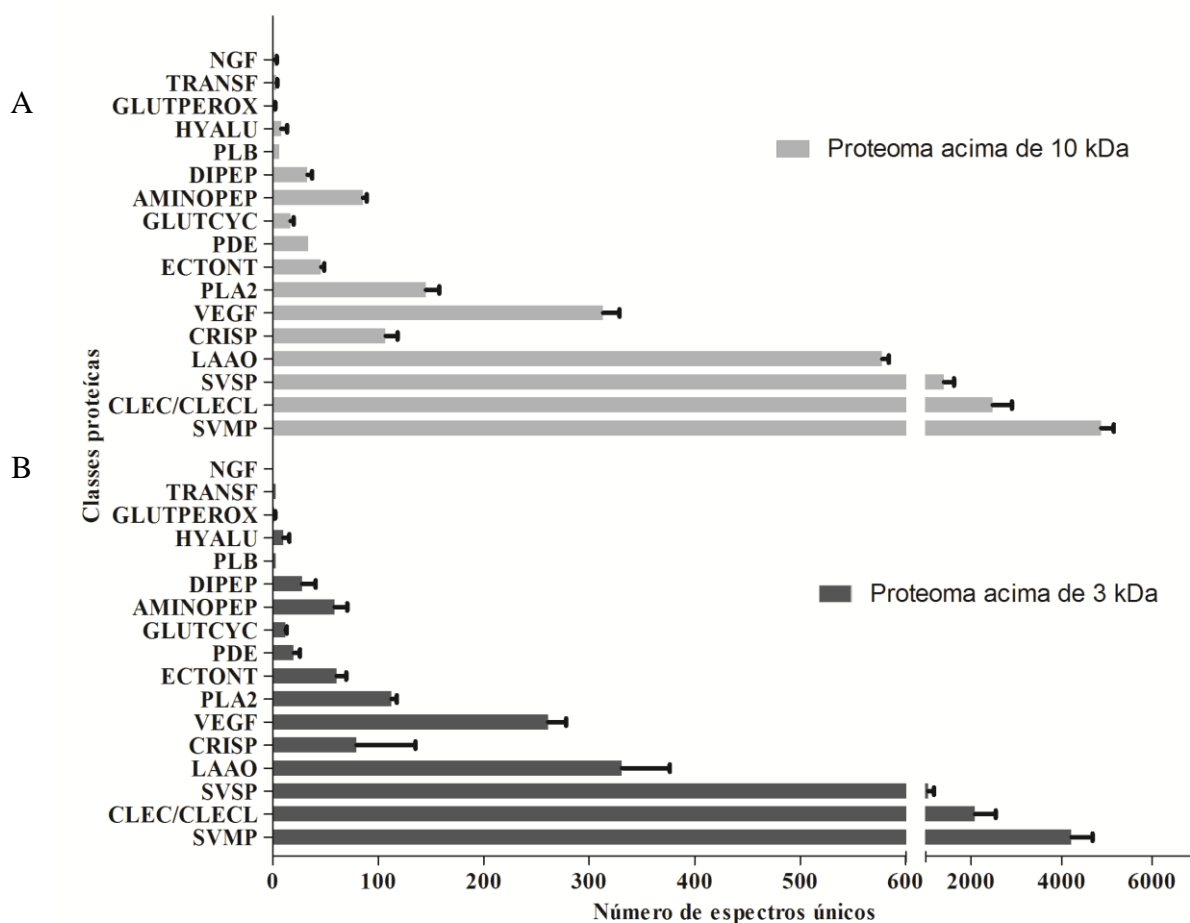


Figura 4.19: Classes proteicas identificadas no proteoma acima de 10 kDa (Painel A) e 3 kDa (Painel B) de *B. jararaca*. Para cada classe proteica o número de espectros totais identificados para cada peptídeo único (excluindo os redundantes) foi somado, excluindo-se possíveis redundâncias. SVMP – metalopeptidase de venenos de serpentes; CLEC/CLECL –

lectina tipo C/tipo C-símile de veneno de serpentes; SVSP – serinopeptidase de veneno de serpentes; LAAO – L-aminoácido oxidase; CRISP – proteína secretória rica em cisteína; VEGF – fator de crescimento de endotélio vascular; PLA₂ – fosfolipase A₂; ECTONT – ecto-5'-nucleotidase; PDIEST – fosfodiesterase; GLUTCYC – glutaminil ciclase; AMINOPEP – aminopeptidase; DIPEP – dipeptidase; PLB – fosfolipase B; HYALU - hialuronidase; GLUTPEROX – glutaciona peroxidase; TRANSF - transferrina; NGF – Fator de crescimento de nervo. Os resultados são decorrentes de dois experimentos independentes, tendo cada qual sido analisado em triplicata técnica por espectrometria de massas. O desvio padrão da média está representando para cada barra.

Nos proteomas acima de 3 e 10 kDa, identificamos um total de 17 grupos proteicos (Figura 4.19). Dentre esses grupos, identificamos grupos de proteínas conhecidamente menos abundantes em venenos de serpentes, tais como glutaminil ciclase, ecto-5'-nucleotidase, fosfodiesterase, hialuronidase, fosfolipase B, dipeptidase e aminopeptidase. Além disso, identificamos os grupos transferrina e glutaciona peroxidase, que não são comumente identificados em venenos de serpentes, e quando são identificados traços dessas proteínas, estes geralmente são associados à contaminação celular durante a extração do veneno. Esses grupos proteicos também foram recentemente identificados no veneno de *Crotalus durissus terrificus* utilizando diferentes estratégias para caracterização de proteínas menos abundantes neste veneno (Melani *et al.* 2015). Embora estes componentes estejam normalmente associados à contaminação do veneno com componentes celulares, eles poderiam eventualmente apresentar funções relacionadas a mecanismos de autoproteção da serpente, como descrito a seguir.

As transferrinas são enzimas ligadoras e carreadoras de ferro, conhecidamente presentes no plasma de todas as classes de vertebrados (Bobak *et al.* 1984). Isoformas de proteínas transferrina-símile já foram reportadas no veneno de *Pseudechis australis* (Georgieva *et al.* 2011), espécie que se alimenta majoritariamente de sapos, os quais são uma grande fonte de bactérias. Por isso, os autores sugeriram que as transferrinas poderiam ter uma função antibacteriana no veneno dessa espécie, uma vez que essas enzimas captam do meio o elemento essencial para o crescimento das bactérias, o ferro (Ratledge e Dover 2000). Apesar de jararacas adultas se alimentarem principalmente de roedores, quando jovens, sapos e lagartos são sua fonte de alimentação principal (Antunes *et al.* 2010). Vale ressaltar que a atividade antibacteriana já foi descrita em venenos desta espécie, porém, associada à atividade da enzima L-aminoácido oxidase (Ciscotto *et al.* 2009). A glutaciona peroxidase, por sua vez, poderia estar relacionada com um mecanismo de proteção da serpente ao estresse oxidativo

através da redução do peróxido de hidrogênio liberado pela atividade da L-aminoácido oxidase, em água (Brigelius-Flohe e Maiorino 2013; Ursini *et al.* 1995).

Com relação aos proteomas acima de 3 kDa e de 10 kDa, não houve diferenças significativas com relação ao número de espectros identificados por classe proteica, o que era esperado uma vez que no intervalo entre 3 e 10 kDa existem poucos representantes proteicos além de algumas desintegrinas (Calvete *et al.* 2005). A maior diferença observada entre os proteomas foi a falta de identificação de NGF no proteoma acima de 3 kDa. Entretanto, este grupo foi identificado no proteoma acima de 10 kDa somente com 3 espectros únicos associados, o que sugere que sua falta de identificação esteja relacionada com a aquisição no modo “dependente de dados” do espectrômetro de massas, que acaba privilegiando a identificação de íons mais abundantes (Liu *et al.* 2004).

Com relação à análise peptidômica, confirmamos a diversidade do peptidoma de *B. jararaca*, previamente reportada em nosso trabalho (Nicolau 2012), apesar de termos utilizado duas abordagens bastante distintas: (i) fracionamento por focalização isoeletrica *OFFGEL* e dessalinização em microcolunas C18 (Zip-Tip) seguida de análise das 24 frações por nanoLC-LTQ/orbitrap (MS/MS); (ii) exclusão molecular em membranas Amicon (*cutoffs* de 3 kDa e 10 kDa), dessalinização em coluna C18 semi-preparativa e análise por nanoLC-Q/Exactive Plus (MS/MS). Embora a abordagem de fracionamento por *OFFGEL* (Nicolau 2012) seja interessante para caracterização aprofundada do proteopeptidoma de qualquer amostra biológica, ela não é ideal para análises comparativas entre amostras ou para análises biológicas de suas frações devido ao grande número de frações e à dificuldade em se obter quantidade de amostra suficiente para ensaios biológicos (no caso do peptidoma). Portanto, mesmo que na abordagem *OFFGEL* seja identificada uma maior diversidade em classes proteicas devido à redução da complexidade das amostras, a abordagem de exclusão molecular implementada neste trabalho é mais simples, rápida e útil para comparação entre diferentes venenos e para geração de quantidades suficientes de peptídeos para ensaios biológicos.

Foi identificado um total de 12 classes proteicas, sendo a classe dos BPP a representante majoritária, seguida pelas classes metalopeptidase e L-aminoácido oxidase, que provavelmente são as mais suscetíveis à proteólise, dentre as classes mais abundantes no proteoma deste veneno (Figura 4.20). Em contrapartida, as classes lectina tipo C/tipo C-símile e serinopeptidase, que representam as segunda e terceira classes mais abundantes no proteoma de *B. jararaca*, respectivamente, foram representadas por poucos peptídeos em seus

peptidomas, indicando que estas classes poderiam ser mais resistentes à proteólise. Outra observação interessante foi a identificação de NGF no peptidoma abaixo de 3 kDa mas não no proteoma acima de 3 kDa. Embora seja possível que houvesse uma maior quantidade de NGF degradado do que íntegro no veneno, uma hipótese atrativa é que essa classe proteica, por ser menos abundante no veneno, só foi identificada no peptidoma porque este é significativamente menos complexo do que o proteoma, aumentando assim a probabilidade de peptídeos pertencentes a proteínas menos abundantes serem identificados. As proteínas ligadoras de cálcio (*nucleobindin protein*) e a peptidil-prolil cis-trans isomerase só foram identificadas no peptidoma de *B. jararaca*, sugerindo que essas classes também estejam presentes no proteoma em quantidades mínimas, inviabilizando suas identificações.

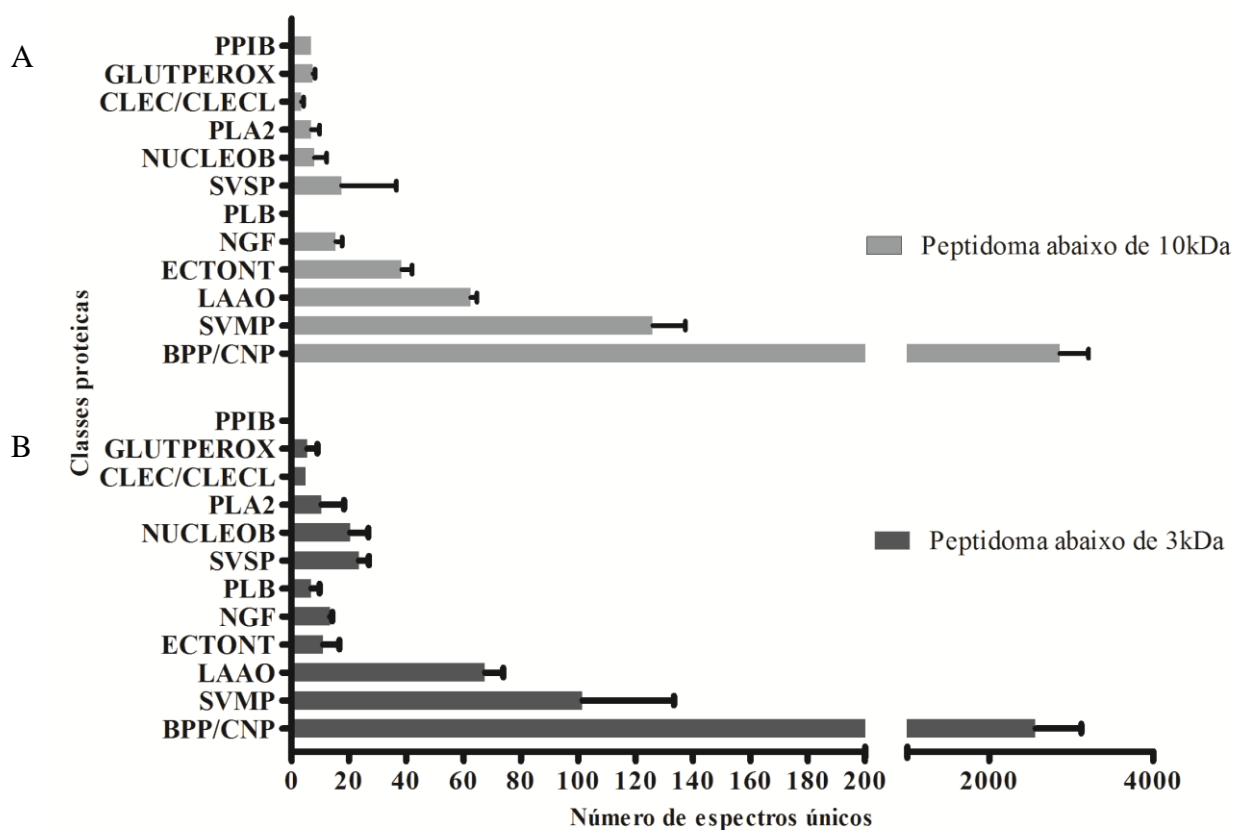


Figura 4.20: Classes proteicas identificadas nos peptidomas abaixo de 10 kDa (Painel A) e abaixo de 3 kDa (Painel B) do veneno de *Bothrops jararaca*. Para cada classe proteica o número de espectros totais identificados para cada peptídeo único (excluindo os redundantes) foi somado, excluindo-se possíveis redundâncias. BPP/CNP – Peptídeos potenciadores de bradicinina e peptídeo natriurético tipo-C; SVMP – Metalopeptidase de venenos de serpentes; LAAO – L-aminoácido oxidase; ECTONT – ecto-5'-nucleotidase; NGF – Fator de crescimento de nervo; PLB – fosfolipase B; SVSP – serinopeptidase de veneno de serpentes; NUCLEOB – *nucleobindin protein* (proteína ligadora de cálcio); PLA2 – fosfolipase A2; CLEC/CLECL – lectina tipo C/tipo C-símile de veneno de serpentes; GLUTPEROX – glutationala peroxidase e PPIB - peptidil-prolil cis-trans isomerase.

Outra observação interessante foi a identificação de peptídeos da região do pró-domínio de metalopeptidases em ambos peptidomas (Figura 4.21). Esse resultado está de acordo com nosso trabalho prévio (Nicolau 2012). Porém, é importante ressaltar que no presente trabalho o veneno foi dissolvido em água gelada e todo o experimento de fracionamento do veneno por exclusão molecular foi realizado a 4°C. Portanto, é improvável que esses peptídeos tenham sido gerados experimentalmente. Como previamente comentado na introdução desta tese é possível que estes peptídeos exerçam uma função de inibição temporária das SVMP até a inoculação do veneno (Portes-Junior *et al.* 2014). Podem também ser produtos de degradação do pró-domínio após a ativação das SVMP, além de apresentar alguma atividade biológica, representando criptídeos.

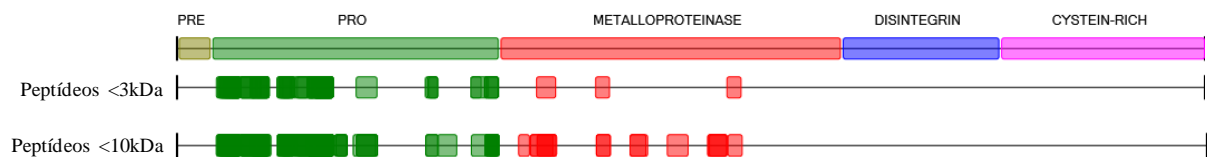


Figura 4.21: Cobertura de sequência da botropasina (SVMP-PIIIa) após análise peptidômica (< 3 kDa e < 10 kDa) do veneno de *Bothrops jararaca*. Os peptídeos foram identificados através da abordagem exclusão molecular (*cutoff* 3 kDa ou 10 kDa) + dessalinização em coluna semipreparativa C18 + nanoLC-MS/MS + identificação no programa PEAKS 7.5. A figura foi gerada pelo programa Caititu (Carvalho *et al.* 2008).

Com exceção da peptidil-prolil cis-trans isomerase que só foi identificada no peptidoma acima de 10 kDa, provavelmente por limitação técnica, não houve diferenças significativas entre os dois peptidomas, o que indica que o peptidoma de *B. jararaca* é composto majoritariamente por peptídeos de até 3 kDa de massa molecular. Por isso, para evitar uma contaminação da amostra de peptídeos com pequenas proteínas (entre 7 e 10 kDa), optamos por utilizar o peptidoma abaixo de 3kDa para os ensaios de varredura por atividades biológicas.

4.3.3 Varredura por potenciais atividades no peptidoma de *B. jararaca*

Para a varredura por atividades biológicas potenciais no peptidoma de *B. jararaca*, utilizamos duas abordagens: a genômica funcional e a plataforma bioinformática *connectivity map*. A genômica funcional no campo da Toxinologia consiste em analisar a expressão gênica de linhagens celulares tratadas com veneno ou com seus componentes. Através de análises de

função biológica dos conjuntos de genes super- e subexpressos, é possível identificar as vias de sinalização celular mais afetadas e associá-las aos possíveis efeitos secundários do envenenamento. Apesar de alguns trabalhos já terem avaliado os efeitos secundários do veneno de *B. jararaca* e seus componentes através da genômica funcional (Gallagher *et al.* 2005; Gallagher *et al.* 2003), essa é a primeira vez que os efeitos gerados pelo peptidoma de venenos de serpentes em linhagens celulares humanas foram analisados.

A abordagem utilizada consistiu em incubar células de câncer de mama (MCF7), que é a linhagem mais utilizada para a geração de dados para a biblioteca do C-Map, com o peptidoma (900 µg em 1 mL em duplicata), incubação por 6 h a 37 °C, extração do RNAm e análise da expressão gênica por microarranjo. Os genes diferencialmente expressos (super ou sub expressos) foram utilizados nas buscas na plataforma do C-Map (<https://www.broadinstitute.org/C-Map/>) (Figura 4.22).

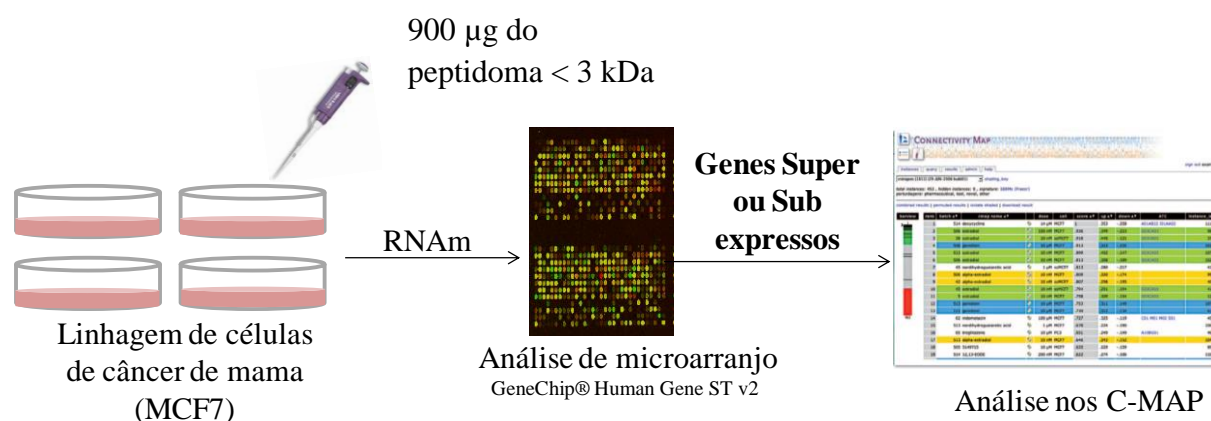


Figura 4.22: Esquema representativo da abordagem para varredura por atividades biológicas no peptidoma de *B. jararaca*.

Através da análise de expressão gênica, identificamos um total de 110 genes diferencialmente expressos (66 super- e 44 subexpressos). A tabela 4.4 lista os 20 genes de MCF7 que sofreram maior modulação após incubação com o peptidoma de *B. jararaca*.

Tabela 4.4 – Lista dos 20 genes considerados mais relevantes (neste trabalho) que foram superexpressos após o tratamento das células MCF7 com o peptidoma de *B. jararaca*.

Código do gene	<i>Fold Change</i>	Nome do gene
CYP1A1	10,29	<i>Cytochrome P450, Family 1, Subfamily A, Polypeptide 1</i>
VTRNA1-2	7,72	<i>Vault RNA 1-2</i>
HMOX1	7,54	<i>Heme oxygenase 1</i>
LRRC15	5,64	<i>Leucine Rich Repeat Containing 15</i>
SLC7A11	4,11	<i>Solute Carrier Family 7 (Anionic Amino Acid Transporter Light Chain, Xc- System), Member 11</i>
TMEM156	3,77	<i>Transmembrane Protein 156</i>
SECTM1	2,70	<i>Secreted And Transmembrane 1</i>
MT-TI	2,56	<i>Mitochondrially Encoded TRNA Isoleucine</i>
ABCG2	2,40	<i>ATP-Binding Cassette, Sub-Family G (WHITE), Member 2 (Junior Blood Group)</i>
CYP1B1	2,29	<i>Cytochrome P450, Family 1, Subfamily B, Polypeptide 1</i>
HECW2	2,28	<i>HECT, C2 And WW Domain Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase 2</i>
CREG2	2,14	<i>Cellular Repressor Of E1A-Stimulated Genes 2</i>
HAR1B	2,11	<i>Highly Accelerated Region 1B (Non-Protein Coding)</i>
RNA5-8SP5	2,03	<i>RNA, 5.8S Ribosomal Pseudogene 5</i>
SPRR1B	2,01	<i>Small Proline-Rich Protein 1B</i>
ALDH3A1	1,93	<i>Aldehyde Dehydrogenase 3 Family, Member A1</i>
GCLM	1,93	<i>Glutamate-Cysteine Ligase, Modifier Subunit</i>
ALDH1A3	1,92	<i>Aldehyde Dehydrogenase 1 Family, Member A3</i>
RNY4P19	1,90	<i>RNA, Ro-Associated Y4 Pseudogene 19</i>
SLC7A5	1,85	<i>Solute Carrier Family 7 (Amino Acid Transporter Light Chain, L System), Member 5</i>

Foram considerados diferencialmente expressos somente os genes que apresentaram um valor de *fold change* maior ou igual a 1,5 em comparação com as células controle. Entre os genes superexpressos, o gene CYP1A1 (citocromo P 450, família 1, subfamília A, polipeptídeo 1) foi o que apresentou um maior valor de *fold change* (10,3). O citocromo P 450 é uma proteína pertencente à classe heme-tiolato (Hrycay e Bandiera 2012) cuja função principal é catalisar reações envolvidas no metabolismo de drogas e síntese de colesterol, esteroides e outros

lipídeos. Entretanto um aumento em sua expressão pode estar relacionado a três diferentes atividades: (i) metabolismo do ácido araquidônico (Zordoky e El-Kadi 2010) liberado após a ação das fosfolipases A₂ (Teixeira *et al.* 2003); (ii) metabolismo do ácido araquidônico liberado pela ação da bradicinina, aumentada pela ação dos BPP (Allen *et al.* 1992) presentes no peptidoma; (iii) uso do peróxido de hidrogênio liberado pela ação das L- aminoácido oxidases como doador de oxigênio (Hrycay e Bandiera 2012). Já foi reportado na literatura que os produtos dos genes CYP1A1 e CYP1B1 (também superexpresso no presente trabalho) são capazes de gerar espécies reativas do oxigênio, que são um dos gatilhos para o início do processo de apoptose, através do metabolismo do ácido araquidônico (Galluzzi *et al.* 2012). Através de análise genômica funcional de células endoteliais de cordão umbilical (HUVECs), foi observado que os venenos de *Bothrops jararaca* e *Crotalus atrox* induzem um aumento significativo na expressão de transcritos associados a respostas inflamatórias e a apoptose (Gallagher *et al.* 2003). O veneno de *Echis carinatus* também gerou em HUVECs um aumento na expressão de genes associados a vias de espécies reativas de oxigênio, incluindo o citocromo P450 (Albrecht *et al.* 2011). Araki e colaboradores observaram que os venenos hemorrágicos, mas não os neurotóxicos, são capazes de induzir apoptose em células endoteliais mesmo em baixas concentrações (Araki *et al.* 1993). O gene HMOX-1, que também foi superexpresso nas células MCF7 incubadas com o peptidoma, geralmente é superexpresso em resposta ao estresse oxidativo (Seixas *et al.* 2009). Durante o estresse oxidativo algumas hemoproteínas, como o citocromo P 450, podem liberar seus grupos prostéticos heme. O ferro contido no grupo heme é considerado um agente citotóxico pró-oxidante, pois ele catalisa a produção de radicais livres através da química de Fenton (Fenton 1894). A enzima heme-oxigenase 1, codificada por HMOX-1, cataboliza o heme livre liberando monóxido de carbono, ferro e biliverdina (Paine *et al.* 2010). O ferro liberado do anel tetrapirrólico do heme é estocado pela ferritina e a biliverdina é convertida em bilirrubina, que é um agente antioxidante (Gozzelino *et al.* 2010). Por isso, é possível que o aumento na expressão do gene HMOX-1 de MCF7 tenha sido um mecanismo de *feedback* negativo em resposta à alta expressão de CYP1A1. Além disso, já foi reportado que a bilirrubina e o monóxido de carbono liberados pela ação da heme-oxigenase-1 apresentam ação antioxidante e tem um papel importantes em vias imunomodulatórias e anti-inflamatórias (Paine *et al.* 2010).

Com relação aos genes sub expressos (Tabela 4.5) é difícil avaliar vias metabólicas que tenham sido comprometidas, uma vez que a maioria dos transcritos está relacionada a pseudogenes, microRNAs e transcritos não caracterizados.

Tabela 4.5 – Lista dos 20 genes considerados mais relevantes (neste trabalho) que foram subexpressos após o tratamento das células MCF7 com o peptidoma de *B. jararaca*.

Código do gene	Fold Change	Nome do gene
MIR3135A	1	<i>MicroRNA 3135a</i>
RNA5SP338	0,93	<i>RNA, 5S Ribosomal Pseudogene 338</i>
MIR3132	0,84	<i>MicroRNA 3132</i>
XXbac-BPG116M5.15	0,84	-
LINC00202-2	0,83	<i>Long Intergenic Non-Protein Coding RNA 202-2</i>
TGFB2	0,79	<i>Transforming Growth Factor, Beta 2</i>
LOC100287704	0,78	-
RNA5SP462	0,76	<i>RNA, 5S Ribosomal Pseudogene 462</i>
LOC101927770	0,76	-
RNU6-922P	0,75	<i>RNA, U6 Small Nuclear 922, Pseudogene</i>
MIR4497	0,74	<i>MicroRNA 4497</i>
TRAV12-1	0,74	<i>T Cell Receptor Alpha Variable 12-1</i>
MYH16	0,71	<i>Myosin, Heavy Chain 16 Pseudogene</i>
RNA5SP113	0,70	<i>RNA, 5S Ribosomal Pseudogene 113</i>
RN7SKP214	0,69	<i>RNA, 7SK Small Nuclear Pseudogene 214</i>
MIR3911	0,69	<i>MicroRNA 3911</i>
RNA5SP160	0,69	<i>RNA, 5S Ribosomal Pseudogene 160</i>
MAGEC2	0,68	<i>Melanoma Antigen Family C2</i>
RP11-932O9.7	0,67	-
MIR3147	0,67	<i>MicroRNA 3147</i>

A análise funcional dos genes de MCF7 superexpressos (Figura 4.23), também revelou o envolvimento de processos apoptóticos, porém os processos metabólicos representaram a maior parte dos processos biológicos relacionados a esses genes, seguido dos processos celulares e imunológicos. Esses processos biológicos são inespecíficos e podem ser induzidos por quaisquer doenças ou disfunções homeostáticas, o que dificulta uma correlação dos genes

diferencialmente expressos com possíveis efeitos secundários ou atividades biológicas presentes no peptidoma. Apesar de a genômica funcional ser utilizada na Toxinologia para estudos de efeitos secundários do envenenamento, neste trabalho utilizamos uma linhagem celular de câncer de mama (MCF7), que não é o modelo ideal para esses estudos, uma vez que este tipo celular não é um alvo primário dos componentes dos venenos de serpentes. Entretanto, é interessante observar que mesmo não sendo o modelo ideal, o peptidoma foi capaz de induzir alterações na expressão gênica dessas células, sugerindo a presença de potenciais atividades biológicas nessa amostra. Além disso, vale ressaltar que a escolha da linhagem MCF7 foi importante para viabilizar a varredura por atividades biosemelhantes a drogas utilizando a biblioteca do *connectivity map*, que foi criada utilizando principalmente transcriptomas dessa linhagem celular.

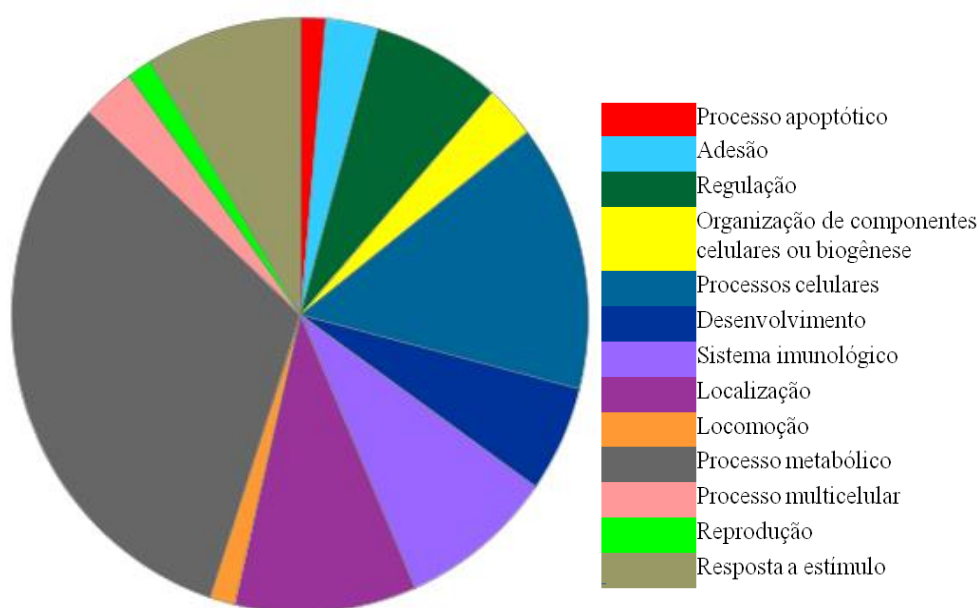


Figura 4.23: Análise funcional dos genes de MCF7 que foram superexpressos após a incubação destas células com o peptidoma de *B. jararaca*.

Desta forma, os genes diferencialmente expressos foram submetidos a buscas no C-Map. Após a busca no banco de dados de transcriptoma, o programa forneceu uma lista de fármacos que apresentaram maior correlação positiva com o peptidoma de *Bothrops jararaca*. A correlação positiva indica o grau de similaridade entre o conjunto de genes diferencialmente

expressos (super ou sub) gerados após incubar determinada linhagem celular com a sua amostra de interesse, em comparação com a ação de drogas conhecidas. Quanto maior a correlação positiva (valor mais próximo de 1), maior a similaridade. A droga que apresentou maior correlação positiva com o peptidoma do veneno de *Bothrops jararaca* foi a antimalárica primaquina (Tabela 4.6).

Tabela 4.6: Lista dos 30 fármacos que apresentaram maior correlação positiva com o peptidoma de *B. jararaca*

Fármaco	Score de correlação positiva	Ação
<i>Primaquine</i>	1	Antiparasitária (antimalárica)
<i>Leflunomide</i>	0,912	Imunossupressora (usada no tratamento de artrite reumatóide)
<i>Proscillaridin</i>	0,887	Tratamento de falência cardíaca congestiva e arritmia cardíaca
<i>Lomustine</i>	0,872	Agente alquilante (antitumoral)
<i>Isoxsuprine</i>	0,869	Vasodilatadora
<i>Isotretinoin</i>	0,840	Antiacne
<i>Valproic acid</i>	0,834	Antipsicótica
<i>Nifuroxazide</i>	0,825	Antibiótica
<i>Trichostatin A</i>	0,822	Antifúngica
<i>Raubasine</i>	0,794	Anti-hipertensiva
<i>Lisuride</i>	0,782	Antiparkinsoniana
<i>Rofecoxib</i>	0,781	Anti-inflamatória
<i>Rosiglitazone</i>	0,774	Antidiabetes
<i>Racecadotril</i>	0,773	Anti-diarreia
<i>Zomepirac</i>	0,771	Anti-inflamatória
<i>Fluphenazine</i>	0,765	Antipsicótica
<i>Oxantel</i>	0,755	Anti-helmíntica
<i>Oxolamine</i>	0,748	Antitussígena
<i>Baclofen</i>	0,746	Relaxante muscular
<i>Fusidic acid</i>	0,746	Antibiótica
<i>Isometheptene</i>	0,739	Analgesica
<i>Vincamine</i>	0,736	Vasodilatadora
<i>Trifluoperazine</i>	0,735	Antipsicótica
<i>Fenofibrate</i>	0,733	Tratamento de elevadas taxas de colesterol e triglicerídeos
<i>Ciclopirox</i>	0,729	Antifúngica
<i>Fludrocortisone</i>	0,727	Corticosteroide
<i>Etamsylate</i>	0,726	Hemostática
<i>Zalcitabine</i>	0,721	HIV
<i>Etoposide</i>	0,720	Antitumoral
<i>Alfaxalone</i>	0,720	Anestésica

A primaquina é particularmente interessante pois ela é a única droga disponível e eficaz contra a recidiva de malária causada pelo *Plasmodium vivax*, responsável por 82% dos casos de malária no Brasil (WHO 2014). Porém, a primaquina acarreta hemólise oxidante em pacientes deficientes da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6DP) (Ashley *et al.* 2014; Howes *et al.* 2013), mutação genética frequente em áreas tropicais, onde há elevada incidência de malária (WHO 2015). Por isso, o desenvolvimento de uma droga alternativa à primaquina se tornou relevante.

A atividade antimalárica já foi reportada para a enzima fosfolipase A₂ de venenos de serpentes. Esta inibiu a formação de oocisto (ovo que contém a forma infectante do parasita) de *Plasmodium gallinaceum* e de *Plasmodium falciparum* (Zieler *et al.* 2001), além de causar efeitos citotóxicos em cultura *in vitro* de *Plasmodium falciparum* (Castillo *et al.* 2012). A presença dessa atividade em venenos de serpentes pode estar relacionada a efeitos secundários de componentes presentes nos mesmos. A enzima heme-oxigenase-1, cujo gene foi superexpresso pelo tratamento das células com o peptidoma de *B. jararaca* no presente trabalho, é capaz de prevenir apoptose via TNF em hepatócitos infectados por *Plasmodium* (Seixas *et al.* 2009), além de inibir o desenvolvimento de malária cerebral (Pamplona *et al.* 2007).

Além da atividade antimalárica, outras atividades antiprotozoário já foram descritas em venenos de diversas serpentes, sendo também atribuídas a de L-aminoácido oxidases isoladas destes (Deolindo *et al.* 2010; Franca *et al.* 2007; Tempone *et al.* 2001).

A atividade anti-hipertensiva e/ou vasodilatadora, indiretamente identificada pelo C-Map, é a atividade mais conhecida do veneno de *B. jararaca* e está associada à presença dos peptídeos potenciadores de bradicinina (BPP) (Ferreira *et al.* 1970). A ação vasodilatadora dos BPP é relacionada à inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA), que por sua vez degrada bradicinina, um peptídeo vasoativo (Villard e Soubrier 1996). Com a inibição da ECA, os níveis de bradicinina ficam elevados, aumentando a permeabilidade vascular e, conseqüentemente, diminuindo a pressão arterial. Entretanto, já foi reportado na literatura que os BPP são capazes de gerar vasodilatação por vias independentes da ECA. O BPP-5a isolado do veneno de *B. jararaca* é capaz de promover vasodilatação através da indução da produção de óxido nítrico via ativação dos receptores de bradicina (B2) e muscarínico (M1) (Morais *et al.* 2011). Embora as células de câncer de mama não apresentem ECA, elas expressam receptores muscarínicos (M1 e M2) (Fizman *et al.* 2007) e de bradicinina (B1 e B2) (da

Costa *et al.* 2014), o que sugere que atividade anti-hipertensiva indiretamente identificada no peptidoma por C-Map possa estar relacionada a esses receptores.

As possíveis atividades antifúngica, antiprotozoário e antibacteriana identificadas pelo C-Map já foram reportadas no veneno bruto de *B. jararaca* (Ciscotto *et al.* 2009; Gomes *et al.* 2005). Atividades antitumoral (Costa *et al.* 2014), anti-HIV (Moustafa *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2003), anti-inflamatória (Gomes *et al.* 2014; Ruan *et al.* 2013) e analgésica (Chen *et al.* 2006; Giorgi *et al.* 1993; Jiang *et al.* 2008; Mancin *et al.* 1998; Pu *et al.* 1995) também já foram atribuídas a venenos brutos de outras serpentes. Embora as atividades mencionadas acima já tenham sido atribuídas aos venenos e/ou a proteínas isoladas dos mesmos, é a primeira vez que elas são identificadas, mesmo que indiretamente, em peptidomas de venenos de serpentes.

Além da identificação indireta de atividades previamente descritas em venenos de serpentes, diversas novas atividades potenciais foram identificadas, tais como imunossupressora, antidiabetes, antipsicótica, anti-helmíntica. De modo interessante, identificou-se também uma correlação positiva com drogas utilizadas para o tratamento de falência cardíaca congestiva e arritmia cardíaca.

Adicionalmente, tratamos as células MCF7 com o veneno bruto de *Bothrops jararaca* para verificar a existência de similaridade com os resultados obtidos com o peptidoma. Inicialmente, tratamos as células MCF7 com 10 µg do veneno de *B. jararaca*, já que esta quantidade já havia sido previamente estabelecida como subtóxica para HUVECs (Gallagher *et al.* 2003). Entretanto, após o período de incubação, observamos que muitas células se desgrudaram do fundo da placa durante a etapa de lavagem, o que é um indicativo de citotoxicidade. Desta forma, passamos a incubar as células com 5 µg de veneno. Após a análise de expressão gênica, foi observado que o gene mais superexpresso, assim como na análise com o peptidoma, foi o CYP1A1, com um *fold change* de 29,6 (Tabela 4.7).

Tabela 4.7: Lista dos 20 genes considerados mais relevantes (neste trabalho) que foram superexpressos após o tratamento das células MCF7 com o veneno de *B. jararaca*.

Código do gene	Fold Change	Nome do gene
CYP1A1	29,6	Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1
SLC7A11	6,5	Solute carrier family 7
HMOX1	5,3	Heme oxygenase (decycling) 1
ALDH3A1	3,6	Aldehyde dehydrogenase 3 family, member A1
TMEM156	3,4	Transmembrane protein 156
CYP1B1	3,4	Cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1
AGPAT9	3,3	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 9
HECW2	2,8	HECT, C2 and WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2
AKR1B10	2,5	Aldo-keto reductase family 1, member B10 (aldose reductase)
HAR1B	2,3	Highly accelerated region 1B (non-protein coding)
ABCG2	2,2	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2
LRRC15	2,1	Leucine rich repeat containing 15
AKR1C2	2,0	Aldo-keto reductase family 1, member C2
TAT	2,0	Tyrosine aminotransferase
CREG2	2,0	Cellular repressor of E1A-stimulated genes 2
AKR1C3	2,0	Aldo-keto reductase family 1, member C3
SLC7A5	1,9	Solute carrier family 7 (amino acid transporter light chain, L system), member 5
RASD1	1,9	RAS, dexamethasone-induced 1
ALDH1A3	1,9	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3
GLDN	1,8	Gliomedin

Em amarelo estão indicados os genes que também constam da lista dos 20 mais superexpressos quando as células MCF7 foram tratadas com o peptidoma do veneno de *B. jararaca*.

Após a análise dos genes diferencialmente expressos pela abordagem do C-Map, dentre as quinze atividades bioquímicas a fármacos que apresentaram maior correlação positiva com fármacos conhecidos, doze também foram identificadas no peptidoma, incluindo as previamente reportadas na literatura para o veneno desta serpente (Tabela 4.8).

Tabela 4.8: Lista dos 30 fármacos que apresentaram maior correlação positiva com o veneno de *B. jararaca*.

Fármaco	Score de correlação positiva	Ação
<i>Sulindac</i>	0,919	Anti-inflamatória
<i>Primaquine</i>	0,879	Antiparasitária (antimalárica)
<i>Oxyphenbutazone</i>	0,866	Anti-inflamatória
<i>Lisuride</i>	0,830	Antiparkinsoniana
<i>Thioridazine</i>	0,829	Antipsicótica
<i>Lansoprazole</i>	0,826	Doença de refluxo gastrointestinal
<i>Metixene</i>	0,821	Antiparkinsoniana
<i>Levomepromazine</i>	0,818	Antipsicótica
<i>Cefalonium</i>	0,817	Antibiótica
<i>Noscapine</i>	0,815	Antitussígena
<i>Tetracycline</i>	0,814	Antibiótica
<i>Nadolol</i>	0,811	Anti-hipertensiva
<i>Syrosingopine</i>	0,808	Anti-hipertensiva
<i>Sotalol</i>	0,804	Antiarrítmica
<i>Dropropizine</i>	0,795	Antitussígena
<i>Streptozocin</i>	0,774	Antitumoral
<i>Alimemazine</i>	0,763	Sedativa, anti-histamínica e Antiemética
<i>Tenoxicam</i>	0,758	Anti-inflamatória
<i>Cefaclor</i>	0,743	Antibiótica
<i>Thalidomide</i>	0,738	Antitumoral
<i>Ambroxol</i>	0,733	Tratamento de problemas respiratórios
<i>Zuclopenthixol</i>	0,733	Antipsicótica
<i>Tretinoin</i>	0,719	Antiacne
<i>Clofazimine</i>	0,719	Tratamento de hanseníase
<i>Guanadrel</i>	0,717	Anti-hipertensiva
<i>Lansoprazole</i>	0,708	Doença de refluxo gastrointestinal
<i>Haloperidol</i>	0,705	Antipsicótica
<i>Fenofibrate</i>	0,701	Tratamento de colesterol e triglicérides alto
<i>Zalcitabine</i>	0,700	Anti-HIV
<i>Fulvestrant</i>	0,699	Antitumoral (para câncer de mama hormônio positivo)

Em amarelo, as atividades bioassimilares à fármacos também indiretamente identificadas no peptidoma de *B. jararaca*.

A droga antimalárica primaquina, que apresentou maior correlação positiva com o peptidoma, foi a segunda com maior correlação positiva com o veneno bruto de *B. jararaca*. Logo, é possível que algumas substâncias ativas presentes nos venenos de serpentes estejam enriquecidas no peptidoma.

Vale ressaltar que a abordagem C-Map tem como função principal gerar hipóteses e direcionar futuros ensaios biológicos a partir de atividades indiretamente identificadas. Por exemplo, esta técnica foi capaz de detectar no veneno do lagarto monstro de Gila a atividade antidiabetes, conhecidamente presente neste veneno (Aramadhaka *et al.* 2013; Furman 2012). Alguns fatores corroboram a hipótese de que uma ou mais atividades identificadas no peptidoma de *Bothrops jararaca* por C-Map estejam efetivamente presentes no mesmo: (i) como esperado, identificamos atividades biológicas já descritas para o veneno bruto (ou seus componentes) de *B. jararaca*; (ii) conseguimos identificar também novas possíveis atividades previamente descritas em outros venenos de serpentes; (iii) identificamos peptídeos naturais pertencentes a classes proteicas (L-aminoácido oxidase e fosfolipase A₂) que apresentam atividades antiprotozoária (de Melo Alves Paiva *et al.* 2011; Deolindo *et al.* 2010; Franca *et al.* 2007; Tempone *et al.* 2001) e antibacteriana (Paramo *et al.* 1998; Santamaria *et al.* 2005; Stabeli *et al.* 2004); (iv) a maior parte das atividades indiretamente identificadas no peptidoma também foram identificadas no veneno utilizando a mesma abordagem.

Neste trabalho, implementamos uma abordagem simples e rápida para caracterização do proteopeptidoma de qualquer veneno de serpente, assim como qualquer amostra biológica. Além da diversidade em classes proteicas identificadas no peptidoma do veneno de *B. jararaca*, esta metodologia foi capaz de gerar uma quantidade suficiente de material para ensaios biológicos posteriores.

Através da abordagem de C-Map, identificamos, pela primeira vez, atividades biológicas potenciais no peptidoma de um veneno de serpente, tais como antimalárica, anti-inflamatória, imunossupressora e analgésica, entre outras. Essas atividades serão posteriormente testadas para validação biológica.

Considerando o já conhecido potencial terapêutico dos venenos de serpentes, assim como as vantagens do uso de peptídeos para o desenvolvimento de fármacos, tais como baixo custo de produção, baixa toxicidade e alta seletividade/especificidade (Fosgerau e Hoffmann 2015), o peptidoma de *Bothrops jararaca* pode representar uma fonte biológica potencial para produção de fármacos contra diferentes doenças.

5. CONCLUSÕES

- Através da abordagem venômica *shotgun*, caracterizamos os venenos de algumas espécies relevantes no Brasil, incluindo as que compõem o *pool* de imunização para produção do soro antiofídico do Instituto Butantan). Identificamos grupos menos abundantes e raramente identificados em venômica de serpentes, tais como fosfolipase B, hialuronidase, fosfodiesterase, glutaminil ciclase e ecto-5'-nucleotidase. Por fim, observamos a falta de correlação entre composição proteica e a classificação filogenética proposta recentemente.
- Através de ensaios de formação de complexo, *cross-linking* químico e análise por espectrometria de massas, verificamos que o pró-domínio recombinante de jararagina (PD-Jar) forma complexo com as SVMP-PI (BaP1, atroxlisina-I e leucurolisina-a), sendo degradado por todas as SVMP testadas (incluindo jararagina), indicando que o potencial terapêutico de PD-Jar deve ser limitado.
- Implementamos uma abordagem simples e rápida para caracterização do proteopeptidoma de venenos de serpentes, permitindo a obtenção de uma quantidade suficiente de material biológico (proteoma ou peptidoma) para ser testado em ensaios biológicos.
- Através da análise de *connectivity map*, identificamos, pela primeira vez, atividades biológicas potenciais no peptidoma de veneno de serpente, tais como antimalárica, anti-inflamatória, imunossupressora, antibiótica e analgésica, entre outras.
- Esta tese consistiu em um grande projeto de venômica translacional que, através do uso de diferentes abordagens, gerou resultados que podem contribuir para questões relevantes no estudo de venenos de serpentes e seus efeitos, a saber: aprimoramento no racional de escolha dos venenos a comporem o *pool* para produção de soro antiofídico eficiente e pan-específico; melhorias na eficácia da neutralização dos efeitos locais através do desenvolvimento de inibidores toxino-específicos para administração local; desenvolvimento de novos fármacos e/ou terapias contra diversas doenças.

6. PERSPECTIVAS

Inicialmente, iremos realizar ensaios *in vitro* e eventualmente *in vivo* para confirmar as atividades antiparasitária, em diferentes modelos, e anti-inflamatória do peptidoma de *B. jararaca*. Sendo confirmadas, iremos avaliar outras atividades identificadas pelo *connectivity map*, assim como iniciaremos as etapas de subfracionamento do peptidoma para identificação dos peptídeos envolvidos em cada atividade, seguido de síntese desses peptídeos para posteriores análises.

Com relação aos ensaios com o pró-domínio recombinante de jararagina (PD-Jar), iremos repetir os ensaios de formação de *cross-linking* entre o PD-Jar e as SVMP-PI (BaP1 e leucurolisina-a) com algumas modificações, para obtenção de dados mais informativos que possam auxiliar em análises de modelagem molecular e maior acurácia na determinação da região de interação estes. Tais modificações incluirão: (i) caracterização físico-química do PD-Jar seguida de repetição dos ensaios de formação de complexo entre PD-Jar e SVMP; (ii) incubação do PD-Jar com as SVMP-PI em diferentes razões molares (2:1,4:1, 6:1, 8:1); (iii) checar e confirmar a degradação do PD-Jar pelas SVMP; (iv) utilização de um conjunto de enzimas com diferentes especificidades, tais como Asp-N e tripsina para melhorar a eficiência da digestão dos peptídeos de *cross-linking*, conseqüentemente, aumentando a cobertura de seqüência desses; (v) utilização de métodos de enriquecimento dos peptídeos de *cross-linking*, tais como cromatografia por troca catiônica e/ou exclusão molecular; (vi) utilização de outro reagente homobifuncional para a reação de *cross-linking*, desta vez com especificidade para cadeias laterais de resíduos ácidos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahlf DR, Thomas PM, Kelleher NL. Developing top down proteomics to maximize proteome and sequence coverage from cells and tissues. *Current opinion in chemical biology*. 2013 Oct;17(5):787-94.
2. Alape-Giron A, Sanz L, Escolano J, Flores-Diaz M, Madrigal M, Sasa M, *et al*. Snake venomomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*: geographic, individual, and ontogenetic variations. *J Proteome Res*. 2008 Aug;7(8):3556-71.
3. Albrecht EA, Dhanasekaran SM, Tomlins S. Immediate early inflammatory gene responses of human umbilical vein endothelial cells to hemorrhagic venom. *Inflamm Res*. 2011 Mar;60(3):213-7.
4. Ali SA, Jackson TN, Casewell NR, Low DH, Rossi S, Baumann K, *et al*. Extreme venom variation in Middle Eastern vipers: a proteomics comparison of *Eristicophis macmahonii*, *Pseudocerastes fieldi* and *Pseudocerastes persicus*. *Journal of proteomics*. 2015 Feb 26;116:106-13.
5. Ali SA, Yang DC, Jackson TN, Undheim EA, Koludarov I, Wood K, *et al*. Venom proteomic characterization and relative antivenom neutralization of two medically important Pakistani elapid snakes (*Bungarus sindanus* and *Naja naja*). *Journal of proteomics*. 2013 Aug 26;89:15-23.
6. Allen AC, Gammon CM, Ousley AH, McCarthy KD, Morell P. Bradykinin stimulates arachidonic acid release through the sequential actions of an sn-1 diacylglycerol lipase and a monoacylglycerol lipase. *J Neurochem*. 1992 Mar;58(3):1130-9.
7. Ande SR, Kommoju PR, Draxl S, Murkovic M, Macheroux P, Ghisla S, *et al*. Mechanisms of cell death induction by L-amino acid oxidase, a major component of ophidian venom. *Apoptosis*. 2006 Aug;11(8):1439-51.
8. Angulo Y, Escolano J, Lomonte B, Gutierrez JM, Sanz L, Calvete JJ. Snake venomomics of Central American pitvipers: clues for rationalizing the distinct envenomation profiles of *Atropoides nummifer* and *Atropoides picadoi*. *J Proteome Res*. 2008 Feb;7(2):708-19.
9. Antunes TC, Yamashita KM, Barbaro KC, Saiki M, Santoro ML. Comparative analysis of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. *Toxicon*. 2010 Dec;56(8):1443-58.
10. Araki S, Ishida T, Yamamoto T, Kaji K, Hayashi H. Induction of apoptosis by hemorrhagic snake venom in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993;190(1):148-53.
11. Aramadhaka LR, Prorock A, Dragulev B, Bao Y, Fox JW. Connectivity maps for biosimilar drug discovery in venoms: the case of Gila monster venom and the anti-diabetes drug Byetta(R). *Toxicon*. 2013 Jul;69:160-7.
12. Ashley EA, Recht J, White NJ. Primaquine: the risks and the benefits. *Malar J*. 2014;13:418.

13. Autelitano DJ, Rajic A, Smith AI, Berndt MC, Ilag LL, Vadas M. The cryptome: a subset of the proteome, comprising cryptic peptides with distinct bioactivities. *Drug Discov Today*. [Review]. 2006 Apr;11(7-8):306-14.
14. Baldo C, Jamora C, Yamanouye N, Zorn TM, Moura-da-Silva AM. Mechanisms of vascular damage by hemorrhagic snake venom metalloproteinases: tissue distribution and in situ hydrolysis. *PLoS Neglect Trop D*. 2010;4(6):e727.
15. Barlow A, Pook CE, Harrison RA, Wuster W. Coevolution of diet and prey-specific venom activity supports the role of selection in snake venom evolution. *Proc Biol Sci*. 2009 Jul 7;276(1666):2443-9.
16. Battellino C, Piazza R, da Silva AM, Cury Y, Farsky SH. Assessment of efficacy of bothropic antivenom therapy on microcirculatory effects induced by Bothrops jararaca snake venom. *Toxicon*. 2003 Apr;41(5):583-93.
17. Bello CA, Hermogenes AL, Magalhaes A, Veiga SS, Gremski LH, Richardson M, *et al*. Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic proteinase from Bothrops leucurus (white-tailed jararaca) snake venom. *Biochimie*. 2006 Feb;88(2):189-200.
18. Birrell GW, Earl S, Masci PP, de Jersey J, Wallis TP, Gorman JJ, *et al*. Molecular diversity in venom from the Australian Brown snake, *Pseudonaja textilis*. *Mol Cell Proteomics*. 2006 Feb;5(2):379-89.
19. Birrell GW, Earl ST, Wallis TP, Masci PP, de Jersey J, Gorman JJ, *et al*. The diversity of bioactive proteins in Australian snake venoms. *Mol Cell Proteomics*. 2007 Feb 21;6:973-86.
20. Bjarnason JB, Fox JW. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmac Ther*. 1994;62(3):325-72.
21. Bjarnason JB, Fox JW. Snake venom metalloendopeptidases: reprotolysins. *Methods Enzymol*. 1995;248:345-68.
22. Bobak P, Stratil A, Valenta M. A Comparison of Molecular Weights of Transferrins of Various Vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 1984;79b(1):113-7.
23. Boschetti E, Giorgio Righetti P. Hexapeptide combinatorial ligand libraries: the march for the detection of the low-abundance proteome continues. *Biotechniques*. 2008 Apr;44(5):663-5.
24. Brigelius-Flohe R, Maiorino M. Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta*. 2013 May;1830(5):3289-303.
25. Calmette A. L'immunisation artificielle des animaux contre le venin des Serpents et de la thérapeutique des morsures venimeuses. *C R Seances Soc Biol Fil*. 1894;XLVI:120-4.
26. Calvete JJ. Proteomic tools against the neglected pathology of snake bite envenoming. *Expert Rev Proteomics*. 2011 Dec;8(6):739-58.

27. Calvete JJ. Snake venomomics: from the inventory of toxins to biology. *Toxicon*. 2013 Dec 1;75:44-62.
28. Calvete JJ. Next-generation snake venomomics: protein-locus resolution through venom proteome decomplexation. *Expert Rev Proteomics*. 2014 Jun;11(3):315-29.
29. Calvete JJ, Cid P, Sanz L, Segura A, Villalta M, Herrera M, *et al*. Antivenomic assessment of the immunological reactivity of EchiTAB-Plus-ICP, an antivenom for the treatment of snakebite envenoming in sub-Saharan Africa. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2011 Jun;82(6):1194-201.
30. Calvete JJ, Juarez P, Sanz L. Snake venomomics. Strategy and applications. *J Mass Spectrom*. 2007 Jul 10;42:1405-14.
31. Calvete JJ, Marcinkiewicz C, Monleon D, Esteve V, Celda B, Juarez P, *et al*. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. *Toxicon*. 2005 Jun 15;45(8):1063-74.
32. Calvete JJ, Sanz L, Angulo Y, Lomonte B, Gutierrez JM. Venoms, venomomics, antivenomics. *FEBS Lett*. 2009 Mar 20.
33. Calvete JJ, Sanz L, Perez A, Borges A, Vargas AM, Lomonte B, *et al*. Snake population venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: Paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. *Journal of proteomics*. 2011 Apr 1;74(4):510-27.
34. Carrasco PA, Mattoni CI, Leynaud GC, Scrocchi GJ. Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pit vipers (Serpentes, Viperidae). In: *Scripta Z*, editor.; 2012. p. 109-24.
35. Carvalho PC, Junqueira M, Valente RH, Domont GB. Caititu: A tool to graphically represent peptide sequence coverage and domain distribution. *Journal of proteomics*. 2008 Oct 7;71(4):486-9.
36. Carvalho PC, Lima DB, Leprevost FV, Santos MD, Fischer JS, Aquino PF, *et al*. Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. *Nat Protoc*. 2016 Jan;11(1):102-17.
37. Castillo JC, Vargas LJ, Segura C, Gutierrez JM, Perez JC. In vitro antiplasmodial activity of phospholipases A2 and a phospholipase homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxins (Basel)*. 2012 Dec;4(12):1500-16.
38. Castoe TA, de Koning AP, Hall KT, Card DC, Schield DR, Fujita MK, *et al*. The Burmese python genome reveals the molecular basis for extreme adaptation in snakes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013 Dec 17;110(51):20645-50.
39. Castoe TA, de Koning JA, Hall KT, Yokoyama KD, Gu W, Smith EN, *et al*. Sequencing the genome of the Burmese python (*Python molurus bivittatus*) as a model for studying extreme adaptations in snakes. *Genome Biol*. 2011;12(7):406.
40. Castoe TA, Parkinson CL. Bayesian mixed models and the phylogeny of pitvipers (Viperidae: Serpentes). *Mol Phylogenet Evol*. 2006 Apr;39(1):91-110.

41. Catanese JJ, Kress LF. Isolation from opossum serum of a metalloproteinase inhibitor homologous to human alpha 1B-glycoprotein. *Biochemistry*. 1992;31:410-8.
42. Chapeaurouge A, Reza MA, Mackessy SP, Carvalho PC, Valente RH, Teixeira-Ferreira A, *et al*. Interrogating the Venom of the Viperid Snake *Sistrurus catenatus edwardsii* by a Combined Approach of Electrospray and MALDI Mass Spectrometry. *PloS one*. 2015;10(5):e0092091.
43. Chatrath ST, Chapeaurouge A, Lin Q, Lim TK, Dunstan N, Mirtschin P, *et al*. Identification of novel proteins from the venom of a cryptic snake *Drysdalia coronoides* by a combined transcriptomics and proteomics approach. *J Proteome Res*. 2011 Feb 4;10(2):739-50.
44. Chen ZX, Zhang HL, Gu ZL, Chen BW, Han R, Reid PF, *et al*. A long-form alpha-neurotoxin from cobra venom produces potent opioid-independent analgesia. *Acta Pharmacol Sin*. 2006 Apr;27(4):402-8.
45. Chippaux JP. Snake-bites: appraisal of the global situation. *Bull World Health Organ*. 1998;76(5):515-24.
46. Chippaux JP. Estimating the global burden of snakebite can help to improve management. *PLoS Med*. 2008 Nov 4;5(11):e221.
47. Chippaux JP, Goyffon M. Production and use of snake antivenin. In: Tu AT, editor. *Reptile Venoms and Toxins*. New York: Marcel Dekker; 1991. p. 529-55.
48. Chippaux JP, Goyffon M. Venoms, antivenoms and immunotherapy. *Toxicon*. 1998;36(6):823-46.
49. Chippaux JP, Williams V, White J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon*. 1991;29(11):1279-303.
50. Ciscotto P, Machado de Avila RA, Coelho EA, Oliveira J, Diniz CG, Farias LM, *et al*. Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an l-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon*. 2009 Mar 1;53(3):330-41.
51. Clissa PB, Lopes-Ferreira M, Della-Casa MS, Farsky SH, Moura-da-Silva AM. Importance of jararhagin disintegrin-like and cysteine-rich domains in the early events of local inflammatory response. *Toxicon*. 2006 Apr;47(5):591-6.
52. Combe CW, Fischer L, Rappsilber J. xiNET: cross-link network maps with residue resolution. *Mol Cell Proteomics*. 2015 Apr;14(4):1137-47.
53. Correa-Netto C, Teixeira-Araujo R, Aguiar AS, Melgarejo AR, De-Simone SG, Soares MR, *et al*. Immunome and venome of *Bothrops jararacussu*: a proteomic approach to study the molecular immunology of snake toxins. *Toxicon*. 2010 Jun 15;55(7):1222-35.
54. Costa TR, Burin SM, Menaldo DL, de Castro FA, Sampaio SV. Snake venom L-amino acid oxidases: an overview on their antitumor effects. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2014;20:23.

55. Google Patents. Analgesic peptides derived from the venom of *Crotalus durissus terrificus* snakes. 2005p.
56. Cushman DW, Cheung HS, Sabo EF, Ondetti MA. Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids. *Biochemistry*. 1977 Dec 13;16(25):5484-91.
57. da Costa PL, Sirois P, Tannock IF, Chammas R. The role of kinin receptors in cancer and therapeutic opportunities. *Cancer Lett*. 2014 Apr 1;345(1):27-38.
58. Daltry JC, Wuster W, Thorpe RS. Diet and snake venom evolution. *Nature*. 1996 Feb 8;379(6565):537-40.
59. de Melo Alves Paiva R, de Freitas Figueiredo R, Antonucci GA, Paiva HH, de Lourdes Pires Bianchi M, Rodrigues KC, *et al*. Cell cycle arrest evidence, parasiticidal and bactericidal properties induced by L-amino acid oxidase from *Bothrops atrox* snake venom. *Biochimie*. 2011 May;93(5):941-7.
60. Deolindo P, Teixeira-Ferreira AS, DaMatta RA, Alves EW. L-amino acid oxidase activity present in fractions of *Bothrops jararaca* venom is responsible for the induction of programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*. *Toxicon*. 2010 Nov;56(6):944-55.
61. Deolindo P, Teixeira-Ferreira AS, Melo EJ, Arnholdt AC, Souza W, Alves EW, *et al*. Programmed cell death in *Trypanosoma cruzi* induced by *Bothrops jararaca* venom. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005 Feb;100(1):33-8.
62. Dhanak AC, Rishipathak DD, Gide DPS. MULTIPLE SCLEROSIS & IT'S TREATMENT WITH ALPHA-COBRATOXIN: A REVIEW. *International Journal of PharmTech Research*. 2010;2(1):740-9.
63. Diochot S, Baron A, Salinas M, Douguet D, Scarzello S, Dabert-Gay AS, *et al*. Black mamba venom peptides target acid-sensing ion channels to abolish pain. *Nature*. 2012 Oct 25;490(7421):552-5.
64. Domont GB, Perales J, Moussatché H. Natural anti-snake venom proteins. *Toxicon*. 1991;29(10):1183-94.
65. Earl ST, Birrell GW, Wallis TP, St Pierre LD, Masci PP, de Jersey J, *et al*. Post-translational modification accounts for the presence of varied forms of nerve growth factor in Australian elapid snake venoms. *Proteomics*. 2006 Dec;6(24):6554-65.
66. Elias JE, Gygi SP. Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. *Nature Methods*. 2007;4(3):207-14.
67. Elias JE, Gygi SP. Target-decoy search strategy for mass spectrometry-based proteomics. *Methods Mol Biol*. 2010;604:55-71.
68. Farah MF, One M, Novello JC, Toyama MH, Perales J, Moussatché H, *et al*. Isolation of protein factors from opossum (*Didelphis albiventris*) serum which protect against *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon*. 1996 Sep;34(9):1067-71.

69. Farsky SH, Goncalves LR, Cury Y. Characterization of local tissue damage evoked by *Bothrops jararaca* venom in the rat connective tissue microcirculation: an intravital microscopic study. *Toxicon*. 1999 Jul;37(7):1079-83.
70. Favreau P, Menin L, Michalet S, Perret F, Cheneval O, Stocklin M, *et al.* Mass spectrometry strategies for venom mapping and peptide sequencing from crude venoms: case applications with single arthropod specimen. *Toxicon*. 2006 May;47(6):676-87.
71. Fenard D, Lambeau G, Valentin E, Lefebvre JC, Lazdunski M, Doglio A. Secreted phospholipases A(2), a new class of HIV inhibitors that block virus entry into host cells. *J Clin Invest*. 1999 Sep;104(5):611-8.
72. Fenton HJH. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Journal of the Chemical Society, Transactions*. 1894;65:948-50.
73. Fenwick AM, Jr. RLG, Evans JA, Parkinson CL. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*. 2009;156:617-40.
74. Fernandez Culma M, Andres Pereanez J, Nunez Rangel V, Lomonte B. Snake venomomics of *Bothrops punctatus*, a semiarboreal pitviper species from Antioquia, Colombia. *PeerJ*. 2014;2:e246.
75. Fernandez J, Lomonte B, Sanz L, Angulo Y, Gutierrez JM, Calvete JJ. Snake venomomics of *Bothriechis nigroviridis* reveals extreme variability among palm pitviper venoms: different evolutionary solutions for the same trophic purpose. *J Proteome Res*. 2010 Aug 6;9(8):4234-41.
76. Fernandez J, Vargas-Vargas N, Pla D, Sasa M, Rey-Suarez P, Sanz L, *et al.* Snake venomomics of *Micrurus alleni* and *Micrurus mosquitensis* from the Caribbean region of Costa Rica reveals two divergent compositional patterns in New World elapids. *Toxicon*. 2015 Aug 29.
77. Ferreira RN, Rates B, Richardson M, Guimaraes BG, Sanchez EO, Pimenta AM, *et al.* Complete amino-acid sequence, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of leucurolysin-a, a nonhaemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops leucurus* snake venom. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 2009 Aug 1;65(Pt 8):798-801.
78. Ferreira SH, Bartelt DC, Greene LJ. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Biochemistry*. 1970;9(13):2583-93.
79. Fiszman GL, Middonno MC, de la Torre E, Farina M, Espanol AJ, Sales ME. Activation of muscarinic cholinergic receptors induces MCF-7 cells proliferation and angiogenesis by stimulating nitric oxide synthase activity. *Cancer Biol Ther*. 2007 Jul;6(7):1106-13.
80. Fosgerau K, Hoffmann T. Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug Discov Today*. 2015 Jan;20(1):122-8.

81. Fox JW. Insights in to Venom and Toxin Activities and Pharmacological/Therapeutic Potential Using Gene Expression Profiling. In: Kini RM, · KJC, Markland FS, · MAM, Morita T, editors. *Toxins and Hemostasis From the bench to bedside*: Springer; 2010. p. 73-81.
82. Fox JW, Ma L, Nelson K, Sherman NE, Serrano SM. Comparison of indirect and direct approaches using ion-trap and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for exploring viperid venom proteomes. *Toxicon*. 2006 May;47(6):700-14.
83. Fox JW, Serrano SM. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 repolysin family of metalloproteinases. *Toxicon*. 2005 Jun 15;45(8):969-85.
84. Fox JW, Serrano SM. Approaching the golden age of natural product pharmaceuticals from venom libraries: an overview of toxins and toxin-derivatives currently involved in therapeutic or diagnostic applications. *Curr Pharm Des*. 2007;13(28):2927-34.
85. Fox JW, Serrano SMT. Exploring snake venom proteomes: multifaceted analyses for complex toxin mixtures. *Proteomics*. 2008;8(4):909-20.
86. Fox JW, Serrano SMT. Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research. *Journal of proteomics*. 2009;72(2):200-9.
87. Fox JW, Shannon JD, Stefansson B, Kamiguti AS, Theakston DG, Serrano SM, *et al*. Role of discovery science in Toxinology: examples in venom proteomics. In: Ménez A, editor. *Perspectives in Molecular Toxinology*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.; 2002. p. 97-105.
88. Franca SC, Kashima S, Roberto PG, Marins M, Ticli FK, Pereira JO, *et al*. Molecular approaches for structural characterization of Bothrops L-amino acid oxidases with antiprotozoal activity: cDNA cloning, comparative sequence analysis, and molecular modeling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Apr 6;355(2):302-6.
89. Funk C, Gmur J, Herold R, Straub PW. Reptilase-R--a new reagent in blood coagulation. *British journal of haematology*. 1971 Jul;21(1):43-52.
90. Furman BL. The development of Byetta (exenatide) from the venom of the Gila monster as an anti-diabetic agent. *Toxicon*. 2012 Mar 15;59(4):464-71.
91. Gallagher P, Bao Y, Serrano SM, Laing GD, Theakston RD, Gutierrez JM, *et al*. Role of the snake venom toxin jararhagin in proinflammatory pathogenesis: in vitro and in vivo gene expression analysis of the effects of the toxin. *Arch Biochem Biophys*. 2005 Sep 1;441(1):1-15.
92. Gallagher PG, Bao Y, Serrano SM, Kamiguti AS, Theakston RD, Fox JW. Use of microarrays for investigating the subtoxic effects of snake venoms: insights into venom-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells. *Toxicon*. 2003 Mar;41(4):429-40.
93. Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Mitochondria: master regulators of danger signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012 Dec;13(12):780-8.

94. Gay C, Sanz L, Calvete JJ, Pla D. Snake Venomics and Antivenomics of *Bothrops diporus*, a Medically Important Pitviper in Northeastern Argentina. *Toxins (Basel)*. 2015;8(1).
95. Georgieva D, Seifert J, Ohler M, von Bergen M, Spencer P, Arni RK, *et al.* *Pseudechis australis* venomics: adaptation for a defense against microbial pathogens and recruitment of body transferrin. *J Proteome Res*. 2011 May 6;10(5):2440-64.
96. Gharahdaghi F, Weinberg CR, Meagher DA, Imai BS, Mische SM. Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis*. 1999 Mar;20(3):601-5.
97. Gibbs HL, Sanz L, Calvete JJ. Snake population venomics: proteomics-based analyses of individual variation reveals significant gene regulation effects on venom protein expression in *Sistrurus rattlesnakes*. *Journal of molecular evolution*. 2009 Feb;68(2):113-25.
98. Gibbs HL, Sanz L, Sovic MG, Calvete JJ. Phylogeny-based comparative analysis of venom proteome variation in a clade of rattlesnakes (*Sistrurus* sp.). *PloS one*. 2013;8(6):e67220.
99. Giorgi R, Bernardi MM, Cury Y. Analgesic effect evoked by low molecular weight substances extracted from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon*. 1993 Oct;31(10):1257-65.
100. Gocmen B, Heiss P, Petras D, Nalbantsoy A, Sussmuth RD. Mass spectrometry guided venom profiling and bioactivity screening of the Anatolian Meadow Viper, *Vipera anatolica*. *Toxicon*. 2015 Dec 1;107(Pt B):163-74.
101. Gomes A, Datta P, Das T, Biswas AK. Anti arthritic and anti inflammatory activity of a cytotoxic protein NN-32 from Indian spectacle cobra (*Naja naja*) venom in male albino rats. *Toxicon*. 2014 Nov;90:106-10.
102. Gomes VM, Carvalho AO, Da Cunha M, Keller MN, Bloch C, Jr., Deolindo P, *et al.* Purification and characterization of a novel peptide with antifungal activity from *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon*. 2005 Jun 1;45(7):817-27.
103. Goncalves-Machado L, Pla D, Sanz L, Jorge RJ, Leitao-De-Araujo M, Alves ML, *et al.* Combined venomics, venom gland transcriptomics, bioactivities, and antivenomics of two *Bothrops jararaca* populations from geographic isolated regions within the Brazilian Atlantic rainforest. *Journal of proteomics*. 2015 May 9.
104. Gorg A, Postel W, Gunther S. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*. 1988 Sep;9(9):531-46.
105. Görg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*. 2004 Dec;4(12):3665-85.
106. Gozzelino R, Jeney V, Soares MP. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2010;50:323-54.

107. Grams F, Huber R, Kress LF, Moroder L, Bode W. Activation of snake venom metalloproteinases by a cysteine switch-like mechanism. *FEBS Lett.* 1993;335(1):76-80.
108. Guercio RA, Shevchenko A, Lopez-Lozano JL, Paba J, Sousa MV, Ricart CA. Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. *Proteome Sci.* 2006;4:11.
109. Guerrier L, Thulasiraman V, Castagna A, Fortis F, Lin S, Lomas L, *et al.* Reducing protein concentration range of biological samples using solid-phase ligand libraries. *Journal of chromatography.* 2006 Mar 20;833(1):33-40.
110. Guillaume C, Deregnaucourt C, Clavey V, Schrevel J. Anti-Plasmodium properties of group IA, IB, IIA and III secreted phospholipases A2 are serum-dependent. *Toxicon.* 2004 Mar 1;43(3):311-8.
111. Guo C, Liu S, Dong P, Zhao D, Wang C, Tao Z, *et al.* Akbu-LAAO exhibits potent anti-tumor activity to HepG2 cells partially through produced H2O2 via TGF-beta signal pathway. *Sci Rep.* 2015;5:18215.
112. Gutierrez JM. Improving antivenom availability and accessibility: science, technology, and beyond. *Toxicon.* 2012 Sep 15;60(4):676-87.
113. Gutierrez JM, Leon G, Burnouf T. Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: the road ahead. *Biologicals.* 2011 May;39(3):129-42.
114. Gutierrez JM, Leon G, Lomonte B. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of immunoglobulin therapy for envenomation. *Clin Pharmacokinet.* 2003;42(8):721-41.
115. Gutierrez JM, Leon G, Lomonte B, Angulo Y. Antivenoms for snakebite envenomings. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2011 Oct 1;10(5):369-80.
116. Gutierrez JM, Leon G, Rojas G, Lomonte B, Rucavado A, Chaves F. Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon.* 1998;36(11):1529-38.
117. Gutierrez JM, Lomonte B. Phospholipases A2: unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. *Toxicon.* 2013 Feb;62:27-39.
118. Gutierrez JM, Lomonte B, Leon G, Alape-Giron A, Flores-Diaz M, Sanz L, *et al.* Snake venomomics and antivenomics: Proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. *Journal of proteomics.* 2009 Mar 6;72(2):165-82.
119. Gutierrez JM, Lomonte B, León G, Rucavado A, Chaves F, Angulo Y. Trends in snakebite envenomation therapy: scientific, technological and public health considerations. *Curr Pharm Des.* 2007;13(28):2935-50.
120. Gutierrez JM, Rucavado A, Escalante T, Diaz C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon.* 2005 Jun 15;45(8):997-1011.

121. Gutierrez JM, Theakston RD, Warrell DA. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. *PLoS Med.* 2006 Jun;3(6):727-31.
122. Gutierrez JM, Williams D, Fan HW, Warrell DA. Snakebite envenoming from a global perspective: Towards an integrated approach. *Toxicon.* [Review]. 2010 Dec 15;56(7):1223-35.
123. Han X, He L, Xin L, Shan B, Ma B. PeaksPTM: Mass spectrometry-based identification of peptides with unspecified modifications. *J Proteome Res.* 2011 Jul 1;10(7):2930-6.
124. Harvey AL. Toxins and drug discovery. *Toxicon.* 2014 Dec 15;92:193-200.
125. Herrera C, Escalante T, Voisin MB, Rucavado A, Morazan D, Macedo JK, *et al.* Tissue localization and extracellular matrix degradation by PI, PII and PIII snake venom metalloproteinases: clues on the mechanisms of venom-induced hemorrhage. *PLoS Neglect Trop D.* 2015 Apr;9(4):e0003731.
126. Hite LA, Jia LG, Bjarnason JB, Fox JW. cDNA sequences for four snake venom metalloproteinases: structure, classification, and their relationship to mammalian reproductive proteins. *Arch Biochem Biophys.* 1994;308(1):182-91.
127. Hite LA, Shannon JD, Bjarnason JB, Fox JW. Sequence of a cDNA clone encoding the zinc metalloproteinase hemorrhagic toxin e from *Crotalus atrox*: evidence for signal, zymogen, and disintegrin-like structures. *Biochemistry.* 1992;31(27):6203-11.
128. Howes RE, Battle KE, Satyagraha AW, Baird JK, Hay SI. G6PD deficiency: global distribution, genetic variants and primaquine therapy. *Advances in parasitology.* 2013;81:133-201.
129. Hrycay EG, Bandiera SM. The monooxygenase, peroxidase, and peroxygenase properties of cytochrome P450. *Arch Biochem Biophys.* 2012 Jun 15;522(2):71-89.
130. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* 2009 Jan;37(1):1-13.
131. Huang da W, Sherman BT, Stephens R, Baseler MW, Lane HC, Lempicki RA. DAVID gene ID conversion tool. *Bioinformatics.* 2008;2(10):428-30.
132. Ianzer D, Konno K, Marques-Porto R, Vieira Portaro FC, Stocklin R, Martins de Camargo AC, *et al.* Identification of five new bradykinin potentiating peptides (BPPs) from *Bothrops jararaca* crude venom by using electrospray ionization tandem mass spectrometry after a two-step liquid chromatography. *Peptides.* 2004 Jul;25(7):1085-92.
133. Iglesias AH, Santos LF, Gozzo FC. Identification of cross-linked peptides by high-resolution precursor ion scan. *Anal Chem.* 2010 Feb 1;82(3):909-16.
134. Izidoro LF, Ribeiro MC, Souza GR, Sant'Ana CD, Hamaguchi A, Homsí-Brandeburgo MI, *et al.* Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated

from *Bothrops pirajai* snake venom. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2006 Oct 15;14(20):7034-43.

135. Jain D, Kumar S. Snake venom: a potent anticancer agent. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(10):4855-60.

136. Jiang WJ, Liang YX, Han LP, Qiu PX, Yuan J, Zhao SJ. Purification and characterization of a novel antinociceptive toxin from Cobra venom (*Naja naja atra*). *Toxicon*. 2008 Oct;52(5):638-46.

137. Jimenez-Charris E, Montealegre-Sanchez L, Solano-Redondo L, Mora-Obando D, Camacho E, Castro-Herrera F, *et al.* Proteomic and functional analyses of the venom of *Porthidium lansbergii lansbergii* (Lansberg's hognose viper) from the Atlantic Department of Colombia. *Journal of proteomics*. 2015 Jan 30;114:287-99.

138. Juárez P, Sanz L, Calvete JJ. Snake venomomics: Characterization of protein families in *Sistrurus barbouri* venom by cysteine mapping, N-terminal sequencing, and tandem mass spectrometry analysis. *Proteomics*. 2004;4(2):327-38.

139. Jurado JD, Rael ED, Lieb CS, Nakayasu E, Hayes WK, Bush SP, *et al.* Complement inactivating proteins and intraspecies venom variation in *Crotalus oreganus helleri*. *Toxicon*. 2007 Mar 1;49(3):339-50.

140. Jurgilas PB, Neves-Ferreira AGC, Domont GB, Perales J. PO41, a snake venom metalloproteinase inhibitor isolated from *Philander opossum* serum. *Toxicon*. 2003 Nov;42(6):621-8.

141. Kashima S, Roberto PG, Soares AM, Astolfi-Filho S, Pereira JO, Giuliati S, *et al.* Analysis of *Bothrops jararacussu* venomous gland transcriptome focusing on structural and functional aspects: I--gene expression profile of highly expressed phospholipases A₂. *Biochimie*. 2004 Mar;86(3):211-9.

142. Kasturiratne A, Wickremasinghe AR, de Silva N, Gunawardena NK, Pathmeswaran A, Premaratna R, *et al.* The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS Med*. 2008 Nov 4;5(11):1591-604.

143. Keller A, Nesvizhskii AI, Kolker E, Aebersold R. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal Chem*. 2002 Oct 15;74(20):5383-92.

144. King GF. Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics. *Expert Opin Biol Ther*. 2011 Nov;11(11):1469-84.

145. Kini RM. Molecular moulds with multiple missions: functional sites in three-finger toxins. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2002 Sep;29(9):815-22.

146. Kini RM, Doley R. Structure, function and evolution of three-finger toxins: mini proteins with multiple targets. *Toxicon*. 2010 Nov;56(6):855-67.

147. Koh DCI, Armugam A, Jeyaseelan K. Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2006;63(24):3030-41.
148. Kulkeaw K, Chaicumpa W, Sakolvaree Y, Tongtawe P, Tapchaisri P. Proteome and immunome of the venom of the Thai cobra, *Naja kaouthia*. *Toxicon*. 2007;49(7):1026-41.
149. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(259):680-5.
150. Lamb J. The Connectivity Map: a new tool for biomedical research. *Nat Rev Cancer*. 2007 Jan;7(1):54-60.
151. Lamb J, Crawford ED, Peck D, Modell JW, Blat IC, Wrobel MJ, *et al*. The Connectivity Map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease. *Science*. 2006 Sep 29;313(5795):1929-35.
152. Laustsen AH, Gutierrez JM, Lohse B, Rasmussen AR, Fernandez J, Milbo C, *et al*. Snake venomomics of monocled cobra (*Naja kaouthia*) and investigation of human IgG response against venom toxins. *Toxicon*. 2015 Jun 1;99:23-35.
153. Laustsen AH, Gutierrez JM, Rasmussen AR, Engmark M, Gravlund P, Sanders KL, *et al*. Danger in the reef: Proteome, toxicity, and neutralization of the venom of the olive sea snake, *Aipysurus laevis*. *Toxicon*. 2015 Dec 1;107(Pt B):187-96.
154. Lei Z, Shi Hong L, Li L, Tao YG, Yong Ling W, Senga H, *et al*. Batroxobin mobilizes circulating endothelial progenitor cells in patients with deep vein thrombosis. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2011 Feb;17(1):75-9.
155. Li S, Wang J, Zhang X, Ren Y, Wang N, Zhao K, *et al*. Proteomic characterization of two snake venoms: *Naja naja atra* and *Agkistrodon halys*. *Biochem J*. 2004 Nov 15;384(Pt 1):119-27.
156. Lima DB, de Lima TB, Balbuena TS, Neves-Ferreira AG, Barbosa VC, Gozzo FC, *et al*. SIM-XL: A powerful and user-friendly tool for peptide cross-linking analysis. *Journal of proteomics*. 2015 Nov 3;129:51-5.
157. Liu H, Sadygov RG, Yates JR, 3rd. A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Anal Chem*. 2004 Jul 15;76(14):4193-201.
158. Loechel F, Overgaard MT, Oxvig C, Albrechtsen R, Wewer UM. Regulation of human ADAM 12 protease by the prodomain. Evidence for a functional cysteine switch. *J Biol Chem*. 1999 May 7;274(19):13427-33.
159. Lomonte B, Fernandez J, Sanz L, Angulo Y, Sasa M, Gutierrez JM, *et al*. Venomous snakes of Costa Rica: biological and medical implications of their venom proteomic profiles analyzed through the strategy of snake venomomics. *Journal of proteomics*. 2014 Jun 13;105:323-39.
160. Lomonte B, Pla D, Sasa M, Tsai WC, Solorzano A, Urena-Diaz JM, *et al*. Two color morphs of the pelagic yellow-bellied sea snake, *Pelamis platura*, from different locations of

Costa Rica: snake venomics, toxicity, and neutralization by antivenom. *Journal of proteomics*. 2014 May 30;103:137-52.

161. Lucke WC, Thomas H, Jr. Anaphylaxis: pathophysiology, clinical presentations and treatment. *J Emerg Med*. 1983;1(1):83-95.

162. Ma B, Zhang K, Hendrie C, Liang C, Li M, Doherty-Kirby A, *et al*. PEAKS: powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2003;17(20):2337-42.

163. Mackessy SP. Venom Composition in Rattlesnakes: Trends and Biological Significance. In: Press LLU, editor. *The Biology of Rattlesnakes*. California; 2008. p. 495-510.

164. Mackessy SP. Evolutionary trends in venom composition in the western rattlesnakes (*Crotalus viridis sensu lato*): toxicity vs. tenderizers. *Toxicon*. 2010 Jul;55(8):1463-74.

165. Malih I, Ahmad rusmili MR, Tee TY, Saile R, Ghalim N, Othman I. Proteomic analysis of Moroccan cobra *Naja haje legionis* venom using tandem mass spectrometry. *Journal of proteomics*. 2014 Jan 16;96:240-52.

166. Mancin AC, Soares AM, Andriao-Escarso SH, Faca VM, Greene LJ, Zuccolotto S, *et al*. The analgesic activity of crotamine, a neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom: a biochemical and pharmacological study. *Toxicon*. 1998;36(12):1927-37.

167. Margres MJ, Aronow K, Loyacano J, Rokyta DR. The venom-gland transcriptome of the eastern coral snake (*Micrurus fulvius*) reveals high venom complexity in the intragenomic evolution of venoms. *BMC Genomics*. 2013;14:531.

168. Markland FS. Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon*. 1998;36(12):1749-800.

169. McCleary RJ, Kini RM. Non-enzymatic proteins from snake venoms: a gold mine of pharmacological tools and drug leads. *Toxicon*. 2012 Feb;62:56-74.

170. McDonald WH, Tabb DL, Sadygov RG, MacCoss MJ, Venable J, Graumann J, *et al*. MS1, MS2, and SQT-three unified, compact, and easily parsed file formats for the storage of shotgun proteomic spectra and identifications. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2004;18(18):2162-8.

171. Melani RD, Araujo GDT, Carvalho PC, Goto L, Nogueira FCS, Junqueira M, *et al*. Seeing beyond the tip of the iceberg: A deep analysis of the venome of the Brazilian Rattlesnake, *Crotalus durissus terrificus*. *European Journal of Integrative Medicine*. 2015.

172. Menezes MC, Furtado MF, Travaglia-Cardoso SR, Camargo AC, Serrano SM. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. *Toxicon*. 2006 Mar;47(3):304-12.

173. Menin L, Perchuc A, Favreau P, Perret F, Michalet S, Schoni R, *et al.* High throughput screening of bradykinin-potentiating peptides in Bothrops moojeni snake venom using precursor ion mass spectrometry. *Toxicon*. 2008 Jun 1;51(7):1288-302.
174. Miller I, Crawford J, Gianazza E. Protein stains for proteomic applications: which, when, why? *Proteomics*. 2006 Oct;6(20):5385-408.
175. Minea R, Swenson S, Costa F, Chen TC, Markland FS. Development of a novel recombinant disintegrin, contortrostatin, as an effective anti-tumor and anti-angiogenic agent. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2005;34(4-5):177-83.
176. Minea RO, Helchowski CM, Zidovetzki SJ, Costa FK, Swenson SD, Markland FS, Jr. Vicrostatin - an anti-invasive multi-integrin targeting chimeric disintegrin with tumor anti-angiogenic and pro-apoptotic activities. *PloS one*. 2010;5(6):e10929.
177. Ministério-da-Saúde. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Brasília: Fundação Nacional de Saúde; 2001 Contract No.: Document Number|.
178. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Casos de acidentes por serpentes. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas de 2000 a 2013. Brasília, Brazil,
179. Morais KL, Hayashi MA, Bruni FM, Lopes-Ferreira M, Camargo AC, Ulrich H, *et al.* Bj-PRO-5a, a natural angiotensin-converting enzyme inhibitor, promotes vasodilatation mediated by both bradykinin B(2) and M1 muscarinic acetylcholine receptors. *Biochem Pharmacol*. 2011 Mar 15;81(6):736-42.
180. Moss ML, Bomar M, Liu Q, Sage H, Dempsey P, Lenhart PM, *et al.* The ADAM10 prodomain is a specific inhibitor of ADAM10 proteolytic activity and inhibits cellular shedding events. *J Biol Chem*. 2007 Dec 7;282(49):35712-21.
181. Moura-da-Silva AM, Butera D, Tanjoni I. Importance of snake venom metalloproteinases in cell biology: effects on platelets, inflammatory and endothelial cells. *Curr Pharm Des*. 2007;13(28):2893-905.
182. Moura-da-Silva AM, Cardoso DF, Tanizaki MM. Differences in distribution of myotoxic proteins in venoms from different Bothrops species. *Toxicon*. 1990;28(11):1293-301.
183. Moura-da-Silva AM, Della-Casa MS, David AS, Assakura MT, Butera D, Lebrun I, *et al.* Evidence for heterogeneous forms of the snake venom metalloproteinase jararhagin: a factor contributing to snake venom variability. *Arch Biochem Biophys*. 2003 Jan 15;409(2):395-401.
184. Moura-da-Silva AM, Furlan MS, Caporrino MC, Grego KF, Portes-Junior JA, Clissa PB, *et al.* Diversity of metalloproteinases in Bothrops neuwiedi snake venom transcripts: evidences for recombination between different classes of SVMPs. *BMC Genet*. 2011;12:94.
185. Moura-da-Silva AM, Laing GD, Paine MJ, Dennison JM, Politi V, Crampton JM, *et al.* Processing of pro-tumor necrosis factor-alpha by venom metalloproteinases: a hypothesis explaining local tissue damage following snake bite. *Eur J Immunol*. 1996;26(9):2000-5.

186. Moura-da-Silva AM, Ramos OH, Baldo C, Niland S, Hansen U, Ventura JS, *et al.* Collagen binding is a key factor for the hemorrhagic activity of snake venom metalloproteinases. *Biochimie*. 2008 Mar;90(3):484-92.
187. Moustafa IM, Foster S, Lyubimov AY, Vrieling A. Crystal structure of LAAO from *Calloselasma rhodostoma* with an L-phenylalanine substrate: insights into structure and mechanism. *Journal of molecular biology*. 2006 Dec 15;364(5):991-1002.
188. Munawar A, Trusch M, Georgieva D, Spencer P, Frochaux V, Harder S, *et al.* Venom peptide analysis of *Vipera ammodytes meridionalis* (Viperinae) and *Bothrops jararacussu* (Crotalinae) demonstrates subfamily-specificity of the peptidome in the family Viperidae. *Molecular bioSystems*. 2011 Dec;7(12):3298-307.
189. Muniz J, Ambrosio A, Selistredearaujo H, Cominetti M, Mouradasilva A, Oliva G, *et al.* The three-dimensional structure of bothropasin, the main hemorrhagic factor from *Bothrops jararaca* venom: Insights for a new classification of snake venom metalloprotease subgroups. *Toxicon*. 2008;52(7):807-16.
190. Murayama N, Hayashi MA, Ohi H, Ferreira LA, Hermann VV, Saito H, *et al.* Cloning and sequence analysis of a *Bothrops jararaca* cDNA encoding a precursor of seven bradykinin-potentiating peptides and a C-type natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997 Feb 18;94(4):1189-93.
191. Nakashima K, Nobuhisa I, Deshimaru M, Nakai M, Ogawa T, Shimohigashi Y, *et al.* Accelerated evolution in the protein-coding regions is universal in crotalinae snake venom gland phospholipase A2 isozyme genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995 Jun 6;92(12):5605-9.
192. Nesvizhskii AI, Keller A, Kolker E, Aebersold R. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal Chem*. 2003 Sep 1;75(17):4646-58.
193. Netzel MC. Anaphylaxis: clinical presentation, immunologic mechanisms, and treatment. *J Emerg Med*. 1986;4(3):227-36.
194. Neves-Ferreira AGC, Cardinale N, Rocha SLG, Perales J, Domont GB. Isolation and characterization of DM40 and DM43, two snake venom metalloproteinase inhibitors from *Didelphis marsupialis* serum. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1474(3):309-20.
195. Neves-Ferreira AGC, Valente RH, Domont GB, Perales J. Natural Inhibitors of Snake Venom Metallopeptidases. In: Gopalakrishnakone P, editor. *Handbooks of Toxinology Toxins and Drug Discovery*. New York: Springer; 2015. p. 1-24.
196. Nicolau CA. Aplicação da tecnologia OFFGEL para determinação do proteopeptidoma do veneno de *Bothrops Jararaca*: uma nova abordagem em venômica de serpentes [Dissertação de mestrado]. Rio de Janeiro: Mestre Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2012.
197. Nunez V, Cid P, Sanz L, De La Torre P, Angulo Y, Lomonte B, *et al.* Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox* venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Peru and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards pedomorphism. *Journal of proteomics*. 2009 Nov 2;73(1):57-78.

198. O'Shea JC, Tchong JE. Eptifibatide: a potent inhibitor of the platelet receptor integrin glycoprotein IIb/IIIa. *Expert Opin Pharmacother*. 2002 Aug;3(8):1199-210.
199. Olamendi-Portugal T, Batista CVF, Restano-Cassulini R, Pando V, Villa-Hernandez O, Zavaleta-Martínez-Vargas A, *et al*. Proteomic analysis of the venom from the fish eating coral snake *Micrurus surinamensis*: Novel toxins, their function and phylogeny. *Proteomics*. 2008;8(9):1919-32.
200. Oliveira BM, Coorssen JR, Martins-de-Souza D. 2DE: the phoenix of proteomics. *Journal of proteomics*. 2014 Jun 2;104:140-50.
201. OmPraba G, Chapeaurouge A, Doley R, Devi K, Padmanaban P, Venkatraman C, *et al*. Identification of a novel family of snake venom proteins Veficolins from *Cerberus rynchops* using a venom gland transcriptomics and proteomics approach. *Journal of proteome research*. 2010;9:1882-93.
202. Paes Leme AF, Escalante T, Pereira JG, Oliveira AK, Sanchez EF, Gutierrez JM, *et al*. High resolution analysis of snake venom metalloproteinase (SVMP) peptide bond cleavage specificity using proteome based peptide libraries and mass spectrometry. *Journal of proteomics*. 2011 Apr 1;74(4):401-10.
203. Paine A, Eiz-Vesper B, Blasczyk R, Immenschuh S. Signaling to heme oxygenase-1 and its anti-inflammatory therapeutic potential. *Biochem Pharmacol*. 2010 Dec 15;80(12):1895-903.
204. Paine MJ, Desmond HP, Theakston RD, Crampton JM. Purification, cloning, and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloprotease, jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. Insights into the disintegrin gene family. *J Biol Chem*. 1992;267(32):22869-76.
205. Pamplona A, Ferreira A, Balla J, Jeney V, Balla G, Epiphany S, *et al*. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Nat Med*. 2007 Jun;13(6):703-10.
206. Paramo L, Lomonte B, Pizarro-Cerda J, Bengoechea JA, Gorvel JP, Moreno E. Bactericidal activity of Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops asper* snake venom--synthetic Lys49 myotoxin II-(115-129)-peptide identifies its bactericidal region. *Eur J Biochem*. 1998 Apr 15;253(2):452-61.
207. Passero LF, Laurenti MD, Tomokane TY, Corbett CE, Toyama MH. The effect of phospholipase A2 from *Crotalus durissus collilineatus* on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Parasitology research*. 2008 Apr;102(5):1025-33.
208. Perales J, Muñoz R, Moussatché H. Isolation and partial characterization of a protein fraction from the opossum (*Didelphis marsupialis*) serum, with protecting property against the *Bothrops jararaca* snake venom. *An Acad Bras Cienc*. 1986;58(1):155-62.
209. Petras D, Heiss P, Sussmuth RD, Calvete JJ. Venom Proteomics of Indonesian King Cobra, *Ophiophagus hannah*: Integrating Top-Down and Bottom-Up Approaches. *J Proteome Res*. 2015 Jun 5;14(6):2539-56.

210. Petricevich VL, Teixeira CF, Tambourgi DV, Gutierrez JM. Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms. *Toxicon*. 2000 Sep;38(9):1253-66.
211. Pierre LS, Birrell GW, Earl ST, Wallis TP, Gorman JJ, Jersey JD, *et al.* Diversity of Toxic Components from the Venom of the Evolutionarily Distinct Black Whip Snake, *Demansia vestigiata*. *J Proteome Res*. 2007 Aug 3;6(8):3093-107.
212. Pimenta DC, Lebrun I. Cryptides: buried secrets in proteins. *Peptides*. [Review]. 2007 Dec;28(12):2403-10.
213. Pimenta DC, Prezoto BC, Konno K, Melo RL, Furtado MF, Camargo AC, *et al.* Mass spectrometric analysis of the individual variability of *Bothrops jararaca* venom peptide fraction. Evidence for sex-based variation among the bradykinin-potentiating peptides. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2007;21(6):1034-42.
214. Pla D, Gutierrez JM, Calvete JJ. Second generation snake antivenomics: comparing immunoaffinity and immunodepletion protocols. *Toxicon*. 2012 Sep 15;60(4):688-99.
215. Portes-Junior JA, Yamanouye N, Carneiro SM, Knittel PS, Sant'Anna SS, Nogueira FC, *et al.* Unraveling the processing and activation of snake venom metalloproteinases. *J Proteome Res*. 2014 Jul 3;13(7):3338-48.
216. Protocolo. BCA Protein Assay Reagent: Pierce, Contract No.: Document Number|.
217. Pu XC, Wong PT, Gopalakrishnakone P. A novel analgesic toxin (hannalgesin) from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*). *Toxicon*. 1995 Nov;33(11):1425-31.
218. Quintana JC, Chacon AM, Vargas L, Segura C, Gutierrez JM, Alarcon JC. Antiplasmodial effect of the venom of *Crotalus durissus cumanensis*, crotoxin complex and Crotoxin B. *Acta tropica*. 2012 Nov;124(2):126-32.
219. Quinton L, Le Caer JP, Phan G, Ligny-Lemaire C, Bourdais-Jomaron J, Ducancel F, *et al.* Characterization of toxins within crude venoms by combined use of Fourier transform mass spectrometry and cloning. *Anal Chem*. 2005 Oct 15;77(20):6630-9.
220. Rabilloud T, Charmont S. Detection of proteins on two-dimensional electrophoresis gels. In: Rabilloud T, editor. *Proteome Research: Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Identification Methods*. New York: Springer; 2000. p. 107-26.
221. Rabilloud T, Vuillard L, Gilly C, Lawrence JJ. Silver-staining of proteins in polyacrylamide gels: a general overview. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 1994 Feb;40(1):57-75.
222. Ramos OH, Carmona AK, Selistre-de-Araujo HS. Expression, refolding, and in vitro activation of a recombinant snake venom pro-metalloprotease. *Protein Expr Purif*. 2003 Mar;28(1):34-41.
223. Ramos OH, Selistre-de-Araujo HS. Snake venom metalloproteases--structure and function of catalytic and disintegrin domains. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2006 Mar-Apr;142(3-4):328-46.

224. Rappsilber J. The beginning of a beautiful friendship: cross-linking/mass spectrometry and modelling of proteins and multi-protein complexes. *J Struct Biol.* 2011 Mar;173(3):530-40.
225. Ratledge C, Dover LG. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2000;54:881-941.
226. Reeks T, Lavergne V, Sunagar K, Jones A, Undheim E, Dunstan N, *et al.* Deep venomomics of the *Pseudonaja* genus reveals inter- and intra-specific variation. *Journal of proteomics.* 2016 Feb 5;133:20-32.
227. Reid PF. Alpha-cobratoxin as a possible therapy for multiple sclerosis: a review of the literature leading to its development for this application. *Crit Rev Immunol.* 2007;27(4):291-302.
228. Righetti PG, Drysdale JW. Isoelectric focusing in gels. *J Chromatogr.* 1974 Sep 25;98(2):271-321.
229. Risch M, Georgieva D, von Bergen M, Jehmlich N, Genov N, Arni RK, *et al.* Snake venomomics of the Siamese Russell's viper (*Daboia russelli siamensis*) -- relation to pharmacological activities. *Journal of proteomics.* 2009 Mar 6;72(2):256-69.
230. Rodrigues RS, Boldrini-Franca J, Fonseca FP, de la Torre P, Henrique-Silva F, Sanz L, *et al.* Combined snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of *Bothropoides pauloensis*. *Journal of proteomics.* 2012 May 17;75(9):2707-20.
231. Ruan Y, Yao L, Zhang B, Zhang S, Guo J. Anti-inflammatory effects of Neurotoxin-Nna, a peptide separated from the venom of *Naja naja atra*. *BMC Complement Altern Med.* 2013;13:86.
232. Rucavado A, Escalante T, Franceschi A, Chaves F, Leon G, Cury Y, *et al.* Inhibition of local hemorrhage and dermonecrosis induced by *Bothrops asper* snake venom: effectiveness of early in situ administration of the peptidomimetic metalloproteinase inhibitor batimastat and the chelating agent CaNa₂EDTA. *PG - 313-9. The American journal of tropical medicine and hygiene.* 2000 Nov-Dec;63(5-6).
233. Rucavado A, Escalante T, Teixeira CF, Fernandes CM, Diaz C, Gutierrez JM. Increments in cytokines and matrix metalloproteinases in skeletal muscle after injection of tissue-damaging toxins from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Mediators Inflamm.* 2002 Apr;11(2):121-8.
234. Rusmili MR, Yee TT, Mustafa MR, Hodgson WC, Othman I. Proteomic characterization and comparison of Malaysian *Bungarus candidus* and *Bungarus fasciatus* venoms. *Journal of proteomics.* 2014 Oct 14;110:129-44.
235. Salazar-Valenzuela D, Mora-Obando D, Fernandez ML, Loaiza-Lange A, Gibbs HL, Lomonte B. Proteomic and toxicological profiling of the venom of *Bothrocophias campbelli*, a pitviper species from Ecuador and Colombia. *Toxicon.* 2014 Nov;90:15-25.

236. Saldarriaga MM, Otero R, Nunez V, Toro MF, Diaz A, Gutierrez JM. Ontogenetic variability of Bothrops atrox and Bothrops asper snake venoms from Colombia. *Toxicon*. 2003 Sep 15;42(4):405-11.
237. Sanchez EF, Schneider FS, Yarleque A, Borges MH, Richardson M, Figueiredo SG, *et al.* The novel metalloproteinase atroxlysin-I from Peruvian Bothrops atrox (Jergon) snake venom acts both on blood vessel ECM and platelets. *Arch Biochem Biophys*. 2010 Apr 1;496(1):9-20.
238. Santamaria C, Larios S, Quiros S, Pizarro-Cerda J, Gorvel JP, Lomonte B, *et al.* Bactericidal and antiendotoxic properties of short cationic peptides derived from a snake venom Lys49 phospholipase A2. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Apr;49(4):1340-5.
239. Saviola AJ, Pla D, Sanz L, Castoe TA, Calvete JJ, Mackessy SP. Comparative venomomics of the Prairie Rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) from Colorado: Identification of a novel pattern of ontogenetic changes in venom composition and assessment of the immunoreactivity of the commercial antivenom CroFab(R). *Journal of proteomics*. 2015 May 21;121:28-43.
240. Sebastiano R, Simo C, Mendieta ME, Antonioli P, Citterio A, Cifuentes A, *et al.* Mass distribution and focusing properties of carrier ampholytes for isoelectric focusing: I. Novel and unexpected results. *Electrophoresis*. 2006 Oct;27(20):3919-34.
241. Seixas E, Gozzelino R, Chora A, Ferreira A, Silva G, Larsen R, *et al.* Heme oxygenase-1 affords protection against noncerebral forms of severe malaria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009 Sep 15;106(37):15837-42.
242. Serrano SM, Shannon JD, Wang D, Camargo AC, Fox JW. A multifaceted analysis of viperid snake venoms by two-dimensional gel electrophoresis: an approach to understanding venom proteomics. *Proteomics*. 2005 Feb;5(2):501-10.
243. Sharp AA, Warren BA, Paxton AM, Allington MJ. Anticoagulant therapy with a purified fraction of Malayan pit viper venom. *Lancet*. 1968 Mar 9;1(7541):493-9.
244. Sinz A. Chemical cross-linking and mass spectrometry to map three-dimensional protein structures and protein-protein interactions. *Mass spectrometry reviews*. 2006 Jul-Aug;25(4):663-82.
245. Smith LM, Kelleher NL. Proteoform: a single term describing protein complexity. *Nat Methods*. 2013 Mar;10(3):186-7.
246. Sousa LF, Nicolau CA, Peixoto PS, Bernardoni JL, Oliveira SS, Portes-Junior JA, *et al.* Comparison of phylogeny, venom composition and neutralization by antivenom in diverse species of bothrops complex. *PLoS Neglect Trop D*. 2013;7(9):e2442.
247. Stabeli RG, Marcussi S, Carlos GB, Pietro RC, Selistre-de-Araujo HS, Giglio JR, *et al.* Platelet aggregation and antibacterial effects of an l-amino acid oxidase purified from Bothrops alternatus snake venom. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2004 Jun 1;12(11):2881-6.

248. Stocker K, Fischer H, Meier J. Practical application of the protein C activator Protac from *Agkistrodon contortrix* venom. *Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch.* 1988;115(3):260-4.
249. Suhr SM, Kim DS. Identification of the snake venom substance that induces apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;224(1):134-9.
250. Takeda S, Takeya H, Iwanaga S. Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2011 Jan;1824(1):164-76.
251. Tan CH, Tan KY, Lim SE, Tan NH. Venomics of the beaked sea snake, *Hydrophis schistosus*: A minimalist toxin arsenal and its cross-neutralization by heterologous antivenoms. *Journal of proteomics.* 2015 Aug 3;126:121-30.
252. Tan CH, Tan NH, Sim SM, Fung SY, Gnanathanan CA. Proteomic investigation of Sri Lankan hump-nosed pit viper (*Hypnale hypnale*) venom. *Toxicon.* 2015 Jan;93:164-70.
253. Tashima AK, Zelanis A, Kitano ES, Ianzer D, Melo RL, Rioli V, *et al.* Peptidomics of three *Bothrops* snake venoms: insights into the molecular diversification of proteomes and peptidomes. *Mol Cell Proteomics.* 2012 Nov;11(11):1245-62.
254. Teixeira CF, Landucci EC, Antunes E, Chacur M, Cury Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2. *Toxicon.* 2003 Dec 15;42(8):947-62.
255. Tempone AG, Andrade HF, Jr., Spencer PJ, Lourenco CO, Rogero JR, Nascimento N. *Bothrops moojeni* venom kills *Leishmania* spp. with hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Jan 26;280(3):620-4.
256. Tu AT. *Venoms: Chemistry and Molecular Biology.* New York, USA: John Wiley; 1977.
257. Tu AT. *Reptile Venoms and Toxins. Handbook of Natural Toxins.* New York, USA.: Marcel Dekker; 1991.
258. Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Flohe R, Aumann KD, Roveri A, Schomburg D, *et al.* Diversity of glutathione peroxidases. *Methods in enzymology.* 1995;252:38-53.
259. Usami Y, Fujimura Y, Miura S, Shima H, Yoshida E, Yoshioka A, *et al.* A 28 kDa-protein with disintegrin-like structure (jararhagin-C) purified from *Bothrops jararaca* venom inhibits collagen- and ADP-induced platelet aggregation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;201:331-9.
260. Valente RH, Dragulev B, Perales J, Fox JW, Domont GB. BJ46a, a snake venom metalloproteinase inhibitor. Isolation, characterization, cloning and insights into its mechanism of action. *Eur J Biochem.* 2001;268(10):3042-52.
261. Valente RH, Guimaraes PR, Junqueira M, Neves-Ferreira AG, Soares MR, Chapeaurouge A, *et al.* *Bothrops insularis* venomics: a proteomic analysis supported by transcriptomic-generated sequence data. *Journal of proteomics.* 2009 Mar 6;72(2):241-55.

262. Valente RH, Nicolau CA, Perales J, Neves-Ferreira AGC. Snake proteo-peptidomics: what lies behind the curtain. In: Gopalakrishnakone P, editor. Handbook of Toxinology: Springer; 2014.
263. Viala VL, Hildebrand D, Trusch M, Fucase TM, Sciani JM, Pimenta DC, *et al.* Venomics of the Australian eastern brown snake (*Pseudonaja textilis*): Detection of new venom proteins and splicing variants. *Toxicon*. 2015 Jun 14.
264. Villard E, Soubrier F. Molecular biology and genetics of the angiotensin-I-converting enzyme: potential implications in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res*. 1996 Dec;32(6):999-1007.
265. Vonk FJ, Casewell NR, Henkel CV, Heimberg AM, Jansen HJ, McCleary RJ, *et al.* The king cobra genome reveals dynamic gene evolution and adaptation in the snake venom system. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013 Dec 17;110(51):20651-6.
266. Vonk FJ, Jackson K, Doley R, Madaras F, Mirtschin PJ, Vidal N. Snake venom: From fieldwork to the clinic: Recent insights into snake biology, together with new technology allowing high-throughput screening of venom, bring new hope for drug discovery. *Bioessays*. 2011 Apr;33(4):269-79.
267. Vyas VK, Brahmabhatt K, Bhatt H, Parmar U. Therapeutic potential of snake venom in cancer therapy: current perspectives. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2013 Feb;3(2):156-62.
268. Warrell DA. The global problem of snake bite: its prevention and treatment. In: Gopalakrishnakone P, Tan CK, editors. Recent advances in toxinology research; 1992. p. 121-53.
269. Wart HEV, Birkedal-Hansen H. The cystine switch: A principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87:5578-82.
270. Watanabe L, Shannon JD, Valente RH, Rucavado A, Alape-Giron A, Kamiguti AS, *et al.* Amino acid sequence and crystal structure of BaP1, a metalloproteinase from *Bothrops asper* snake venom that exerts multiple tissue-damaging activities. *Protein Sci*. 2003 Oct;12(10):2273-81.
271. Weinger RS, Rudy C, Moake JL, Olson JD, Cimo PL. Prothrombin Houston: a dysprothrombin identifiable by crossed immunoelectrofocusing and abnormal *Echis carinatus* venom activation. *Blood*. 1980 May;55(5):811-6.
272. Wermelinger LS, Dutra DL, Oliveira-Carvalho AL, Soares MR, Bloch C, Jr., Zingali RB. Fast analysis of low molecular mass compounds present in snake venom: identification of ten new pyroglutamate-containing peptides. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2005;19(12):1703-8.
273. WHO. Rabies and Envenomings: a neglected public health issue - Report of a Consultative Meeting. 2007:http://www.who.int/bloodproducts/animal_sera/Rabies.pdf.

274. WHO. Guidelines for the Production, Control and Regulation of snake antivenom Immunoglobulins.
http://www.who.int/bloodproducts/snake_antivenoms/snakeantivenomguide/en/. 2010.
275. WHO. WORLD MALARIA REPORT; 2014 Contract No.: Document Number|.
276. WHO. Guidelines for malaria treatment. 2015.
277. Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, *et al.* From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Bio/Technology*. 1996;14:61-5.
278. Woessner JF, Nagase H. Matrix metalloproteinases and TIMPs. Oxford: Oxford University Press; 2000.
279. Wüster W, Salomão MG, Quijada-mascareñas JA, Thorpe RS. Origins and evolution of the South American pitviper fauna: evidence from mitochondrial DNA sequence analysis. In: Shuett W, Hoggren M, Douglas ME, Greene HW, editors. *Biology of the vipers*. Eagle Mountain, UT: Eagle Mountain; 2002. p. 111-29.
280. Xu T, Venable JD, Park SK, Cociorva D, *al. e.* ProLuCID, a fast and sensitive tandem mass spectra-based protein identification program. *Mol Cell Proteomics*. 2006;5:S:174.
281. Yamakawa Y, Omori-Satoh T. Primary structure of the antihemorrhagic factor in serum of the Japanese Habu: a snake venom metalloproteinase inhibitor with a double-headed cystatin domain. *J Biochem*. 1992;112(5):583-9.
282. Yates JR, Ruse CI, Nakorchevsky A. Proteomics by Mass Spectrometry: Approaches, Advances, and Applications. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2009;11(1):49-79.
283. Zelanis A, Tashima AK, Pinto AF, Leme AF, Stuginski DR, Furtado MF, *et al.* Bothrops jararaca venom proteome rearrangement upon neonate to adult transition. *Proteomics*. 2011 Nov;11(21):4218-28.
284. Zelanis A, Tashima AK, Rocha MM, Furtado MF, Camargo AC, Ho PL, *et al.* Analysis of the ontogenetic variation in the venom proteome/peptidome of Bothrops jararaca reveals different strategies to deal with prey. *J Proteome Res*. 2010 May 7;9(5):2278-91.
285. Zhang B, Chambers MC, Tabb DL. Proteomic parsimony through bipartite graph analysis improves accuracy and transparency. *J Proteome Res*. 2007 Sep;6(9):3549-57.
286. Zhang H, Li XJ, Martin DB, Aebersold R. Identification and quantification of N-linked glycoproteins using hydrazide chemistry, stable isotope labeling and mass spectrometry. *Nat Biotechnol*. 2003 Jun;21(6):660-6.
287. Zhang Y, Fonslow BR, Shan B, Baek MC, Yates JR, 3rd. Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. *Chem Rev*. 2013 Apr 10;113(4):2343-94.
288. Zhang YJ, Wang JH, Lee WH, Wang Q, Liu H, Zheng YT, *et al.* Molecular characterization of Trimeresurus stejnegeri venom L-amino acid oxidase with potential anti-HIV activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Sep 26;309(3):598-604.

289. Zieler H, Keister DB, Dvorak JA, Ribeiro JM. A snake venom phospholipase A(2) blocks malaria parasite development in the mosquito midgut by inhibiting ookinete association with the midgut surface. *J Exp Biol.* 2001 Dec;204(Pt 23):4157-67.
290. Ziganshin RH, Kovalchuk SI, Arapidi GP, Starkov VG, Hoang AN, Thi Nguyen TT, *et al.* Quantitative proteomic analysis of Vietnamese krait venoms: Neurotoxins are the major components in *Bungarus multicinctus* and phospholipases A2 in *Bungarus fasciatus*. *Toxicon.* 2015 Dec 1;107(Pt B):197-209.
291. Zordoky BN, El-Kadi AO. Effect of cytochrome P450 polymorphism on arachidonic acid metabolism and their impact on cardiovascular diseases. *Pharmacol Ther.* 2010 Mar;125(3):446-63.

8. ANEXO (1)

Comparison of Phylogeny, Venom Composition and Neutralization by Antivenom in Diverse Species of Bothrops Complex

Leijiane F. Sousa^{1,9}, Carolina A. Nicolau^{2,3,9}, Pedro S. Peixoto⁴, Juliana L. Bernardoni¹, Sâmella S. Oliveira^{3,5}, José Antonio Portes-Junior¹, Rosa Helena V. Mourão^{3,6}, Isa Lima-dos-Santos¹, Ida S. Sano-Martins^{3,5}, Hipócrates M. Chalkidis^{3,7}, Richard H. Valente^{2,3}, Ana M. Moura-da-Silva^{1,3*}

1 Laboratório de Imunopatologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil, **2** Laboratório de Toxinologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, **3** Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Toxinas (INCTTox/CNPq), Brazil, **4** Instituto de Matemática e Estatística, Universidade São Paulo, São Paulo, Brazil, **5** Laboratório de Fisiopatologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil, **6** Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, Pará, Brazil, **7** Faculdades Integradas do Tapajós, Santarém, Pará, Brazil

Abstract

In Latin America, *Bothrops* snakes account for most snake bites in humans, and the recommended treatment is administration of multispecific *Bothrops* antivenom (SAB – *soro antibotrópico*). However, *Bothrops* snakes are very diverse with regard to their venom composition, which raises the issue of which venoms should be used as immunizing antigens for the production of pan-specific *Bothrops* antivenoms. In this study, we simultaneously compared the composition and reactivity with SAB of venoms collected from six species of snakes, distributed in pairs from three distinct phylogenetic clades: *Bothrops*, *Bothropoides* and *Rhinocerophis*. We also evaluated the neutralization of *Bothrops atrox* venom, which is the species responsible for most snake bites in the Amazon region, but not included in the immunization antigen mixture used to produce SAB. Using mass spectrometric and chromatographic approaches, we observed a lack of similarity in protein composition between the venoms from closely related snakes and a high similarity between the venoms of phylogenetically more distant snakes, suggesting little connection between taxonomic position and venom composition. P-III snake venom metalloproteinases (SVMPs) are the most antigenic toxins in the venoms of snakes from the *Bothrops* complex, whereas class P-I SVMPs, snake venom serine proteinases and phospholipases A₂ reacted with antibodies in lower levels. Low molecular size toxins, such as disintegrins and bradykinin-potentiating peptides, were poorly antigenic. Toxins from the same protein family showed antigenic cross-reactivity among venoms from different species; SAB was efficient in neutralizing the *B. atrox* venom major toxins. Thus, we suggest that it is possible to obtain pan-specific effective antivenoms for *Bothrops* envenomations through immunization with venoms from only a few species of snakes, if these venoms contain protein classes that are representative of all species to which the antivenom is targeted.

Citation: Sousa LF, Nicolau CA, Peixoto PS, Bernardoni JL, Oliveira SS, et al. (2013) Comparison of Phylogeny, Venom Composition and Neutralization by Antivenom in Diverse Species of Bothrops Complex. *PLoS Negl Trop Dis* 7(9): e2442. doi:10.1371/journal.pntd.0002442

Editor: José Gutiérrez, Universidad de Costa Rica, Costa Rica

Received: May 13, 2013; **Accepted:** August 11, 2013; **Published:** September 12, 2013

Copyright: © 2013 Sousa et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – Grant 063/2010 – Edital Toxinologia), Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde (PAPES VI/FIOCRUZ). LFS, CAN and SSO are recipients of a student fellowship from CAPES; JLB, JAPJ and ILS are recipients of a student fellowship from FAPESP and PSP is recipient of a student fellowship from CNPq. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: ana.moura@butantan.gov.br

⁹ These authors contributed equally to this work.

Introduction

Envenomation by snakebites, which is incorporated by the World Health Organization (WHO) in its list of neglected tropical diseases, constitutes an important worldwide public health concern, particularly in the rural areas of tropical countries as Africa, Asia and Latin America, affecting mostly agricultural workers and children [1]. The estimated number of global envenoming events exceed 400,000, with more than 20,000 fatalities [2]. In Brazil, the incidence is above 25,000 accidents/year, and the incidence in the northern region was 52.6 accidents/100,000 inhabitants in 2008 [3]. Most of the Brazilian accidents with species notification are due to vipers of the genera *Bothrops*

(83.8%), *Crotalus* (8.5%) and *Lachesis* (3.4%), with only 3.4% of accidents related to the Elapidae snakes of the genus *Micrurus* [3]. Antivenoms raised in horses are the recommended treatment in Brazil.

Based on early reports [4], it was accepted that the efficacy of a specific antivenom covers bites by those snake groups with venom represented in the pool of antigens used for horse immunization for the production of that specific antivenom. Recently, the knowledge of venom toxins has increased considerably, especially due to the characterization of detailed composition of venom proteomes based on mass spectrometry. In 2007, the concept of ‘venomics’ was introduced by Calvete et al. [5] and the method was important to describe the venom composition from a great

Author Summary

Snakebite envenomation is a serious health issue in Latin America, particularly in the Amazon, where antivenom administration may be delayed due to logistic constraints. *Bothrops* snakes are involved in most of the snakebite-related accidents in Brazil. This work reports a comparative study of the toxin composition and antigenicity of the *Bothrops* venoms used to prepare the commercial antivenom and its effectiveness against the venom from *Bothrops atrox*, a prevalent Amazon species that is not included in the pool. Our data show a lack of connection between *Bothrops* taxonomic identity and venom composition. We also show that different toxins display distinct reactivity with the tested antivenom. However, the antivenom reacted similarly with each class of toxin present in the venoms of the different snakes studied. Important evidence was the neutralization of the major toxic effects of *B. atrox* venom, not included in the mixture of antigens used to produce the antivenom. Based on the observed antigenicity of the distinct protein classes of toxins, we suggest that it is possible to obtain pan-specific and efficient *Bothrops* antivenoms via immunization with venoms from a few species of snakes that are representative of the protein composition of a large number of targeted species.

number of snake species, as revised recently [6,7]. Then, it was possible to characterize the families of venom toxins represented in the venoms of different species of snakes [6,7]. The implications of venomics in the rational necessary for the development of antivenoms was further supported by the ‘antivenomics’ [8,9], that allowed the identification of venom proteins bearing epitopes recognized by one antivenom and the toxins not covered by the immune response of the hyperimmunized animal. The importance of venomics and antivenomics was readily incorporated in antivenom development, indicating the possibility of a rational design of pan-specific antivenoms combining distinct protein families in immunization pools [10–12].

The venom composition of many species of *Bothrops* complex is already known by venomics [13–27] or indirectly by transcriptomics [28–32]. From these studies, it has become clear that a limited number of protein families compose the venoms of *Bothrops* snakes, with snake venom metalloproteinases (SVMPs), snake venom serine proteinases (SVSPs) and phospholipases A₂ (PLA₂s) being the most abundant and most frequently correlated with the clinical symptoms of envenoming. SVSPs are generally thrombin-like enzymes that are involved in the coagulation disturbances observed in most patients [33]. PLA₂s are involved in local effects and the myotoxicity observed in bites with some species [34]. SVMPs are multifunctional enzymes involved in the local and systemic symptoms of bites, such as the induction of local hemorrhage, inflammatory reaction, activation of coagulation factors and inhibition of platelet aggregation [35]. The variability in venom composition is notable and can be correlated with phylogeny [36,37], age [38,39], sex [40], geographical distribution [13,40,41] and diet [42–44] of the snake. However, venom variability is mostly related to the expression level of each group of toxin rather than to the presence or absence of major families of venom proteins. Moreover, within the same protein family, variability in the toxic properties may also occur when distinct functional motifs are introduced in structurally related toxins, increasing the diversity of targets that can be affected by venom toxins [45,46]. Thus, the relevance of variability in venom

composition should also be reflected in the reactivity with antivenom and its efficacy.

This problem particularly affects *Bothrops* snakes, which are diverse in their morphological and ecological traits and are distributed in different habitats throughout Latin America [47]. Due to the great diversity of *Bothrops* snakes, the systematics and phylogenetic relationships of this group are not completely resolved, and the distinction of snakes in different genera is often suggested. Based on morphology and mtDNA sequences, a broad classification of the *Bothrops* complex by Wüster et al. recognized *Bothrops* and *Bothrocophias* as independent genera [48]; furthermore, Castoe and co-authors [49] have proposed the classification of *Bothrops*, *Bothrocophias* and also *Bothropsis* as independent genera. More recently, the *Bothrops* genus was further divided into three independent genera by Fenwick et al. [50]: *Bothropoides*, *Rhinocerocephis* and *Bothrops*, representing the groups of “jararaca/neuwiedii”, “alternatus” and “jararacussu/atrox” snakes, respectively, previously recognized by Wüster et al. [48]. This classification was further questioned by Carrasco and collaborators [47], and the maintenance of *Bothrocophias* as an independent genus and synonymizing *Bothropsis*, *Bothropoides* and *Rhinocerocephis* within the *Bothrops* genus was suggested. However, according to the emerging methodology of DNA sequencing for cladistic analyses, it is reasonable to expect that further revisions of *Bothrops* systematics will be offered in the near future.

Following the classification of Fenwick and coworkers [50], several species of *Bothropoides*, *Rhinocerocephis* and *Bothrops* groups are involved in snakebite envenomings, contributing to the high number of reported incidents in Brazil [3]. Antibothropic antivenoms are used in the treatment of these patients and are produced in Brazil by horse immunization with the venoms of five species of these snakes: *Bothropoides jararaca*, *Bothropoides neuwiedii*, *Rhinocerocephis alternatus*, *Bothrops moojeni* and *Bothrops jararacussu*. In spite of venomics evidences showing the venom composition of several species, there are still concerns about the efficacy of *Bothrops* antivenoms in the treatment of envenomings inflicted by species whose venom is not used for animal immunization. These objections include mostly the accidents by *Bothrops atrox*, which is the snake responsible for the majority of snake bites in the Amazon, whose venom is not included in the immunization mixture. Most of these concerns arise because, in previous studies, the venoms were independently analyzed and, also, by the lack of comparative neutralization assays in the few papers showing antivenomics data for Brazilian *Bothrops* [16,19,26]. Thus, the complexity of the *Bothrops* group and the relevance of these species from a public health viewpoint justify the need for a multifaceted study comparing the venoms of the most relevant species and their reactivity with antivenoms in the light of recent proteomics studies.

In this study, we used a shotgun approach that allowed a simultaneous comparison of the composition of venoms collected from six species of snakes from the *Bothrops* complex, distributed in pairs from three distinct genera [50]. Fractionated venom components were tested for reactivity with the widely-used antivenom (SAB). The efficacy of the antivenom was then assessed for the neutralization of relevant symptoms of experimental envenomings by (a) *B. jararaca*, which accounts for 50% of venom composition in the immunization pool and is prevalent in the southeastern Brazil, and (b) *B. atrox*, which is not present in the immunization pool although representing a common cause of snakebite in the Amazon. The venom analysis showed that phylogenetic classification *per se* is not directly linked to venom composition. Furthermore, the antivenoms reacted equally with the toxins from the same protein family, regardless of snake phylogeny or the presence of the venom in the immunization pool

used for antivenom production, highlighting new priorities when considering the selection of venoms to be used in the production of antivenoms.

Materials and Methods

Venoms

The venoms of *Bothropoides jararaca*, *Bothropoides neuwiedi* (*B. n. pauloensis*, *B. n. matogrossensis*, *B. n. marmoratus*, *B. n. neuwiedi* and *B. n. diporus* subspecies), *Rhinocerocephis alternatus*, *Rhinocerocephis cotiara*, *Bothrops jararacussu* and *Bothrops atrox* were obtained from adult snakes of both sexes kept in captivity at the Laboratório de Herpetologia, Instituto Butantan, Brazil. The venoms from more than 10 specimens of each species were pooled, freeze-dried and stored at -20°C until use. Venoms from snakes kept under captivity represented as close as possible the same pools of venoms used for antivenom production and were used for proteomics and immunoreactivity assays. For experiments involving the neutralization of *B. atrox* venom toxic activities, we used venoms from wild *B. atrox* snakes collected at the Amazonian Floresta Nacional (FLONA) do Tapajós, Pará, Brazil, under SISBio license 32098-1, aiming to get venom samples as close as possible to the ones responsible for human accidents. Eight snakes were collected in pitfalls or by active search (five males and three females, with sizes ranging from 82 to 110 cm). The snakes were extracted in the herpetarium of Faculdades Integradas do Tapajós, Santarém, Pará, Brazil, and the venom from each snake was individually lyophilized and stored frozen until use, for which a pool was generated with equal proportions of venom from each snake. The chromatographic profile of the pool of venoms from snakes collected at Floresta Nacional do Tapajós was similar to that described below for the *B. atrox* venom pooled from snakes kept under captivity (data not shown).

Antivenoms

The antithropic serum (SAB) was produced at the Instituto Butantan, São Paulo, Brazil in horses immunized with a mixture of the following venoms: *B. jararaca* (50%), *B. neuwiedi* (12.5%), *R. alternatus* (12.5%), *B. moojeni* (12.5%) and *B. jararacussu* (12.5%). The final preparation consists of soluble IgG F(ab')₂ fragments: 1 mL neutralizes the lethality of 5 mg standard *B. jararaca* venom (according to the manufacturer). Anti-jararhagin monoclonal antibodies (MAJar-3) were produced in hybridomas previously selected and maintained in our laboratory, as previously described [51]. The MAJar-3 antibodies are IgG1 isotypes and recognize conformational epitopes located on the jararhagin disintegrin-like domain. MAJar-3 neutralizes jararhagin collagen binding and hemorrhagic activity and cross-reacts with hemorrhagins from venoms of different species of viper snakes [52].

Venomic characterization by shotgun mass spectrometry

Fifty micrograms of each venom were subjected to trypsin digestion, as previously described [53]. The tryptic digests were desalted with in-lab-generated columns packed with Poros R2 resin (Life Technologies, USA). Each of the 12 venom digests generated (6 venoms in duplicate) were analyzed in triplicate by nanoLC-MS/MS. The separation was performed on a 75 μm \times 30 cm column packed with a 5- μm , 200 Å Magic C-18 AQ matrix (Michrom Bioresources, USA). The eluted peptides were directly injected into an LTQ/Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo, USA) for analysis. The MS1 spectra were acquired using the orbitrap analyzer (300 to 1,700 m/z) at a 60,000 resolution (for m/z 445.1200). For each spectrum, the 10 most intense ions were subjected to CID fragmentation, followed by

MS2 acquisition on a linear trap analyzer. The tandem mass spectra were extracted by RAW Xtractor (version 1.9.9.2) [54]. All of the MS/MS samples were analyzed using ProLuCID (version 1.3.1) [55]. ProLuCID was set up to search a database (forward + reverse decoy) that was built from the protein entries contained in the NCBI non-redundant database from April 29, 2012 that satisfied the following search terms criteria: “serpentes OR snakes OR snake OR venom OR venoms OR bothrops OR bothrops OR bothrocophias OR rhinocerocephis OR bothropoides”. The database was comprised of 87,384 entries (43,692 “forward” and 43,692 “reverse decoy”). The ProLuCID search was performed with a fragment ion mass tolerance of 600 ppm and a parent ion tolerance of 70 ppm. Cysteine carbamidomethylation was specified as a fixed modification. Scaffold version 4.0.4 (Proteome Software Inc., USA) was used to validate the MS/MS-based peptide and protein identifications. The peptide identifications were accepted if they could be established at greater than 99.0% probability by the Peptide Prophet algorithm [56], with Scaffold delta-mass correction, and the protein identifications were accepted if they could be established at greater than 99.0% probability and contained at least 2 identified peptides. The protein probabilities were assigned by the Protein Prophet algorithm [57]. The acceptable false discovery rates, at the peptide and protein levels, were less than or equal to 1%.

Venom fractionation

The venoms were fractionated by reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) according to previously described reports [16], with some modifications. Samples of 5 mg of crude lyophilized venom were dissolved in 250 μL 0.1% trifluoroacetic acid (TFA), and the insoluble material was removed by centrifugation at 18,400 \times g for 10 min at room temperature. The proteins in the soluble material were applied to a Vydac C-18 column (4.6 \times 250 mm, 10- μm particle size) coupled to an Agilent 1100 HPLC system. The column was eluted at 1 mL/min with a gradient of 0.1% TFA in water (solution A) and 0.1% TFA in acetonitrile (solution B) (5% B for 10 min, followed by 5–15% B over 20 min, 15–45% B over 120 min, 45–70% B over 20 min and 70–100% B over 10 min). The separations were monitored at 214 nm, and the peaks were collected manually and dried in a Speed-Vac (Savant). The fractions were resuspended in PBS, and the protein concentration was estimated by OD at 280 nm in a NanoVue plus spectrophotometer (GE Healthcare).

Venom clustering

The venoms were classified according to their toxin composition by hierarchical clustering of observations constructed using nearest neighbor linkage method (minimum Euclidean distance between items in different clusters), considering initially each observation as an individual cluster. The degrees of similarity between observations were expressed in terms of a cluster tree (dendrogram). We performed also a Principal Component Analysis (PCA) in order to understand the key toxins responsible for the venom clustering. The principal components 1 (PC1) and 2 (PC2), which were responsible for explaining more than 70% of the total variability, were calculated using the covariance matrix. The toxin composition loadings and venom scores were expressed in terms of loading and score plots. These procedures were performed in Minitab 16 software.

The variables used for clustering and PCA were the relative concentrations of each toxin family, accessed by shotgun mass spectrometry. The mean of each protein family spectral counts was normalized by the total venom counting [1,891 (*B. atrox*); 1,727 (*B. jararacussu*); 2,719 (*B. jararaca*); 2,287 (*B. neuwiedi*); 1,252

(*R. alternatus*) and 1,767 (*R. cotiara*)], distributed within the identified protein families: SVMP-I, -II and -III (snake venom metalloproteinase - classes P-I, P-II and P-III); PLA2 (phospholipase A2); SVSP (snake venom serine proteinase); CLEC (C-type lectin); CLECL (C-type lectin-like); LAAO (L-amino acid oxidase); NGF (nerve growth factor); HYALU (hyaluronidase); VEGF (vascular endothelial growth factor); CRISP (cysteine-rich secretory protein); PDIEST (phosphodiesterase 1); ECTONT (ecto-5'-nucleotidase); PLB (phospholipase B); GLUTCYC (glutaminy cyclase) and ACTIN (actin).

The venoms were also analyzed by the relative mAU of the highest peaks collected in C-18 reverse-phase chromatography in the elution time intervals of 56–57, 57–58, 58–60, 67–71, 108–112, 113–116, 121–123, 124–127, 128–129, 130–132, 134–136, 136–138, 139–140, 140–150, 150–152, 153–155, 157–159, 160–162, 163–164, 164–166, 166–168, 169–170, and 171–172 minutes. The mAU values of the peaks were normalized in % by the mAU of the highest peak eluted in the chromatography, taken as 100%.

ELISA assays

Samples containing 100 μ L whole venom (10 μ g/mL) or isolated fractions (1 μ g/mL), in carbonate buffer (pH 9.6), were used to coat maxisorb microplates (Nunc). To determine the antibody titers, plates coated with whole venom were incubated with serial dilutions of SAB (from 1:10,000), followed by incubation with anti-horse IgG labeled with peroxidase (1:2,000). For assessing the antigenicity of the fractions, the plates were incubated with a fixed dilution of SAB (1:1,000) or MAJar-3 (1:50), followed by incubation with anti-horse IgG (1:1,000) or anti-mouse IgG (1:1,000) labeled with peroxidase. The reactions were developed with ortho-phenylenediamine/H₂O₂ as the enzyme substrate, and the products were detected at 490 nm. The reactions were performed in duplicates in three independent experiments. The results of antivenom titration are expressed as mean \pm sd of the six OD values. The results of fraction antigenicity were calculated as mean of the six OD values after normalization using as 100% the maximal OD value obtained in each of the independent experiments [(Fraction OD/maximal OD of the test) \times 100].

Western blotting

Samples of crude venom (10 μ g) were subjected to 12.5% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) under non-reducing conditions. After SDS-PAGE, the separated proteins were transferred to nitrocellulose membranes, which were then immersed in a blocking solution (5% non-fat milk in Tris-saline). The membranes were incubated with SAB (1:1,000) as the primary antibody and then with peroxidase-labeled goat anti-horse IgG (1:1,000). The reactive bands were detected by incubation with 4-chloro- α -naphthol and H₂O₂. The results shown represent three independent experiments.

Antivenom efficacy

For accessing the neutralization of the lethal and hemorrhagic venom activities, Swiss mice bred and maintained at the Instituto Butantan (Brazil) animal house were used as an animal model.

For the neutralization of hemorrhagic activity, doses of 10 μ g *B. jararaca* or *B. atrox* venom were incubated with SAB at ratios of 1, 2 or 4 times the SAB volume required to neutralize 10 μ g of reference venom, according to the manufacturer. The mixtures were incubated at 37°C for 30 min, and a 50- μ L aliquot of each mixture was injected intradermally in the dorsa of a group of 5 mice. The control groups included mice injected with PBS or with

venom incubated with PBS. At three hours after the injection, the mice were sacrificed by CO₂ inhalation; the skin of the dorsa was removed, and the hemorrhagic spots were measured (longest diameter multiplied by the diameter perpendicular to it). The results represent the values obtained for 5 different mice and are expressed as the % neutralization using as 100% activity the value obtained after an injection with venom incubated with PBS.

For the neutralization of lethal activity, the LD₅₀ values of *B. jararaca* and *B. atrox* venoms were estimated according to previous studies [58] to avoid unnecessary animal sacrifice. In all experiments, 3 LD₅₀ doses of *B. jararaca* (105 μ g) or *B. atrox* (225 μ g) venom were incubated with SAB at ratios of 1, 2 and 4 times the potency reference value (1 mL/5 mg venom). The mixtures were incubated at 37°C for 30 min, and 500- μ L aliquots were injected intraperitoneally in groups of 5 mice. Control groups included mice injected with PBS or with venom incubated with PBS. Lethality was recorded over a period of 48 hours. The results shown represent the values obtained in 3 independent experiments and are expressed as the % neutralization considering the number of dead/live mice after 48 hours.

The neutralization of the coagulant activity was determined as previously described [59], with some modifications. Samples containing 2 minimum coagulant doses of *B. jararaca* (71.3 μ g/mL) or *B. atrox* (21.7 μ g/mL) venom were incubated with several dilutions of SAB for 30 min at 37°C. Each mixture was added to 100 μ L bovine plasma, and the clotting times were recorded using a model ST4 mechanical coagulometer (Diagnostica Stago). Neutralization was expressed as the effective dose (ED), defined as the antivenom/venom ratio at which the clotting time was increased threefold when compared to the clotting time of plasma incubated with venom alone.

Ethics statement

All experiments involving mice were approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Instituto Butantan (CEUAIB), São Paulo, Brazil, (application approval number 752/10), who certified its agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA).

Results and Discussion

To evaluate the relationship between venom composition and phylogenetic position of the species, we analyzed the proteome of the venoms from the six selected species using shotgun nanoESI-LTQ/Orbitrap. The distribution of the protein families in selected venoms was calculated according to the normalized total spectral counts. As shown in Figure 1, the data analysis revealed 15 different protein groups in different proportions: SVMP-I, -II and -III (snake venom metalloproteinase - classes P-I, P-II and P-III); PLA2 (phospholipase A2); SVSP (snake venom serine proteinase); CLEC (C-type lectin); CLECL (C-type lectin-like); LAAO (L-amino acid oxidase); NGF (nerve growth factor); HYALU (hyaluronidase); VEGF (vascular endothelial growth factor); CRISP (cysteine-rich secretory protein); PDIEST (phosphodiesterase 1); ECTONT (ecto-5'-nucleotidase); PLB (phospholipase B); GLUTCYC (glutaminy cyclase) and ACTIN (actin). The SVMPs were the most abundant toxins in all of the venoms, particularly in the *B. atrox*, *R. alternatus*, *R. cotiara* and *B. jararaca* venoms, in which class P-III was notably the predominant toxin. PLA₂s predominated in the *B. jararacussu* venom and was found in significant amounts in the *B. neuwiedi* venom. A significant contribution of C-type lectin-like proteins was also detected in the *B. jararaca*, *R. alternatus* and *B. atrox* venoms, whereas the SVSPs and LAAOs

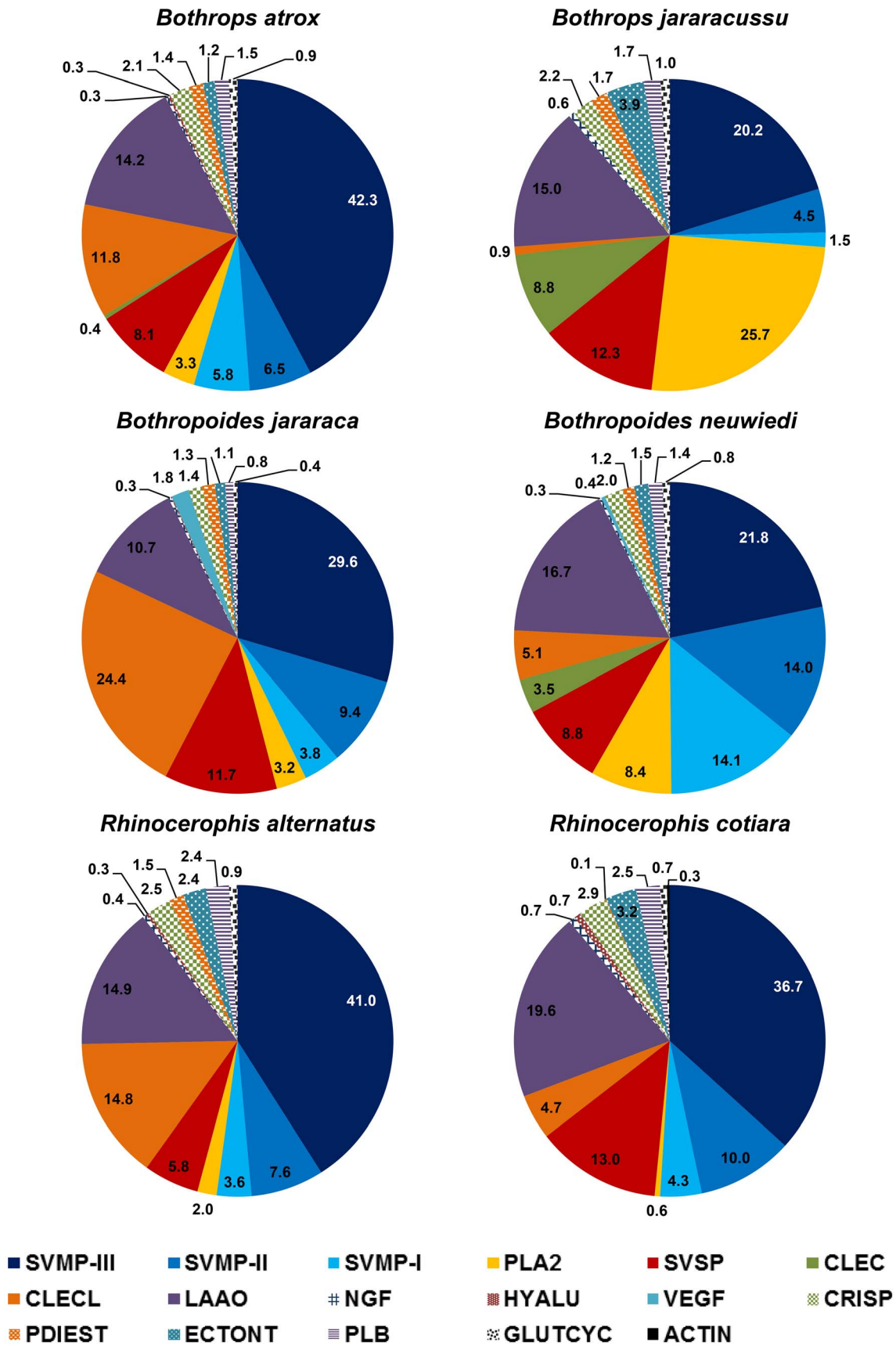


Figure 1. Protein family distribution for the venoms of the three different snake genera, as determined using a shotgun proteomics approach. Each venom sample was prepared in duplicate, and the MS analyses were performed in triplicate for each venom sample replicate (a total of six MS analyses per venom). The data represent the mean of the normalized total spectral count distributed as follows: 1,891 (*B. atrox*); 1,727 (*B.*

jararacussu); 2,719 (*B. jararaca*); 2,287 (*B. neuwiedi*); 1,252 (*R. alternatus*) and 1,767 (*R. cotiara*). The following were identified: SVMP-I, SVMP-II and SVMP-III (snake venom metalloproteinase - classes P-I, P-II and P-III); PLA₂ (phospholipase A₂); SVSP (snake venom serine proteinase); CLEC (C-type lectin); CLECL (C-type lectin-like); LAAO (L-amino acid oxidase); NGF (nerve growth factor); HYALU (hyaluronidase); VEGF (vascular endothelial growth factor); CRISP (cysteine-rich secretory protein); PDIEST (phosphodiesterase 1); ECTONT (ecto-5'-nucleotidase); PLB (phospholipase B); GLUTCYC (glutamyl cyclase) and ACTIN (actin).
doi:10.1371/journal.pntd.0002442.g001

were almost equally distributed in all of the venoms. One interesting fact was the significant contribution of C-type (true) lectins in the *B. jararacussu* (8.8%) and *B. neuwiedi* (3.5%) venoms, in parallel with its absence (<1%) in the other venoms (Figure 1). Comparing these data with previous venomomics studies [16,18–20,23], the major venom protein families as SVMPs, PLA₂s and SVSPs were detected in our study in equivalent proportions. However, shotgun nanoESI-LTQ/Orbitrap allowed the detection in all venoms tested of some proteins not yet described as PDIEST, ECTONT, PLB and GLUTCYC. Also, NGF, detected here in all venoms, and HYALU, present in *B. atrox*, *B. jararaca*, *R. alternatus* and *R. cotiara* venoms, were previously detected in transcriptomes of *B. jararacussu* and *Bothropoides pauloensis*, respectively [19,30], but not in their venomes. Five spectra identified as actin were detected in *R. cotiara* venom shotgun and due to the high sensitivity of the method, may derive from a minor contamination of the venom with venom gland cells. The most striking difference was the presence of significant amounts of LAAO, CLECL and CLEC spectra detected in our samples, compared to the previous venomomics studies. Proteomics by shotgun nanoESI-LTQ/Orbitrap is based on a whole venom digestion by trypsin and the peptide mixture is then fractionated and analyzed in a high sensitive detection system. This approach may bias peptides with higher ionizable efficiency, but all protein families will be represented in the original mixture at the same proportions as they are present on venoms and the bias due to ionization efficiency will be the same for similar peptides present on venoms from different species. Thus, this method is appropriate for comparative studies, allowing the simultaneous analysis of different venoms, under exactly the same conditions. On the other hand, the traditional venomomics [5] includes one step in which proteins are quantified and selected after SDS-PAGE separation, according to their staining by Coomassie blue. After trypsinization of selected bands, peptide detection and protein identification will also depend on peptide ionizable efficiency. It is well known that proteins present in venom mixtures in low proportions are hardly detectable by SDS-PAGE as some other venom proteins may be weakly stained. These proteins would be neglected in total protein detection and also when calculating their proportional participation in venom composition. The differences in protein separation methods and sensitivity of detection systems could explain the higher participation of some protein families described in our study when compared to the traditional venomomics.

The venoms were also compared according to the elution profile from reverse-phase C-18 columns. To compare our findings with the previous data from *B. atrox*, *B. cotiara* and *B. neuwiedi* venomomics studies [16,19,20], C-18 reverse-phase chromatography protocols using similar columns, buffer systems and elution conditions were used to fractionate the venoms. Figure 2 shows the chromatographic profile of the venoms from the six species selected for this study. As expected, the venoms presented comparable chromatographic profiles to those reported in the referenced studies. According to these previous studies, the major protein families were eluted as follows: disintegrins at approximately 50–60 min [19,20]; basic PLA₂s at approximately 110–120 min [19]; P-I SVMPs, some D-49 PLA₂s and SVSPs between

120 and 160 min [18–20] and P-III SVMPs predominating after 160 min [18–20]. Using these data as references, P-III SVMPs appeared to be the most abundant antigens in the chromatograms of the *B. atrox*, *R. alternatus*, *R. cotiara*, *B. jararaca* and *B. neuwiedi* venoms, whereas several different peaks in the region corresponding to P-I SVMPs and SVSPs were detected. These observations are consistent with our venomomics analysis results shown in Figure 1 and with previous proteomic studies in which P-III SVMPs comprised more than 50% of *B. atrox* venom [16,18], approximately 50% of *R. alternatus* venom [23], approximately 70% of *R. cotiara* venom [20] and approximately 25.9% of *B. neuwiedi* venom [19]. SVMPs were also reported to comprise 53.1% of *B. jararaca* venom gland toxin transcripts [31]. The *B. jararacussu* venom was the most distinct venom in this group, showing a predominant peak in the PLA₂ region and a low abundance of SVMPs, which is consistent with the literature showing a high expression of PLA₂ in *B. jararacussu* venom glands and representing 35% of the total transcripts, followed by only 16% SVMPs and 2% SVSPs [30]. The marked difference in *B. jararacussu* venom compared to the other *Bothrops* species was previously reported [60], and a K-49 myotoxin yield of 25% from the crude venom was purified and considered to be the predominant antigen of the *B. jararacussu* venom [61].

According to the independent parameters used to compare the venoms, in *Bothrops*, the *B. jararacussu* profile was very different from that of *B. atrox*, showing a higher content of phospholipase A₂ and a smaller amount of the class P-III metalloproteinase (SVMP) group, as detected either by proteomics or by the elution profile of the native proteins. Within the *Bothropoides* genus, major differences were observed by proteomics, such as the higher content of CLECL and P-III SVMP in *B. jararaca* and PI and PII SVMPs, PLA₂ and CLEC in *B. neuwiedi*. The venoms were more similar within the *Rhinocerocephis* genus, particularly when comparing the elution profile of the native proteins, though a higher contribution of CLECL was found in *R. alternatus*, and higher contents of L-amino acid oxidase and serine proteinase were detected in the *R. cotiara* venom using the proteomics approach. However, the distribution of *B. atrox* venom components was very similar to that of *R. alternatus* by both methods. Furthermore, the pattern observed for *B. neuwiedi* was closer to that of *B. jararacussu* venom due to the presence of higher levels of PLA₂ and CLEC (Figures 1 and 2). Thus, apparently, venom composition was not related to the phylogenetic position of the snakes.

In order to statistically demonstrate these differences, the normalized values of the venom composition obtained by the total spectrum counts of each protein family, and the mAU values of the major peaks eluted in different volumes during the C-18 chromatography, were used as variables to cluster the venoms of snake species. A Principal Component Analysis (PCA) was also carried out in order to understand the key toxins responsible for the venom clustering. The resulting dendrograms and loading and score plots of the PCA are shown in Figures 3 and 4, respectively. Clustering according to the C-18 elution profile shows a strong similarity between *R. alternatus* and *B. jararaca* venoms. *B. atrox* and *R. cotiara* venoms also show similar elution profile, but different than *R. alternatus* and *B. jararaca* venoms, forming, therefore, two

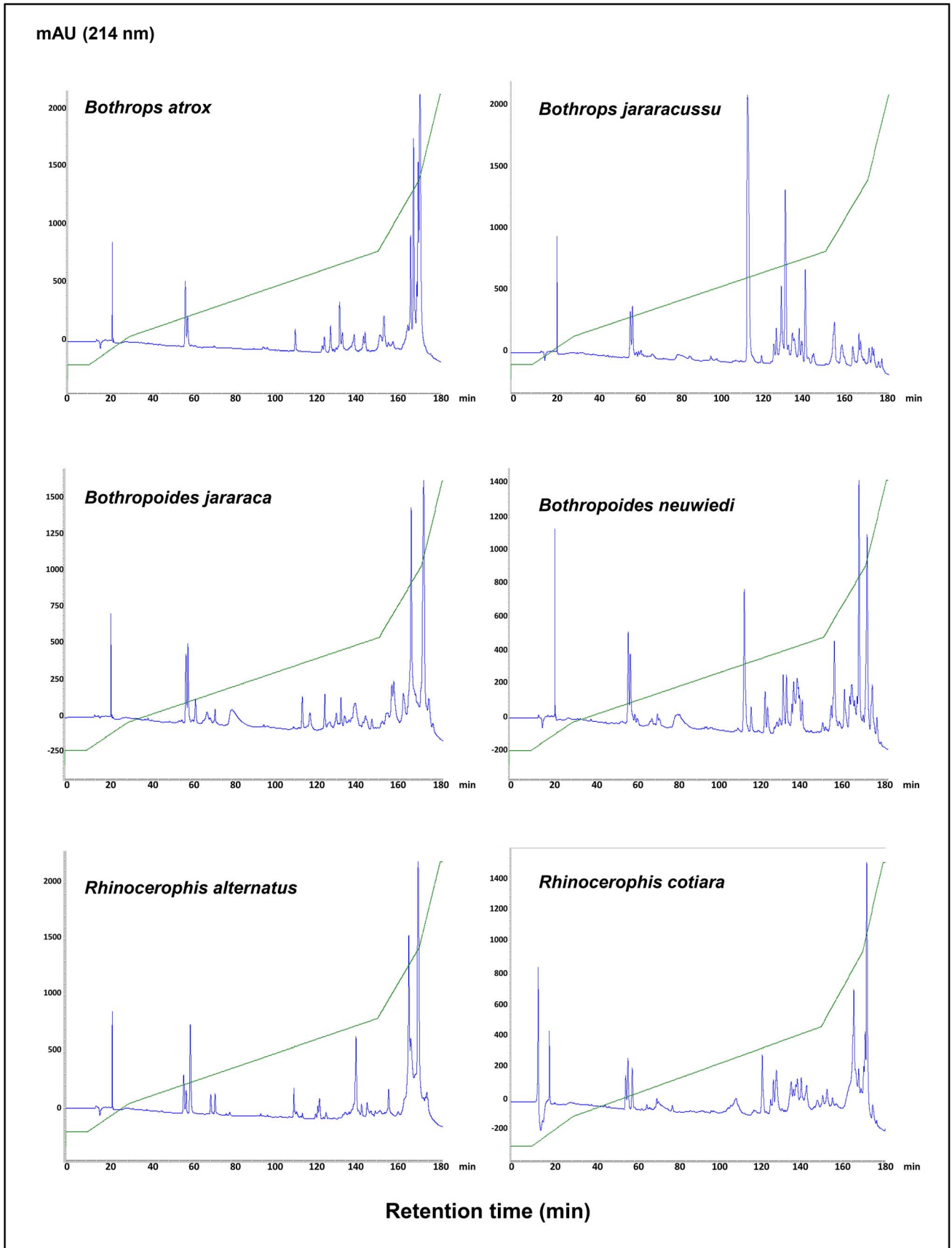


Figure 2. Comparison of the elution profiles of venoms from snakes classified in different genera. Samples containing 5 mg of crude lyophilized venom from *Bothrops atrox*, *Bothrops jararacussu*, *Bothropoides jararaca*, *Bothropoides neuwiedi*, *Rhinocerothis alternatus* and *Rhinocerothis cotiara*, species maintained at Instituto Butantan herpetarium, were applied to a Vydac C-18 column (4.6×250 mm, 10- μ m particle size) coupled to an Agilent 1100 HPLC system. The fractions were eluted at 1 mL/min, with a gradient of 0.1% TFA in water (solution A) and 0.1% TFA in acetonitrile (solution B) (5% B for 10 min, followed by 5–15% B over 20 min, 15–45% B over 120 min, 45–70% B over 20 min and 70–100% B over 10 min). The separations were monitored at 214 nm.
doi:10.1371/journal.pntd.0002442.g002

different clusters. On the other hand, *B. neuwiedi* and *B. jararacussu* venoms reveal lower similarity with the two former clusters, with *B. jararacussu* having the most distinct features (Figure 3). In the PCA, shown in Figure 4A, components with most prominent loadings that contributed to venom clusterization are the fractions eluted after 160 min with the highest negative values of PC1 (Fraction 164–166: PC1 = -0.365, PC2 = 0.209; Fraction 166–168: PC1 = -0.175, PC2 = -0.128; Fraction 169–170: PC1 = -0.461, PC2 = 0.481; Fraction 171–172: PC1 = -0.311, PC2 = -0.783). These fractions were characterized mostly as class P-III SVMPs in other studies [18–20] and reacted with MAJar-3 monoclonal antibodies in this study (see below). Fractions with the highest PC1 positive values were eluted between 108–112 min (PC1 = 0.630, PC2 = 0.029), recognized as PLA₂s in previous studies [19], and fractions between 130–132 min (PC1 = 0.330, PC2 = -0.018), characterized as class P-I SVMP in the venom of adult *B. atrox* from El Paují (Orinoquia, Venezuela) that underwent ontogenetic variation [16]. With respect to proteomic data, *B. atrox* and *R. alternatus* venoms were the most closely related, and distances to this group increased gradually for *R. cotiara*, *B. jararaca*, *B. neuwiedi* and *B. jararacussu* venoms. The clustering of *B. atrox* and *R. alternatus* venoms is related to high values of CLECL and P-III SVMPs, which are the proteins with most prominent loadings (CLECL: PC1 = -0.431, PC2 = 0.789, P-III SVMPs: PC1 = -0.592, PC2 = -0.472), and low values of PLA₂ and CLEC, also with significant loadings (PLA₂: PC1 = 0.245, CLEC: PC1 = 0.245). *R. cotiara* venom shows similar pattern with respect to P-III SVMP, PLA₂ and CLEC, but low values of CLECL and high values of LAAO (PC1 = 0.037, PC2 = -0.339). On the other hand, *B. jararaca* venom reveals low values of LAAO and large

values of CLECL. *B. neuwiedi* and *B. jararacussu* venoms present an opposite pattern, with high values of PLA₂ and CLEC and low values of PIII-SVMP (Figure 4 B).

The dendrograms and PCAs obtained using the distinct sets of variables do not coincide, as they were based in distinct parameters. The number of total spectral counts of a given protein is not necessarily related to its mAU 214; moreover, chromatographic fractions represent mixtures of protein families treated as independent variables in the cluster corresponding to the proteomic data. In spite of these differences, both sets of variables indicate that the distribution of venoms is not related to the phylogenetic position of the snakes. It is important to note that a more comprehensive study using venoms from a larger number of species, quantitative assays for isolated components and also complete sequences of venom proteins would be essential to a definitive support of the lack of connection referred to above. Nevertheless, our data are supported by the literature. Taken together, the clusterization and PCA analysis indicate a polarization among the venoms. According to significant PC1 loadings, *B. atrox*, *R. alternatus*, *R. cotiara* and *B. jararaca* venoms are clearly opposite to *B. jararacussu* venom, the former group with prominent negative PC1 values of class P-III SVMPs, while *B. jararacussu* venom shows a polarization towards the presence of PLA₂s and class P-I SVMPs. The same toxin polarization has been indicated to venoms from snakes that conserved the paedomorphic characteristics in their venoms (first group) and venoms of snakes whose venom underwent ontogenetic variation (in our study, *B. jararacussu* venom) [13,16,18,38,39]. Interestingly, *B. neuwiedi* venom was grouped closer to *B. jararacussu* in the cluster analysis, but showed smaller negative PC1 scores, in opposition to *B.*

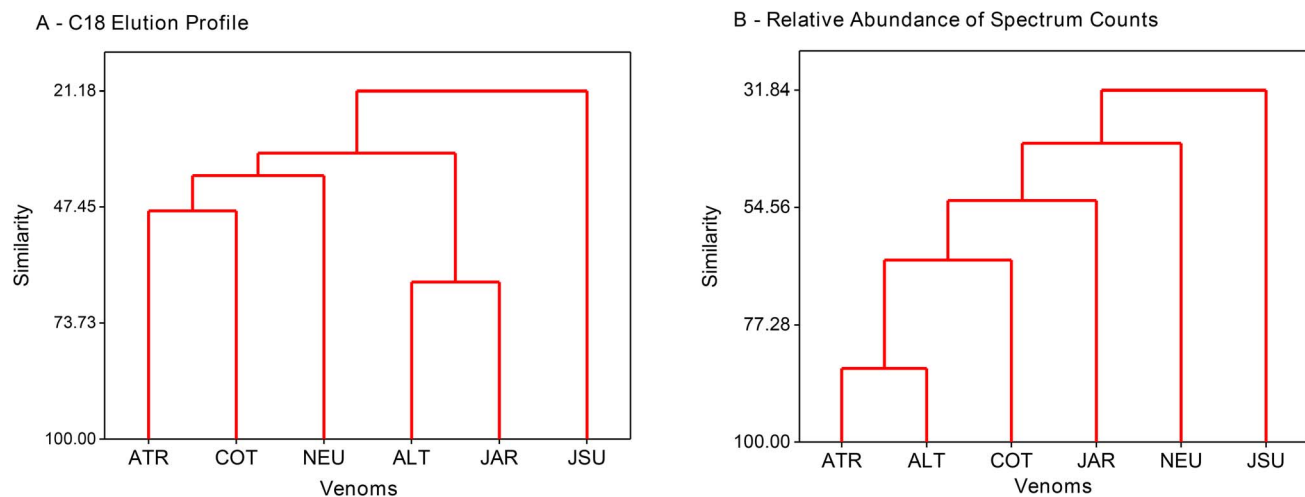


Figure 3. Venom clustering according to toxin composition. The venoms from *Bothrops atrox* (ATR), *Bothrops jararacussu* (JSU), *Bothropoides jararaca* (JAR), *Bothropoides neuwiedi* (NEU), *Rhinocerothis alternatus* (ALT) and *Rhinocerothis cotiara* (COT) were classified according to their protein composition by hierarchical clustering of the observations, including as a variable the normalized maximal mAU at 214 nm in defined elution intervals of C-18 reverse-phase chromatography (Panel A) or normalized total spectral counts of each protein group, as evaluated by shotgun mass spectrometry (Panel B). The procedure used an agglomerative hierarchical method linked by the minimum Euclidean distance between an item in one cluster and an item in another cluster (nearest neighbor) using the Minitab 16 software.
doi:10.1371/journal.pntd.0002442.g003

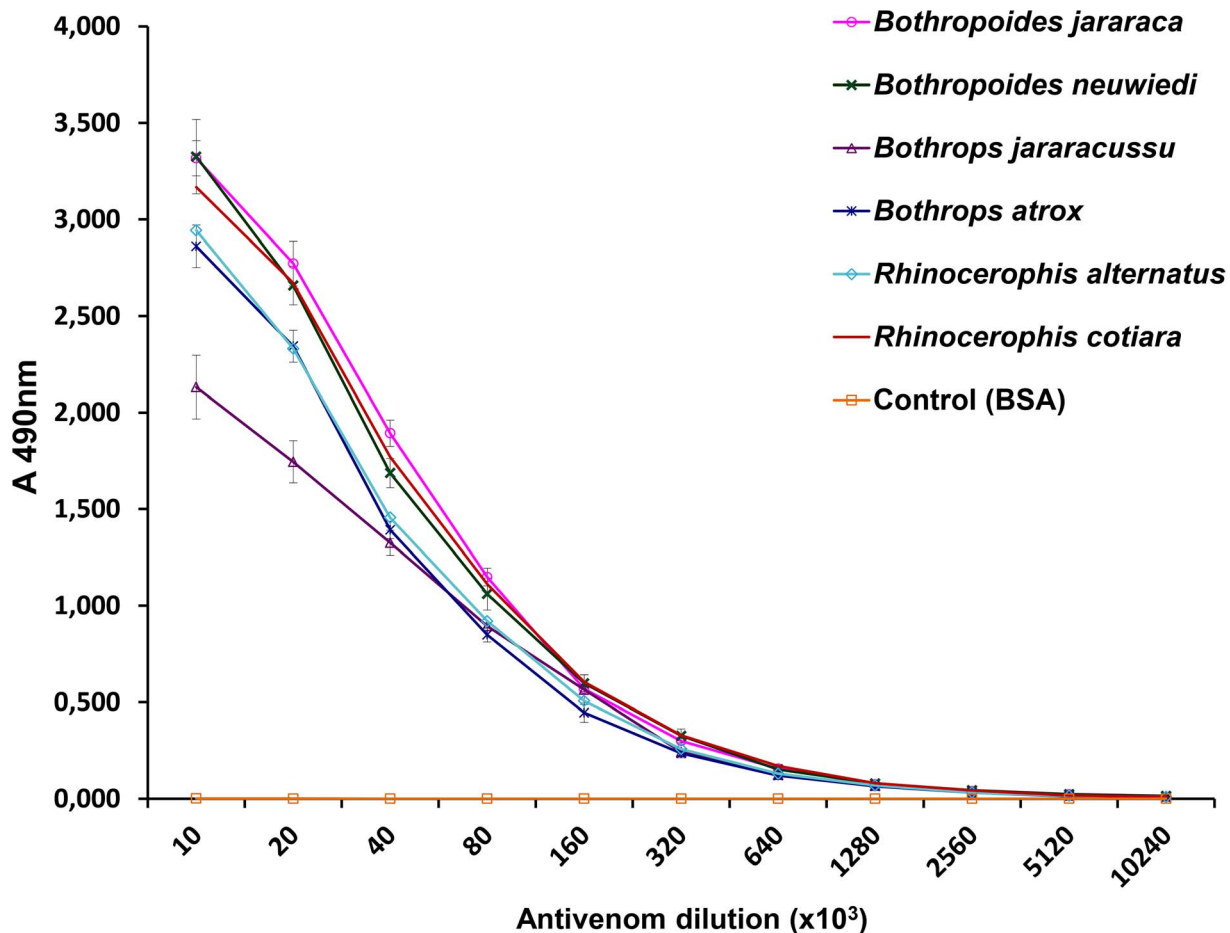


Figure 5. Comparison of ELISA titration curves of *Bothrops* antivenom with venom from snakes classified in different genera. Samples containing 100 μ L whole venom (10 μ g/mL) were used to coat maxisorb microplates (Nunc), which were incubated with crescent dilutions of SAB (starting from 1:10,000), followed by incubation with anti-horse IgG labeled with peroxidase (1:2,000). The reactions were developed with ortho-phenylenediamine/H₂O₂ as the enzyme substrate, and the products were detected at 490 nm. The experiments were performed in duplicate in three independent experiments, and the results are expressed as the mean \pm sd of the six OD values. doi:10.1371/journal.pntd.0002442.g005

nicity of SVMPs class P-III. Bands between 20 and 30 kDa, with masses corresponding to SVSPs and P-I SVMPs, were also recognized by SAB (Figure 6B). The SAB reactivity with each fraction from reverse-phase chromatography was also assessed and compared to the reactivity of a monoclonal antibody, MAJar-3, which recognizes the disintegrin domain of P-III SVMPs [51]. In Figure 7, we demonstrate the strong reactivity of the monoclonal antibody with the fractions eluted after 160 minutes (in all chromatograms), confirming that these fractions correspond to P-III SVMPs. The same fractions were the most SAB-reactive antigens in all venoms, regardless of whether these venoms were included in the immunization pool used to prepare the SAB antivenom. Even for the *B. jararacussu* venom, with a low abundance of SVMPs, the fractions eluted after 160 minutes were the most reactive. Intermediate levels of reactivity were detected with the fractions eluted between 120 and 160 minutes, with very limited reactivity for some, particularly the venoms of *B. atrox* and *B. alternatus*, suggesting a lower antigenicity of P-I SVMPs and SVSPs in relation to the SAB antivenom. Interestingly, three small peaks collected from the *R. cotiara* venom at approximately 140 minutes were strongly reactive with SAB and also with MAJar-3, suggesting the presence of P-III SVMPs in this venom, with distinct structural features and elution profiles. Despite the

inclusion of *B. jararacussu* and *B. neuwiedi* venoms in the immunization pool, the reactivity of SAB with their fractions (showing PLA₂ elution characteristics) from 100 to 110 minutes was moderate. The fractions eluted prior to 100 minutes in all of the chromatograms were poorly recognized by SAB. In other publications, fractions that eluted before 100 min under similar chromatographic conditions corresponded to disintegrins [19,20], vasoactive peptides [19] or DC fragments of SVMPs [20].

Interestingly, despite the different methods used in this study, our results are comparable to those of Núñez et al. [18] and Calvete et al. [16], who showed the complete immunoprecipitation of PIII-SVMPs, to a minor extent of SVSPs and DC-fragments, and limited immunoreactivity towards PLA₂s molecules and PI-SVMPs by antivenomics of *B. atrox* venom with commercial antivenoms. Using antivenomics of *B. asper* venom and commercial antivenoms, Gutiérrez et al. [9] also showed complete immunodepletion of P-III SVMPs and partial depletion of PLA₂s, some serine proteinases, and P-I SVMPs. Correa-Neto et al. [26] approached the same issue by immunomics where the western blots of 2D-gel electrophoresed venoms revealed that antiserum against *B. jararacussu* venom showed higher reactivity to SVMPs and weaker reactivity towards SVSPs and PLA₂s, and anti-jararaca serum preferentially recognized SVMPs and SVSPs

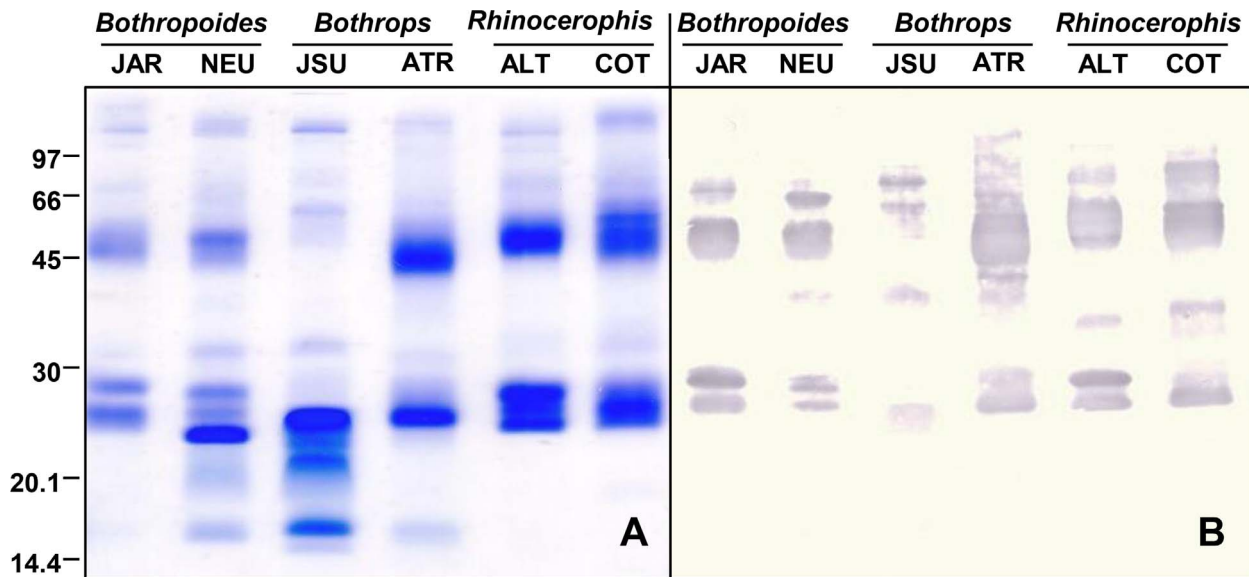


Figure 6. Comparison of electrophoretic profile (A) and *Bothrops* antivenom antigenic reactivity (B) of venoms from snakes classified in different genera. Samples containing 10 μ g *Bothropoides jararaca* (JAR), *Bothropoides neuwiedi* (NEU), *Bothrops atrox* (ATR), *Bothrops jararacussu*(JSU), *Rhinocerothis alternatus* (ALT) and *Rhinocerothis cotiara* (COT) venoms were fractionated by SDS-PAGE (12.5% acrylamide gels) under non-reducing conditions and were either stained with Coomassie blue (A) or transferred to nitrocellulose membranes, which were then incubated with SAB (1:1,000) as the primary antibody and peroxidase-labeled goat anti-horse IgG (1:1,000). The reactive bands were detected by incubation with 4-chloro- α -naphthol and H_2O_2 (B). The numbers at the left indicate the mobility of the molecular mass markers in kDa. These results represent three independent runs.
doi:10.1371/journal.pntd.0002442.g006

among other antigens. Both of these sera failed to recognize low-molecular weight proteins [26]. Comparing the different methods, antivenomics is the best choice for a detailed study, since identifications of non-depleted proteins will show exactly the antigens that are partially immunodepleted or non-reactive with the antivenom. However, the method used here has the advantage to allow simultaneous tests of different venoms, at exactly the same conditions, and gives comparable results to antivenomics, thus is appropriate for comparative studies.

Important conclusions arise from these results. It becomes clear that P-III SVMPs are the predominant antigens in the venom of snakes from the *Bothrops* complex. Moreover, at least among the *Bothrops*, SVMPs are cross-reactive antigens that are equally recognized in venoms, regardless of their inclusion in the immunization pool. This is a good indication for antivenom efficacy, as P-III SVMPs are also abundant in most of these venoms and are related to the important symptoms of local and systemic envenomings, such as hemorrhage, the activation of coagulation factors, the inhibition of platelet aggregation and the activation of several factors that lead to local symptoms [35]. Interestingly, P-III and P-I SVMPs share similar catalytic domains and catalytic properties [68], which are involved in most of the toxic activities of SVMPs. Therefore, it is very intriguing that P-I SVMPs are less recognized by the antivenoms than are P-III SVMPs and raises some concerns about the neutralization efficacy of those activities related to the catalytic domain of these molecules. This observation suggests different interpretations: the most immunogenic epitopes of SVMPs may be located within the disintegrin-like or cysteine-rich domains; or catalytic domains of P-III SVMPs are more immunogenic than catalytic domains of P-I SVMPs. For instance, high hemorrhagic activity and the inhibition of platelet aggregation are typical for P-III SVMPs and depend upon disintegrin-like/cysteine-rich domains [69,70], yet P-I SVMPs are able to induce local

reactions [71] and activate coagulation factors [72], which are important effects of snake bites.

SVSPs and PLA_2 s are important toxins involved in the coagulopathy and local effects, respectively, of patients bitten by snakes of the *Bothrops* complex. Thus, the limited reactivity of SAB with these fractions should be addressed. Most SVSPs are thrombin-like enzymes involved in the blood coagulation disturbances induced by venom [33], and this symptom is easily controlled in patients after antivenom administration [73], suggesting that the presence of anti-SVSP antibodies in SAB is appropriate to neutralize the activity. However, PLA_2 s are generally myotoxic or pro-inflammatory [34], and these symptoms are not well neutralized by antivenoms. In the case of SVSPs, it appears that the low levels of antibodies present in SAB are sufficient to neutralize the systemic effects of SVSPs after intravenous administration. In contrast, this does not appear to be the case for the neutralization of the local effects of envenomings induced by PLA_2 s or P-I SVMPs. This lack of efficacy could most likely be dependent upon antivenom biodisponibility at the site of the lesion rather than on the potency of an antivenom against the myotoxic or dermonecrotic components of the venom [74] or the antibody titer against the toxins inducing the local effects.

Another important point observed in this study was the limited reactivity of antivenom with disintegrins and the DC fragments of SVMPs, which are recognized as inhibitors of platelet aggregation [69,75], and its reactivity with vasoactive peptides. Although they are not presently considered major toxins correlated with the symptoms of envenomings, the additive or synergistic role of these small toxins in snake bite disorders cannot be ruled out. These low molecular mass peptides are known to be weakly immunogenic; however, in antivenomics studies, at least DC fragments and disintegrins were depleted from *B. atrox* [18] and *B. asper* [9] venoms by commercial antivenoms. Nevertheless, the presence of

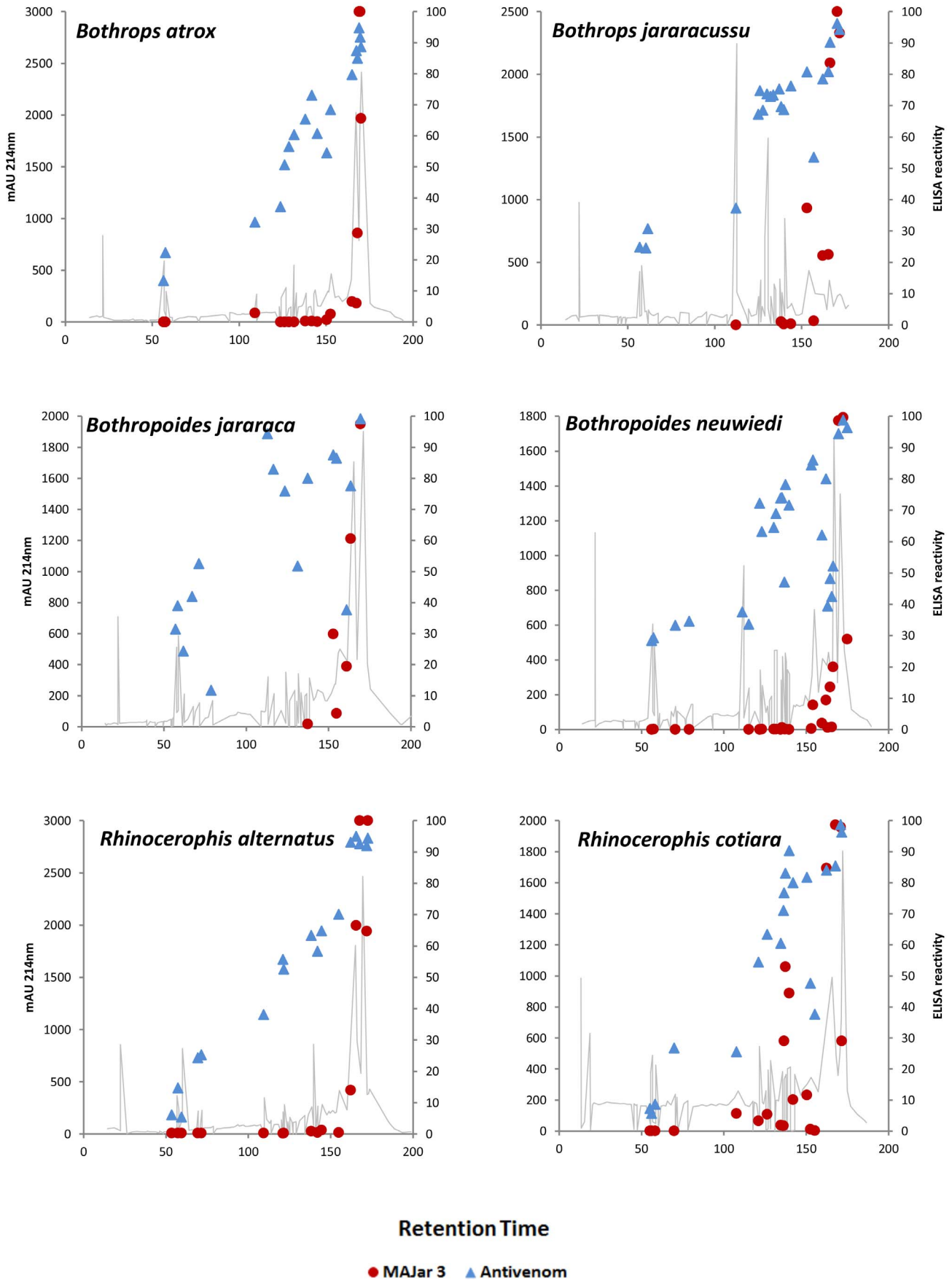


Figure 7. ELISA reactivity with *Bothrops* antivenom and MAJar-3 monoclonal antibody of fractions collected from chromatograms of venom from snakes classified in different genera. Samples containing 100 μ L 1- μ g/mL fractions collected at the elution times represented in the chromatograms were used to coat maxisorb microplates (Nunc), which were incubated with SAB (1:1,000) or a monoclonal antibody against jararhagin (class P-III SVMP) MAJar-3 (1:50), followed by incubation with anti-horse IgG (1:2,000) or anti-mouse IgG (1:1,000) labeled with peroxidase. The reactions were developed with ortho-phenylenediamine/H₂O₂ as the enzyme substrate, and the products were detected at 490 nm. The ELISA reactivity was calculated as % reactivity, taking as 100% the maximal OD value obtained in each of three independent experiments performed in duplicate.
doi:10.1371/journal.pntd.0002442.g007

antibodies against such classes of low molecular size toxins in antivenoms should be regarded with more attention.

The next step of this study was to evaluate the SAB neutralization efficacy of the lethality, hemorrhagic and coagulant activities of *B. atrox* venom in comparison to *B. jararaca* venom. For these experiments, we used venoms from snakes collected in a region where many accidents are reported. The accepted potency of SAB efficacy, calculated as the volume necessary to neutralize the lethality of standard *B. jararaca* venom, is 1 mL antivenom/5 mg venom. This value was used as a reference to design the neutralization protocols used in this study, whereby this proportion was sufficient to protect more than 50% of mice from the

challenge with 3 LD₅₀ doses of *B. jararaca* venom (105 μ g). However, neutralization of the 3 LD₅₀ doses of *B. atrox* venom (225 μ g) was achieved only when the proportion of 2 mL antivenom/5 mg venom was used (Figure 8). Most of the standard protocols to assess antivenom potency use a fixed LD₅₀ value to challenge experimental mice. Therefore, this is also the reference assay used to compare the antivenom efficacy against different venoms. However, it is important to consider that LD₅₀ values are variable among venoms and reflect the toxic activity of each toxin and their synergistic effect to induce death. Additionally, in most tests, the mice are challenged with pre-incubated mixtures of venoms and antivenoms, and, in these reactions, toxins are

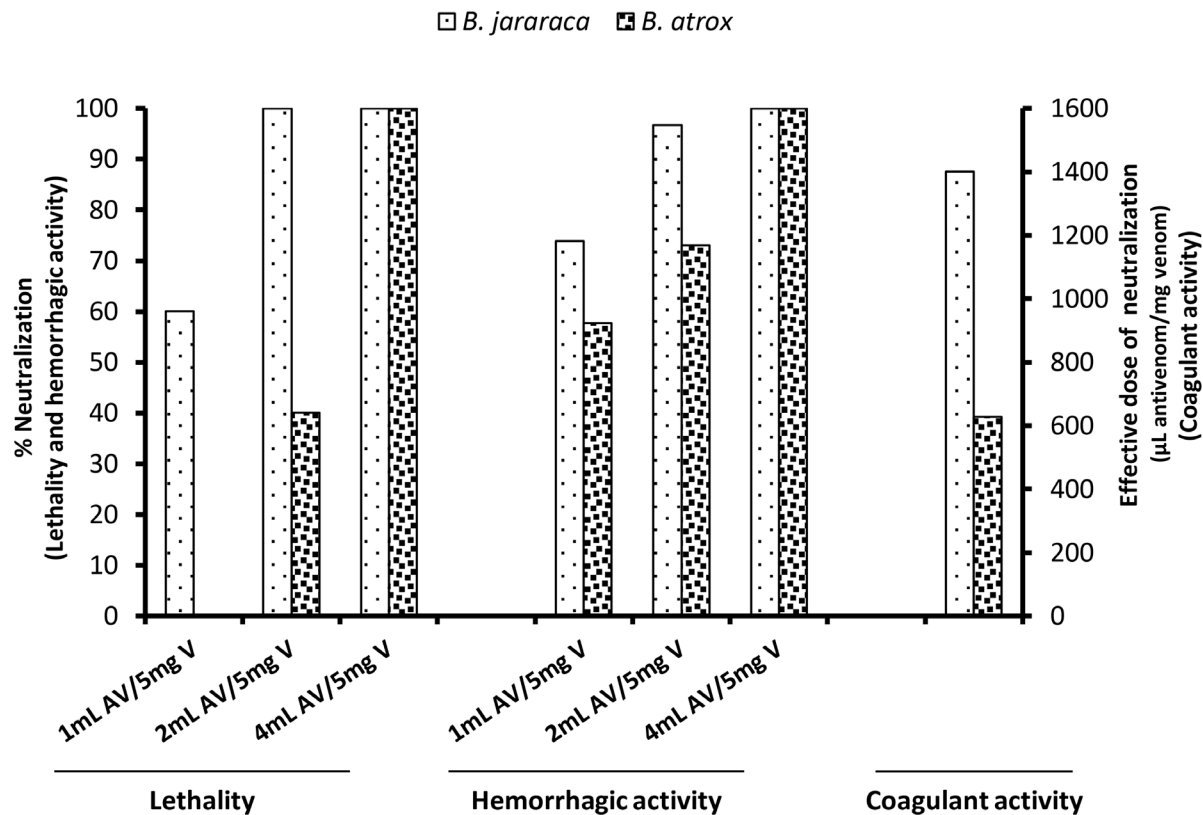


Figure 8. Neutralizing ability of *Bothrops* antivenom (SAB) against the major toxic activities of *Bothropoides jararaca* and *Bothrops atrox* venoms. In the neutralization assays, the *Bothrops atrox* venom was pooled from 8 adult snakes collected in FLONA Tapajós, Santarém, Pará, Brazil. For the neutralization of lethality and hemorrhagic activity, doses of *B. jararaca* or *B. atrox* venoms were pre-incubated with SAB at ratios of 1, 2 or 4 times the SAB volume required to neutralize an equal amount of reference venom according to the manufacturer. To assess hemorrhage, 10 μ g was incubated and injected intradermally in the dorsum of a group of 5 mice. The results show the % neutralization of the mean values, taken as 100% activity, of the data obtained after injection with venom incubated with saline. For the neutralization of lethal activity, 3 LD₅₀ doses of *B. jararaca* (105 μ g) or *B. atrox* (225 μ g) venom were incubated, and the mixtures were injected intraperitoneally into groups of 5 mice; lethality was recorded over a period of 48 hours. The results represent the values obtained in 3 independent experiments and are expressed as % neutralization, considering the number of live/dead mice after this period. To assess the neutralization of coagulant activity, a constant amount of venom (2 times the minimum coagulant concentrations) was incubated with several dilutions of antivenom; the mixture was added to 100 μ l bovine plasma, and the clotting times were recorded using a model ST4 mechanical coagulometer (Diagnostica Stago). The neutralization was expressed as the effective dose (ED), defined as the antivenom/venom ratio at which the clotting time was increased threefold when compared to the clotting time of plasma incubated with venom alone.
doi:10.1371/journal.pntd.0002442.g008

neutralized or cleared from the solution on a molar concentration basis rather than according to the neutralization of activity. This fact may explain why several previous studies reported that some venoms with higher LD₅₀ values, such as *B. atrox* and *B. jararacussu*, are neutralized with higher concentrations of commercial antivenoms.

Similar findings were observed in our study regarding the neutralization of the coagulant activity of *B. atrox* and *B. jararaca* venoms. In this case, the *B. atrox* venom was more coagulant (minimal coagulant concentration in plasma: 10.8 µg/mL) than the *B. jararaca* venom (minimal coagulant concentration in plasma: 35.6 µg/mL), and higher concentrations of *B. jararaca* venom were used in the assays. The SAB neutralized the coagulating activity of both venoms; in this case, however, lower amounts of antivenoms were needed to neutralize the *B. atrox* activity (ED = 627 µL antivenom/mg venom), whereas *B. jararaca* venom neutralization required a higher antivenom concentration (ED = 1400 µL antivenom/mg venom), as shown in Figure 8.

The hemorrhagic activity was comparable between the venoms, and the ratio of 1 mL antivenom/5 mg venom neutralized more than 50% of the hemorrhage induced by both venoms (Figure 8). Taken together, these data suggest that SAB is efficient in neutralizing the most important effects of *B. atrox* venom despite the phylogenetic distance of the snake and the fact that the venom is not included in the immunization pool used to produce SAB. There are previously published papers in the literature suggesting the need to include *B. atrox* venom for horse immunization [76–78]. However, our data showing the opposite are supported by a previous study in which SAB immunodepleted the venom proteins from *B. atrox* populations exhibiting the paedomorphic venom phenotype, the same pattern found in specimens collected in Pará State, Brazil [16]. Moreover, our present data are supported by other pre-clinical assessments showing neutralization of the toxic activities of venoms not included in immunization protocols [79,80] and by a clinical trial for the treatment of snake bite

patients clinically classified as mild and moderate in Pará State (Brazil) demonstrated that the efficacy of a conventional antivenom (SAB) was comparable to the efficacy of an experimental antivenom prepared through horse immunization with *B. atrox* venom [81].

Recently, the understanding of venom composition by venomics [5,6] and tests of the efficacy of antivenoms by antivenomics [8,9,11] have been extremely important approaches in order to achieve efficient antivenoms [82–84]. In this work, we approached this issue by a multifaceted comparative study of venoms from six species of snakes of distinct phylogenetic clades of *Bothrops* complex. Important differences were observed in venom composition of the snakes from *Bothrops* complex, mainly for *B. jararacussu* venom. However, these differences showed no apparent relationship with the phylogeny of the snakes. In this regard, although the taxonomy of this group is still under revision, the toxins present in the venoms are similar, in agreement with previous molecular data showing that the ancestral genes encoding *Bothrops* major toxin families were already present before the differentiation of the *Bothrops* species [85,86]. As a result, the antivenom reacted similarly with toxins from the same protein family, as SVMs, SVSPs or PLA₂s, regardless of the snake phylogeny or the presence of the venom in the immunization pool used for antivenom production. Thus, we confirm previous data of antivenomics and suggest that it is possible to obtain pan-specific and efficient antivenoms to *Bothrops* snakes through immunization with venoms from a few species of snakes, if immunogenicity and antigenicity of the distinct protein classes of toxins are considered.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LFS PSP RHV ISSM AMMdS. Performed the experiments: LFS CAN PSP JLB ILdS JAPJ SSO. Analyzed the data: PSP ISSM RHV AMMdS. Contributed reagents/materials/analysis tools: RHVM HMC ISSM RHV AMMdS. Wrote the paper: LFS CAN PSP RHV AMMdS.

References

- WHO (2007) Rabies and envenomings. A neglected public health issue. Available: http://whqlibdoc.who.int/publications/2007/9789241563482_eng.pdf
- Kasturiratne A, Wickremasinghe AR, de Silva N, Gunawardena NK, Pathmeswaran A, et al. (2008) The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS Med* 5: e218.
- Ministério-da-Saúde (2001) Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. 2nd ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde.
- Brazil V (1918) Do envenenamento ofídico e seu tratamento. *Collectanea de Trabalhos (1901–1917)* - Instituto Butantan. São Paulo: Typographia do Diário Oficial. pp. 31–52.
- Calvete JJ, Juárez P, Sanz L (2007) Snake venomics. Strategy and applications. *J Mass Spectrom* 42: 1405–1414.
- Calvete JJ (2013) Snake venomics: From the inventory of toxins to biology. *Toxicon*: doi: 10.1016/j.toxicon.2013.03.020.
- Calvete JJ (2011) Proteomic tools against the neglected pathology of snake bite envenoming. *Expert Rev Proteomics* 8: 739–758.
- Calvete JJ, Sanz L, Angulo Y, Lomonte B, Gutiérrez JM (2009) Venoms, venomics, antivenomics. *FEBS Lett* 583: 1736–1743.
- Gutiérrez JM, Lomonte B, León G, Alape-Girón A, Flores-Díaz M, et al. (2009) Snake venomics and antivenomics: Proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. *J Proteomics* 72: 165–182.
- Gutiérrez JM, León G, Lomonte B, Angulo Y (2011) Antivenoms for snakebite envenomings. *Inflamm Allergy Drug Targets* 10: 369–380.
- Pla D, Gutiérrez JM, Calvete JJ (2012) Second generation snake antivenomics: comparing immunoaffinity and immunodepletion protocols. *Toxicon* 60: 688–699.
- Calvete JJ, Cid P, Sanz L, Segura A, Villalta M, et al. (2010) Antivenomic assessment of the immunological reactivity of EchiTAB-Plus-ICP, an antivenom for the treatment of snakebite envenoming in sub-Saharan Africa. *Am J Trop Med Hyg* 82: 1194–1201.
- Alape-Girón A, Sanz L, Escolano J, Flores-Díaz M, Madrigal M, et al. (2008) Snake venomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*: geographic, individual, and ontogenetic variations. *J Proteome Res* 7: 3556–3571.
- Alape-Girón A, Flores-Díaz M, Sanz L, Madrigal M, Escolano J, et al. (2009) Studies on the venom proteome of *Bothrops asper*: perspectives and applications. *Toxicon* 54: 938–948.
- Calvete JJ, Borges A, Segura A, Flores-Díaz M, Alape-Girón A, et al. (2009) Snake venomics and antivenomics of *Bothrops colombiensis*, a medically important pitviper of the *Bothrops atrox*-*asper* complex endemic to Venezuela: Contributing to its taxonomy and snakebite management. *J Proteomics* 72: 227–240.
- Calvete JJ, Sanz L, Pérez A, Borges A, Vargas AM, et al. (2011) Snake population venomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: Paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. *J Proteomics* 74: 510–527.
- Gutiérrez JM, Sanz L, Escolano J, Fernández J, Lomonte B, et al. (2008) Snake venomics of the Lesser Antillean pit vipers *Bothrops caribbaeus* and *Bothrops lanceolatus*: correlation with toxicological activities and immunoreactivity of a heterologous antivenom. *J Proteome Res* 7: 4396–4408.
- Núñez V, Cid P, Sanz L, De La Torre P, Angulo Y, et al. (2009) Snake venomics and antivenomics of *Bothrops atrox* venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Perú and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards paedomorphism. *J Proteomics* 73: 57–78.
- Rodrigues RS, Boldrini-França J, Fonseca FP, de la Torre P, Henrique-Silva F, et al. (2012) Combined snake venomics and venom gland transcriptomic analysis of *Bothropoides pauloensis*. *J Proteomics* 75: 2707–2720.
- Tashima AK, Sanz L, Camargo AC, Serrano SM, Calvete JJ (2008) Snake venomics of the Brazilian pitvipers *Bothrops cotiara* and *Bothrops fonsecai*. Identification of taxonomy markers. *J Proteomics* 71: 473–485.
- Fox JW, Ma L, Nelson K, Sherman NE, Serrano SM (2006) Comparison of indirect and direct approaches using ion-trap and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for exploring viperid venom proteomes. *Toxicon* 47: 700–714.
- Baramova EN, Shannon JD, Bjarnason JB, Fox JW (1989) Degradation of extracellular matrix proteins by hemorrhagic metalloproteinases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 275: 63–71.

23. Ohler M, Georgieva D, Seifert J, von Bergen M, Arni RK, et al. (2010) The Venomics of *Bothrops alternatus* is a Pool of Acidic Proteins with Predominant Hemorrhagic and Coagulopathic Activities. *Journal of Proteome Research* 9: 2422–2437.
24. Valente RH, Guimarães PR, Junqueira M, Neves-Ferreira AG, Soares MR, et al. (2009) Bothrops insularis venomics: a proteomic analysis supported by transcriptomic-generated sequence data. *J Proteomics* 72: 241–255.
25. Zelanis A, Tashima AK, Pinto AF, Leme AF, Stuginski DR, et al. (2011) Bothrops jararaca venom proteome rearrangement upon neonate to adult transition. *Proteomics* 11: 4218–4228.
26. Correa-Netto C, Teixeira-Araujo R, Aguiar AS, Melgarejo AR, De-Simone SG, et al. (2010) Immunome and venom of *Bothrops jararacussu*: a proteomic approach to study the molecular immunology of snake toxins. *Toxicon* 55: 1222–1235.
27. Kohlhoff M, Borges MH, Yarleque A, Cabezas C, Richardson M, et al. (2012) Exploring the proteomes of the venoms of the Peruvian pit vipers *Bothrops atrox*, *B. barnetti* and *B. pictus*. *J Proteomics* 75: 2181–2195.
28. Cardoso KC, Da Silva MJ, Costa GG, Torres TT, Del Bem LE, et al. (2010) A transcriptomic analysis of gene expression in the venom gland of the snake *Bothrops alternatus* (urutu). *BMC Genomics* 11: 605.
29. Neiva M, Arraes FB, de Souza JV, Rádis-Baptista G, Prieto da Silva AR, et al. (2009) Transcriptome analysis of the Amazonian viper *Bothrops atrox* venom gland using expressed sequence tags (ESTs). *Toxicon* 53: 427–436.
30. Kashima S, Roberto PG, Soares AM, Astolfi-Filho S, Pereira JO, et al. (2004) Analysis of *Bothrops jararacussu* venomous gland transcriptome focusing on structural and functional aspects: I-gene expression profile of highly expressed phospholipases A2. *Biochimie* 86: 211–219.
31. Cidade DA, Simão TA, Dávila AM, Wagner G, Junqueira-de-Azevedo IL, et al. (2006) *Bothrops jararaca* venom gland transcriptome: analysis of the gene expression pattern. *Toxicon* 48: 437–461.
32. Durban J, Juárez P, Angulo Y, Lomonte B, Flores-Díaz M, et al. (2011) Profiling the venom gland transcriptomes of Costa Rican snakes by 454 pyrosequencing. *BMC Genomics* 12: 259.
33. Serrano SM, Marouf RC (2005) Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon* 45: 1115–1132.
34. Gutiérrez JM, Lomonte B (2013) Phospholipases A(2): Unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. *Toxicon* 62: 27–39.
35. Moura-da-Silva AM, Butera D, Tanjoni I (2007) Importance of snake venom metalloproteinases in cell biology: Effects on platelets, inflammatory and endothelial cells. *Current Pharmaceutical Design* 13: 2893–2905.
36. Tu AT (1977) *Venoms: Chemistry and Molecular Biology*. New York, USA: John Wiley.
37. Tu AT (1991) *Reptile Venoms and Toxins*. Handbook of Natural Toxins. New York: Marcel Dekker, Inc.
38. Guercio RA, Shevchenko A, Lopez-Lozano JL, Paba J, Sousa MV, et al. (2006) Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. *Proteome Sci* 4: 11.
39. Saldarriaga MM, Otero R, Núñez V, Toro MF, Díaz A, et al. (2003) Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. *Toxicon* 42: 405–411.
40. Menezes MC, Furtado MF, Travaglia-Cardoso SR, Camargo AC, Serrano SM (2006) Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. *Toxicon* 47: 304–312.
41. Gibbs HL, Sanz L, Calvete JJ (2009) Snake population venomics: proteomics-based analyses of individual variation reveals significant gene regulation effects on venom protein expression in *Sistrurus rattlesnakes*. *J Mol Evol* 68: 113–125.
42. Dalry JC, Wüster W, Thorpe RS (1996) Diet and snake venom evolution. *Nature* 379: 537–540.
43. Gibbs HL, Mackessy SP (2009) Functional basis of a molecular adaptation: prey-specific toxic effects of venom from *Sistrurus rattlesnakes*. *Toxicon* 53: 672–679.
44. Barlow A, Pook CE, Harrison RA, Wüster W (2009) Coevolution of diet and prey-specific venom activity supports the role of selection in snake venom evolution. *Proc Biol Sci* 276: 2443–2449.
45. Calvete JJ, Marcinkiewicz C, Monleone D, Esteve V, Celda B, et al. (2005) Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. *Toxicon* 45: 1063–1074.
46. Moura-da-Silva AM, Theakston RDG, Crampton JM (1996) Evolution of Disintegrin Cysteine-rich and mammalian Matrix-degrading Metalloproteinases: Gene duplication and divergence of a common ancestor rather than convergent evolution. *Journal of Molecular Evolution* 43: 263–269.
47. Carrasco PA, Mattoni CI, Leynaud GC, Scrocchi GJ (2012) Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pit vipers (Serpentes, Viperidae). *Zoologica Scripta* 41: 109–124.
48. Wüster W, Salomão MG, Quidjada-Mascarenhas JA, Thorpe RS (2002) Origins and evolution of the South American pitvipers fauna: evidence from mitochondrial DNA sequence analysis. In: Shuett W, Höggren M, Douglas ME, Greene HW, editors. *Biology of the vipers*. Eagle Mountain, UT: Eagle Mountain Publishing, pp. 111–129.
49. Castoe TA, Parkinson CL (2006) Bayesian mixed models and the phylogeny of pitvipers (Viperidae: Serpentes). *Mol Phylogenet Evol* 39: 91–110.
50. Fenwick AM, Gutberlet Jr RL, Evans JA, Parkinson CL (2009) Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothropsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* 156: 617–640.
51. Tanjoni I, Butera D, Bento L, Della-Casa MS, Marques-Porto R, et al. (2003) Snake venom metalloproteinases: structure/function relationships studies using monoclonal antibodies. *Toxicon* 42: 801–808.
52. Tanjoni I, Butera D, Spencer PJ, Takehara HA, Fernandes I, et al. (2003) Phylogenetic conservation of a snake venom metalloproteinase epitope recognized by a monoclonal antibody that neutralizes hemorrhagic activity. *Toxicon* 42: 809–816.
53. Cunha Bastos VL, Salles JB, Valente RH, León IR, Perales J, et al. (2007) Cytosolic glutathione peroxidase from liver of pacu (*Piaractus mesopotamicus*), a hypoxia-tolerant fish of the Pantanal. *Biochimie* 89: 1332–1342.
54. McDonald WH, Tabb DL, Sadygov RG, MacCoss MJ, Venable J, et al. (2004) MS1, MS2, and SQT—three unified, compact, and easily parsed file formats for the storage of shotgun proteomic spectra and identifications. *Rapid Commun Mass Spectrom* 18: 2162–2168.
55. Xu T, Venable JD, Park SK, Cociorva D (2006) ProLuCID, a fast and sensitive tandem mass spectra-based protein identification program. *Molecular and Cellular Proteomics* 5: S-174.
56. Keller A, Nesvizhskii AI, Kolker E, Aebersold R (2002) Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal Chem* 74: 5383–5392.
57. Nesvizhskii AI, Keller A, Kolker E, Aebersold R (2003) A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 75: 4646–4658.
58. Camey KU, Velarde DT, Sanchez EF (2002) Pharmacological characterization and neutralization of the venoms used in the production of Bothropic antivenom in Brazil. *Toxicon* 40: 501–509.
59. Gené JA, Roy A, Rojas G, Gutiérrez JM, Cerdas L (1989) Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon* 27: 841–848.
60. Moura-da-Silva AM, Cardoso DF, Tanizaki MM (1990) Differences in distribution of myotoxic proteins in venoms from different *Bothrops* species. *Toxicon* 28: 1293–1301.
61. Moura-da-Silva AM, Desmond H, Laing G, Theakston RDG (1991) Isolation and Comparison of Myotoxins Isolated From Venoms of Different Species of *Bothrops* Snakes. *Toxicon* 29: 713–723.
62. Mackessy SP (2008) Venom composition in rattlesnakes: trends and biological significance. In: Hayes WK, Beaman KR, Cardwell MD, Bush SP, editors. *The Biology of Rattlesnakes*. Loma Linda, CA, USA: Loma Linda University Press, pp. 495–510.
63. Angulo Y, Escolano J, Lomonte B, Gutiérrez JM, Sanz L, et al. (2008) Snake venomics of Central American pitvipers: clues for rationalizing the distinct envenomation profiles of *Atropoides nummifer* and *Atropoides picadoi*. *J Proteome Res* 7: 708–719.
64. Fernández J, Lomonte B, Sanz L, Angulo Y, Gutiérrez JM, et al. (2010) Snake venomics of *Bothriechis nigroviridis* reveals extreme variability among palm pitviper venoms: different evolutionary solutions for the same trophic purpose. *J Proteome Res* 9: 4234–4241.
65. Gibbs HL, Sanz L, Sovic MG, Calvete JJ (2013) Phylogeny-Based Comparative Analysis of Venom Proteome Variation in a Clade of Rattlesnakes (*Sistrurus* sp.). *PLoS One* 8: e67220.
66. Mackessy SP (2010) Evolutionary trends in venom composition in the western rattlesnakes (*Crotalus viridis* sensu lato): toxicity vs. tenderizers. *Toxicon* 55: 1463–1474.
67. Calvete JJ, Sanz L, Cid P, de la Torre P, Flores-Díaz M, et al. (2010) Snake venomics of the Central American rattlesnake *Crotalus simus* and the South American *Crotalus durissus* complex points to neurotoxicity as an adaptive paedomorphic trend along *Crotalus* dispersal in South America. *J Proteome Res* 9: 528–544.
68. Fox JW, Serrano SMT (2008) Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. *Febs Journal* 275: 3016–3030.
69. Serrano SM, Kim J, Wang D, Dragulev B, Shannon JD, et al. (2006) The cysteine-rich domain of snake venom metalloproteinases is a ligand for von Willebrand factor A domains: role in substrate targeting. *Journal of Biological Chemistry* 281: 39746–39756.
70. Baldo C, Jamora C, Yamanouye N, Zorn TM, Moura-da-Silva AM (2010) Mechanisms of Vascular Damage by Hemorrhagic Snake Venom Metalloproteinases: Tissue Distribution and In Situ Hydrolysis. *Plos Neglected Tropical Diseases* 4: e272. doi:10.1371/journal.pntd.0000727.
71. Gutierrez JM, Rucavado A (2000) Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie* 82: 841–850.
72. Modesto JC, Junqueira-de-Azevedo IL, Neves-Ferreira AG, Fritzen M, Oliva ML, et al. (2005) Insularinase A, a prothrombin activator from *Bothrops insularis* venom, is a metalloprotease derived from a gene encoding protease and disintegrin domains. *Biol Chem* 386: 589–600.
73. Cardoso JL, Fan HW, França FO, Jorge MT, Leite RP, et al. (1993) Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. *Quarterly Journal of Medicine* 86: 315–325.
74. Gutierrez JM, Leon G, Rojas G, Lomonte B, Rucavado A, et al. (1998) Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon* 36: 1529–1538.
75. McLane MA, Marcinkiewicz C, Vijay-Kumar S, Wierzbicka-Patynowski I, Niewiarowski S (1998) Viper venom disintegrins and related molecules.

- Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 219: 109–119.
76. Furtado MeF, Cardoso ST, Soares OE, Pereira AP, Fernandes DS, et al. (2010) Antigenic cross-reactivity and immunogenicity of Bothrops venoms from snakes of the Amazon region. *Toxicon* 55: 881–887.
 77. Queiroz GP, Pessoa LA, Portaro FC, Furtado MeF, Tambourgi DV (2008) Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from Bothrops genus. *Toxicon* 52: 842–851.
 78. Muniz EG, Maria WS, Estevão-Costa MI, Buhnheim P, Chávez-Olórtegui C (2000) Neutralizing potency of horse antiotherropic Brazilian antivenom against Bothrops snake venoms from the Amazonian rain forest. *Toxicon* 38: 1859–1863.
 79. Segura A, Castillo MC, Núñez V, Yarlequé A, Gonçalves LR, et al. (2010) Preclinical assessment of the neutralizing capacity of antivenoms produced in six Latin American countries against medically-relevant Bothrops snake venoms. *Toxicon* 56: 980–989.
 80. Saravia P, Rojas E, Escalante T, Arce V, Chaves E, et al. (2001) The venom of Bothrops asper from Guatemala: toxic activities and neutralization by antivenoms. *Toxicon* 39: 401–405.
 81. Pardal PPO, Souza SM, Monteiro MRCC, Fan HW, Cardoso JLC, et al. (2004) Clinical trial of two antivenoms for the treatment of Bothrops and Lachesis bites in the north eastern Amazon region of Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 98: 28–42.
 82. Calvete JJ (2010) Antivenomics and venom phenotyping: A marriage of convenience to address the performance and range of clinical use of antivenoms. *Toxicon* 56: 1284–1291.
 83. Calvete JJ, Domont GB (2011) Omic technologies to fight the neglect. *J Proteomics* 74: 1483–1484.
 84. Gutiérrez JM, Solano G, Pla D, Herrera M, Segura A, et al. (2013) Assessing the preclinical efficacy of antivenoms: From the lethality neutralization assay to antivenomics. *Toxicon* 69: 168–179.
 85. Casewell NR, Wagstaff SC, Harrison RA, Renjifo C, Wüster W (2011) Domain loss facilitates accelerated evolution and neofunctionalization of duplicate snake venom metalloproteinase toxin genes. *Mol Biol Evol* 28: 2637–2649.
 86. Fry BG, Vidal N, van der Weerd L, Kochva E, Renjifo C (2009) Evolution and diversification of the Toxicofera reptile venom system. *J Proteomics* 72: 127–136.

8. ANEXO (2)

Banda 3

PD-Jar

1 MRGSHHHHHH GGRDRGS IIL ESGNVNDYEV VYPRKVTALP KGA VQPKYED AMQYEFK VNG EPVVLHLEKN KGLFSKDYSE IHYSPDGREI
91 TTYPPVEDHC YYHGRIENDA DSTASISACN GLKGYFKLQR ETYFIEPLKL PDSEAHAVFK YENVEKEDEA PKMCGVTQNW KSYEPIKKAS
181 QLAFTA

Jararagina

1 EQQR YDPYKY IEFFVVVDQG TVTKNNGDLD KIKAR MYELA NIVNEIFRYL YMHVALVGL E IWSNGDKITV KPDVDYTLNS FAEWRKTDLL
91 TRKKHDNAQL LTAIDFNGPT IGYAYIGSMC HPKRSV GIVQ DYSPINLVVA VIMAH EMGHN LGIHHD TGSC SCGDYPCIMG PTISNEPSKF
181 FSNCSYIQCW DFIMNHNPEC IINEPLGTDI ISPPVCGNEL LEVGEECDG TPENCQNECC DAATCKL KSG SQCGHGDCCE QCKFSKSGTE
271 CRASMSECDP AEHCTGQSSE CPADV FHKNG QPCLDNYGYC YNGNCPIMYH QCYALFGADV YEAEDSCFKD NQKGNYYGYC RKENGGKIPC
361 APEDVKCGRL YCKDN SPGQN NPCKMFYSND DEHKGMVLPG TKCADGK VCS NGHCVDVATA Y

Banda 4

PD-Jar

1 MRGSHHHHHH GGRDRGS IIL ESGNVNDYEV VYPRKVTALP KGA VQPKYED AMQYEFK VNG EPVVLHLEKN KGLFSKDYSE IHYSPDGREI
91 TTYPPVEDHC YYHGRIENDA DSTASISACN GLKGYFKLQR ETYFIEPLKL PDSEAHAVFK YENVEKEDEA PKMCGVTQNW KSYEPIKKAS
181 QLAFTA

Jararagina

1 EQQR YDPYKY IEFFVVVDQG TVTKNNGDLD KIKAR MYELA NIVNEIFRYL YMHVALVGL E IWSNGDKITV KPDVDYTLNS FAEWRKTDLL
91 TRKKHDNAQL LTAIDFNGPT IGYAYIGSMC HPKRSV GIVQ DYSPINLVVA VIMAH EMGHN LGIHHD TGSC SCGDYPCIMG PTISNEPSKF
181 FSNCSYIQCW DFIMNHNPEC IINEPLGTDI ISPPVCGNEL LEVGEECDG TPENCQNECC DAATCKL KSG SQCGHGDCCE QCKFSKSGTE
271 CRASMSECDP AEHCTGQSSE CPADV FHKNG QPCLDNYGYC YNGNCPIMYH QCYALFGADV YEAEDSCFKD NQKGNYYGYC RKENGGKIPC
361 APEDVKCGRL YCKDN SPGQN NPCKMFYSND DEHKGMVLPG TKCADGK VCS NGHCVDVATA Y

Banda 5

PD-Jar

1 MRGSHHHHHH GGRDRGS IIL ESGNVNDYEV VYPRKVTALP KGAVQPKYED AMQYEFKVNG EPVVLHLEKN KGLFSKDYSE IHYS PDGREI
91 TTYPPVEDHC YYHGRIENDA DSTASISACN GLKGYFKLQR ETYFIEPLKL PDSEAHAVFK YENVEKEDEA PKMCGVTQNW KSYEPIKKAS
181 QLAFTA

Jararagina

1 EQQKYNPFRY VELFIVVDQG MVTKNGDLD KIKARMYELA NIVNEILRYL YMHAALVGLE IWSNGDKITV KPDVDYTLNS FAEWRKTDLL
91 TRKKHDNAQL LTAIDFNGPT IGYAYIGSMC HPKRSVAIVE DYS PINLVVA VIMHEMGN LGIHHDDFC SCGDYPCIMG PTISNEPSKF
181 FSNCSYIQCW DFIMKENPQC ILNEPLGTDI VSPPVCGNEL LEVGEEDCG TPENCQNECC DAATCKLKS GQCGHGDCCE QCKFSKSGTE
271 CFASMSECDP AEHCTGQSSE CPADVFKNG QPCLDNYGC YNGNCPIMYH QCYALFGADV YEAEDSCFKD NQKGNYYGYC RKENGKIPC
361 APEDVKCGRL YCKDNSPGQN NPCKMFYSND DEHKGMVLP TKCADGKVCS NGHCVDVATA Y

Banda 6

PD-Jar

1 MRGSHHHHHH GGRDRGS IIL ESGNVNDYEV VYPRKVTALP KGAVQPKYED AMQYEFK VNG EPVVLHLEKN KGLFSKDYSE IHYS PDGREI
91 TTYPPVEDHC YYHGRIENDA DSTASISACN GLKGYFKLQR ETYFIEPLKL PDSEAHAVFK YENVEKEDEA PKMCGVTQNW KSYEPIKKAS
181 QLAFTA

Jararagina

1 EQQKYNPFRY VELFIVVDQG MVTKNGDLD KIKARMYELA NIVNEILRYL YMHAALVGLE IWSNGDKITV KPDVDYTLNS FAEWRKTDLL
91 TRKKHDNAQL LTAIDFNGPT IGYAYIGSMC HPKRSVAIVE DYS PINLVVA VIMHEMGN LGIHHDDFC SCGDYPCIMG PTISNEPSKF
181 FSNCSYIQCW DFIMENPQC ILNEPLGTDI VSPVCGNEL LEVGEEDCG TPENCQNECC DAATCKLKSG QCGHGDCCE QCKFSKSGTE
271 CFASMSECDP AEHCTGQSSE CPADVFKNG QPCLDNYGC YNGNCPIMYH QCYALFGADV YEAEDSCFKD NQKGNYYGYC RKENGKIPC
361 APEDVKCGRL YCKDNSPGQN NPCKMFYSND DEHKGMVLP TKCADGKVCS NGHCVDVATA Y

Banda 7

PD-Jar

1 MRGSHHHHHH GGRDRGS **IIL ESGNVNDYEV VYPRKVTALP KGAVQPKYED AMQYEFKVG EPVVLHLEKN** KGLFSK **DYSE IHSPDGREI**
91 **TTYPPVEDHC YYHGRIENDA DSTASISACN GLKGYFKLQR** **ETYFIEPLKL PDSEAHAVFK YENVEKEDEA PKMCGVTQNW** KSYEPIKKAS
181 QLAFTA

Jararagina

1 EQ**QR**YDPYKY IEFVVVDQG TVTKNNGDLD KIKAR**MYELA NIVNEIFRYL** YMHVALVGLE IWSNGDK**ITV KPDVDYTLNS FAEWRKTDLL**
91 **TR**KKHDNAQL LTAIDFNGPT IGYAYIGSMC HPKRSVGIVQ DYSPINLVVA VIM**HEMGN LGIHHD**GSC SCGDYPCIMG PTISNEPSKF
181 FSNCSYIQCW DFIMNHNPEC IINEPLGTDI ISPPVCGNEL LEVGEECDG TPENCQNECC DAATCKLKSQ SQCGHGDCCE QCKFSKSGTE
271 CRASMSECDP AEHCTGQSSE CPADVFKNG QPCLDNYGYC YNGNCPIMYH QCY**ALFGADV YEAEDSCFKD** NQ**KGNYYGYC RKENGK****KIPC**
361 **APEDVKCGRL YCKDNSPGQN NPCKMFYSND DEHKGMLVPG TKCADGK****VCS NGHCVDVATA Y**

Banda 8

Jararagina

1 EQ**QR**YDPYKY IEFVVVDQG TVTKNNGDLD KIKAR**MYELA NIVNEIFRYL** YMHVALVGLE IWSNGDK**ITV KPDVDYTLNS FAEWRKTDLL**
91 **TR**KKHDNAQL LTAIDFNGPT IGYAYIGSMC HPKRSVGIVQ DYSPINLVVA VIM**HEMGN LGIHHD**GSC **SCGDYPCIMG PTISNEPSKF**
181 FSNCSYIQCW DFIMNHNPEC IINEPLGTDI ISPPVCGNEL LEVGEECDG TPENCQNECC DAATCKLKSQ SQCGHGDCCE QCKFSKSGTE
271 CR**ASMSECDP AEHCTGQSSE CPADVFKNG QPCLDNYGYC** YNGNCPIMYH QCY**ALFGADV YEAEDSCFKD** NQ**KGNYYGYC RKENGK****KIPC**
361 **APEDVKCGRL YCKDNSPGQN NPCKMFYSND DEHKGMLVPG TKCADGK****VCS NGHCVDVATA Y**

Banda 9

Jararagina

1 EQQRYPYKY IEFFVVVDQG TVTKNNGDLD KIKAR**MYELA NIVNEIFRYL** YMHVALVGL**E IWSNGDKITV KPDVDYTLNS FAEWRKTDLL**

91 **TRKKHDNAQL LTAIDFNGPT IGYAYIGSMC HPK**RSVGIVQ DYSPINLVVA VIM**HEMGHN LGIHHD**GSC SCGDYPC**IMG PTISNEPSK**F

181 FSNCSYIQCW DFIMNHNPEC IINEPLGTDI ISPPVCGNE**EL LEVGEECDG TPENCQNECC DAATCK**LKSG SQCGHDCCE QCKFSKSGTE

271 CR**ASMSECDP AEHCTGQSSE CPADVFK**NG QPCLDNYGYC YNGNCPIMYH QCY**ALFGADV YEAEDSCFKD** NQK**GNYGYC RKENGK****KIPC**

361 **APEDVKCGRL YCKDNSFGQN NPCKMFYSND DEHKGMVLPG TKCADGK****VCS** NGHCVDVATA **Y**

Banda 10

Jararagina

1 EQQKYNPFRY VELFIVVDQG MVTKNNGDLD KIKARMYELA NIVNEILRYL YMHAALVGLE IWSNGDKITV KPDVDYTLNS FAEWRKTDLL
91 TRKKHDNAQL LTAIDFNGPT IGYAYIGSMC HPKRSVAIVE DYSPINLVVA VIMAFHEMGHN LGIHHDYDFC SCGDYPCIMG PTISNEPSKF
181 FSNCSIYIQCW DFIMKENPQC ILNEPLGTDI VSPPCVGNEL LEVGEEDCG TPENCQNECC DAATCKLKSQ SQCGHGDCE QCKFSKSGTE
271 CRASMSECDP AEHCTGQSSE CPADVFKNG QPCLDNYGYC YNGNCPIMYH QCYALFGADV YEAEDSCFKD NQKGNYYGYC RKENGK KIPC
361 APEDVKCGRL YCKDNSPGQN NPCKMFYSND DEHKGMVLPG TKCADGK VCS NGHCVDVATA Y

Banda 11b

PD-Jar

1 MRGSHHHHHH GGRDRGSIIL ESGNVNDYEV VYPRKVTALP KGAVQPKYED AMQYEFKVG EPVVLHLEKN KGLFSKDYSE IHYS PDGREI
91 TTYPPVEDHC YYHGRIENDA DSTASISACN GLKGYFKLQR ETYFIEPLKL PDSEAHAVFK YENVEKEDEA PKMCGVTQNW KSYEPIKKAS
181 QLAFTA

Banda 14

PD-Jar

1 MRGSHHHHHH GGRDRGSIIL ESGNVNDYEV VYPRKVTALP KGAVQPKYED AMQYEFKVG EPVVLHLEKN KGLFSKDYSE IHYS PDGREI
91 TTYPPVEDHC YYHGRIENDA DSTASISACN GLKGYFKLQR ETYFIEPLKL PDSEAHAVFK YENVEKEDEA PKMCGVTQNW KSYEPIKKAS
181 QLAFTA

Banda 15

PD-Jar

1 MRGSHHHHHH GGRDRGSIIL ESGNVNDYEV VYPRKVTALP KGAVQPKYED AMQYEFKVG EPVVLHLEKN KGLFSKDYSE IHYS PDGREI
91 TTYPPVEDHC YYHGRIENDA DSTASISACN GLKGYFKLQR ETYFIEPLKL PDSEAHAVFK YENVEKEDEA PKMCGVTQNW KSYEPIKKAS
181 QLAFTA

Banda 17

PD-Jar

1 MRGSHHHHHH GGRDRG**SIIL ESGNVNDYEV VYPRKVTALP** KGAVQPK**YED AMQYEFKVG EPVVLHLEKN** KGLFSK**DYSE IHYSPDGREI**
91 **TTYPPVEDHC YYHGRIENDA DSTASISACN GLK**GYFKLQR **ETYFIEPLKL PDSEAHAVFK YENVEKEDEA** **PKMCGVTQ**NW **KSYEPIKKAS**
181 QLAFTA

Leucurolisina-a

1 QQFSPR**YIEL VVVADHGMFK KYN**SNLNTIR KVVHEMLNTV NGFFR**SMNVD ASLVNLEVWS** KKDLIKVEKD SSK**TLTSFGE WRERD**LLPRI
91 SHDHAQLLTV IFLDEETIGI AYTAGMCDLS QSVAVVMDHS KKNLRVAVTM **AHELGHNLGM RHD**CNQCHN APSCIMADTL SKGLSFEFSD
181 CSQNQYQTYL TKHNPQCILN KP

Banda 18

PD-Jar

1 MRGSHHHHHH GGRDRG**SIIL ESGNVNDYEV VYPRKVTALP** KGAVQPK**YED AMQYEFKVG EPVVLHLEKN** KGLFSK**DYSE IHYSPDGREI**
91 **TTYPPVEDHC YYHGRIENDA DSTASISACN GLK**GYFKLQR **ETYFIEPLKL PDSEAHAVFK YENVEKEDEA** **PKMCGVTQ**NW **KSYEPIKKAS**
181 QLAFTA