

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO  
LABORATÓRIO DE QUÍMICA E FUNÇÃO DE PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA

**CARLOS EDUARDO CARDOSO CORDEIRO**

**ANÁLISE DE PERFIS PROTEICOS DE VENENOS DE  
SERPENTES DO GÊNERO *BOTHROPS***

Campos dos Goytacazes

2015

**CARLOS EDUARDO CARDOSO CORDEIRO**

**ANÁLISE DE PERFIS PROTEICOS DE VENENOS DE  
SERPENTES DO GÊNERO *BOTHROPS***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

**ORIENTADOR: Dr. Jorge Hernandez Fernandez**

**Campos dos Goytacazes**

**2015**

**FOLHA DE APROVAÇÃO****CARLOS EDUARDO CARDOSO CORDEIRO****ANÁLISE DE PERFIS PROTEICOS DE VENENOS DE SERPENTES DO  
GÊNERO *BOTHROPS***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em 31 de Março de 2015.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Jorge Hernandez Fernandez  
(Orientador- UENF)

---

Prof. Dra. Heloisa Alves Guimarães (IFF)

---

Prof. Dra. Olga Lima Tavares Machado (UENF)

---

Prof. Dr. Vanildo Silveira (UENF)

## RESUMO

Venenos de serpentes são ricos em compostos bioativos de relevância farmacológica, médica e acadêmica. Através do avanço da tecnologia relacionada ao estudo proteômico, incluindo o surgimento de novos protocolos para tratamento das amostras e o desenvolvimento de ferramentas que facilitam a análise dos dados gerados, o estudo venômico tem alcançado novos patamares. Muitos trabalhos que exploram proteínas presentes nos venenos de serpentes negligenciam componentes de baixas massas moleculares, talvez pela dificuldade de acesso a esses componentes e a falta de informações depositadas em bancos de dados. Este trabalho tem como principal objetivo a identificação de componentes presentes nos venenos, com foco nos peptídeos de baixo peso molecular dos venenos das serpentes *Bothrops jararaca*, *Bothrops insularis* e *Bothrops atrox*, além de caracterizar os perfis proteicos do veneno total solubilizado em diferentes concentrações de acetonitrila e realizar uma análise proteômica dos componentes através da espectrometria de massas. Os perfis de migração eletroforética dos venenos assemelharam-se ao que há descrito na literatura para os venenos de serpentes do gênero *Bothrops*. O veneno de *Bothrops atrox* apresentou bandas mais intensas no gel na região de alto peso molecular, comparando-se com os demais venenos. Os cromatogramas gerados por RP-HPLC também seguiram o padrão do gênero *Bothrops*, porém, nas amostras tratadas com maior concentração de acetonitrila formaram-se picos com maiores áreas. A maioria dos peptídeos identificados nas amostras são peptídeos potenciadores de bradiginina (BPPs). No veneno de *B. atrox*, essas proteínas são pouco abundantes, e somente uma está anotada nos bancos de dados. Foi encontrada uma sequência peptídica (<qKWPRSVPP(L/I)P>) analisada como um possível novo BPP. Foi encontrada no presente trabalho uma sequência com aminoácidos alanina-prolina na região C-terminal presente na sequência da proteína precursora de BPPs-CNP de *Bothrops insularis*.

Palavras-chave: Veneno; Proteômica; Peptídeos potenciadores de bradiginina.

## ABSTRACT

Snake venoms are rich in bioactive compounds of pharmacological, medical and academic relevance. Through the advancement of proteomics tools, including the emergence of new protocols for samples prepare and the development of mechanisms that facilitate the analysis of the data generated, the venomics has reached new heights. Several works that explore proteins in snake venoms neglect the low molecular weight components, perhaps the difficulty of access these components and the lack of information deposited in databases. This work aims to maximize the identification of the components present in snake venoms, focusing on low molecular weight peptides in venoms of *Bothrops jararaca* snake, *Bothrops insularis* and *Bothrops atrox*. Characterize the protein profiles of the total venom solubilized in different acetonitrile concentrations and conduct a proteomic analysis of the components by mass spectrometry. The electrophoretic migration profiles of peptides resembled to what is described in the literature for the *Bothrops* venoms. The venom of *Bothrops atrox* presented more intense bands in the gel in the high molecular weight region, comparing with other poisons. The chromatograms generated by RP-HPLC also followed the pattern of the *Bothrops*, but the samples treated with the highest concentration of acetonitrile were formed with higher peak areas. Most peptides in samples are bradykinin potentiating peptides (BPPs). In the venom of *B. atrox*, these proteins are not very common, and only one is recorded in databases. A peptide sequence (<qKWPRSVPP(L/I)P>) analyzed as a possible new BPP. It was found in this study a sequence of alanine-proline amino acids in the C-terminal region.

Keywords: Venom; Proteomics; Bradykinin potentiating peptides.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Perfil de migração das proteínas solubilizadas em 5 e 10% de acetonitrila extraídas dos venenos das serpentes *Bothrops jararaca* (Bj5% e Bj10%), *B. insularis* (Bi5% e Bi10%), amostras de *B. atrox* coletadas em Tucuruí (BaTuc5% e BaTuc10%) e *B. atrox* de diversas localidades (Bapool5% e Bapool10%). E marcações das bandas para realização das análises densitométricas do gel. Padrão de peso molecular (MW) no centro dos géis.. 31
- Figura 2 Análise cromatográfica das proteínas solubilizadas em 5 e 10% de acetonitrila da serpente *Bothrops jararaca* através de RP-HPLC utilizando coluna analítica C18 e gradiente de acetonitrila..... 37
- Figura 3 Análise cromatográfica das proteínas solubilizadas em 5 e 10% de acetonitrila da serpente *Bothrops insularis* através de RP-HPLC utilizando coluna analítica C18 e gradiente de acetonitrila..... 38
- Figura 4 Análise cromatográfica das proteínas solubilizadas em 5 e 10% de acetonitrila da serpente *Bothrops atrox* através de RP-HPLC utilizando coluna analítica C18 e gradiente de acetonitrila. .... 41
- Figura 5. Cromatogramas obtidos a partir de nanoRP-HPLC dos venenos da serpente *B. jararaca* solubilizados em 5 e 10% de ACN utilizando nano coluna analítica C18. .... 43
- Figura 6 Cromatogramas obtidos a partir de nanoRP-HPLC dos venenos da serpente *B. insularis* solubilizados em 5 e 10% de ACN utilizando nano coluna analítica C18. .... 45
- Figura 7 Cromatogramas obtidos a partir de nanoRP-HPLC dos venenos da serpente *B. atrox* solubilizados em 5 e 10% de ACN utilizando nano coluna analítica C18. .... 47
- Figura 8 Sequência completa de BPPs e CNP da serpente *Bothrops jararaca*. Sequências sublinhadas representam os BPPs já descritos. Sequências em negrito e contornadas são os BPPs identificados neste trabalho..... 54
- Figura 9 Sequência completa de BPPs e CNP da serpente *Bothrops insularis*. Sequências sublinhadas representam os BPPs já descritos. Sequências em negrito e contornadas são os BPPs identificados neste trabalho..... 54
- Figura 10 Sequência completa de BPPs e CNP da serpente *Bothrops jararacussu*. Sequências sublinhadas representam os BPPs já descritos. Sequências em negrito e contornadas são os BPPs identificados neste trabalho. .... 54
- Figura 11 Sequência candidata a novo BPP identificada no veneno de *B. atrox* tratado com 5% ACN. a) Sequência gerada por MS/MS. b) Gráfico RTxm/z do peptídeo. c) Análise dos íons imônios b e y. d) Desvio de erro de massa dos fragmentos. e) Sequenciamento de novo..... 55

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Análise semi-quantitativa do perfil eletroforético das proteínas tratadas com 5 e 10% de acetonitrila de venenos da serpente <i>B. jararaca</i> .....	33
Tabela 2 Análise semi-quantitativa do perfil eletroforético das proteínas tratadas com 5 e 10% de acetonitrila de venenos da serpente <i>B. insularis</i> . ....	33
Tabela 3 Análise semi-quantitativa do perfil eletroforético das proteínas tratadas com 5 e 10% de acetonitrila do pool de venenos da serpente <i>B. atrox</i> .....	34
Tabela 4 Análise semi-quantitativa do perfil eletroforético das proteínas tratadas com 5 e 10% de acetonitrila do veneno coletado em Tucuruí-PA da serpente <i>B. atrox</i> . ....	34
Tabela 5 Área das frações obtidas por RP-HPLC (coluna C18) com amostras de venenos de <i>B. jararaca</i> solubilizadas em 5 e 10% de acetonitrila.....	39
Tabela 6 Área das frações obtidas por RP-HPLC (coluna C18) com amostras de venenos de <i>B. insularis</i> solubilizadas em 5 e 10% de acetonitrila.....	39
Tabela 7 Área das frações obtidas por RP-HPLC (coluna C18) com amostras de venenos de <i>B. atrox</i> (Tucuruí) solubilizadas em 5 e 10% de acetonitrila. ...	42
Tabela 8 Área dos picos gerados por nanoRP-HPLC (nano coluna C18). Proteínas solubilizadas em 5 e 10% de ACN do veneno de <i>Bothrops jararaca</i> . ....	44
Tabela 9 Área dos picos gerados por nanoRP-HPLC (nano coluna C18). Proteínas solubilizadas em 5 e 10% de ACN do veneno de <i>Bothrops insularis</i> . ....	46
Tabela 10 Área dos picos gerados por nanoRP-HPLC (nano coluna C18). Proteínas solubilizadas em 5 e 10% de ACN do veneno de <i>Bothrops atrox</i> . ...	48
Tabela 11 Sequências peptídicas identificadas das amostras de <i>B. jararaca</i> , <i>B. insularis</i> e <i>B. atrox</i> .....	50
Tabela 12 Peptídeos Potenciadores de Bradicinina (BPPs) identificados nos bancos de dados UniprotKB/NCBI. ....	53

**LISTA DE GRÁFICOS**

Gráfico 1 Número publicações entre os anos de 2000-2015 depositadas no site < <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed</a> > utilizando a palavra-chave “proteomics”.	14
--	----



**LISTA DE ABREVIATÓES**

ACN: Acetonitrila

ALC: Local de confiança de cobertura

BPP: Peptídeo potenciador de bradicinina

CID: Dissociação induzida por colisão

CNP: Peptídeo Natriurético do tipo C

ECA: Enzima Conversora de Angiotensina

ESI: Ionização por eletrospray

FAD: Dinucleótido de flavina e adenina

RP-HPLC: Cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa

LAAO: L-aminoácido oxidase

LC-MS/MS: Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

LTC: Lectinas do tipo C

MALDI: Ionização por desorção a laser auxiliada por matriz

MALDI-TOF: espectrometria de massa baseada na ionização por desorção a laser auxiliada por matriz (MALDI) e análise por tempo de voo (TOF)

MALDI-TOF-TOF: fonte MALDI com dois analisadores em série tipo TOF (tempo de vôo)

MS: Espectrometria de massas

MS/MS: Espectrometria de massas *in tandem*

NCBI: Centro Nacional para informação biotecnológica

OMS: Organização Mundial de Saúde

PLA2: Fosfolipase A<sub>2</sub>

Q: Analisador de massa Quadrupolo

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida usando dodecilsulfato de sódio

SVMP: Metaloprotease de veneno de serpente

SVSP: Serinoprotease de veneno de serpente

TFA: Ácido Trifluoracético

TLC: Local de confiança total

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
2.1 Venenos ofídicos.....	15
2.2 Serpentes do gênero <i>Bothrops</i> .....	16
2.3 Principais Toxinas .....	18
2.3.1 Metaloproteases .....	18
2.3.2 Serinoproteases.....	19
2.3.3 Fosfolipases A2 .....	19
2.3.4 Lectinas do tipo C .....	20
2.3.5 L-aminoácido oxidases .....	20
2.3.6 Desintegrinas .....	21
2.3.7 Peptídeos Potenciadores de Bradicینina (BPPs).....	22
2.5 Venômica .....	23
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
3.1 Objetivo Geral .....	25
3.2 Objetivos específicos .....	25
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
4.1 Amostras de venenos .....	26
4.2 SDS-PAGE.....	26
4.3 Análise densitométrica .....	27
4.4 Cromatografia Líquida de Fase Reversa .....	27
4.5 LC-MS/MS.....	27
4.6 Análise dos dados.....	28

<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>30</b>
5.1 Análise dos perfis eletroforéticos dos venenos de <i>Bothrops jararaca</i> , <i>B. insularis</i> e <i>B. atrox</i> solubilizados em 5 e 10% de acetonitrila .....	30
5.2 Análise cromatográfica das proteínas tratadas com 5 e 10% de acetonitrila dos venenos de <i>B. jararaca</i> , <i>B. insularis</i> e <i>Bothrops atrox</i> utilizando RP-HPLC .....	35
5.3 Análises cromatográficas das proteínas solubilizadas em 5 e 10% de acetonitrila dos venenos das Serpentes <i>Bothrops jararaca</i> , <i>Bothrops insularis</i> e <i>Bothrops atrox</i> através de nano RP-HPLC utilizando nano coluna C18 analítica.....	42
5.4 Análises por espectrometria de massas (Q-TOF) dos peptídeos solubilizados em 5 e 10% de ACN dos venenos de <i>B. jararaca</i> , <i>B. insularis</i> e <i>B. atrox</i> .....	48
5.5 Proteínas identificadas nas amostras de <i>Bothrops jararaca</i> e <i>Bothrops insularis</i> .....	51
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>57</b>
6.1 As serpentes .....	57
6.2 Caracterização dos venenos por SDS-PAGE .....	58
6.3 Fracionamento das proteínas por RP-HPLC.....	59
6.4 Análise venômica por LC-MS/MS .....	60
6.5 Identificação de novos componentes de baixo peso molecular .....	62
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	<b>64</b>
<b>8 PERSPECTIVAS</b> .....	<b>65</b>
<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>66</b>
<b>10 ANEXOS</b> .....	<b>75</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Envenenamento ocasionado por picadas de serpentes passou a ser considerado um problema de saúde pública e incluído pela Organização Mundial de Saúde (OMS) na lista das doenças tropicais negligenciadas junto com a dengue, febre amarela, doença de Chagas e outras. Esses acidentes ocorrem principalmente em áreas rurais e as complicações causadas pelo envenenamento ofídico estão diretamente relacionadas com a composição de toxinas e a concentração em que cada uma delas ocorre no veneno inoculado na vítima (WHO, 2007).

Os venenos de serpentes compreendem uma característica evolutiva, conferindo vantagem na sobrevivência desses animais. São produzidos e armazenados em glândulas especializadas e eliminados através de canais veneníferos no momento da picada. Proteínas, enzimas e peptídeos bioativos são os principais componentes dos venenos, chegando a mais de 90% de seu peso seco. Essa composição proteica dos venenos apresenta variabilidade até mesmo entre indivíduos da mesma espécie (Calvete, 2011).

Os venenos são considerados coquetéis mortíferos, capazes de imobilizar e levar suas vítimas e presas a óbitos. Paradoxalmente os venenos possuem componentes de grande importância terapêutica e farmacológica, despertando interesse acadêmico, industrial e médico. São chamados por alguns autores de *Ying e Yang* das toxinas (Calvete, 2011).

A maioria dos acidentes por envenenamento ofídico no Brasil é causada por serpentes do gênero *Bothrops* (83,8%), seguido por *Crotalus* (8,5%) e *Lachesis* (3,4%) (WHO, 2007). O envenenamento por picada de serpentes do gênero *Bothrops* causa diversos distúrbios fisiopatológicos, incluindo desordens do sistema hemostático, associadas às ações de proteases e peptídeos de baixo peso molecular, como as desintegrinas e peptídeos potenciadores de bradicinina (BPPs), que possuem efeitos significativos na ação dos venenos (Souza *et al.*, 2013).

Os estudos realizados acerca da descoberta de componentes nos venenos ofídicos e a forma como eles atuam são de grande importância para entender a atuação de cada proteína, correlacionando sua estrutura e função indicando seu papel na ação do veneno. O avanço das técnicas proteômicas facilitaram a identificação de diversos componentes de venenos de serpentes (Souza *et al.*, 2013).

Com o surgimento de técnicas suaves de ionização, a espectrometria de massas passou a ser utilizada para análises de moléculas grandes, como as proteínas. Com isso, os estudos proteômicos tiveram grandes avanços, aumentando consideravelmente o número de publicações de trabalhos científicos depositados em banco de dados ao longo dos últimos anos, como mostra o *Gráfico 1*. Desde então, diversas espécies de serpentes se tornaram alvos de estudos proteômicos, dando origem ao termo venômica, por Calvete (2007). Porém, mesmo com todo o avanço da tecnologia e surgimento de novos protocolos para tratamento das amostras, muitas vezes os peptídeos de baixo peso molecular são negligenciados nos estudos venômicos (Corrêa-Netto *et al.*, 2011).

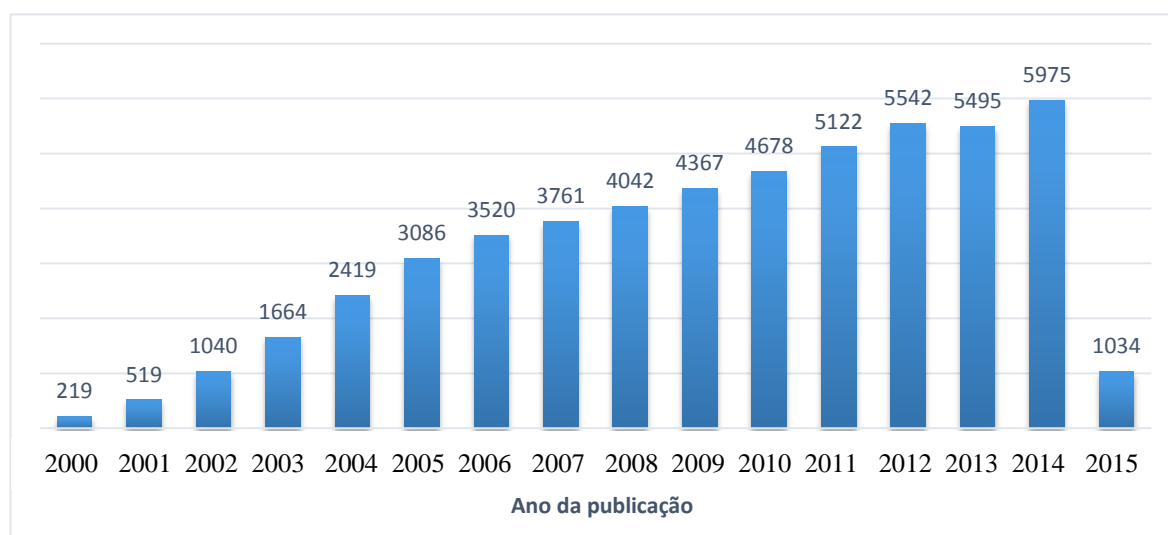


Gráfico 1 Número publicações entre os anos de 2000-2015 depositadas no site <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>> utilizando a palavra-chave "proteomics".

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Venenos ofídicos

Em qualquer lugar do planeta existe competição por recursos, e os venenos representam uma adaptação crucial para o sucesso das serpentes. Venenos são coquetéis mortíferos, compreendendo uma mistura complexa adaptada pela seleção natural para atuar nos sistemas vitais de presas ou vítimas (Calvete *et al.*, 2009). O veneno ofídico possui componentes que atuam de forma sinérgica, podendo atuar no sistema locomotor, cardiovascular, nervoso, alterando a coagulação sanguínea e permeabilidade de vasos (Karlsson, 1979).

Segundo Russel (1980), “venenos são substâncias tóxicas produzidas por plantas ou animais em um órgão secretor bem desenvolvido, ou mesmo, num grupo de células, as quais são liberadas durante o ato da picada ou mordida”.

Venenos ofídicos compreendem um dos fluidos biológicos mais concentrados encontrados no reino animal. Apresentam uma grande variabilidade biológica na sua composição e essa variação pode ocorrer em animais da mesma família, do mesmo gênero e até da mesma espécie; pode ocorrer, também, devido a fatores ontogenéticos, sexuais, sazonais e alimentares (Chippaux *et al.*, 1991; Mendoza *et al.*, 1992; Moura da Silva, 1992). Algumas espécies de serpentes possuem uma determinada dieta quando jovens, e mudam essa dieta com o passar da idade, passando a se alimentarem de animais maiores. E a composição dos venenos também é alterada com a mudança com a mudança dos hábitos alimentares (Calvete *et al.*, 2010).

A variabilidade na composição do veneno tem um significativo impacto na pesquisa científica e no tratamento de acidentes devido à dificuldade na seleção do soro antiofídico adequado e a escolha de espécies mais apropriadas para produção do soro (Woodhams *et al.*, 1990).

Os interesses iniciais em estudar os venenos de serpentes eram voltados ao combate de seu efeito em vítimas de envenenamento e à compreensão de

como essas toxinas funcionavam. No início do século 20, surgiu o interesse em estudar essas toxinas para fins terapêuticos (Koh *et al.*, 2006). O primeiro exemplo de droga desenvolvida com sucesso a partir de uma toxina isolada de veneno de serpente foi o Captopril, um agente hipotensivo baseado na estrutura do Peptídeo Potenciador de Bradicinina (do inglês, Bradykinin Potentiating Peptide – BPP), isolado da serpente brasileira *Bothrops jararaca* (Ferreira, 1965).

Diversas proteínas dos venenos causam alterações no sistema hemostático, podendo ter efeitos anti- e pró-coagulantes, fibrinolíticos e na ativação plaquetária. Proteínas como ancrod, batroxobin e crotalase têm sido usadas no tratamento de diversas doenças, como trombose, infarto do miocárdio, embolia pulmonar e outras patologias envolvendo o sistema hemostático. O fármaco Aggrastat (tirofiban) é um inibidor de glicoproteínas IIb/IIIa na superfície das plaquetas, inibindo a sua agregação, sendo desenvolvido para tratamento de angina. Dos venenos ofídicos também já foram isolados componentes com atividades antitumorais, antimetastáticas, antibacterianas e antivirais (Calvete, 2009).

A composição completa dos venenos de serpentes ainda não está totalmente elucidada. Os componentes proteicos dos venenos são uma importante ferramenta biotecnológica para o conhecimento da biologia e evolução das serpentes, além do benefício para a pesquisa acadêmica, diagnósticos clínicos, produção de soros mais eficazes, desenvolvimento de novas ferramentas e biofármacos (Calvete, 2009).

## **2.2 Serpentes do gênero *Bothrops***

As serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis por mais de 70% do total de acidentes ofídicos que ocorrem no país (WHO, 2007). O envenenamento por picada de serpentes do gênero *Bothrops* causa diversos distúrbios fisiopatológicos, incluindo desordens do sistema hemostático, associadas às ações de proteases como as metaloproteases e



serinoproteases, além da ação de desintegrinas. O veneno botrópico também é marcado pelo efeito hipotensor causado pelos BPPs (Souza *et al.*, 2013).

Há cerca de trinta espécies pertencentes ao gênero *Bothrops*, incluindo *Bothrops jararaca*, *Bothrops insularis* e *Bothrops atrox* (Campbell e Lamar, 2004). No Brasil, a espécie *Bothrops jararaca* é uma das serpentes de maior distribuição geográfica, e 90% dos casos de acidentes nos locais onde ocorrem são causados por essa espécie (Santoro *et al.*, 2008).

Essas serpentes possuem uma dieta bem diversificada, e seu veneno é caracterizado por efeitos sistêmicos e locais, como edemas, mionecroses, hemorragias, desfibrinogenação e nefrotoxicidade. O veneno dessa espécie tem sido alvo de diversos estudos, não só devido à sua importância com relação à saúde pública, mas por ter servido de modelo experimental para o isolamento dos BPPs, que por sua vez serviram de modelo para o desenvolvimento do Captopril, um importante fármaco hipotensor (Ferreira, 1965).

A espécie *Bothrops atrox*, também conhecida como Jararaca do Norte, é encontrada nas Guianas, Venezuela, Colômbia, Equador, Bolívia, Peru, norte da Argentina e Brasil. São as serpentes mais encontradas no leste do Pará e na Amazônia. São serpentes terrestres de hábito normalmente noturno, consideradas tão perigosas que o epíteto latim *atrox* significa “severo”, “cruel” ou “violento”. São responsáveis por 70-90% dos 3000 casos de acidentes com serpentes por ano na Colômbia. O envenenamento por picada de *B. atrox* causa efeitos locais, como edema, hemorragia local e necrose, além de alterações na coagulação sanguínea e hemorragias distantes do local da picada (Guércio *et al.*, 2006; Calvete, 2013).

Isoladas geograficamente, as *Bothrops insularis* (Jararaca ilha) estão localizadas na Ilha da Queimada Grande, a 64km da costa de São Paulo, Brasil (Campbell e Lamar, 1989). Essas serpentes possuem uma dieta restrita, diferente de outras espécies de *Bothrops*, alimentando-se de aves migratórias e eventualmente de anfíbios, lagartos e outras serpentes. Os venenos dessa serpente possuem efeitos tóxicos quase instantâneos, uma adaptação para captura de suas presas (Cogo *et al.*, 2006).

## 2.3 Principais Toxinas

Os venenos ofídicos são fluidos secretórios altamente concentrados, produzidos e armazenados em glândulas especializadas, apresentando uma composição variável, compreendendo substâncias orgânicas e inorgânicas (Stocker, 1990).

Os principais componentes tóxicos presentes nos venenos são proteínas e peptídeos, representando mais de 90% de seu peso seco. Essas toxinas podem causar efeitos bioquímicos, imunológicos, farmacológicos e patológicos (Kularatne e Senanayake, 2014).

Dentre as principais toxinas presentes nos venenos podemos destacar as metaloproteases, serinoproteases, fosfolipases A2, lectinas do tipo C, L-aminoácido-oxidases, desintegrinas e peptídeos potenciadores de bradicinina (Calvete *et al.*, 2009).

### 2.3.1 Metaloproteases

As metaloproteases presentes nos venenos de serpentes (SVMP – Snake Venoms Metalloproteases) são endopeptidases que possuem em comum um sítio de ligação de zinco. Representam as toxinas mais abundantes nos venenos de serpentes e são responsáveis por alguns processos fisiológicos, como fibrinólise, coagulação, migração celular, organogênese, reparo tecidual, formação óssea e reprodução (Hooper, 1994). Degradam proteínas da matriz extracelular, como colágeno, fibronectina, laminina, entre outras, produzindo hemorragia local, inflamação e necrose (Gutierrez *et al.*, 2005).

São divididas em quatro classes (PI a PIV) de acordo com a organização de seus domínios e sua massa molecular. A classe PI inclui SVMP pequenas (20-30 kDa), com pouca atividade hemorrágica, apresentando somente o domínio metaloprotease. A classe PII (30-50 kDa) possui um domínio desintegrina na porção C-terminal. A classe PIII (50-90 kDa) possui um domínio desintegrina-like e um domínio rico em cisteína, e são as toxinas de maior

atividade hemorrágica. E a classe PIV, que se diferenciam das PIII por conterem um domínio de lectina tipo C unido por ligações dissulfeto ao domínio rico em cisteína. As proteínas da classe PIV são relativamente raras (Markland e Swenson, 2013).

### **2.3.2 Serinoproteases**

As serinoproteases de venenos de serpentes (Snake venom serineprotease- SVSP) são enzimas com massa molecular variando entre 26 e 67 kDa. Além de em venenos de serpentes, são encontradas também em microrganismos, plantas e diversos outros animais. A maioria das SVSPs são glicoproteínas, com variável número e sítios de glicosilações, não sendo conservados (Calvete, 2013).

Constitui um grupo de toxinas que atuam na digestão, ativação do sistema complemento, diferenciação das células e processo hemostático, causando um desequilíbrio na cascata de coagulação, através da clivagem proteolítica de fatores da cascata ou ativação/inativação de fatores envolvidos na agregação plaquetária, coagulação e fibrinólise. São enzimas tipo tripsina, que clivam seus substratos em ligações que antecipam os resíduos de arginina e lisina. Possuem o sítio ativo formado pela tríade (His57, Asp102 e Ser195) (Rawlings e Barrett, 1993).

### **2.3.3 Fosfolipases A<sub>2</sub>**

As fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) são abundantes componentes dos venenos ofídicos e estão distribuídas na natureza em 15 grupos. Apresentam entre 120-125 resíduos de aminoácidos com sete pontes dissulfeto. Cerca de 50% de sua estrutura são  $\alpha$ -hélices e cerca de 10% são folhas  $\beta$ . Possuem um ácido aspártico na posição 49 (D49-PLA<sub>2</sub>) importante na sua atividade enzimática (Gutierrez e Lomonte, 2013).

As PLA<sub>2</sub> compreendem enzimas que catalisam a hidrólise Ca<sup>+</sup>-dependente de fosfolipídeos de membranas, dando origem a ácidos graxos e

lisofosfolípídeos. As PLA<sub>2</sub> são enzimas-chave na regulação de mediadores lipídicos nos processos inflamatórios (Paula *et al.*, 2009).

Possuem grande importância na letalidade dos venenos. Seus valores de dose letal são muito baixos, com uma ação intensa na junção neuromuscular e necrose da musculatura esquelética. As PLA<sub>2</sub> também são encontradas nos venenos de abelhas, e possuem grande interesse médico por serem responsáveis por diversas patologias humanas inflamatórias (Gutiérrez e Lomonte, 2013).

#### **2.3.4 Lectinas do tipo C**

As lectinas do tipo C (LTCs) são proteínas homodiméricas, apresentando massa molecular de aproximadamente 30 kDa. Essas proteínas estão presentes nos venenos de serpentes da família Viperidae e participam de sua ação hemorrágica. Além das LTCs verdadeiras, os venenos também apresentam as LTC-símiles. As LTCs verdadeiras possuem em sua estrutura um domínio de ligação aos carboidratos (CRD, *carbohydrate recognition domain*), que nas LTC-símiles são alterados, portanto não se ligam aos carboidratos (Arlinghaus e Ebler, 2012).

As LTCs participam de processos hemostáticos, se ligando aos carboidratos da superfície dos eritrócitos, provocando aglutinação. As LTCs também aumentam a permeabilidade de vasos sanguíneos, levando a um quadro de hipotensão e se ligam aos receptores de membranas das plaquetas, ativando-os e fazendo com que haja agregação plaquetária. Também possuem capacidade de se ligarem à trombina, impedindo a conversão de fibrinogênio em fibrina (Arlinghaus e Ebler, 2012).

#### **2.3.5 L-aminoácido oxidases**

As L-aminoácido oxidases (LAAOs) são glicoproteínas homodiméricas, apresentando massa molecular entre 110-150 kDa. Suas subunidades estão ligadas não-covalentemente, e algumas LAAOs já foram identificadas com

massa entre 50-70 kDa. Em um mesmo tipo de amostra podemos encontrar mais de um tipo de LAAO. Essas proteínas já foram isoladas de algas, fungos, bactérias e venenos de insetos, mas as LAAOs isoladas de venenos de serpentes (SV-LAAOs) são as melhor caracterizadas (Ali *et al.*, 2000).

Em 2000, Pawelek e co-autores determinaram a estrutura por cristalografia de raio-X de uma LAAO isolada de *Calloselasma rhodostoma*, indicando sua funcionalidade como um dímero. Foi determinado que as SV-LAAOs possuem um domínio de ligação a FAD, um domínio de ligação ao substrato e um domínio helicoidal. Entre os domínios de ligação ao substrato e o domínio helicoidal é formado um funil, permitindo o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima. As SV-LAAOs estão sendo alvo de atenção pelas suas aplicações biológicas, como antimicrobiana, anti-HIV e anti tumoral, como exemplos (Yu *et al.*, 2014).

As SV-LAAOs são flavoenzimas responsáveis pela deaminação oxidativa de l-aminoácidos essenciais, produzindo amônia e peróxido de hidrogênio (Sajevic *et al.*, 2011). No envenenamento, as SV-LAAOs levam as células a um processo apoptótico, pois privam as células de aminoácidos essenciais, além da produção de peróxido de hidrogênio, causando um grave estresse oxidativo nas células (Ande *et al.*, 2006).

A ação das SV-LAAOs na agregação plaquetária é controversa, onde alguns trabalhos mostram que essas proteínas podem inibir a agregação plaquetária (Naumann *et al.*, 2011), enquanto outros estudos mostram a capacidade de indução da agregação das plaquetas (Lu *et al.*, 2002).

### **2.3.6 Desintegrinas**

O termo desintegrina foi proposto para designar moléculas de baixo peso molecular encontradas em venenos de serpentes que se ligavam aos receptores de membranas (Dennis *et al.*, 1990).

As desintegrinas liberadas através do processamento proteolítico das SVMP da classe PII são normalmente pequenas, compostas por 41-84

resíduos de aminoácidos e apresentam de 5 a 9 kDa. Possuem a sequência adesiva RGD, responsável por se ligar aos receptores na superfície das células, como por exemplo, à glicoproteína IIb/IIIa (integrina  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ ) presente na superfície das plaquetas, resultando na inibição da agregação plaquetária. (Calvete *et al.*, 2005).

O processamento proteolítico do domínio desintegrina das SVMP da classe PIII, resulta em desintegrinas (“desintegrinas-like”) com massa molecular um pouco maior (30 kDa) e que não possuem a sequência RGD. Em seu lugar, o tripeptídeo D/ECD é responsável pela região de adesão destas desintegrinas (Jia *et al.*, 1997).

Resultados animadores têm mostrado que as desintegrinas também podem atuar na inibição de metástases, sugerindo que essas moléculas possam ser de grande valor na terapia do câncer (Hailey *et al.*, 2013).

### **2.3.7 Peptídeos Potenciadores de Bradicinina (BPPs)**

A bradicinina, um importante vasodilatador, foi descoberta em 1949, por Rocha e Silva, ao incubar veneno de *Bothrops jararaca* com plasma de cães (Rocha e Silva *et al.*, 1949). Sérgio Ferreira, em 1965, mostrou que os venenos de serpentes possuíam fatores que prolongavam os efeitos da bradicinina, os peptídeos potenciadores de bradicinina- BPPs (Ferreira *et al.*, 1970).

Os BPPs possuem 5-14 resíduos de aminoácidos, tendo como característica um ácido piroglutâmico na porção N-terminal e a tríade de aminoácidos ILE-PRO-PRO na porção C-terminal. Possuem a ação de inibir a enzima conversora de angiotensina (ECA), uma dipeptidil-carboxipeptidase, que cliva angiotensina-I no vasoconstrictor angiotensina-II, aumentando a pressão sanguínea. Além disso, a ECA também degrada a bradicinina, que é hipotensora, em metabólitos inativos (Krieger *et al.*, 1971).

A descoberta dos BPPs foi essencial para o desenvolvimento do fármaco Captopril, o primeiro inibidor da ECA utilizado para tratamento da hipertensão humana, e sua estrutura utilizada para pesquisas de novas drogas (Ondetti e

Cushman, 1984; Fernandez *et al.*, 2004). Diversos BPPs já foram isolados de diferentes espécies e suas sequências anotadas no banco de dados (Anexo 1).

## 2.5 Venômica

Os estudos proteômicos surgiram na década de 1990 e buscam identificar e quantificar todas as proteínas que são expressas por um genoma, incluindo isoformas e modificações pós-traducionais (Wasinger *et al.*, 1995; Cox e Mann, 2011). Em 2007, Calvete e co-autores denominaram o estudo proteômico voltado aos venenos de serpentes de “venômica”, que sofreu grande impulso nos últimos anos devido ao desenvolvimento de novos protocolos para preparação das amostras, avanço das técnicas de separação das proteínas, a espectrometria de massas (MS) e ferramentas para análise dos dados (Fry *et al.*, 2002; Fox *et al.*, 2006). A pesquisa venômica consiste basicamente de fracionamento do veneno bruto, caracterização desse veneno geralmente por eletroforese uni ou bidimensional e a determinação das massas moleculares das proteínas desse veneno por espectrometria de massas (Calvete *et al.*, 2007).

A espectrometria de massas se tornou essencial para os estudos proteômicos. Um espectrômetro de massas consiste basicamente de uma fonte, um ou mais analisadores e um detector. O principal desafio para a espectrometria de massas foi desenvolver uma fonte capaz de transferir moléculas grandes, como os peptídeos, para a fase gasosa sem destruí-los. Isso foi possível com o surgimento de técnicas suaves de ionização como as técnicas de eletronebulização (electrospray ionization – ESI) e a ionização e dessorção por laser assistida por matriz (matrix-assisted laser desorption ionization – MALDI) (Ong e Mann, 2005).

A combinação dessas técnicas suaves de ionização e analisadores de massas potentes, fizeram com que a espectrometria de massas atingisse altos níveis de sensibilidade e precisão. Os principais analisadores de massas são os quadrupolos (Q), os tempo-de-voo (Time-of-flight- TOF) e os Orbitraps. A espectrometria de massas in tandem consiste na seleção de íons de acordo

com a sua relação massa/carga ( $m/z$ ), que serão fragmentados e submetidos a uma segunda análise, denominando-se MS/MS ou MS2. Para uma análise MS/MS ou MS2 é necessário que pelo menos dois analisadores de massas estejam incorporados (Medzihradzsky e Chalkley, 2015).

A eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) é uma técnica simples para caracterização dos venenos que consiste em aplicar uma força elétrica para que ocorra fracionamento das partículas em gel. As proteínas e peptídeos carregados migram pelos poros do gel, e são separadas em bandas de acordo com sua massa relativa. Normalmente utiliza-se eletroforese descontínua, onde os poros do gel possuem diferentes tamanhos e pH, aumentando a qualidade e obtendo uma melhor resolução das bandas (Ornstein, 1964).

O fracionamento dos venenos por cromatografia consiste na técnica de separação que se baseia na interação das proteínas utilizando duas fases: uma fase móvel e uma fase estacionária ancorada em uma matriz inerte. Para separação de proteínas e peptídeos, a cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC) costuma ser a mais utilizada, realizando a separação dos componentes de acordo com seu grau de hidrofobicidade. As colunas cromatográficas utilizam matriz de sílica, onde ancoram cadeias de carbonos. As proteínas que possuem regiões hidrofóbicas irão se ligar aos carbonos e serão eluídos da coluna de acordo com o aumento de afinidade pela fase móvel, contendo o solvente orgânico acetonitrila. Portanto, quanto maior a hidrofobicidade das proteínas e peptídeos, maior a concentração de acetonitrila necessária para retirá-la da coluna (Snyder *et al.*, 2004).

Técnicas de nano-cromatografias acopladas a um espectrômetro de massas em tandem e análises de *shotgun proteomics* têm sido amplamente utilizadas para estudar as proteínas presentes nos venenos de serpentes. Porém uma única estratégia de análise não é suficiente para explorar todo o proteoma dos venenos, logo, a melhor técnica ou conjunto de técnicas a serem utilizados vai depender da pergunta a ser respondida (Ardrey, 2003; Cotrell, 2011).



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a identificação de componentes proteicos de venenos de serpentes *Bothrops jararaca*, *Bothrops insularis* e *Bothrops atrox*, através do aumento na concentração de acetonitrila na solução de solubilização dos venenos.

#### 3.2 Objetivos específicos

- a) Procurar bandas específicas no perfil eletroforético das proteínas tratadas com 5 e 10% de acetonitrila, dos venenos de *B. jararaca*, *B. insularis* e *B. atrox*.
- b) Analisar diferenças no fracionamento por RP-HPLC das proteínas totais solubilizadas em 5 e 10% de acetonitrila, dos venenos de *B. jararaca*, *B. insularis* e *B. atrox*;
- c) Analisar diferenças no fracionamento por nanoRP-HPLC dos peptídeos de baixo peso molecular, solubilizados em 5 e 10% de acetonitrila, dos venenos de *B. jararaca*, *B. insularis* e *B. atrox*;
- d) Isolar e identificar as frações de baixo peso molecular dos venenos de *B. jararaca*, *B. insularis* e *B. atrox*, por LC-MS/MS.
- e) Analisar o sequenciamento *de novo* dos íons obtidos por MS/MS para descoberta de possíveis candidatos a BPPs nas amostras.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Amostras de venenos

Os exemplares de venenos de *Bothrops jararaca* e *Bothrops insularis* foram gentilmente cedidos pelo Instituto Butantan e os venenos das serpentes *Bothrops atrox* coletados em Tucuruí (PA) e o pool de *Bothrops atrox* foram cedidos pelo Professor Elias Walter Alves (LQFPP-CBB-UENF). As amostras foram liofilizadas e armazenadas a -20°C. Foram pesadas 5 mg de cada amostra e dissolvidas em 100 µL de água com 0,05 % de ácido trifluoracético (TFA) e 5% ou 10% do solvente orgânico acetonitrila (ACN). O material insolúvel de todas as amostras foi removido por centrifugação a 13.000xg por 10 min.

### 4.2 SDS-PAGE

A análise eletroforética foi realizada em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) segundo Laemli (1970). Os géis foram produzidos nas concentrações de 15% para o gel de separação e 4% para o gel de empilhamento. Foi utilizado o sistema Mini- PROTEAN Tetra System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), para géis de 8 x 10 cm e a corrida processou-se sob corrente constante de 12 mA. As amostras foram quantificadas pelo método de Bradford e aplicados 45 µg de proteínas em cada poço do gel. As amostras foram dissolvidas em tampão de amostra contendo β- mercaptoetanol, fervidas à 95°C por 5 min e utilizado um padrão de peso molecular para referência (Thermo Fisher Scientific<sup>®</sup>) com os valores de 170, 130, 95, 72, 55, 43, 34, 26, 17 e 10 kDa. Após a corrida eletroforética os géis foram corados com solução de Coomassie Brilliant Blue, por 30 minutos e em seguida lavados com solução descorante de metanol e ácido acético (54% e 13,5%, respectivamente).

### 4.3 Análise densitométrica

As imagens do gel foram analisadas e semi-quantificadas por densitometria. As análises de mobilidade eletroforética e a quantificação de massa molecular relativa das bandas do gel foram realizadas através do software GEL ANALYZER 2010a<sup>®</sup>.

### 4.4 Cromatografia Líquida de Fase Reversa

As proteínas presentes no material solúvel foram separadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa (RP-HPLC) (Shimadzu LC10AT) (Tokyo, Japan) utilizando um fluxo para a eluição de 1mL/min, em uma coluna C18 Phenomenex (250/4.6 mm, 5  $\mu$ m) utilizando gradiente linear de 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) em água (solução A) e 0,1% de TFA em acetonitrila (solução B) (10% de solução B por 5 min, 15% de solução B por 5 min, 45% B por 50 min, 70% B por 15 min, 100% B por 10 min). As proteínas foram detectadas em um comprimento de onda de 220 nm através do software LCsolution. Os cromatogramas das diferentes amostras foram analisados, e seus picos comparados através de suas áreas. Os picos de interesse foram coletados manualmente e as frações que representam as moléculas de baixo peso molecular foram levadas diretamente ao espectrômetro de massas.

### 4.5 LC-MS/MS

As frações de interesse coletadas na cromatografia foram liofilizadas e ressuspensas em solução de 0,1% de ácido fórmico e 10% de acetonitrila em água. Foram transferidos 50  $\mu$ L da solução com os peptídeos para um *vial* (Total Recovery, Waters) e 5  $\mu$ L foram injetados no aparelho de nano cromatografia líquida (nanoACQUITY UPLC<sup>™</sup> System, Waters, Milford, MA) passando por uma coluna *trap* C18 em um fluxo de 10 $\mu$ L/min de solução A (0,1% de ácido fórmico em água), visando a dessalinização das amostras. À medida em que se aumentou a concentração de solução B (0,1% de ácido

fórmico em acetonitrila), os peptídeos foram sendo liberados da coluna *trap* e entra-se em uma coluna C18 analítica. A eluição das amostras ocorreu em um fluxo de 350nL/min utilizando gradiente de 10% B por 3 min, 10-40% do solvente B em 37,87 min, 40-85% de B em 4 min, 85% de B por 4 min, e retorna a 10% de B em 2 min.

O sistema de nano-LC está acoplado a um espectrômetro de massas em tandem Quadrupolo - Tempo de voo (Q-TOF) (Waters, Milford, MA), onde os espectros foram adquiridos. Devido ao baixo peso molecular dos peptídeos analisados, não foram utilizadas enzimas digestivas para redução das amostras. As moléculas sofreram ionização por nano *electrospray* em modo positivo (nanoESI +) a uma voltagem de 3 kV. As moléculas passaram por um sistema de *StepWave*, ocorrendo a eliminação de moléculas não ionizadas. Os íons seguiram para o analisador Quadrupolo, onde atravessam axialmente entre quatro cilindros de metal com cargas alternadas. A estabilidade da trajetória dos íons no quadrupolo depende de sua relação massa/carga. Em seguida os íons entram no analisador TOF, percorrendo uma trajetória em modo *V* e chegam no detector de massas em diferentes tempos. O tempo de voo de cada íon vai depender de sua relação massa/carga ( $m/z$ ).

#### 4.6 Análise dos dados

Os espectros de massas detectados pelo espectrômetro de massas geraram arquivos com extensão RAW, que foram convertidos em arquivos mzML utilizando o software *MSConvert*. Após a conversão dos arquivos, foi utilizado o software PEAKS v.7 para análise dos dados.

O software PEAKS realiza a deconvolução dos espectros, sequenciando os peptídeos (íons -b e íons -y) de acordo com o valor de massa que cada aminoácido ou grupo de aminoácidos apresentam. Além disso, permite a identificação de modificações pós-traducionais, como a adição de ácido piroglutâmico, importante na estrutura dos BPPs.

Foi utilizado o banco de dados “*Viperidae*” do UniProtKB (<http://www.uniprot.org>) e NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para identificação

das proteínas e peptídeos. Foram filtrados somente os peptídeos que apresentaram valor de ALC (“Average Local Confidence”) acima de 45%, um desvio de erro de massa menor que 0,1 Da e mais de 10% de cobertura da sequência para determinação das proteínas.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análise dos perfis eletroforéticos dos venenos de *Bothrops jararaca*, *B. insularis* e *B. atrox* solubilizados em 5 e 10% de acetonitrila

Foram gerados por SDS-PAGE os perfis de migrações eletroforéticas das proteínas (solubilizadas em 5 e 10% de acetonitrila) dos venenos de *Bothrops jararaca* (Bj5% e Bj10%) e *B. insularis* (Bi5% e Bi10%), das proteínas extraídas do veneno de exemplares *B. atrox* coletadas no município de Tucuruí-PA (BaTuc5% e BaTuc10%) e das proteínas de um *pool* de venenos de *B. atrox* de diferentes localidades (Bapool5% e Bapool10%).

Apesar de semelhantes entre si, os venenos analisados apresentaram diferenças no padrão de bandas obtidas no gel. Os venenos apresentaram bandas majoritárias, bandas minoritárias e bandas exclusivas para cada veneno (Figura 1). Os perfis de migração das proteínas dos venenos foram melhor estudados através de densitometria óptica utilizando o software Gel Analyzer 2010a<sup>®</sup>, que nos permite uma análise mais detalhada do padrão de migração, além de realizar uma quantificação relativa das bandas de cada amostra. As bandas foram então selecionadas manualmente e quantificadas em relação às demais bandas do gel.

Os géis apresentaram um padrão de migração característico para o gênero *Bothrops*, sendo possível supor quais proteínas estão presentes nas bandas de acordo com a massa relativa, com base no descrito pela literatura. Todos os venenos estudados apresentaram uma banda majoritária em aproximadamente 50kDa, possivelmente se tratando de metaloproteases do tipo PIII, que de fato se apresentam em grande abundância no veneno botrópico (Gomes *et al.*, 2015).

Entre 20-30kDa também surgiram bandas majoritárias em todas as amostras. Nesse intervalo de massas, com base na literatura (Valente *et al.*, 2009), estão contidas além de metaloproteases e serinoproteases, as fosfolipases A<sub>2</sub>, responsáveis pela ação neurotóxica dos venenos.

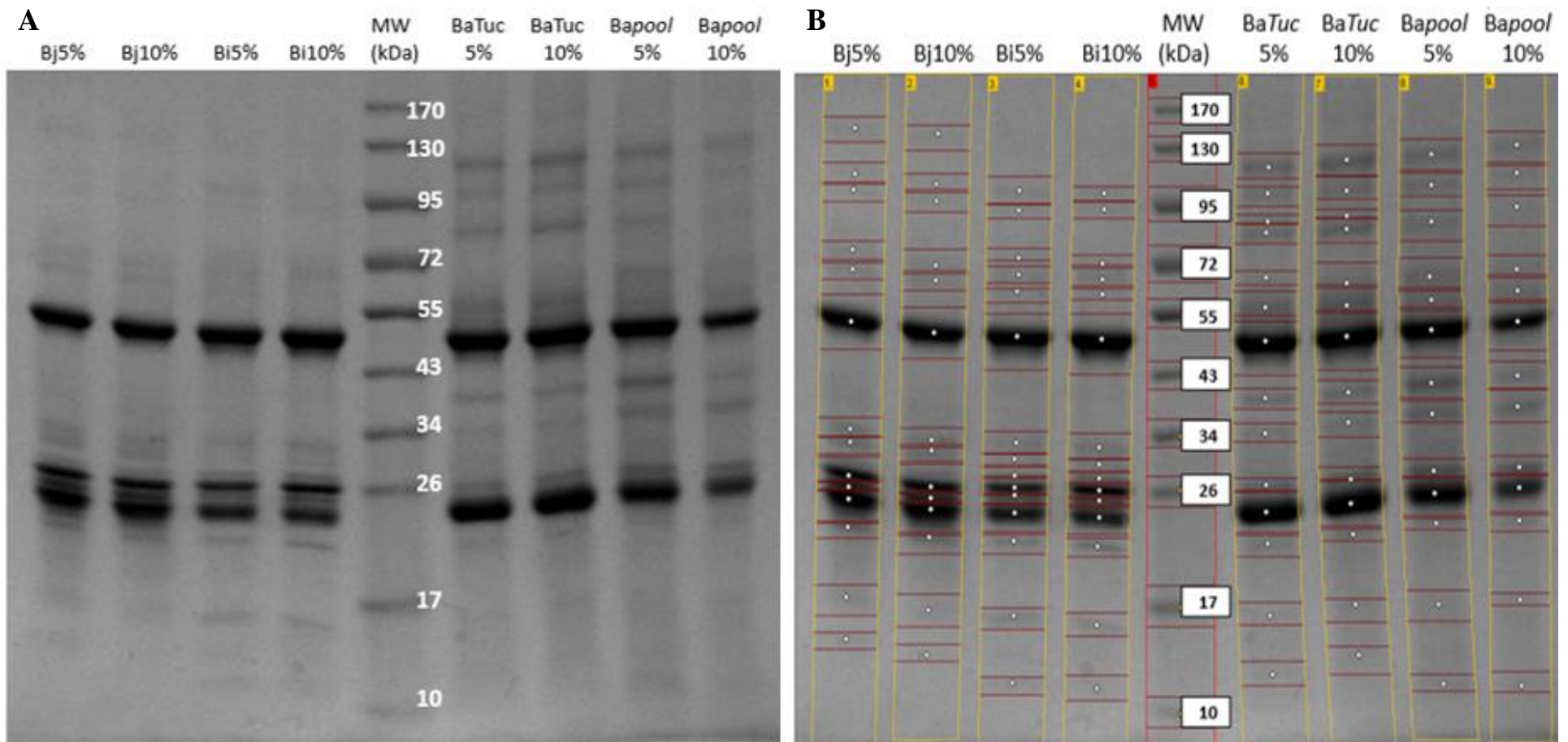


Figura 1 A) Perfil de migração das proteínas solubilizadas em 5 e 10% de acetonitrila extraídas dos venenos das serpentes *Bothrops jararaca* (Bj5% e Bj10%), *B. insularis* (Bi5% e Bi10%), amostras de *B. atrox* coletadas em Tucuruí (BaTuc5% e BaTuc10%) e *B. atrox* de diversas localidades (Bapool5% e Bapool10%). B) O mesmo gel, porém com marcações das bandas para realização das análises densitométricas do gel. Padrão de peso molecular (MW) no centro dos géis.

O perfil de migração das proteínas do veneno de *B. jararaca* apresentaram 14 bandas no gel de SDS, apresentando bandas majoritárias em ~52kDa, ~26kDa e ~23kDa (bandas 6, 9 e 11 da Tabela 1), representando aproximadamente 28, 27 e 34% do total de proteínas, respectivamente. Os valores de massa e a porcentagem do volume ocupado estão sendo demonstrados em média entre os dois tratamentos (5% e 10% de acetonitrila). Com essas massas moleculares, nas bandas majoritárias do veneno de *B. jararaca* estão presentes metaloproteases, serinoproteases, fosfolipases A<sub>2</sub> e L-aminoácido oxidases, como mostra a Tabela 1. *Bothrops jararaca* apresentou uma banda exclusiva no gel em ~150kDa (banda 1, Tabela 1).

As proteínas do veneno de *B. insularis* apresentaram um perfil de migração semelhante ao de *B. jararaca*. A análise densitométrica detectou um total de 15 bandas proteicas no veneno de *B. insularis* para ambos os tratamentos.

No presente trabalho analisamos duas amostras distintas do veneno da serpente *B. atrox*. Uma das amostras foi coletada de serpentes localizadas no município de Tucuruí-PA, e a outra amostra é um pool de amostras coletadas de *B. atrox* de diferentes localidades.

No gel, os perfis de migração das diferentes amostras de *B. atrox* foram semelhantes entre si (Tabelas 3 e 4). A amostra das serpentes de Tucuruí apresentou uma banda exclusiva em relação ao pool de amostras, uma banda em ~86kDa (Banda 4, Tabela 4).

Com relação ao veneno de *B. jararaca* e *B. insularis*, as bandas dos géis de *B. atrox* acima de 50kDa apresentaram maiores volumes, sendo visível a maior intensidade com que elas apresentaram no gel. Uma banda localizada na faixa entre 35-38kDa (banda 8, Tabelas 3 e 4) foi exclusiva para este veneno, se tratando possivelmente de metaloproteases, serinoproteases ou fosfolipases A<sub>2</sub>.

Em todos os venenos estudados, o aumento na concentração de acetonitrila para solubilização das proteínas não alterou significativamente o perfil de migração das proteínas no gel de SDS.



Tabela 1 Análise semi-quantitativa do perfil eletroforético das proteínas tratadas com 5 e 10% de acetonitrila de venenos da serpente *B. jararaca*.

Banda	Bj5%			Bj10%			Possíveis proteínas
	MW	Volume	Vol (%)	MW	Volume	Vol (%)	
1	152	77	1.46	147	71	1.33	<u>LAO-SVMP III (Dímero)</u>
2	117	24	0.45	111	23	0.43	LAO-SVMP III (Dímero)
3	108	27	0.51	101	37	0.69	LAO-SVMP III (Dímero)
4	78	81	1.54	71	49	0.92	SVMP
5	70	69	1.31	66	48	0.9	SVMP
6	54	1805	34.24	51	1774	33.16	<u>SVMP-SVSP-LAO</u>
7	33	89	1.69	31	94	1.76	PLA <sub>2</sub> -SVSP-SVMP
8	31	74	1.4	29	103	1.92	PLA <sub>2</sub> -SVSP-SVMP
9	27	884	16.77	25	921	17.22	PLA <sub>2</sub> -SVSP-SVMP
10	26	423	8.02	24	516	9.65	PLA <sub>2</sub> -SVSP-SVMP
11	24	1456	27.62	23	1510	28.23	<u>PLA<sub>2</sub>-SVSP-SVMP</u>
12	22	126	2.39	21	125	2.34	PLA <sub>2</sub> -SVSP-SVMP
13	17	72	1.36	17	57	1.06	PLA <sub>2</sub> -SVSP-SVMP
14	15	64	1.21	15	21	0.39	PLA <sub>2</sub> -LTC

\*De acordo com Dias *et al.*, 2013. LAO= L-aminoácido oxidases; SVMP= Metaloproteases; SVSP= Serinoproteases; PLA<sub>2</sub> = Fosfolipases A<sub>2</sub>; LTC= Lectinas do tipo C.

Tabela 2 Análise semi-quantitativa do perfil eletroforético das proteínas tratadas com 5 e 10% de acetonitrila de venenos da serpente *B. insularis*.

Banda	Bi5%			Bi10%			Possíveis proteínas
	MW	Volume	% Vol	MW	Volume	%Vol	
1	108	71	1.42	106	47	0.95	LAO-SVMP III (Dímero)
2	97	20	0.4	98	50	1.01	LAO-SVMP III (Dímero)
3	75	23	0.46	73	19	0.38	SVMP
4	69	71	1.42	68	83	1.68	SVMP
5	63	33	0.66	62	14	0.28	SVMP
6	50	1965	39.31	50	2187	44.18	<u>SVMP-SVSP-LAO</u>
7	31	107	2.14	30	118	2.38	SVSP-SVMP
8	29	41	0.82	28	24	0.48	PLA <sub>2</sub> -SVSP-SVMP
9	27	101	2.02	27	169	3.41	PLA <sub>2</sub> -SVSP-SVMP
10	26	759	15.18	25	727	14.69	<u>PLA<sub>2</sub>-SVSP-SVMP</u>
11	25	354	7.08	24	257	5.19	PLA <sub>2</sub> -SVSP-SVMP
12	23	1178	23.56	23	1033	20.87	<u>PLA<sub>2</sub>-SVSP-SVMP</u>
13	21	108	2.16	21	82	1.66	PLA <sub>2</sub> -SVMP
14	16	132	2.64	16	77	1.55	PLA <sub>2</sub> -SVMP
15	14	36	0.72	14	63	1.27	PLA <sub>2</sub> -LTC

\*De acordo com Valente *et al.*, 2009. LAO= L-aminoácido oxidases; SVMP= Metaloproteases; SVSP= Serinoproteases; PLA<sub>2</sub> = Fosfolipases A<sub>2</sub>; LTC= Lectinas do tipo C.

Tabela 3 Análise semi-quantitativa do perfil eletroforético das proteínas tratadas com 5 e 10% de acetonitrila do pool de venenos da serpente *B. atrox*.

Banda	BaT5%			BaT10%			Possíveis proteínas
	MW	Volume	%Vol	MW	Volume	%Vol	
1	121	184	3.58	127	301	5.07	LAAO-SVMP (Dímero)
2	105	55	1.07	108	112	1.89	LAAO-SVMP (Dímero)
3	90	24	0.47	94	29	0.49	LAAO
4	85	130	2.53	88	200	3.37	LAAO-SVMP
5	67	31	0.6	66	111	1.87	SVMP
6	58	349	6.8	59	392	6.61	SVMP
7	49	2146	41.77	50	2300	38.78	SVMP-LAAO
8	38	119	2.32	38	83	1.4	SVMP
9	32	60	1.17	34	51	0.86	SVSP-SVMP
10	26	135	2.63	26	161	2.71	SVSP-CRISP
11	23	1804	35.12	24	2048	34.54	SVMP-SVSP-CRISP-PLA <sub>2</sub>
12	21	39	0.76	21	41	0.69	PLA <sub>2</sub> -SVMP
13	17	34	0.66	17	68	1.15	PLA <sub>2</sub> -LTC
14	14	27	0.52	15	33	0.56	PLA <sub>2</sub> -LTC

\*De acordo com Valente *et al.*, 2009. LAAO= L-aminoácido oxidases; SVMP= Metaloproteases; SVSP= Serinoproteases; PLA<sub>2</sub> = Fosfolipases A<sub>2</sub>; LTC= Lectinas do tipo C.

Tabela 4 Análise semi-quantitativa do perfil eletroforético das proteínas tratadas com 5 e 10% de acetonitrila do veneno coletado em Tucuruí-PA da serpente *B. atrox*.

Banda	Bapool5			Bapool10%			Possíveis proteínas
	MW	Volume	%Vol	MW	Volume	%Vol	
1	130	170	3.55	137	118	3.53	LAAO-SVMP (Dímero)
2	110	89	1.86	117	45	1.34	LAAO-SVMP (Dímero)
3	90	124	2.59	98	61	1.82	LAAO
4	67	183	3.82	70	75	2.24	SVMP
5	60	191	3.98	63	186	5.56	SVMP
6	52	1812	37.81	54	1290	38.55	SVMP-LAAO
7	40	256	5.34	41	74	2.21	SVMP
8	35	108	2.25	36	160	4.78	SVSP-SVMP
9	27	221	4.61	28	238	7.11	SVSP-SVMP
10	25	1517	31.66	25	1008	30.12	SVMP-SVSP- PLA <sub>2</sub>
11	22	33	0.69	22	39	1.16	PLA <sub>2</sub> -SVMP
12	17	42	0.88	17	26	0.78	PLA <sub>2</sub> -LTC
13	14	46	0.96	14	26	0.78	PLA <sub>2</sub> -LTC

\*De acordo com Dias *et al.*, 2013. LAAO= L-aminoácido oxidases; SVMP= Metaloproteases; SVSP= Serinoproteases; PLA<sub>2</sub> = Fosfolipases A<sub>2</sub>; LTC= Lectinas do tipo C.

## 5.2 Análise cromatográfica das proteínas solubilizadas com 5 e 10% de acetonitrila dos venenos de *B. jararaca*, *B. insularis* e *Bothrops atrox* utilizando RP-HPLC

As amostras liofilizadas dos venenos de *B. jararaca*, *B. insularis* e *B. atrox* coletadas em Tucuruí-PA liofilizadas foram tratadas com 5% e 10% de acetonitrila e analisadas por RP-HPLC (Figuras 2 a 4). Utilizou-se coluna C18 em gradiente linear de 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) em água (solução A) e 0,1% de TFA em acetonitrila (solução B) (10% de solução B por 5 min, 15% de solução B por 5 min, 45% B por 50 min, 70% B por 15 min, 100% B por 10 min), com um fluxo de 1 mL/min. Os cromatogramas foram fiéis aos perfis de *Bothrops* já descritos. Baseando-se na literatura foi possível identificar em quais frações estão os peptídeos de baixo e alto peso molecular (Calvete, 2011; Souza *et al.*, 2013). Os cromatogramas foram divididos em oito frações, sendo as frações I, II, III e IV as que apresentam peptídeos de baixo peso molecular e as frações V, VI, VII e VIII apresentam proteínas de médio e alto peso molecular, como as metaloproteases, serinoproteases, L-aminoácido oxidases e fosfolipases A<sub>2</sub>. Cada uma das oito frações dos cromatogramas tiveram suas áreas calculadas utilizando o software LCsolution.

Na tabela 5 estão anotados os valores das áreas dos cromatogramas das amostras da serpente *B. jararaca*, tratadas com 5 e 10% de ACN. O valor total das áreas dos picos do cromatogramas referente à amostra tratada com 10% ACN foi maior que a área da amostra com 5%, ocorrendo um aumento de 8,9%. Porém, nem todas as frações apresentaram maiores áreas no tratamento com maior concentração de ACN. As frações III e VI (Figura 2) tiveram uma diminuição das áreas dos picos no tratamento com 10% de acetonitrila. A fração VI teve a diminuição mais significativa, de 21,87%. Na fração III do tratamento com 10% de ACN, mesmo diminuindo seu valor de área, pode-se observar uma melhor definição de seus picos, surgindo um pico exclusivo para o tratamento com 10% ACN (Fração III, Figura 2). As demais frações (I, II, IV, V, VII e VIII) tiveram suas áreas aumentadas em 10% ACN, e a fração VII apresentou um aumento considerável na sua área de 187,77%, região no

cromatograma onde se encontram metaloproteases e L-aminoácido-oxidases. No veneno de *B. jararaca* as frações com maiores valores de área foram as frações II, VI, VII e VIII, que representam potencialmente as áreas relativas às desintegrinas, metaloproteases e L-aminoácido oxidases.

Os cromatogramas da amostra de *B. insularis* também foram separados em oito frações (Figura 3) e as áreas dos picos calculadas (Tabela 6).

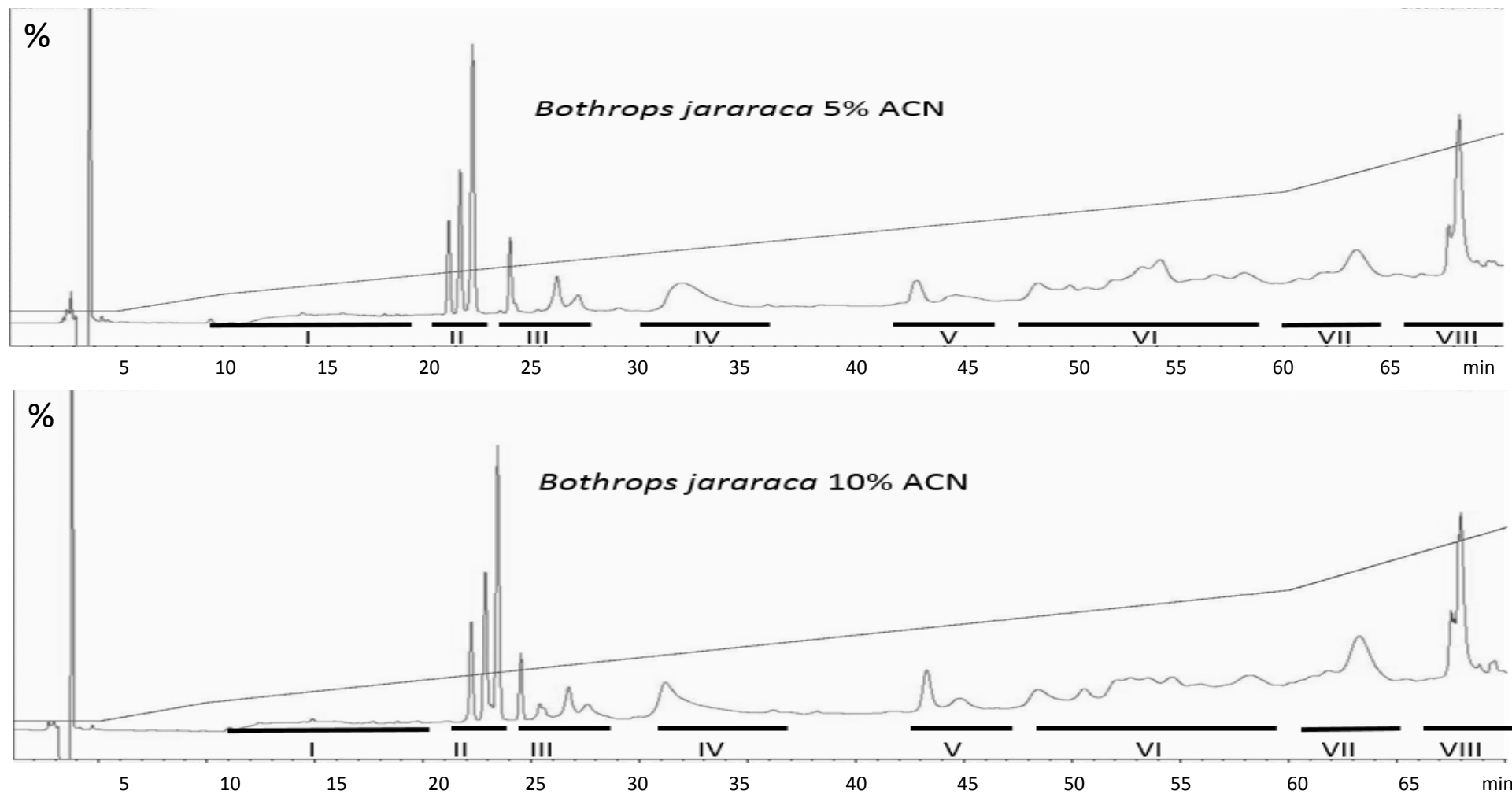


Figura 2 Análise cromatográfica das proteínas solubilizadas em 5 e 10% de acetonitrila da serpente *Bothrops jararaca* através de RP-HPLC utilizando coluna analítica C18 e gradiente de acetonitrila.

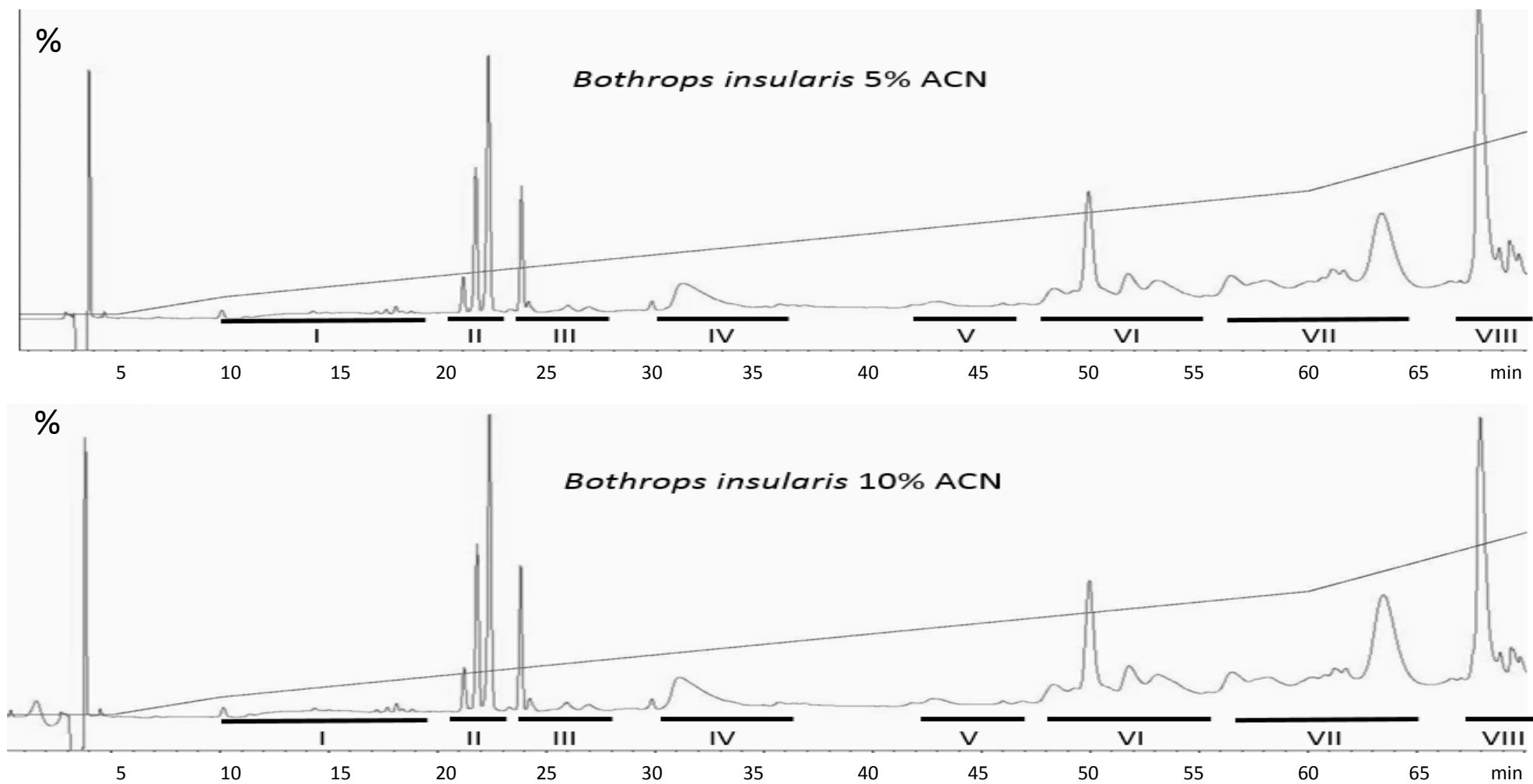


Figura 3 Análise cromatográfica das proteínas solubilizadas em 5 e 10% de acetonitrila da serpente *Bothrops insularis* através de RP-HPLC utilizando coluna analítica C18 e gradiente de acetonitrila.

Tabela 5 Área das frações obtidas por RP-HPLC (coluna C18) com amostras de venenos de *B. jararaca* solubilizadas em 5 e 10% de acetonitrila.

<b><i>Bothrops jararaca</i></b>			
<b>Fração</b>	<b>5% ACN Área</b>	<b>10% ACN Área</b>	<b>Diferença</b>
I	1383614,7	1838196,6	↑ 32,85%
II	5108940,2	5344437,2	↑ 4,61%
III	2595169,7	2505483,5	↓ 3,45%
IV	3046604,2	3303937,3	↑ 8,45%
V	1588127,2	1750335,3	↑ 10,21%
VI	7467125,2	5834209,1	↓ 21,87%
VII	1370601,2	3944198,4	↑ 187,77%
VIII	4580147,1	5036153,1	↑ 9,96%
Área total: 27140329,5		Área total: 29556950,5	↑ <b>8,9%</b>

Tabela 6 Área das frações obtidas por RP-HPLC (coluna C18) com amostras de venenos de *B. insularis* solubilizadas em 5 e 10% de acetonitrila.

<b><i>Bothrops insularis</i></b>			
<b>Fração</b>	<b>5% ACN Área</b>	<b>10% ACN Área</b>	<b>Diferença</b>
I	2834007,1	3243397,1	↑ 14,44%
II	8182159,4	9263669,4	↑ 13,22%
III	3024094,2	3608685,2	↑ 19,33%
IV	6135913,4	6694124,4	↑ 9,10%
V	811607,8	989879,1	↑ 21,96%
VI	11861206,1	13926496,1	↑ 17,41%
VII	16113213,1	18484669,1	↑ 14,72%
VIII	16148619,4	14063128,4	↓ 12,91%
Área total: 65110820,5		Área total: 70274048,8	↑ <b>7,9%</b>

Analisando as frações individualmente, somente a fração VIII diminuiu com o aumento de acetonitrila, tendo uma redução de 12,91% de sua área. Na fração VIII estão presentes principalmente as metaloproteases do tipo PIII. As demais áreas dos picos aumentaram no tratamento com 10% de ACN, totalizando um aumento de 7,9%. As maiores áreas no veneno de *B. insularis* foram as das frações II, VI, VII e VIII, correspondendo às potenciais áreas de separação de desintegrinas, BPPs, l-aminoácido oxidases e metaloproteases.

As proteínas do veneno de *B. atrox* coletado em Tucuruí também foram fracionadas por RP-HPLC (Figura 4) e as áreas de suas frações estão anotadas na tabela 7. Com base no cromatograma foi possível observar que o veneno de *B. atrox* apresenta maiores áreas de proteínas de alto peso molecular e menores áreas na região de baixo peso molecular. A fração II do cromatograma (~8%), região onde eluem principalmente as desintegrinas, foi menor com relação aos venenos de *B. jararaca* e *B. insularis* (13% e 18%, respectivamente) e a fração IV, onde se separou os BPPs, quase não apareceu (~0,37% das proteínas). Em geral, todas as frações no veneno de *B. atrox* aumentaram suas áreas no tratamento com 10% de ACN e um aumento também de sua área total de 70,83% com relação ao tratamento com 5%.



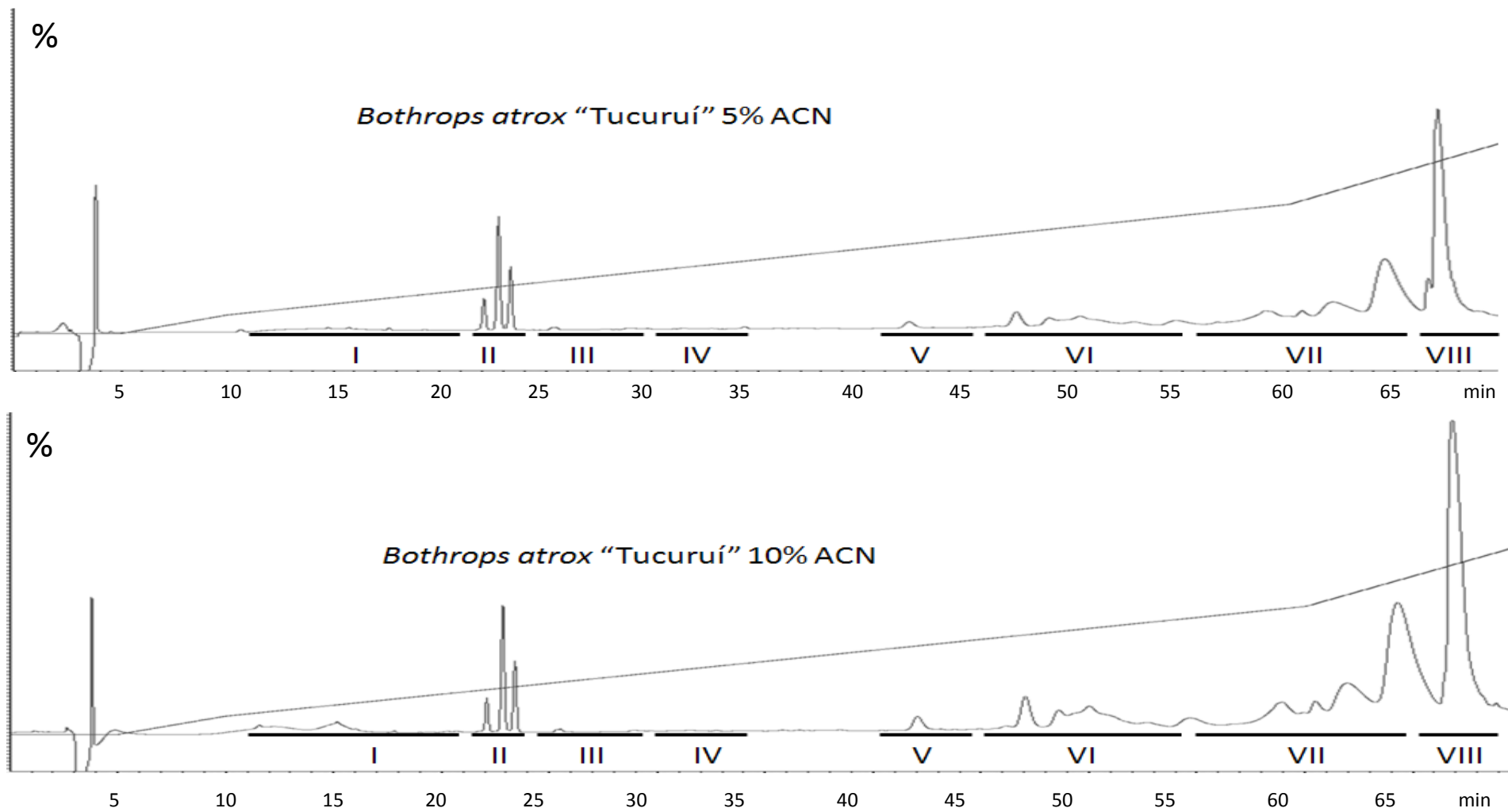


Figura 4 Análise cromatográfica das proteínas solubilizadas em 5 e 10% de acetonitrila da serpente *Bothrops atrox* através de RP-HPLC utilizando coluna analítica C18 e gradiente de acetonitrila.

Tabela 7 Área das frações obtidas por RP-HPLC (coluna C18) com amostras de venenos de *B. atrox* (Tucuruí) solubilizadas em 5 e 10% de acetonitrila.

<b><i>Bothrops atrox</i> "Tucuruí"</b>			
<b>Fração</b>	<b>5% ACN Área</b>	<b>10% ACN Área</b>	<b>Diferença</b>
I	2247047,2	7085982,6	↑215,34%
II	6408732,5	7358362,1	↑14,81%
III	319318,3	459405,7	↑43,87%
IV	263072,2	382296,3	↑45,31%
V	623486,1	1297156,2	↑108,04%
VI	6480639,5	13379000,6	↑106,44%
VII	23672450,3	42125066,2	↑77,94%
VIII	24444007,2	38030082,1	↑55,58%
Área total: 64458753,3		Área total: 110117351,8	↑ <b>70,83%</b>

### 5.3 Análises cromatográficas das proteínas solubilizadas em 5 e 10% de acetonitrila dos venenos das Serpentes *Bothrops jararaca*, *Bothrops insularis* e *Bothrops atrox* através de nano RP-HPLC utilizando nano coluna C18 analítica

As frações I, II, III e IV coletadas no RP-HPLC que se referem aos peptídeos de baixo peso molecular foram liofilizadas, solubilizadas em solução contendo 5 e 10% de acetonitrila e aplicadas no nanoRP-HPLC. Para melhor visualização dos cromatogramas, em cada pico foram aplicadas diferentes cores e as áreas dos picos de ambos os tratamentos foram calculadas através do software MassLynx.

Os cromatogramas dos peptídeos de baixo peso molecular das amostras de *B. jararaca* estão representados pela Figura 5. Foram registrados os 5 picos mais intensos no cromatograma de *B. jararaca*. Com base nos cromatogramas é possível observar que ocorreram algumas alterações pelo aumento de acetonitrila na amostra. Os valores das áreas dos cromatogramas referentes aos venenos de *B. jararaca* estão contidos na Tabela 8.

A única fração que não teve aumento em sua área em 10% de ACN foi a fração II. A fração V, de acordo com a literatura, representa potencialmente os BPPs, e essa fração teve um aumento em sua área de 150,1% em tratamento com 10% ACN (Calvete, 2011).

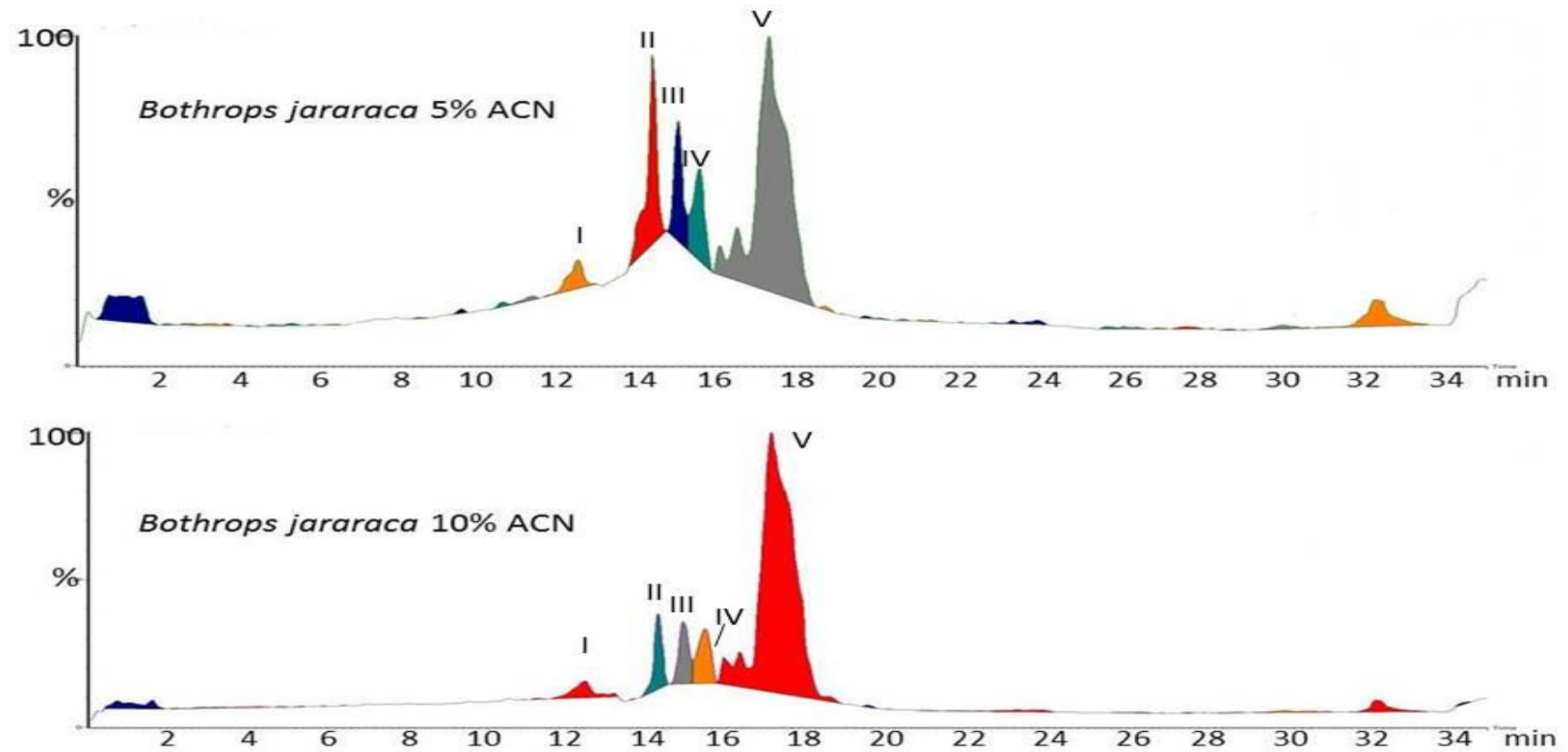


Figura 5. Cromatogramas obtidos a partir de nanoRP-HPLC dos venenos da serpente *B. jararaca* solubilizados em 5 e 10% de ACN utilizando nano coluna analítica C18.

Tabela 8 Área dos picos gerados por nanoHPLC (nano coluna C18). Proteínas solubilizadas em 5 e 10% de ACN do veneno de *Bothrops jararaca*.

<b>Bothrops jararaca</b>			
<b>Fração</b>	<b>Área (5% ACN)</b>	<b>Área (10% ACN)</b>	<b>Diferença (%)</b>
I	1298777	2666824	↑ 105,3
II	5927799	4400636	↓ 25,8
III	3264666	4444160	↑ 36,1
IV	3265404	5128328	↑ 57,0
V	24104394	60298196	↑ 150,1

A nano-cromatografia das proteínas de *B. insularis* também foi realizada (Figura 6) e os valores das áreas estão anotados na Tabela 9. Os cromatogramas referentes à espécie *Bothrops insularis* foram divididos em sete frações de interesse. As frações I e V tiveram uma diminuição em suas áreas na solubilização com 10% de acetonitrila, de 16,5% e 13,2%, respectivamente. A fração VII, correspondente aos BPPs, teve um aumento de 24,7%.

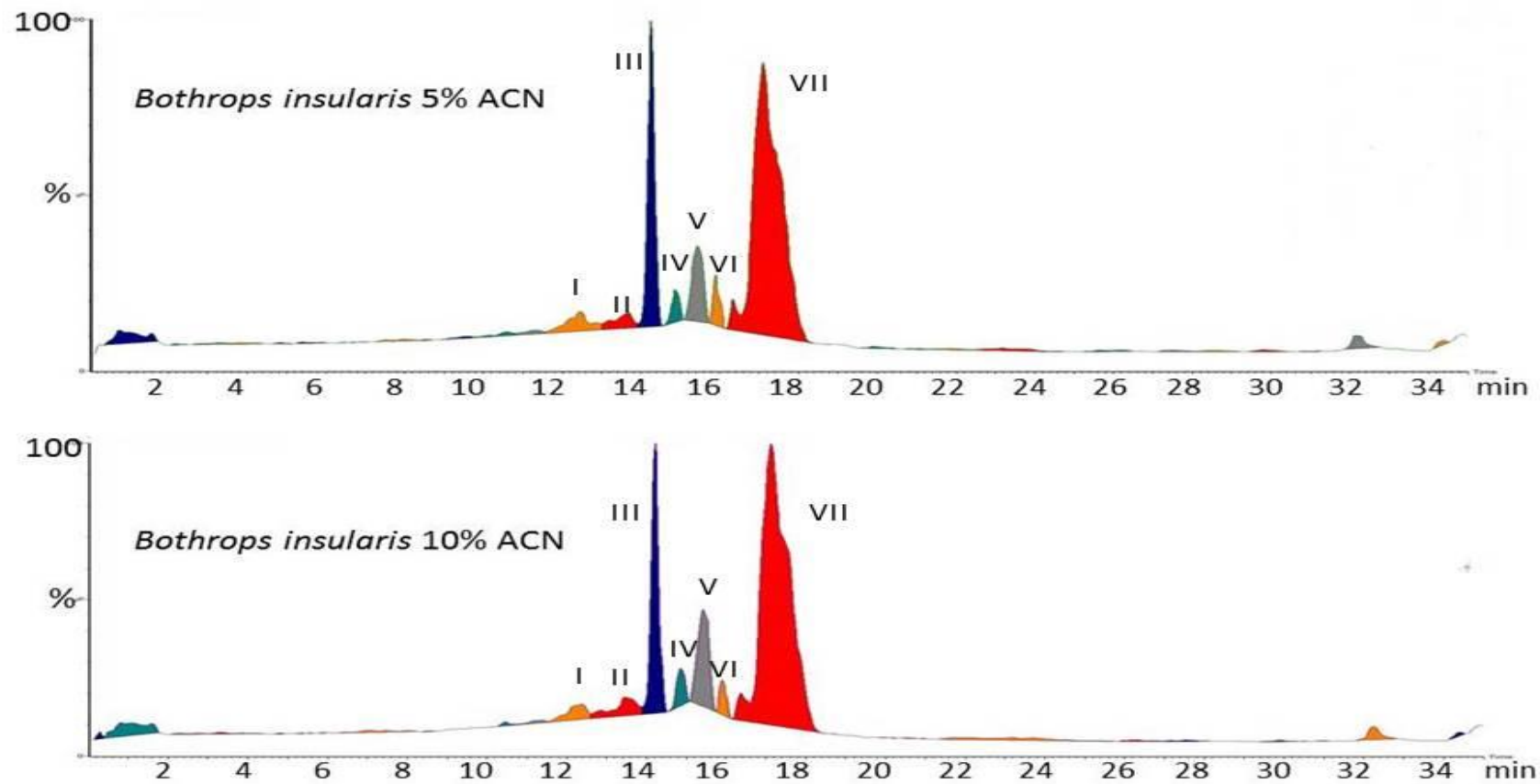


Figura 6 Cromatogramas obtidos a partir de nanoRP-HPLC dos venenos da serpente *B. insularis* solubilizados em 5 e 10% de ACN utilizando nano coluna analítica C18.

Tabela 9 Área dos picos gerados por nanoHPLC (nano coluna C18). Proteínas solubilizadas em 5 e 10% de ACN do veneno de *Bothrops insularis*.

<b>Bothrops insularis</b>			
Fração	Área (5% ACN)	Área (10% ACN)	Diferença (%)
I	2372029	1980048	↓ 16,5
II	1631492	2819846	↑ 72,8
III	11687495	13250184	↑ 13,4
IV	1416041	2089480	↑ 47,5
V	4696181	7447232	↑ 58,6
VI	1811922	1572480	↓ 13,2
VII	39144456	48802900	↑ 24,7

As proteínas do veneno de *B. atrox* tratadas com 5 e 10% de ACN também foram fracionadas por nano cromatografia (Figura 7) e as áreas dos picos dos diferentes tratamentos estão na Tabela 10.

O veneno de *B. atrox* mostrou um perfil diferente dos outros venenos, não apresentando pico com área elevada em aproximadamente 18 min, onde eluem majoritariamente os BPPs nos venenos botrópicos. As maiores áreas foram entre 14-16 min, sendo a maior área em aproximadamente 16 min.

Os cromatogramas de *Bothrops atrox* Tucuruí foram divididos em oito frações, sendo o aumento mais significativo em 10% de ACN, a fração III (267,8%).

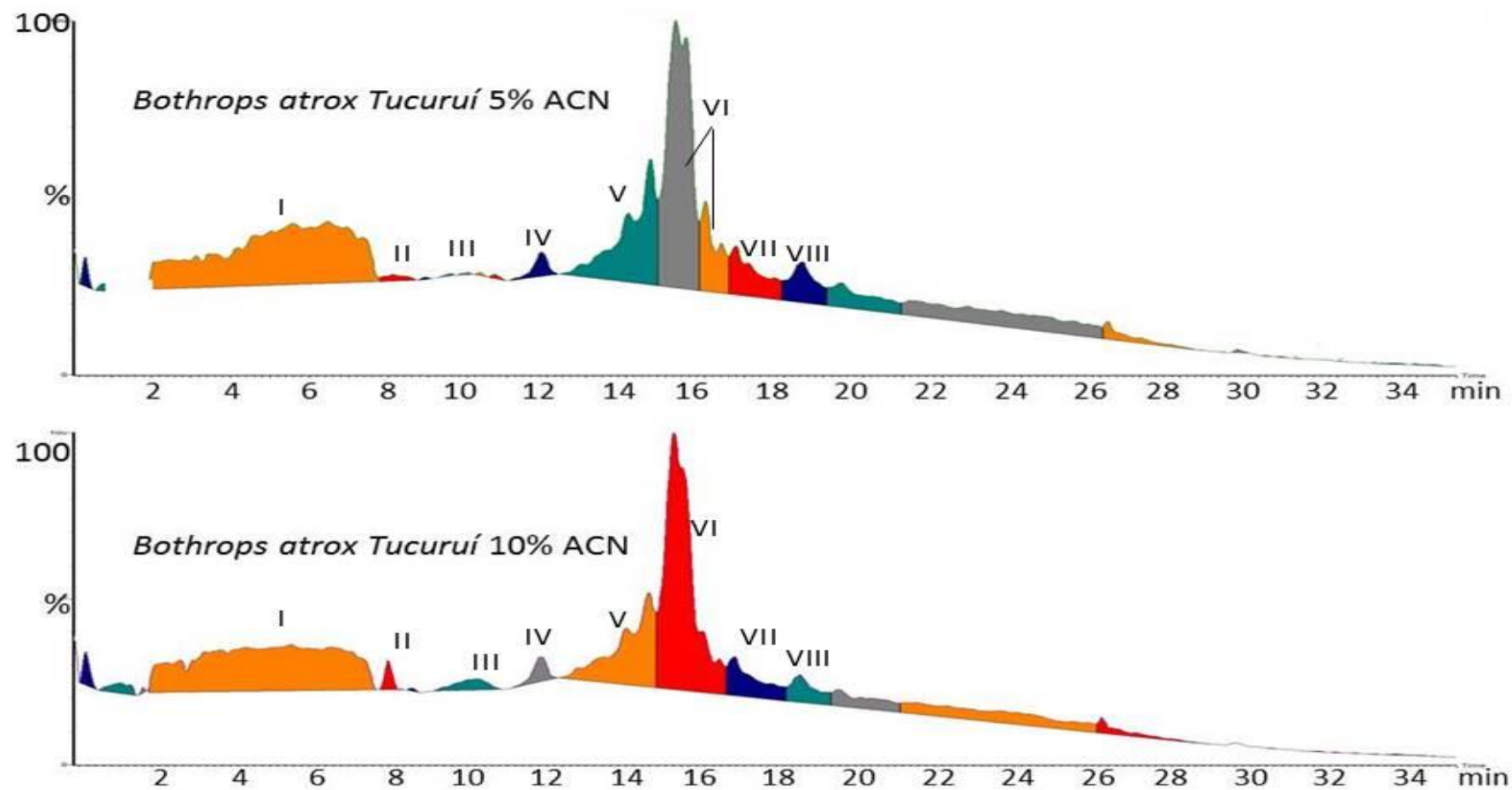


Figura 7 Cromatogramas obtidos a partir de nanoRP-HPLC dos venenos da serpente *B. atrox* solubilizados em 5 e 10% de ACN utilizando nano coluna analítica C18.

Tabela 10 Área dos picos gerados por nanoRP-HPLC (nano coluna C18). Proteínas solubilizadas em 5 e 10% de ACN do veneno de *Bothrops atrox*.

<b>Bothrops atrox Tucuruí</b>			
<b>Fração</b>	<b>Área (5% ACN)</b>	<b>Área (10% ACN)</b>	<b>Diferença (%)</b>
I	15353174	13767823	↓ 10,3
II	265690	418670	↑ 57,6
III	190887	702029	↑ 267,8
IV	639532	670297	↑ 4,8
V	6440685	5531523	↓ 14,1
VI	14814525	13640097	↓ 7,9
VII	2469109	2147812	↓ 13,0
VIII	1968128	1298540	↓ 34,0

#### 5.4 Análises por espectrometria de massas (Q-TOF) dos peptídeos solubilizados em 5 e 10% de ACN dos venenos de *B. jararaca*, *B. insularis* e *B. atrox*

Após serem eluídos da coluna cromatográfica, as proteínas foram ionizadas positivamente e transferidos para fase de gás no espectrômetro de massas. Os peptídeos, agora em forma de íons gasosos, passaram por um sistema de remoção dos nêutrons e foram analisados utilizando dois analisadores, um quadrupolo e um tempo de voo. As relações massa/carga dos íons foram detectadas em forma de sinais pelo detector. Os sinais gerados pelos íons foram deconvoluídos a partir da massa que cada aminoácido apresenta. A partir da deconvolução foram feitos sequenciamentos *de novo* e geradas sequências que foram confrontadas com as depositadas em bancos de dados para identificação de peptídeos presentes nas amostras.

Cada aminoácido possui um valor de confiança para a posição que ocupa na sequência peptídica; é o chamado TLC (“Total Local Confidence”) e a média desses valores de TLC, ou seja, a soma todos os valores de TLC divididos pelo número total de aminoácidos é o chamado ALC (“Average Local Confidence”). Foi aplicado um filtro, onde somente foram aceitas sequências com valor de ALC



acima de 45%, além de aceitar somente sequências com desvio de massa de  $\pm 0,1\text{Da}$ .

Para análise dos resultados foi utilizado o software PEAKS. O programa gera possíveis sequências de acordo com os íons detectados. Os íons possuem valor de massa e carga, o software calcula a massa monoisotópica e gera a sequência. Confrontando-se com banco de dados de interesse, o software compara as sequências obtidas com as depositadas no banco e identifica os peptídeos.

Para as proteínas tratadas com 5 e 10% de ACN dos venenos de *B. jararaca*, *B. insularis* e *B. atrox* foram feitos sequenciamentos *de novo*. A solubilização com 5% de ACN das amostras de *B. jararaca*, *B. insularis* e *B. atrox* (Anexos 2, 4 e 6) gerou respectivamente 16, 28 e 12 sequências peptídicas. A solubilização dos venenos com 10% de ACN (Anexos 3, 5 e 7) gerou 35, 27 e 23 sequências, respectivamente.

As frações de baixo peso molecular dos venenos botrópicos possuem uma grande quantidade de BPPs. Devido a isso, grande parte das sequências possui ácido piroglutâmico como modificação pós-traducional, tríades de Ile-Pro-Pro na região C-terminal. Essas sequências geradas foram confrontadas com bancos de dados para identificação dos peptídeos (Tabela 12).

Tabela 11 Sequências peptídicas identificadas das amostras de *B. jararaca*, *B. insularis* e *B. atrox*.

<b><i>Bothrops jararaca</i> 5% ACN</b>							
Peptídeo	m/z	z	Tempo	Massa	ppm	MPT	Acesso
p-QARPPHPPIPPAP	679.3776	2	23.17	1356.7302	7.7	Pyro-glu from Q	gij 476007198
p-QGRPPHPPIPPAP	672.3912	2	22.22	1342.7146	39.6	Pyro-glu from Q	gij 476007201
KTNRATRGAPP	1168.3899	1	26.4	1167.6472	-226.6		gij 387019891
KTNRATRGAPP	1168.3899	1	26.4	1167.6472	-226.6		gij 521752765
PHLGGPPPQPP	547.2965	2	15.12	1092.5715	6.3		gij 521758367
KSADPPP	711.2998	1	17.54	710.3599	-94.8		gi:387015560
<b><i>Bothrops jararaca</i> 10% ACN</b>							
Peptídeo	m/z	z	Tempo	Massa	ppm	MPT	Acesso
p-QNWPHPQIPP	598.7890	2	16.82	1195.5774	-11.7	Pyro-glu from Q	gij 82202072
p-QWGRPPGPIPP	641.3401	2	17.74	1280.6665	-0.7	Pyro-glu from Q	gij 82202072
p-QNWRPQIPP	608.3099	2	17.85	1214.6196	-11.8	Pyro-glu from Q	gij 461641
p-QWPRPQIPP	551.2958	2	17.71	1100.5767	0.4	Pyro-glu from Q	gij 150438850
p-QGGLPRPGPEIPP	649.3448	2	16.61	1296.6826	-5.9	Pyro-glu from Q	gij 150438851
p-QGRPPHPPIPP	588.3196	2	20.86	1174.6246	0	Pyro-glu from Q	gij 476007201
p-QLGPPPRPQIPP	640.3952	2	27.37	1278.7084	52.8	Pyro-glu from Q	gij 20069129
IPKPLNPALWF	648.3639	2	25.77	1294.7438	-23.6		gij 387014782
PPSTPP	595.3274	1	20.91	594.3013	31.7		gij 387017474
<b><i>Bothrops insularis</i> 5% ACN</b>							
Peptídeo	m/z	z	Tempo	Massa	ppm	MPT	Acesso
p-QGGWPRPGPEIP	637.3233	2	17.52	1272.6251	5.4	Pyro-glu from Q	gij 20069131
p-QNWPHPQIP	550.3400	2	17.62	1098.5247	128.2	Pyro-glu from Q	gij 20069131
p-QQGRAPHPPPIPPAP	659.3571	2	22.05	1316.6989	0.5	Pyro-glu from Q	gij 189047126
p-QQLGPPPRPQIPP	640.4033	2	26.94	1278.7084	65.4	Pyro-glu from Q	gij 189047126
p-QQGGWPRPGPEIPP	685.8785	2	27.82	1369.6779	47.2	Pyro-glu from Q	gij 189047126
p-QARPPHPPIPPAP	679.4377	2	23.08	1356.7302	96.3	Pyro-glu from Q	gij 82095681
LTAARDVNRASENPSG	829.426	2	11.16	1656.8179	11.8		gij 704043537
LTAPVDRIY	524.294	2	22.48	1046.576	-2.5		gij 704043537
PPPPAP	575.3283	1	18.65	574.3115	16.7		gij 521760708
<b><i>Bothrops insularis</i> 10% ACN</b>							
Peptídeo	m/z	z	Tempo	Massa	ppm	MPT	Acesso
p-QGRAPHPPPIPPAP	659.3571	2	22.48	1316.6989	0.5	Pyro-glu from Q	gij 189047126
p-QLGPPPRPQIPP	640.3989	2	27.71	1278.7084	58.5	Pyro-glu from Q	gij 20069129
p-QGGWPRPGPEIPP	685.883	2	28.1	1369.6779	53.7	Pyro-glu from Q	gij 20069129
p-QGRHPPIPPAP	575.3283	2	18.97	1148.609	28.8	Pyro-glu from Q	gij 476007199
REVNKDPGVLEYPVKP	920.4849	2	14.95	1838.9890	-18.4		gij 602183275
ESAIPPP	710.2992	1	17.13	709.3646	-102.5		gij 387015692
<b><i>Bothrops atrox</i> "Tucuruí" 5%ACN</b>							
Peptídeo	m/z	z	Tempo	Massa	ppm	MPT	Acesso
KKPAPR	348.6869	2	14.27	695.4442	-122.1		gij 387017444
<b><i>Bothrops atrox</i> "Tucuruí" 10%ACN</b>							
Peptídeo	m/z	z	Tempo	Massa	ppm	MPT	Acesso
p-QQWRDPAPIP	644.3734	2	25.31	1286.6407	71	Pyro-glu from Q	gij 308191397

\*Sendo (p-Q)= presença de Ácido piroglutâmico. Em negrito= BPPs. MPT (Modificação pós traducional). Ppm= erro.

As sequências foram confrontadas com sequências que estão anotadas em bancos de dados. Foram utilizadas sequências dos bancos de dados depositadas no NCBI, encontradas através da busca pela palavra-chave “*Viperidae*”. Não houve diferenças entre os tratamentos com acetonitrila na identificação dos peptídeos. Para *Bothrops jararaca* foram identificados 6 peptídeos em 5% e 9 em 10% de ACN. Para *B. insularis*, em 5% de ACN identificaram 9 peptídeos e 6 em 10%. E em *B. atrox* foram identificados somente 2 peptídeos, um em cada tratamento.

### **5.5 Proteínas identificadas nas amostras de *Bothrops jararaca* e *Bothrops insularis***

As proteínas que tiveram mais de 10% de cobertura de sequência pelos peptídeos identificados foram anotadas na Tabela 13. Os genes que codificam os precursores de BPPs nos venenos de serpentes também contêm a sequência dos peptídeos natriuréticos do tipo C (CNP) (Murayama *et al.*, 2000). Foram identificados BPPs presentes na sequência dos CNPs de *B. jararaca* (Figura 8), de *B. insularis* (Figura 9) e também BPPs descritos no gene de *Bothrops jararacussu* (Figura 10).

Na sequência que dá origem aos precursores de BPPs e CNPs de *B. insularis* foram identificadas as sequências <QGGWPRPGPEIPP> e <QGRAPHPPIPPAP> a partir das amostras de *B. insularis* em ambos os tratamentos com ACN. A sequência <PRPGPEIPP> encontrada no veneno de *B. jararaca* (10% ACN), se tratando de parte de um BPP de 13 aminoácidos. E no gene CNP-BPP de *Bothrops insularis* também foi encontrada a sequência precursora <QLGPPRPQIPP> em *B. insularis* (10% ACN). As sequências identificadas representam 24% de cobertura da sequência completa dos BPPs-CNPs de *B. insularis*.

No gene de CNP-BPP de *B. jararaca* foram encontradas as sequências <QGGWPRPGPEIPP>, <QGGWPRPGPEIP> e <QWGRPPGPPIPP>, identificadas nas amostras de *B. insularis* (5% ACN), *B. insularis* (10% ACN) e *B. jararaca* (10% ACN), respectivamente. Na sequência de de CNPs de *Bothrops*

*jararacussu* foram encontradas as sequências <QGGWPRPGPEIPP> e <QARPPHPPIPPPAP>, isoladas de *B. insularis* (5% ACN).

Foram encontrados nos venenos estudados, BPPs já descritos para *B. fonsecai* (BPP-AP), *B. neuwiedii* (BPP-9a), *B. jararaca* (BPP-10b, BPP-11h, BPP-12c, BPP-13b e BPP-13c) e *B. atrox* (BPP-12a).

As sequências que dão origem aos precursores de BPPs e CNPs de *B. jararaca*, *B. insularis* e *B. jararacussu* estão representados pelas Figuras 8, 9 e 10, respectivamente, com as sequências dos precursores de BPPs sublinhadas. As sequências contornadas foram observadas nos venenos estudados.

Porém, o banco de dados de proteínas de venenos de serpentes possui poucas informações, principalmente com relação aos peptídeos de baixo peso molecular. Para *Bothrops atrox*, existe somente um BPP anotado, o BPP-12a. Por isso, foi realizada uma análise das sequências obtidas no sequenciamento *de novo* para descoberta de candidatos a BPPs.

Na amostra de *B. atrox* foi encontrado um íon com  $m/z$  644.3734 [M + 2H]<sup>2+</sup>. Esse íon foi submetido à MS/MS e resultou em um espectro de massas (Figura 11), seus íons b<sup>+</sup> e y<sup>+</sup> foram submetidos a análise de sua sequência peptídica por sequenciamento *de novo*. A análise mostrou uma sequência com 11 resíduos de aminoácidos (<qKWPRSVPP(L/I)P>), contendo um ácido piroglutâmico na região N-terminal e uma tríade de Ile-Pro na Carboxi-terminal. O peptídeo possui uma massa monoisotópica muito próxima da massa teórica, levando a uma acurácia de 14,6 ppm. O peptídeo foi eluído em 25.31 min.

Tabela 12 Peptídeos Potenciadores de Bradicinina (BPPs) identificados nos bancos de dados UniprotKB/NCBI.

Proteínas identificadas					
Descrição	Organismo	Sequência	Amostra	Cobertura (%)	Acesso
BPP e CNP	<i>Bothrops insularis</i>	QGGWPRPGPEIPP PRPGPEIPP QLGPPPRQIPP QGRAPHPPIPPAP	<i>B. insularis</i> 5%, <i>B. insularis</i> 10% <i>B. jararaca</i> 10% <i>B. insularis</i> 10% <i>B. insularis</i> 5%, <i>B. insularis</i> 10%	24	Q8QG90_BOTIN
BPP e CNP	<i>Bothrops jararaca</i>	QGGWPRPGPEIPP QGGWPRPGPEIP QWGRPPGPPIPP	<i>B. insularis</i> 5% <i>B. insularis</i> 10% <i>B. jararaca</i> 10%	13	BNP2_BOTJA
BPP e CNP	<i>Bothrops jararacussu</i>	QGGWPRPGPEIPP QARPPHPIPPAP	<i>B. insularis</i> 5% <i>B. insularis</i> 5%	18	BNP_BOTJR
BPP AP	<i>Bothrops fonsecai</i>	QARPPHPIPPAP	<i>B. jararaca</i> 5%	100	BBPAP_BOTFO
BPP 9a	<i>Bothrops neuwiedi</i>	QWPRPQIPP	<i>B. jararaca</i> 10%	100	BPP9A_BOTNU
BPP 10b	<i>Bothrops jararaca</i>	QNWPRPQIPP	<i>B. jararaca</i> 10%	100	BPPAB_BOTJA
BPP 11H	<i>Bothrops jararaca</i>	QGRHPIPPAP	<i>B. jararaca</i> 10%	100	BPPBH_BOTJA
BPP 12a	<i>Bothrops atrox</i>	QQWPRDPAPIP	<i>B. atrox</i> 10%	92	BPP12_BOTAT
BPP 12c	<i>Bothrops jararaca</i>	QQWPRPQIPP	<i>B. jararaca</i> 10%	75	BPPCC_BOTJA
BPP 13b	<i>Bothrops jararaca</i>	QGGLPRPGPEIP	<i>B. jararaca</i> 10%	100	BPPDB_BOTJA
BPP 13c	<i>Bothrops jararaca</i>	QRRPPHPIPPAP QRRPPHPIPP*	<i>B. jararaca</i> 5% <i>B. jararaca</i> 10%	100 85	BPPDC_BOTJA

\*Peptídeo fragmentado

```

      10          20          30          40          50
MVL SRLAASG LLL LALLALS VDGKPVQQWA QGGWPRPGPE IPP LKVQQWA
      60          70          80          90          100
QGGWPRPGPE IPPLTVQQWA QNWPHQIPP LTVQQWA QWG RPPGPIIPL
      110         120         130         140         150
TVQQWAQARP PPHPIPPAPL QKWAPVQKWA PLLQP HESPA SGT TALREEL
      160         170         180         190         200
SLGPEAASGV PSAGAEVGRS GSKAPAAPHR LSKSKGAAAT SAASRPMRDL
      210         220         230         240         250
RPDGKQARQN WGRMVHHDH AAVGGGGGGG GGGARRLKGL AKKGAAK GCF
      260
GLKVDRIGTM SGLGC

```

Figura 8 Sequência completa de BPPs e CNP da serpente *Bothrops jararaca*. Sequências sublinhadas representam os BPPs já descritos. Sequências em negrito e contornadas são os BPPs identificados neste trabalho.

```

      10          20          30          40          50
MVL SRLAASG LLL LALLALS VDGKPVQQWA QGGWPRPGPE IPP LKVQQWA
      60          70          80          90          100
QGGWPRPGPE IPPLTVQQWA QNWPHQIPP LTVQQWA QLG PPRPQIIPPL
      110         120         130         140         150
EVQQWA QGRA PPHPIPP AP L QKWAPVQKWA PLLQP HESPA SGT TALREEL
      160         170         180         190         200
SLGPEAASGV PSAGAEVGRS GSKAPAAPHR LSKSKGAAAT SAASRPMRDL
      210         220         230         240         250
RPDGKQARQN WGRMVHHDH AAVGGGGGGG GGGARRLKGL AKKGAAK GCF
      260
GLKLD RIGTM SGLGC

```

Figura 9 Sequência completa de BPPs e CNP da serpente *Bothrops insularis*. Sequências sublinhadas representam os BPPs já descritos. Sequências em negrito e contornadas são os BPPs identificados neste trabalho.

```

      10          20          30          40          50
MVL SRLAASG LLL LALLALS VDGKPVQQWA QSWPGPNIPQ LLVQQWA QGG
      60          70          80          90          100
WPRPGPEIPP LTVQQWA QNW PPHQIIPPLTV QQWA QGRPPG PPIIPLTVQQ
      110         120         130         140
WA QARPPHP IPPAP LQKWA PVQKWAPVQK WAPVQKWAPL LQPT

```

Figura 10 Sequência completa de BPPs e CNP da serpente *Bothrops jararacussu*. Sequências sublinhadas representam os BPPs já descritos. Sequências em negrito e contornadas são os BPPs identificados neste trabalho.

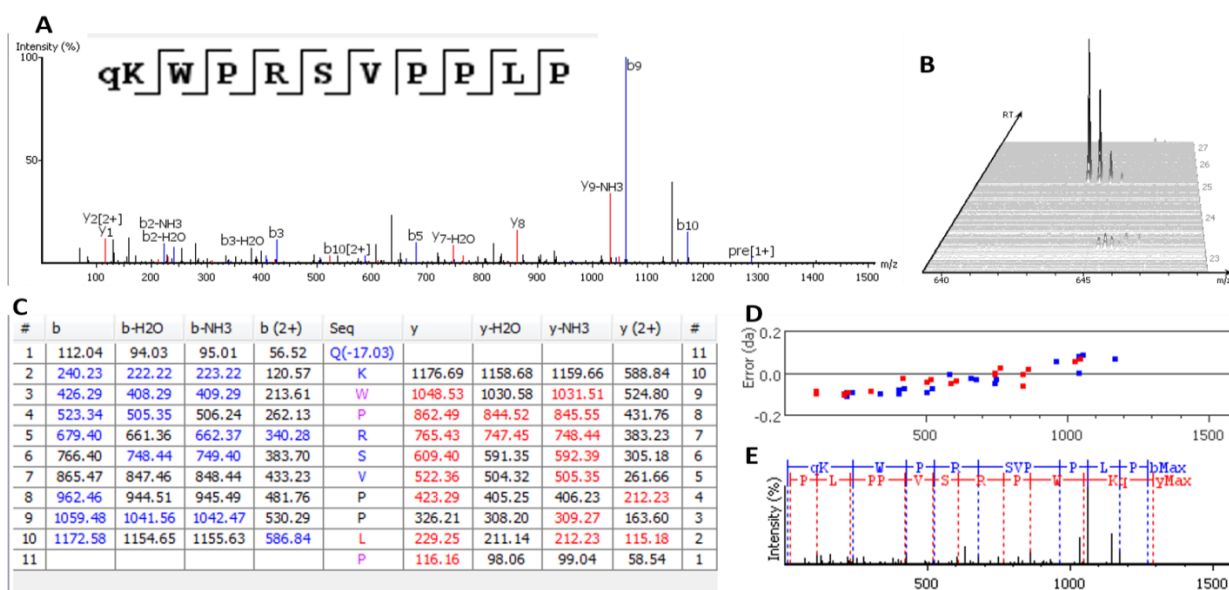


Figura 11 Sequência candidata a novo BPP identificada no veneno de *B. atrox* tratado com 5% ACN. a) Sequência gerada por MS/MS. b) Gráfico RTxM/z do peptídeo. c) Análise dos íons imônios b e y. d) Desvio de erro de massa dos fragmentos. e) Sequenciamento de novo.

Nos venenos tratados com 5 e com 10% de acetonitrila da serpente *B. insularis*, foi encontrada a sequência <p-QGRAPHPPIPPAP> que está inserida na sequência que dá origem aos precursores de BPPs e CNP de *B. insularis*. Porém, este BPP ainda não foi descrito pela literatura, e não possui anotação em bancos de dados.

O íon referente ao BPP analisado possui uma m/z 659.3571 [M + 2H]<sup>2+</sup>. Esse íon foi submetido à MS/MS e resultou em um espectro de massas (Figura 12), seus íons b<sup>+</sup> e y<sup>+</sup> foram submetidos a análise de sua sequência peptídica por sequenciamento *de novo*. A sequência contendo um ácido piroglutâmico na região N-terminal. O peptídeo possui uma massa monoisotópica muito próxima da massa teórica, levando a uma acurácia de 0,5 ppm.

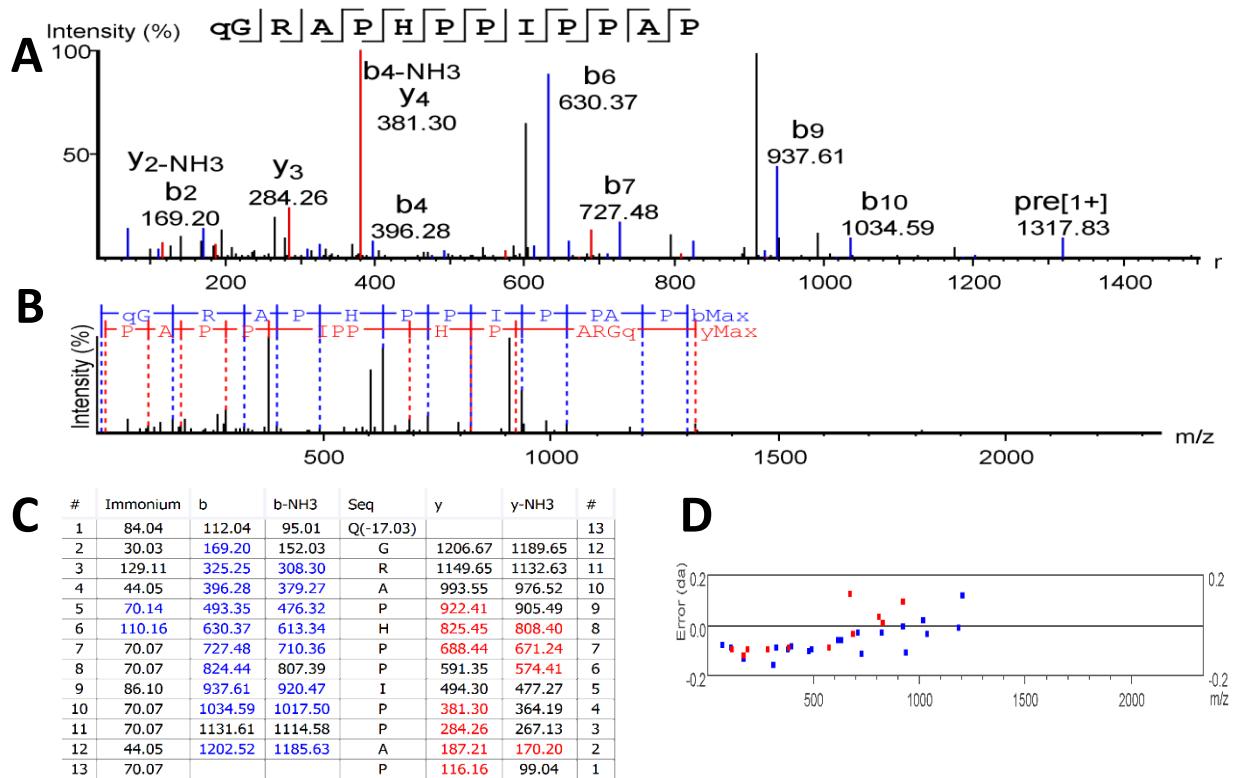


Figura 12 Sequência identificada no veneno de *B. insularis*. a) Sequência gerada por MS/MS. b) Sequenciamento de novo. c) Análise dos íons imônios b e y. d) Desvio de erro de massa dos fragmentos.



## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 As serpentes

Durante seu processo evolutivo, algumas serpentes desenvolveram mecanismos para defesa contra predadores e para captura de suas presas. Tal mecanismo consiste em um complexo altamente especializado de glândulas secretoras para produção e armazenamento de substâncias biologicamente ativas inoculadas na vítima através de um sistema de presas sulcadas que se projetam pra frente no momento do ataque (Thomas e Pough, 1979; Russel, 1980).

Essas substâncias biologicamente ativas, os venenos ofídicos, são misturas complexas com mais de 20 diferentes componentes orgânicos e inorgânicos, constituído de componentes proteicos, que podem apresentar atividade tóxica e ou enzimática, carboidratos, lipídios, aminas biogênicas, nucleotídeos, aminoácidos e peptídeos (Bjarnason e Fox, 1988).

Os venenos de serpentes apresentam grande variabilidade em sua composição e diversos fatores contribuem para que tais variações ocorram. Na literatura já foram descritas variações na composição dos venenos de *B. jararaca* devido à diferença de idade e sexo das serpentes (Zelanis *et al.*, 2012). A dieta apresenta um importante papel na composição dos venenos. Serpentes cuja alimentação é diversificada necessitam de uma multiplicidade de diferentes toxinas para burlar os diferentes sistemas de defesa das presas, atingindo seus alvos (Fry *et al.*, 2003).

A serpente *B. jararaca* tem distribuição ampla no Brasil, habitando do estado da Bahia ao Rio Grande do Sul, ocupando florestas tropicais, florestas decíduas, savanas e florestas semitropicais de altitude (Campbell e Lamar, 1989). Seu veneno encontra-se extensamente estudado e caracterizado por se tratar de uma espécie das mais frequentes em nosso meio. As serpentes *B. jararaca* e *B. insularis* são serpentes bem próximas, e mesmo sendo similares, o veneno da *B. insularis* possui particularidades, como uma atividade neurotóxica que não é característico do gênero *Bothrops*. O veneno dessa serpente apresentou uma

fração incomum no cromatograma (Fração VI, Figura 3) em relação a *B. jararaca*. Estudos realizados por Cogo e co-autores (2006) identificaram atividade de PLA<sub>2</sub> nessa mesma região do cromatograma (Fração VI, Figura 3). A PLA<sub>2</sub> é responsável por uma atividade neurotóxica intensa que facilita a obtenção de suas presas, já que estas serpentes possuem o hábito de se alimentarem de aves migratórias (Cogo *et al.*, 1993).

As serpentes da espécie *Bothrops atrox* são as maiores causadoras de acidentes na região norte do Brasil, sendo conhecida como *Jararaca-do-Norte*. Estudos realizados por Calvete (2011) mostraram a grande variação intraespecífica na composição destes venenos, sendo relatados casos de diferentes manifestações clínicas com acidentes por serpentes da mesma espécie. O envenenamento por *B. atrox* está relacionado principalmente com quadros de hemorragias e coagulopatias, devido principalmente aos elevados níveis de metaloproteases e fosfolipases A<sub>2</sub>, como mostram os dados obtidos no presente trabalho, tanto pelo padrão de migração do gel de SDS-PAGE, como pelo perfil dos cromatogramas, indicando maiores áreas nas regiões em que se apresentam essas proteínas (Frações VII e VIII, Figura 4). Esses dados são corroborados por Calvete (2011) que mostra a predominância de metaloproteases do tipo PIII no veneno de *B. atrox*, seguida por metaloproteases do tipo PI e fosfolipases A<sub>2</sub>.

## 6.2 Caracterização dos venenos por SDS-PAGE

Baseando-se em estudos clássicos, a técnica de eletroforese permite uma grande resolução dos padrões de proteínas dos venenos, permitindo a separação e identificação de seus componentes (Moura-Da-Silva, 1992; Mendoza *et al.*, 1992). A análise dos perfis de migração eletroforética das amostras do veneno das espécies *B. jararaca* e *B. insularis* resultou em perfis em geral semelhantes, porém com algumas pequenas variações no número, disposição e intensidade das bandas. No gel de SDS-PAGE não observaram diferenças na intensidade das bandas, quando comparando os diferentes tratamentos com diferentes concentrações de acetonitrila. Os venenos de serpentes do gênero *Bothrops* apresentam grande quantidade de proteases, apresentando majoritariamente

metaloproteases em ~50 kDa. Campos e colaboradores observaram uma grande atividade proteolítica do veneno de *B. jararaca* sobre a caseína em bandas de 25 a 28 kDa, 24 kDa e uma atividade menos intensa em 20 kDa (Campos *et al.*, 2013). Nessa região de peso molecular estão contidas as fosfolipases A<sub>2</sub> e no veneno de *Bothrops insularis* apresentaram bandas exclusivas, conferindo maior ação neurotóxica dessas espécies.

O veneno de *B. atrox* possui ação principalmente no sistema hemostático, desencadeada principalmente por ação de metaloproteases. As proteínas dos venenos de *B. atrox* apresentaram bandas acima de 55 kDa mais intensas no gel com relação aos demais venenos (Figura 1), região onde se encontram principalmente metaloproteases. Nos géis de *B. atrox*, uma banda de aproximadamente 24 kDa, ocupou mais de 30% do gel com relação às demais, se tratando provavelmente de fosfolipases A<sub>2</sub>, outra proteína muito abundante no veneno dessa espécie (Cintra *et al.*, 2012).

### 6.3 Fracionamento das proteínas por RP-HPLC

Em geral, para fracionamento das proteínas dos venenos utiliza-se a cromatografia líquida de alta performance de fase reversa (RP-HPLC), com uma coluna C18 e concentrações crescentes de solvente orgânico para eluição dos componentes proteicos da coluna. O RP-HPLC possui a capacidade de resolver componentes presentes nos venenos em um intervalo de 7-150 kDa. O gradiente inicial de solvente orgânico (acetonitrila) do método de cromatografia elui os peptídeos de baixo peso molecular (Calvete, 2013). Aplicando-se a mesma quantidade de material na coluna observou-se uma área total dos picos maior nos tratamentos com maior concentração de acetonitrila em todos os venenos (Figuras 2 a 4).

Porém, analisando as frações individuais, nem todas apresentaram um aumento na área com o aumento na concentração da acetonitrila, o que indica que o volume de injeção foi equivalente entre os tratamentos. Alguns picos praticamente não tiveram alteração em sua área. Em algumas frações observou-se uma melhor resolução dos picos, surgindo inclusive picos exclusivos em

tratamento com 10% de ACN, provavelmente uma maior concentração de acetonitrila na solubilização dos peptídeos aumenta a capacidade de recuperação desses peptídeos, fazendo com que os picos no RP-HPLC tenham melhor resolução.

O veneno da serpente *B. insularis* apresentou um pico intenso na fração VI do cromatograma (Figura 3). Esse pico pode estar relacionado com a presença de fosfolipases  $A_2$ , que aparecem em grandes proporções nos venenos dessas serpentes. Esses resultados são corroborados por estudos realizados por Cogo e colaboradores (2006), que observaram atividades fosfolipásicas nessa mesma região do cromatograma.

Os cromatogramas das proteínas do veneno da serpente *B. atrox* (Figura 4) mostram picos mais intensos de metaloproteases do tipo PIII e PI (Figura 4; fração VII e fração VIII) com relação aos demais venenos, ocupando uma área de mais de 70% com relação às demais. Estudos por RP-HPLC realizados por Kohlhoff e co-autores (2012) mostram que os venenos de serpentes desse gênero possuem 54% de SVMP PIII, 21% de SVMP PI e 16% de  $PLA_2$ , corroborando com o presente estudo.

Outra característica dos venenos de *B. atrox* estudados é a falta de picos relevantes na região dos BPPs. Nos venenos de *B. jararaca* e *B. insularis* os BPPs apresentaram picos relevantes em comparação com o todo, e em *B. atrox* a fração IV do cromatogramas (Figura 4) não chegaram nem a 1% do total. Análises cromatográficas dos venenos dessas espécies também foram realizados por Calvete et al (2009), onde é possível observar que a região dos BPPs também se apresentou irrelevante comparada com a mesma região do veneno de *B. jararaca*.

#### **6.4 Análise venômica por LC-MS/MS**

A técnica de espectrometria de massas tornou-se uma poderosa ferramenta para análise e identificação de proteínas, complementando técnicas de bioquímica e biologia molecular. A evolução na instrumentação do equipamento, desenvolvimento de softwares para interpretação dos dados e a combinação de

técnicas e protocolos prévios de separação e preparo dos peptídeos permitem estudos em larga escala, incluindo a identificação de um grande número de proteínas expressas e suas modificações pós-traducionais. Estudos mostram que um lisado celular pode potencialmente produzir mais de 100.000 peptídeos. Vários estudos têm sido realizados para aperfeiçoar a análise de proteínas. Speers e co-autores (2007), em um experimento de “shotgun” de proteínas de membrana concluíram que a cromatografia líquida realizada em altas temperaturas permite a identificação de um maior número de peptídeos. Depleção de proteínas muito abundantes em uma amostra com um grande intervalo dinâmico é uma estratégia para aumentar o poder de detecção de proteínas menos abundantes na célula (Fonslow *et al.*, 2013). Keppel e co-autores compararam os solventes orgânicos acetona e acetonitrila na eluição de peptídeos na cromatografia líquida, concluindo a maior eficácia da acetonitrila. Peterson e colaboradores (2009) mostraram que diminuindo a concentração de acetonitrila durante o carregamento da amostra em um tipo específico de resina, no nanoRP-HPLC de 5% para 2% conseguiram aumentar a detecção de proteínas pelo MS. Lee *et al* (2004) mostraram a importância de otimizar o gradiente do solvente orgânico na identificação de peptídeos na amostra, ajustando o gradiente, conseguiu ter uma melhor resolução de seus cromatogramas e aumentar o número de peptídeos identificados. Peptídeos de baixo peso molecular presentes em venenos de serpentes apresentam grande importância médica e farmacológica, e sua recuperação da amostra é muitas vezes negligenciada, como mostra o banco de dados UniprotKB (<http://www.uniprot.org>) que apresenta apenas um BPP anotado para a serpente *Bothrops atrox*.

As frações de baixo peso molecular foram analisadas por LC-MS/MS e os cromatogramas gerados por nanoRP-HPLC corroboram com os resultados anteriores, mostrando uma diminuição nos picos referentes aos BPPs nos venenos de *B. atrox*. Nuñez e colaboradores (2009) realizaram uma análise proteômica do veneno de *B. atrox* da região amazônica, através de um MALDI/TOF e encontrarem menos de 0,1% de BPPs na composição dos venenos dessas espécies. E em estudos realizados com venenos de *B. atrox* coletados na região de Alto Marañón (Peru) por Kohlhoff e colaboradores (2012), utilizando

MALDI-TOF/TOF não foram identificados BPPs nas amostras.

A diferença na concentração de acetonitrila não alterou na identificação de peptídeos dos venenos estudados. Analisando os peptídeos de baixo peso molecular, em ambos os tratamentos do veneno de *B. jararaca* com 5 e 10% de acetonitrila foram identificadas 12 sequências peptídicas, sendo a maioria das sequências identificadas como BPPs ou parte de BPPs (Tabela 12). Em *B. insularis*, o tratamento com 5% de acetonitrila identificou uma sequência a mais com relação a 10%, sendo novamente a maioria referente a BPPs. Para *B. insularis*, foi identificado somente um BPP na amostra tratada com 10% de acetonitrila, provavelmente pela menor quantidade de BPPs nesse veneno e também pela falta de informações nos bancos de dados para peptídeos de baixo peso molecular dessa espécie.

### 6.5 Identificação de novos componentes de baixo peso molecular

Uma grande dificuldade no estudo proteômico de venenos de serpentes é a falta de informações dos componentes dos venenos em banco de dados, sendo necessária a realização de sequenciamento *de novo* dos íons gerados por MS/MS. Venenos de serpentes são fontes ricas em peptídeos bioativos de importância biotecnológica. Porém os estudos dessas moléculas muitas vezes são negligenciados pela dificuldade de acesso a esses componentes.

Diversos BPPs já foram descritos pela literatura (Tabela 1), e possuem uma estrutura bem definida que os caracterizam. Na grande maioria dos casos possuem na sua porção N-terminal um ácido-pirolutâmico e na porção C-terminal uma tríade formada pelos aminoácidos ILE-PRO-PRO.

Analisando as sequências peptídicas geradas pelo sequenciamento *de novo*, foram identificadas duas sequências que podem ser novos BPPs ainda não descritos. Na amostra de *Bothrops jararaca*, tratada com 10% de ACN foi encontrado um íon com  $m/z$  608.3099  $[M+2H]^{2+}$ . Esse íon foi submetido à MS/MS resultou em um espectro de massas (Figura 11) e seus íons  $b^+$  e  $y^+$  foram submetidos a análise de sua sequência peptídica por sequenciamento *de novo*. A análise mostrou uma sequência com 11 resíduos de aminoácidos

(<qKWPRSVPP(L/I)P>), encontrada na amostra de *B. atrox* tratada com 10% de ACN. A sequência possui  $m/z$  644.3734  $[M+2H]^{2+}$ , com um ácido piroglutâmico na região N-terminal e é rico em prolinas.

Acredita-se que novos componentes importantes para a bioprospecção encontram-se inexplorados nos venenos de serpentes atualmente em estudo, como a sequência <p-QGRAPHPPIPPAP>, encontrada no veneno de *B. insularis*. O mecanismo de clivagem dos precursores de BPPs ainda não está completamente elucidado, outros BPPs já foram descritos apresentando os aminoácidos AP na região C-terminal, como o BPP-AP <EARPPHPPIPPAP> encontrado no veneno de *B. jararacussu* por Rioli e co-autores (2008).

## 7 CONCLUSÕES

- As proteínas dos venenos de *B. atrox* apresentaram bandas mais intensas entre 55 e 130 kDa e em ~24 kDa em comparação aos demais venenos;
- O aumento na concentração de acetonitrila de 5 para 10% na solução de solubilização de venenos liofilizados das serpentes *B. jararaca*, *B. insularis* e *B. atrox* ocasionou um aumento do total das áreas dos picos em cromatogramas por RP-HPLC;
- A fração do cromatograma referente a eluição dos BPPs na espécie *B. atrox* foi praticamente nula;
- A maioria dos peptídeos de baixo peso molecular identificados nas serpentes estudadas são os BPPs;
- A sequência <qKWPRSVPP(L/I)P>, isolada de *B. atrox* corresponde a um possível novo BPP;
- A sequência <p-QGRAPHPPIPPAP>, identificada no veneno de *B. insularis*, faz parte da sequência gênica que dá origem aos precursores de BPPs dessa serpente;
- A solubilização dos venenos com 10% de acetonitrila nos permitiu caracterizar novos peptídeos nas frações de baixo peso molecular nas espécies *B. jararaca* e *B. atrox*.



## 8 PERSPECTIVAS

Futuramente pretendemos coletar dados de venenos de outras espécies de serpentes para aumentarmos a diversidade de padrões proteicos das serpentes do gênero *Bothrops*. Pretendemos analisar as proteínas de baixo peso molecular do pool de amostras da serpente *B. atrox*, para que possamos fazer uma comparação do perfil proteico entre as amostras coletadas em Tucuruí.

Pretende-se realizar uma análise de “shotgun proteomics” utilizando enzimas digestivas, para podermos analisar todo o proteoma das amostras, e não somente as frações de baixo peso molecular.

Além de, realizarmos ensaios biológicos dos peptídeos encontrados nas amostras, para confirmarmos a ação hipotensora dos peptídeos potenciadores de bradicinina.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, S.A., STOEVA, S., ABBASI, A., ALAM, J.M., KAYED, R., FAIGLE, M., NEUMEISTER, B., VOELTER, W. Isolation, structural, and functional characterization of an apoptosis-inducing L-amino acid oxidase from leaf-nosed viper (*Eristocophis macmahoni*) snake venom. **Arch Biochem Biophys**, v. 384, p.216-226, 2000.

ANDE, S.R; KOMMOJU, P.R; DRAXL, S; MURKOVIC, M; MACHEROUX, P; GHISLA, S; FERRANDO-MAY, E. Mechanisms of cell death induction by L-amino acid oxidase, a major component of ophidian venom. **Apoptosis**, v.11, p.1439-1451, 2006.

ARDREY, R. E. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction, **Wiley: Huddersfield**, 2003.

ARLINGHAUS, F.T; EBLE, J.A. C-type lectin-like proteins from snake venoms. **Toxicon**, v.60, n.4, p. 512-519, 2012.

BJARNASON, J; FOX, J.W. Hemorrhagic toxins snake venoms. **J Toxicol Toxin Rev**, v.7, p.121-209, 1988.

CALVETE, J.J. Proteomic tools against the neglected pathology of snake bite envenoming. **Expert Rev Proteomics**, v.8, n.6, p.739-758, 2011.

CALVETE, J.J. Snake venomics: From the inventory of toxins to biology. **Toxicon**, v.75, p.44-62, 2013.

CALVETE, J.J., BORGES, A., SEGUR, A., FLORES-DÍAZ, M., ALAPE-GIRÓND, A., GUTIÉRREZ, J.M., DIEZE, N., SOUSA, L., KIRIAKOS, D., SÁNCHEZ, E., FAKS, J.G., ESCOLANO, J., SANZ, L. 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 Proteom**, v.72, p.227-240, 2009.

CALVETE, J.J; JUÁREZ, P; SANZ, L. Snake venomics. Strategy and applications. **J Mass Spectrom**, v.42, p.1405–1414, 2007.

CALVETE, J.J; MARCINKIEWICZ, C.; MONLEÓN, D.; ESTEVE, V.; CELDA, B.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. **Toxicon**, v.45, p. 1063-74, 2005.

CALVETE, J.J; SANZ, L., CID, P., DE LA TORRE, P., FLORES-DÍAZ, M., DOS SANTOS, M.C., BORGES, A., BREMO, A., ANGULO, Y., LOMONTE, B., ALAPE-GIRÓN, A., GUTIÉRREZ, J.M. Snake venomomics of the Central American rattlesnake *Crotalus simus* and the South American *Crotalus durissus* complex points to neurotoxicity as an adaptive pedomorphic trend along *Crotalus* dispersal in South America. **J Proteome Res**, v.9, p.528-544, 2010.

CAMPBELL, J.A; LAMAR, W.W. The Venomous Reptiles of Latin America. Cornell University, Ithaca, N.Y., USA, 1989.

CAMPBELL, J.A; LAMAR, W.W. The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere. Ithaca (NY): Comstock Publishing Associates; 2004.

CAMPOS, L.B, PUCCA, M.B., RONCOLATO, E.C., BERTOLINI, T.B., NETTO, J.C., BARBOSA, J.E. In vitro comparison of enzymatic effects among Brazilian Bothrops spp. Venoms. **Toxicon**, v.76, p.1-10, 2013.

CHI, C.-W; WANG, S.-Z; XU, L.-G; WANG, M.-Y; LO, S.-S; HUANG, W.-D. Structure-function studies on the bradykinin potentiating peptide from Chinese snake venom (*Agkistrodon halys pallas*). **Peptides 6 Suppl.**, v.3, p.339-342, 1985.

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

CINTRA AC, DE TONI LG, SARTIM MA, FRANCO JJ, CAETANO RC, MURAKAMI MT, SAMPAIO SV. Batroxase, a new metalloproteinase from *B. atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity. **Toxicon**, v.60, p.70-82, 2012.

CINTRA, A.C.O; VIEIRA, C.A; GIGLIO, J.R. Primary structure and biological activity of bradykinin potentiating peptides from *Bothrops insularis* snake venom. **J Protein Chem.**, v.9, p.221-27, 1990.

COGO, J.C., LILLA, S., SOUZA, G.H., HYSLOP, S., DE NUCCI, G. Purification, sequencing and structural analysis of two acidic phospholipases A2

from the venom of *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa). **Biochimie**, v.88, n.12, p.1947-1959, 2006.

COGO, J.C.; PRADO-FRANCISCETTI, J.; CRUZ-HOFLING, M.A.; CORRADO, A.P. e RODRIGO-SIMIONI, L. Effects of *Bothrops insularis* venom on the mouse and chick nerve-muscle preparation. **Toxicon**, v.31, p.1237-47, 1993.

CONCEICAO, K; KONNO, K; DE MELO, R.L., ANTONIAZZI, M.M., JARED, C; SCIANI, J.M; CONCEICAO, I.M; PREZOTO, B.C; DE CAMARGO, A.C.M; PIMENTA, D.C. Isolation and characterization of a novel bradykinin potentiating peptide (BPP) from the skin secretion of *Phyllomedusa hypochondrialis*. **Peptides**, v.28, p.515-523, 2007.

CORRÊA-NETTO, C., JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.D.E.L., SILVA, D.A., HO, P.L., LEITÃO-DE-ARAÚJO, M., ALVES, M.L., SANZ, L., FOGUEL, D., ZINGALI, R.B., CALVETE, J.J. Snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of Brazilian coral snakes, *Micrurus altirostris* and *M. corallinus*. **J Proteomics**, v.74, n.9, p.1795-1809, 2011.

COTRELL, J.S. Protein identification using MS/MS data. **J. Proteomics**, v.74, p. 1842-1851, 2011.

COUTINHO-NETO, A; CARDOZO-FILHO, J.L; CALDEIRA, C.A.S; SILVA, L.P; BLOCH, C.JR; CALDERON, L.A; STABELI, R.G. Identification of peptides from Amazonian *Bothrops atrox* venom by MALDI TOF/TOF. Submitted (JUL-2010) to UniProtKB.

COX, J; MANN, M. Quantitative, high-resolution proteomics for data-driven systems. **Biol Ann Rev Biochem**, v.80, p.273-299, 2011.

DENNIS, M.S; HENZE, L.W.J; PITTI, R.M. Platelet glycoprotein IIb-IIIa protein antagonists from snake venom: evidence for a family of platelet-aggregation inhibitors. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.87, p. 2471-2475, 1990.

DIAS, G.S.; KITANO, E.S.; PAGOTTO, A.H.; SANT'ANNA, S.S.; ROCHA, M.M.T.; ZELANIS, A.; SERRANO, M.S.T. Individual variability in the venom proteome of juvenile *Bothrops jararaca* specimens. **J Proteome Res**, v.12, p.4585-4598, 2013.

FERREIRA L.A.F., GALLE A., RAIDA M., SCHRADER M., LEBRUN I., HABERMEHL G. Isolation: analysis and properties of three bradykinin-potentiating peptides (BPP-II, BPP-III, and BPP-V) from *Bothrops neuwiedi* venom. **J Protein Chem**, v.17, 285-289, 1998.

FERREIRA, S. H. A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. **Br J Pharmacol Chemother**, v.24, p.163-169, 1965.

FERREIRA, S.H., BARTELT, D.C., GREENE, L.J. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. **Biochem**, v.9, n.13, p. 2583–2593, 1970.

FONSLOW, B.R., STEIN, B.D., WEBB, K.J., XU, T., CHOI, J., PARK, S.K., YATES III, J.R. Digestion and depletion of abundant proteins improves proteomic coverage. **Nature Methods**, v.10, n.1, 2013.

FOX, J.W; MA, L; NELSON, K; SHERMAN, N.E; SERRANO, S.M.T. Comparison of indirect and direct approaches using ion-trap and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for exploring Viperid venom proteomes. **Toxicon**, v.47, p.700-14, 2006.

FRY, B.G; WICKRAMARATNA, J.C; HODGSON, W.C; ALEWOOD, P.F; KINI, R.M; HO, H; WÜSTER, W. Electrospray liquid chromatography/mass spectrometry fingerprinting of *Acanthophis* (death adder) venoms: taxonomic and toxinological implications. **Mass Spectrom**, v.16, p.600-608, 2002.

FRY, B.G., WÜSTER, W., RAMJAN, S.F.R., JACKSON, T., MARTELLI, P., KINI, R.M. Analysis of *Colubroidea* snake venoms by liquid chromatography with mass spectrometry: evolutionary and toxinological implications. **Rapid Commun Mass. Spectrom**, v.17, 2047–62, 2003.

GOMES, M.S., NAVES DE SOUZA, D.L., GUIMARÃES, D.O., LOPES, D.S., MAMEDE, C.C., GIMENES, S.N., ACHÊ, D.C., RODRIGUES, R.S., YONEYAMA, K.A., BORGES, M.H., DE OLIVEIRA, F., RODRIGUES, V.M. Biochemical and functional characterization of Bothropoidin: the first haemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops pauloensis* snake venom. **J Biochem**, v.157, n.3, 2015.

GUÉRCIO, R.A.P; SHEVCHENKO, A; SHEVCHENKO, A; LÓPEZ-LOZANO, J.L; PABA, J; SOUSA, M.V; RICART, C.A.O. Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. **Proteome Sci**, v.4, n.11, p.1-14 2006.

GUO, C.T. Molecular analysis of the bioactive components in snake venoms. Submitted (NOV-2006) to UniProtKB.

GUTIÉRREZ, J.M., LOMONTE, B. Phospholipases A2: Unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. **Toxicon**, v.62, p.27-39, 2013.

GUTIÉRREZ, J.M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; DÍAZ, C., Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon**, v.45, p. 997-1011, 2005.

HAILEY, S; ADAMS, E; PENN, R; WONG, A; MCLANE, M.A. Effect of the disintegrin eristostatin on melanoma-natural killer cell interactions. **Toxicon**, v.61, p.83-93, 2013.

IANZER, D; KONNO, K; MARQUES-PORTO, R; PORTARO, F.C.V; STOECKLIN, R; DE CAMARGO, A.C.M; PIMENTA, D.C. 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**, v.25, p.1085-1092, 2004.

JIA, L.G., WANG, X.M., SHANNON, J.D., BJARNASON, J.B., FOX, J.W. Function of Disintegrin-like/Cysteine-rich Domains of Atrolysin A inhibition of platelet aggregation by recombinant protein and peptide antagonists. **J Biol Chem**, v.272, n.20, p.13094–102, 1997.

KARLSSON, E. In: Snake venoms. **Handb Exp Pharmacol**, v.2, p.159-212, 1979.

KEPPEL, T.R., JACQUES, M.E., WEIS, D.D. The use of acetone as a substitute for acetonitrile in analysis of peptides by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v.24, p.6-10, 2010.

KOH, D.C; ARMUGAM, A; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cell Mol Life Sci**, v.63, p.3030-41, 2006.

KOHLHOFF, M; BORGES, M.H; YARLEQUE, A; CABEZAS, C; RICHARDSON, M; SANCHEZ, E.F. Exploring the proteomes of the venoms of the Peruvian pit vipers *Bothrops atrox*, *B. barnetti* and *B. Pictus*. **J Proteomics**, v.75, p.2181-2195, 2012.

KOMORI, Y, SUGIHARA, H. Characterization of a new inhibitor for angiotensin converting enzyme from the venom of *Vipera aspis aspis*. **Int. J Biochem.**, v.22, p.767-771, 1990.

KRIEGER, E.M; SALGADO, H.C; ASSAN, C.J; GREENE, L.L.J.; FERREIRA S.H. Potential screening test for detection of over activity of renin-angiotensin system. **The Lancet**, v.297, p.269-71, 1971.

KULARATNE, S.A; SENANAYAKE, N. Venomous snake bites, scorpions, and spiders. **Handb Clin Neurol**, v.120, p.987-1001, 2014.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LU, Q. M., WEI, Q., JIN, Y., WEI, J. F., WANG, W. Y., e XIONG, Y. L. L-amino acid oxidase from *Trimeresurus jerdonii* snake venom: Purification, characterization, platelet aggregation-inducing and antibacterial effects. **J Nat Toxins**, v.11, n.4, p.345–352, 2002.

MARKLAND JR; F.S; SWENSON, S. Snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v.62, p.3-18, 2013.

MEDZIHRADSKY, K.F., CHALKLEY, R.J. Lessons in de novo peptide sequencing by tandem mass spectrometry. **Mass Spectrom Rev**, v.34, n.1, 2015.

MENDOZA, C.E.C.; BHATTI, A.R. Electrophoretic analysis of snake venoms. **J Chromatography**, v.580, p.355-363, 1992.

MEKI, A.R, NASSAR, A.Y; ROCHAT, H. A bradykinin-potentiating peptide (peptide K12) isolated from the venom of Egyptian scorpion *Buthus occitanus*. **Peptides**, v.16, p.1359-1365, 2005.

MOURA DA SILVA, A.M. Caracterização de venenos de serpentes por eletroforese em poliacrilamida. **Bol Biotecnol**, v.3, p.3-7, 1992.

ONDETTI, M.A.; CUSHMAN, D.W. Angiotensin converting enzyme inhibitors: biochemical properties and biological activities. **CRC Crit Rev Biochem.**, v.16, p.381-411, 1984.

ONG, S.E., MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. **Nat Chem Biol**, v.1, n.5, p.252-262, 2005.

ORNSTEIN, L. Disc electrophoresis – 1- Background and theory. **Ann NY Acad Sci**, v.121, p. 321-47, 1964.

PAULA, R.C; CASTRO, H.C; RODRIGUES, C.R; MELO, P.A; FULY, A.L. Structural and pharmacological features of phospholipases A2 from snake venoms. **Protein Pept Lett**, v.16, n.8, p.899-907, 2009.

PETERSON, A., HOHMANN, L., HUANG, L., KIM, B., ENG, J.K., MARTIN, D.B. Analysis of RP-HPLC loading conditions for maximizing peptide identifications in shotgun proteomics. **J Proteome Res**, v.8, p.4161-4168, 2009.

RAWLINGS, N.D; BARRETT, A.J. Evolutionary families of peptidases. **Biochem J**, v.15, p. 205-218, 1993.

RIOLI, V; PREZOTO, B.C; KONNO, K; MELO, R.L; KLITZKE, C.F; FERRO E.S; FERREIRA-LOPES, M; CAMARGO, A.C.M; PORTARO, F.C.V. A novel bradykinin potentiating peptide isolated from *Bothrops jararacussu* venom using catalytically inactive oligopeptidase EP24.15. **Febs J**, v.275, p.2442-2454, 2008.

RUSSEL, F.E. Snake Venom Poisoning. **J B Lippincott: Philadelphia**, p.526, 1980.

SANTORO, M.L; SANO-MARTINS, I.S; FAN, W.H; CARDOSO, J.L.C; THEAKSTON, R.D.G; WARREL, D.A; BIASG. Haematological evaluation of patients bitten by the jararaca, *Bothrops jararaca*, in Brazil. **Toxicon**, v.51, n.8, p. 1440-1448, 2008.

SNYDER, L.R; DOLAN, J.W; CARR, P.W. The hydrophobic-subtraction model of reversed-phase column selectivity. **J Chromatogr A**, v. 1060, p.77-116, 2004.



SOUZA, G.H.M.F; CATHARINO, R.R; IFA, D.R; EBERLIN, M.N; HYSLOP, S. Peptide fingerprinting of snake venoms by direct infusion nano-electrospray ionization mass spectrometry: potential use in venom identification and taxonomy. **J Mass Spectrom.**, v.43, p.594-99, 2008.

SOUZA, L.F; NICOLAU, C.A; PEIXOTO, P.S; BERNARDONI, J.L; OLIVEIRA, S.S; PORTES-JUNIOR, J.A; MOURÃO, R.H.V; LIMA-DOS-SANTOS, I; SANO-MARTINS, I.S; CHALKIDIS, H.M; VALENTE, R.H; MOURA-DA-SILVA, A.M. Comparison of phylogeny, venom composition and neutralization by antivenom in diverse species of *Bothrops* complex. **PLoS Negl Trop Dis**, v.7, n.9, p.1-16, 2013.

SPEERS, A.E., BLACKLER, A.R., WU, C.C. Shotgun analysis of integral membrane proteins facilitated by elevated temperature. **Anal Chem**, v.79, p.4613-4620, 2007.

STOCKER, K.F. Medical of snake venom proteins. **CRC Press**, p.34-50, 1990.

TASHIMA, A.K; ZELANIS, A; KITANO, E.S; IANZER, D; MELO, R.L; RIOLI, V; SANT'ANNA, S.S; SCHENBERG, A.C; CAMARGO, A.C; SERRANO, S.M.T. Peptidomics of three *Bothrops* snake venoms: insights into the molecular diversification of proteomes and peptidomes. **Mol Cell Proteomics**, v.11, p.1245-1262, 2012.

THOMAS, R.G., POUGH, F.H. The effect of rattlesnake venom on digestion of prey. **Toxicon**, v.17, p.221-228, 1979.

VALENTE, R.H., GUIMARÃES, P.R., JUNQUEIRA, M., NEVES-FERREIRA, A.G., SOARES, M.R., CHAPEAUROUGE, A., TRUGILHO, M.R., LEÓN, I.R., ROCHA, S.L., OLIVEIRA-CARVALHO, A.L., WERMELINGER, L.S., DUTRA, D.L., LEÃO, L.I., JUNQUEIRA- DE-AZEVEDO, I.L., HO, P.L., ZINGALI, R.B., PERALES, J., DOMONT, G.B. *Bothrops insularis* venomomics: a proteomic analysis supported by transcriptomic-generated sequence data. **J. Proteomics**, v.72, p.241–255, 2009.

WHO (2007) Rabies and envenomings. A neglected public health issue. Disponível em: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2007/9789241563482\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2007/9789241563482_eng.pdf).

WASINGER, V.C; CORDWELL, S.J; CERPA-POLJAK, A; YAN, J.X; GOOLEY, A.A; WILKINS, M.R; DUNCAN, M.W; HARRIS, R; WILLIAMS, K.L; HUMPHERY-SMITH, I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. **Electrophoresis**, v.16, n.7, p.1090-1094, 1995.

WERMELINGER, L.S; DUTRA, D.L; OLIVEIRA-CARVALHO, A.L; BLOCH, C. JR; ZINGALI, R.B. Fast analysis of low molecular mass compounds present in snake venom: identification of ten new pyroglutamate-containing peptides. **Rapid Commun. Mass Spectrom**, v.19, p.1703-1708, 2005.

WOODHAMS, B.J; WILSON, S.E; XIN, B.C; HUTTON, R.A. Differences between the venoms of two sub-species of Russell's viper: *Vipera russelli pulchella* and *Vipera russelli siamensis*. **Toxicon**, v.28, n.4, p.427-433, 1990.

YU, Z., WANG, Y., ZHOU, N., ZHAO, M., QIU, J., LIN, J. Advances in Detection Methods of L-Amino Acid Oxidase Activity. **Appl Biochem Biotechnol**, v.174, p.13-27, 2014.

ZELANIS, A., ANDRADE-SILVA, D., ROCHA, M.M., FURTADO, M.F., SERRANO, S.M., JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.L., HO, P.L. A transcriptomic view of the proteome variability of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. **PLoS Negl Trop Dis**, v.6, p.1554, 2012.

## 10 ANEXOS

### ANEXO 1- TABELA DOS (BPPS) DEPOSITADOS NO BANCO DE DADOS UniprotKB (ACESSO EM 01/03/2015).

<b>Organismo</b>	<b>Peptídeo</b>	<b>Sequência</b>	<b>Massa (Da)</b>	<b>Fonte</b>	<b>Referência</b>
<i>B. alternatus</i>	BPP-11	QWDPSSDIPP	1221.46	MALDI	Wermelinger <i>et al.</i> (2005)
<i>B. alternatus</i>	BPP-13a	QGGWPRPGPEIPP*	1388	ESI	Souza <i>et al.</i> (2008)
<i>B. atrox</i>	BPP-12a	QQWPRDPAPIPP*	1384.60	MALDI	Coutinho-Neto <i>et al.</i> (2010)
<i>B. erythromelas</i>	BPP-13a	QGGWPRPGPEIPP	1,388	ESI	Souza <i>et al.</i> (2008)
<i>B. insularis</i>	BPP-10	QNWPHPQIPP	1196.41	MALDI	Wermelinger <i>et al.</i> (2005)
<i>B. insularis</i>	BPP-11	QLGPPRPQIPP*	1279.50	MALDI	Wermelinger <i>et al.</i> (2005)
<i>B. insularis</i>	BPP-13	QGGWPRPGPEIPP*	1370.81	MALDI	Wermelinger <i>et al.</i> (2005)
<i>B. insularis</i>	BPP-S4,1,2	QGGPPRPQIPP	1,143	EDMAN	Cintra <i>et al.</i> (1990)
<i>B. insularis</i>	BPP-S5,1	QWGQHPNIPP	1,173	EDMAN	Cintra <i>et al.</i> (1990)
<i>B. jararaca</i>	BPP-5a	QKWAP	611.70	ESI	lanzer <i>et al.</i> (2004)
<i>B. jararaca</i>	BPP-5b	QWPRP	665.60	ESI	lanzer <i>et al.</i> (2004)
<i>B. jararaca</i>	BPP-6a	QSWPGP	653.70	ESI	lanzer <i>et al.</i> (2004)
<i>B. jararaca</i>	BPP-7a	QDGPIPP	705.80	ESI	lanzer <i>et al.</i> (2004)
<i>B. jararaca</i>	BPP-9a	QWPRPQIPP*	1101.30	MALDI	Wermelinger <i>et al.</i> (2005)
<i>B. jararaca</i>	BPP-10a	QSWPGPNIPP	1075.20	ESI	lanzer <i>et al.</i> (2004)
<i>B. jararaca</i>	BPP-10b	QNWPRPQIPP*	1215.40	MALDI	Wermelinger <i>et al.</i> (2005)
<i>B. jararaca</i>	BPP-10c	QNWPHPQIPP	1196.30	ESI	Tashima <i>et al.</i> (2012)
<i>B. jararaca</i>	BPP-11a	QWPRPTPQIPP	1299.50	MALDI	Wermelinger <i>et al.</i> (2005)
<i>B. jararaca</i>	BPP-11b	QGRAPGPIPP	1069.20	ESI	lanzer <i>et al.</i> (2004)
<i>B. jararaca</i>	BPP-11c	QARPPHPPIPP	1189.40	ESI	lanzer <i>et al.</i> (2004)
<i>B. jararaca</i>	BPP-11d	QGRPPGPIPP	1095.30	ESI	Tashima <i>et al.</i> (2012)
<i>B. jararaca</i>	BPP-11e	QARPPHPPIPP	1188.70	ESI	Tashima <i>et al.</i> (2012)
<i>B. jararaca</i>	BPP-12a	QGWAWPRPQIPP	1415.60	ESI	lanzer <i>et al.</i> (2004)
<i>B. jararaca</i>	BPP-12b	QWGRPPGPIPP*	1280.70	ESI	Tashima <i>et al.</i> (2012)
<i>B. jararaca</i>	BPP-12c	QWAQWPRPQIPP*	1485.80	ESI	Tashima <i>et al.</i> (2012)
<i>B. jararaca</i>	BPP-13a	QGGWPRPGPEIPP*	1370.50	MALDI	Wermelinger <i>et al.</i> (2005)
<i>B. jararaca</i>	BPP-13b	QGGLPRPGPE IPP*	1297.50	ESI	Tashima <i>et al.</i> (2012)

Cont.

<i>B. jararaca</i>	BPP-14a	QWAQWPRPTQIPP	1683.85	ESI	Ianzer <i>et al.</i> (2004)
<i>B. jararaca</i>	BPP- AP	QARPPHPPIPPAP*	1356.50	ESI	Tashima <i>et al.</i> (2012)
<i>B. jararacussu</i>	BPP-10	QNWPHQIPP	1196.65	MALDI	Wermelinger <i>et al.</i> (2005)
<i>B. jararacussu</i>	BPP-11a	QGRPPGPIPP	1095.66	MALDI	Wermelinger <i>et al.</i> (2005)
<i>B. jararacussu</i>	BPP-11b	QARPPHPPIPP	1189.71	MALDI	Rioli <i>et al.</i> (2008)
<i>B. jararacussu</i>	BPP-13a	QGGWPRPGPEIPP*	1370.75	MALDI	Wermelinger <i>et al.</i> (2005)
<i>B. jararacussu</i>	BPP-13b	QARPPHPPIPPAP*	1357.70	MALDI	Rioli <i>et al.</i> (2008)
<i>B. leucurus</i>	BPP-13a	QGGWPRPGPEIPP*	1,388	ESI	Souza <i>et al.</i> (2008)
<i>B. moojeni</i>	BPP-13a	QGGWPRPGPEIPP*	1,388	ESI	Souza <i>et al.</i> (2008)
<i>B. neuwiedi</i>	BPP-II	EEGGRPPPI	1046.00	EDMAN	Ferreira <i>et al.</i> (1998)
<i>B. neuwiedi</i>	BPP-III	QGGWPRPGPEIPP*	1370.85	MALDI	Wermelinger <i>et al.</i> (2005)
<i>B. neuwiedi</i>	BPP-V	EEGSPPPVVI	1078.00	EDMAN	Ferreira <i>et al.</i> (1998)
<i>B. neuwiedi</i>	BPP-9a	QWPRPQIPP*	1101.72	MALDI	Wermelinger <i>et al.</i> (2005)
<i>B. neuwiedi</i>	BPP-11	QWPRPTQIPP	1299.85	MALDI	Wermelinger <i>et al.</i> (2005)
<i>B. occitanus</i>	BPP-K12	LRDYANRVINGGPEAAGPPA	2137.30	ESI	Meki <i>et al.</i> (2005)
<i>C. adamanteus</i>	BPP-11a	QQWPPGHHIPP	1276.71	MALDI	Wermelinger <i>et al.</i> (2005)
<i>C. adamanteus</i>	BPP-11b	QGGWPRNPPIPP	1201.73	MALDI	Wermelinger <i>et al.</i> (2005)
<i>C. atrox</i>	POL236	QLWPRPQIPP	1213.80	ESI	Calvete <i>et al.</i> (2009)
<i>C. d. terrificus</i>	-	QRWPHLEIPP	1255.36	MALDI	Wermelinger <i>et al.</i> (2005)
<i>C. v. viridis</i>	BPP-11a	QGSPRHPPIPP	1165.72	MALDI	Wermelinger <i>et al.</i> (2005)
<i>C. v. viridis</i>	BPP-11b	QGGAPWNPPIPP	1116.65	MALDI	Wermelinger <i>et al.</i> (2005)
<i>C. v. viridis</i>	BPP-11c	QSAPGNEAIPP	1063.63	MALDI	Wermelinger <i>et al.</i> (2005)
<i>G. blomhoffii</i>	BPP-11	QGLPPGPIPR	1073.30	ESI	Murayama <i>et al.</i> (2000)
<i>G. halys</i>	BPP-1	QGRPPGPIPP	1112	EDMAN	Chi <i>et al.</i> (1985)
<i>G. halys</i>	BPP-2	QGRPPRHIPP	1,251	-	Guo (2006)
<i>L. muta</i>	BPP-1	WPPRPQIPP	1088.11	MALDI	Soares <i>et al.</i> (2005)
<i>L. muta</i>	BPP-2	QKPWPPGHHIPP	1244.63	MALDI	Soares <i>et al.</i> (2005)
<i>L. muta</i>	BPP-3	QEWPPGHHIPP	1404.60	MALDI	Soares <i>et al.</i> (2005)
<i>L. muta</i>	BPP-4	QKKWPPGHHIPP	1277.74	MALDI	Soares <i>et al.</i> (2005)
<i>L. muta</i>	BPP-5	QKWDPPISPP	1374.16	MALDI	Soares <i>et al.</i> (2005)
<i>L. erythrognatha</i>	BBP-S	QAPWPDTISPP	1208	EDMAN	Ferreira <i>et al.</i> , 1993
<i>P. burmeisteri</i>	BPP-PB	QTLLQELPIPP	1230.67	ESI	Conceição <i>et al.</i> (2007)
<i>P. hypochondrialis</i>	PhipoXA	QFRPSYQIPP	1214.62	ESI	Conceição <i>et al.</i> (2007)
<i>T. serrulatus</i>	BBP-T	KKDGYPVEYDRAY	1603.7	EDMAN	Ferreira <i>et al.</i> , 1993
<i>V. aspis</i>	BPP-10	QGWPGPKVPP	1,062	FAB	Komori e Sugihara (1990)

\*Observados no presente trabalho.

**ANEXO 2- TABELA COM SEQUÊNCIAS PEPTÍDICAS OBTIDAS A PARTIR DO SEQUENCIAMENTO *DE NOVO* DOS ESPECTROS DE MASSAS GERADOS PELOS PEPTÍDEOS DE BAIXO PESO MOLECULAR DOS VENENOS SOLUBILIZADOS EM 5% DE ACN DA SERPENTE *B. jararaca***

Sequências obtidas ( <i>Bothrops jararaca</i> 5% acetonitrila)							
Peptídeo	m/z	z	RT	Massa	ppm	PTM	ALC (%)
LAPPLPPFQPPAP	671.3591	2	14.6	1340.7493	-34		60
GALGPPAP	679.4201	1	14.77	678.3701	63.1		54
ANLPPAP	679.4201	1	15.28	678.3701	63.1		63
PGSPVLPGVPAIPP	649.3448	2	16.65	1296.7441	-53.3		51
p-QQLTPNASYNGPP	685.3402	2	16.84	1368.6309	25.6	Pyro-glu from Q	52
p-QVLQPTPPSPPPG	649.3448	2	17.11	1296.6714	2.8	Pyro-glu from Q	47
p-QVLQPHPAQPP	597.7748	2	17.43	1193.6194	-70.6	Pyro-glu from Q	52
p-QVLQPHQAPP	597.7748	2	17.95	1193.6194	-70.6	Pyro-glu from Q	49
GLPHL	536.2646	1	18.53	535.3118	-101.8		55
p-QVLQPHPAQPP	597.7748	2	16.94	1193.6194	-70.6	Pyro-glu from Q	45
PPLPQHPLPPAP	679.3776	2	23.17	1356.7554	-10.8		82
PARPAYPPLPPAP	672.3912	2	22.22	1342.7397	20.9		71
PAAVSFPPPLPPAP	679.3662	2	22.66	1356.7441	-19.4		69
QRVLEPR	449.2577	2	15.24	896.5192	-20.5		62
PAPNLYPPLPPAP	672.3912	2	22.74	1342.7285	29.3		60
AALL	387.2455	1	21.75	386.2529	-38		58
APVVH	522.2871	1	22.38	521.2961	-31.3		57
p-QVNFP	587.337	1	20.75	586.2751	93.3	Pyro-glu from Q	54
LVPP	213.1235	2	21.92	424.2686	-84.9		53
VRPTPGGAPAPGVPP	685.41	2	27.87	1368.7512	39.6		51
NPVTPVGQPLPP	608.3568	2	29.02	1214.6658	27.3		51
PPLAGHPPPLPPAP	679.3776	2	23.71	1356.7554	-10.8		51
p-QKLTPGGAPAPGVPP	685.41	2	28.88	1368.74	47.8	Pyro-glu from Q	50
HTLTLCHDAPAPP	686.8496	2	25.91	1371.6604	17.7		50
p-QELTHADPPLPP	649.3534	2	26.73	1296.635	44.1	Pyro-glu from Q	49
THPE	242.1429	2	17.06	482.2125	121.9		47

\*Sendo (p-Q)= presença de Ácido piroglutâmico.

**ANEXO 3- TABELA COM SEQUÊNCIAS PEPTÍDICAS OBTIDAS A PARTIR DO SEQUENCIAMENTO *DE NOVO* DOS ESPECTROS DE MASSAS GERADOS PELOS PEPTÍDEOS DE BAIXO PESO MOLECULAR DOS VENENOS SOLUBILIZADOS EM 10% DE ACN DA SERPENTE *B. jararaca***

Sequências obtidas ( <i>Bothrops jararaca</i> 10% acetonitrila)							
Peptídeo	m/z	z	RT	Massa	ppm	PTM	ALC (%)
p-QAPTPP	593.3123	1	14.46	592.2856	32.7	Pyro-glu from Q	55
KVVVAP	612.3673	1	14.96	611.4006	-66.4		63
GPSPVNGPHEIPP	649.3559	2	16.09	1296.6462	39.3		53
PGSPVNPGEIIPP	649.3448	2	16.61	1296.6462	22.2		48
LPHSNPLGDPGPP	649.3448	2	17	1296.6462	22.2		55
NPLSPHPQIIPP	598.789	2	17.32	1195.635	-59.8		57
NPLEPAPLGPP	551.2958	2	17.71	1100.5867	-8.7		49
NPLEPHPQAPP	598.789	2	17.83	1195.5986	-29.4		61
NPLEPAGPIIPP	551.2958	2	18.21	1100.5867	-8.7		50
GPLHL	536.2545	1	18.41	535.3118	-120.7		66
VHLSNPSGPP	551.2958	2	17.21	1100.5615	14.2		46
p-QENGPRPQIIPP	608.3099	2	17.34	1214.6042	0.9	Pyro-glu from Q	48
PPCRPPTPKLCL	661.4041	2	17.72	1320.7046	67.5		46
WAPGPRKPLPP	608.3099	2	17.85	1214.6924	-71.7		46
PNLPPHPPLPP	588.3196	2	20.86	1174.6499	-21.5		72
PLNPPHPPLPP	588.3301	2	20.35	1174.6499	-3.6		64
FVAF	242.1429	2	22.27	482.2529	38.1		63
VPEGLL	314.2277	2	17.88	626.3639	122.7		62
APVHV	522.2871	1	22.44	521.2961	-31.3		57
p-QELVPGPLHLPP	640.3952	2	27.37	1278.6973	61.5	Pyro-glu from Q	56
p-QKLTPGGAPAGVPP	685.4161	2	28.02	1368.74	56.7	Pyro-glu from Q	56
VHSAGPALGPP	550.3392	2	29.16	1098.582	74.4		55
HGSSLP	299.1706	2	22.74	596.2918	58.5		53
CVGQPAP	671.3583	1	22.25	670.3109	60		52
PADGLL	293.1915	2	21.13	584.317	88.2		52
NMAAPAP	671.347	1	22.8	670.3109	43.1		52
HTLL	242.1429	2	17.6	482.2853	-29		49
p-QKLTPGGAPAGVPP	685.4161	2	29.03	1368.74	56.7	Pyro-glu from Q	49
PPLSPPCSVPAP	678.3995	2	22.78	1354.6956	65.7		49
GGAH	341.1887	1	17.09	340.1495	93.9		49
PPSTPP	595.3274	1	20.91	594.3013	31.6		48
VVHPP	548.3636	1	23.76	547.3118	81.3		47
TSLY	242.1429	2	19.45	482.2377	69.7		46
HASGLL	299.1933	2	16.82	596.3282	73.5		45
EPGPRPLGPALPP	649.3821	2	26.79	1296.719	23.6		45

\*Sendo (p-Q)= presença de Ácido piroglutâmico.

**ANEXO 4- TABELA COM SEQUÊNCIAS PEPTÍDICAS OBTIDAS A PARTIR DO SEQUENCIAMENTO *DE NOVO* DOS ESPECTROS DE MASSAS GERADOS PELOS PEPTÍDEOS DE BAIXO PESO MOLECULAR DOS VENENOS SOLUBILIZADOS EM 5% DE ACN DA SERPENTE *B. insularis***

Sequências obtidas ( <i>Bothrops insularis</i> 5% acetonitrila)							
Peptídeo	m/z	z	RT	Massa	ppm	PTM	ALC (%)
APVVH	522.2886	1	14.78	521.2961	-28.5		48
TPSVNQDPVGLPEYVPVQ	920.4111	2	14.96	1838.905	-52.9		69
THLVPGPAGPAFN	639.3522	2	16.45	1276.6565	26.2		48
PNLSRPGPEIPP	685.8585	2	17.28	1369.7354	-24.1		45
HTLVPGPCFIPP	639.3522	2	17.5	1276.6638	20.4		58
VTVLEASGR	466.2619	2	15.69	930.5134	-4.4		83
GHPPAP	575.3283	1	18.65	574.2863	60.5		73
PPALNHPPLPPAP	659.3571	2	22.05	1316.7241	-18.7		71
LTAPVDRFE	524.294	2	22.48	1046.5396	32.4		69
PVDYLR	381.7169	2	17.98	761.4072	15.9		64
NPLQPHPQAPP	598.3326	2	29.21	1194.6145	30.2		62
NPLQPHPQAPP	598.3326	2	28.18	1194.6145	30.2		62
NPLQPHPQAPP	598.3326	2	27.68	1194.6145	30.2		62
NPLQPHPQAPP	598.3326	2	29.72	1194.6145	30.2		61
p-QLGPPVGPQLPP	640.4033	2	27.99	1278.6973	74.1	Pyro-glu from Q	59
CHLTGPNAGPLPP	685.8785	2	28.32	1369.6812	44.8		58
NPLQPHPQAPP	598.3326	2	30.23	1194.6145	30.2		57
NPLQPHPQAPP	598.3326	2	28.7	1194.6145	30.2		56
p-QLGPPVGPQLPP	640.4033	2	27.47	1278.6973	74.1	Pyro-glu from Q	55
p-QLGPPVGPQLPP	640.4033	2	28.48	1278.6973	74.1	Pyro-glu from Q	55
EPGQPDLPNPLPP	685.8785	2	29.35	1369.6877	40		54
TLGAGPP	612.355	1	23.02	611.3278	32.6		52
STPHP	538.2269	1	17.11	537.2547	-65.3		48
p-QDGKPRGPPELPP	685.8785	2	27.82	1369.699	31.8	Pyro-glu from Q	46
PLAPPAGGVPLPP	640.4033	2	26.94	1278.7336	45.6		45
PPALPPPPLPPAP	679.4377	2	23.08	1356.7805	59.2		45
SGAH	371.1879	1	19.33	370.1601	55.5		45
LLAL	215.1546	2	23.48	428.2999	-12.2		45

\*Sendo (p-Q)= presença de Ácido piroglutâmico.

**ANEXO 5- TABELA COM SEQUÊNCIAS PEPTÍDICAS OBTIDAS A PARTIR DO SEQUENCIAMENTO *DE NOVO* DOS ESPECTROS DE MASSAS GERADOS PELOS PEPTÍDEOS DE BAIXO PESO MOLECULAR DOS VENENOS SOLUBILIZADOS EM 10% DE ACN DA SERPENTE *B. insularis***

Sequências obtidas ( <i>Bothrops insularis</i> 10% acetoneitrila)							
Peptídeo	m/z	Z	RT	Massa	ppm	PTM	ALC (%)
TLGPGAP	612.3491	1	14.87	611.3278	22.9		64
GAGESSAP	675.3342	1	16.32	674.2871	59		48
HSGPPNPVPAIPP	640.3568	2	16.45	1278.6721	21		45
p-QQLGPPPRPQIPP	640.3568	2	17.01	1278.7085	-7.5	Pyro-glu from Q	50
p-QQLPGPPRGAIPP	640.3568	2	17.54	1278.7085	-7.5	Pyro-glu from Q	46
VPGMNQDPRLEYVPPK	920.4849	2	14.95	1838.9348	11.1		54
CDPASTST	781.3631	1	16.51	780.296	76.7		56
NPLQPHPQAPP	598.3284	2	28.39	1194.6145	23.3		60
NPLQPHPQAPP	598.3284	2	29.41	1194.6145	23.3		60
p-QLGPPPRPQLPP	640.3989	2	27.71	1278.7085	58.4	Pyro-glu from Q	60
NPLQPHPQAPP	598.3284	2	29.92	1194.6145	23.3		60
PPALNHPLPPAP	659.3571	2	22.48	1316.7241	-18.7		60
SHGPPPRPQLPP	640.3989	2	28.22	1278.6833	78.1		60
PAPDLPPKFAP	575.3283	2	18.97	1148.6228	16.8		60
ASVGNVLSQHP	590.3065	2	17.82	1178.6042	-4.9		59
NPLQPHPQAPP	598.3284	2	28.9	1194.6145	23.3		59
NPLQPHPQAPP	598.3284	2	30.42	1194.6145	23.3		59
TAPVGAP	612.3582	1	23.44	611.3278	37.8		57
EPGQPDLPAPGVPP	685.883	2	28.1	1369.6877	46.5		57
NPLQHPAKPP	598.3284	2	27.88	1194.6509	-7.2		57
p-QLGPPPRPQLPP	640.3989	2	28.72	1278.7085	58.4	Pyro-glu from Q	56
p-QKLTPGGAPAGVPP	685.3574	2	28.62	1368.74	-29	Pyro-glu from Q	55
p-QKLTPGGAPAGVPP	685.3574	2	29.16	1368.74	-29	Pyro-glu from Q	52
TSTHGMFT	441.1994	2	10.87	880.3749	10.6		49
PEGQRPPGPELPP	685.883	2	27.6	1369.699	38.3		47
PLAPPVGGAPLPP	640.3989	2	27.22	1278.7336	38.7		46
TSSGLL	289.1845	2	17.59	576.3119	74		46

\*Sendo (p-Q)= presença de Ácido piroglutâmico.



**ANEXO 6- TABELA COM SEQUÊNCIAS PEPTÍDICAS OBTIDAS A PARTIR DO SEQUENCIAMENTO *DE NOVO* DOS ESPECTROS DE MASSAS GERADOS PELOS PEPTÍDEOS DE BAIXO PESO MOLECULAR DOS VENENOS SOLUBILIZADOS EM 5% DE ACN DA SERPENTE *B. atrox TUCURUÍ***

Sequências obtidas ( <i>Bothrops atrox</i> "Tucuruí" 5% acetonitrila)							
Peptídeo	m/z	Z	RT	Massa	ppm	PTM	ALC (%)
GPLHL	536.2293	1	30.24	535.3118	-167.7		87
KQPAPR	348.6869	2	14.27	695.4078	-69.8		74
p-QKLTPGPGVNVPP	692.3762	2	24.65	1382.7559	-13	Pyro-glu from Q	66
SELAK	547.3773	1	10.06	546.3013	125.8		63
MLGNLESAGHP	563.2691	2	11.09	1124.5283	-4.1		61
APVHV	522.2871	1	22.53	521.2961	-31.3		61
HAMLLGLL	434.2776	2	16.15	866.5048	41.5		58
PTDTQP	658.3264	1	11.62	657.2969	33.8		56
p-GAL	371.1919	1	18.78	370.1852	-1.6	Pyro-glu from Q	56
p-QLTPGSPPPGGAPP	692.3762	2	25.16	1382.6829	39.8	Pyro-glu from Q	55
AAPLLGRPGGAPLPP	692.3762	2	24.13	1382.8032	-47.2		51
LLPGLLPRENAPP	693.8679	2	22.81	1385.803	-58.9		50

\*Sendo (p-Q)= presença de Ácido piroglutâmico.

**ANEXO 7- TABELA COM SEQUÊNCIAS PEPTÍDICAS OBTIDAS A PARTIR DO SEQUENCIAMENTO *DE NOVO* DOS ESPECTROS DE MASSAS GERADOS PELOS PEPTÍDEOS DE BAIXO PESO MOLECULAR DOS VENENOS SOLUBILIZADOS EM 10% DE ACN DA SERPENTE *B. atrox TUCURUÍ***

Sequências obtidas ( <i>Bothrops atrox</i> "Tucuruí" 10% acetonitrila)							
Peptídeo	m/z	Z	RT	Massa	ppm	PTM	ALC (%)
GPLHL	536.2327	1	30.65	535.3118	-161.4		84
TELLPAV	742.3652	1	16.11	741.4272	-93.5		73
PYLVLGT	381.7169	2	17.93	761.4323	-17.1		68
p-KWPRSVPLP	644.3734	2	25.31	1286.7134	14.6	Pyro-glu from Q	67
EDDDPP	687.3069	1	26.1	686.2395	87.6		64
NSGATD	564.2536	1	10.95	563.2187	49.1		63
NPLEPGPRGTRPP	694.3624	2	23.12	1386.7368	-19.1		60

ALADGSC	636.3412	1	18.94	635.2585	118.8		57
APVVH	522.2871	1	22.41	521.2961	-31.3		56
AAPLTPGPRPNVPP	692.3735	2	25.57	1382.7671	-25.1		54
TDLAK	547.3734	1	9.9	546.3013	118.6		54
AAPLTPGPRPNVPP	692.3735	2	24.54	1382.7671	-25.1		54
TSLKP	545.2669	1	17.85	544.322	-114.6		53
AAPLTPGPGVPNVPP	692.3735	2	25.05	1382.7559	-17		53
KVLLL	293.2601	2	12.97	584.4261	136.2		52
APLDGVP	668.3309	1	28.08	667.3541	-45.6		51
p-KLTPGAAGSLPAPP	694.3739	2	22.63	1386.7507	-12.6	Pyro-glu from Q	51
TCFL	242.1429	2	17.43	482.2199	106.5		50
EEDYLKGV	527.2864	2	21.87	1052.5027	52.9		47
AAPLPLALNPVPP	692.3735	2	24.03	1382.7922	-43.3		47
TQH	193.1424	2	14.46	384.1757	245.9		47
TLLLAH	223.168	3	17.18	666.4064	113.8		46
THLL	242.1429	2	18.45	482.2853	-29		45

\*Sendo (p-Q)= presença de Ácido piroglutâmico.