

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

**ANÁLISE PROTEÔMICA DO VENENO DE
Bothrops jararaca (Viperidae)**

FRANK EDUARDO DE MORAES REGO FAIRBAIRN COELHO

**Rio de Janeiro
Junho 2009**



ANÁLISE PROTEÔMICA DO VENENO DE *Bothrops jararaca* (Viperidae)

Frank Eduardo de Moraes Rego Fairbairn Coelho

**Dissertação de Mestrado apresentada
ao programa de pós-graduação em
bioquímica, Instituto de Química, da
Universidade Federal do Rio de
Janeiro, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do título de
mestre em bioquímica.**

**Orientadores: Dr. GILBERTO BARBOSA DOMONT
Dr. JONAS PERALES**

**Rio de Janeiro
Junho 2009**

ii



ANÁLISE PROTEÔMICA DO VENENO DE *Bothrops jararaca* (Viperidae)

Frank Eduardo de Moraes Rego Fairbairn Coelho

Orientadores: Dr. GILBERTO BARBOSA DOMONT
Dr. JONAS PERALES

Dissertação de mestrado submetida ao programa de pós-graduação em bioquímica, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre em bioquímica.

Aprovada por:

Presidentes, Prof. Gilberto Barbosa Domont

Prof. Jonas Enrique Perales Aguilar

Prof. Russolina Benedeta Zingali

Prof. Rodolpho Albano

Prof. Denise Maria Guimarães Freire

Rio de Janeiro
Junho 2009

iii

Coelho, Frank Eduardo de M. R. F.

Análise proteômica do veneno de *Bothrops jararaca* / Frank Eduardo de Moraes Rego Fairbairn Coelho. – Rio de Janeiro: UFRJ/ IQ, 2009

Orientadores: Gilberto Barbosa Domont e Jonas Perales
Dissertação (Mestrado) – UFRJ/ Instituto de Química/ Programa de Pós-graduação em Bioquímica, 2009.

1. Análise proteômica. 2. *Bothrops jararaca*.
3. Espectrometria de massas – Projeto de dissertação. I. Domont, Gilberto Barbosa; Perales, Jonas. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química. III. Título.

Brindo a casa, brindo a vida, meus amores, minha família.

AGRADECIMENTOS

- Ao Dr. Jonas Perales, pela oportunidade de estágio neste departamento, por ser um grande orientador e incentivador. Obrigado pela paciência e dedicação, que me levaram a conseguir um crescimento profissional.
- Ao Dr. Gilberto Domont, por sempre contribuir com seu vasto conhecimento, agradeço pelo carinho e orientação.
- Ao Dr. Richard Hemmi Valente, que me ajudou a dar os primeiros passos no laboratório, assim que cheguei, sempre orientando e estando disponível nos momentos de dúvida.
- A Dra. Ana Gisele, por estar sempre me incentivando a fazer cursos, e graças a ela acabei conhecendo a área em que trabalho hoje. Obrigado, por contribuir para o meu crescimento.
- Aos colegas da “sala 7”, que acabou tornando-se um segundo lar.
- Aos colegas do laboratório de toxicologia.
- A Dra Patrícia Barbosa Jurgilas, por sempre ser uma boa amiga.
- Ao Dr. Joab, que sempre me ajudou, além de ter contribuído muito para o meu aprendizado, por ser um excelente professor, muito obrigado pela ajuda.
- Um agradecimento especial à Tia Dani e Pink, por estarem sempre disponíveis, auxiliando quando necessário e curtindo nos momentos de descontração.
- Aos amigos que fiz no mestrado, Duda, Nath, Rodrigo, Anali, Bruna, Manu e Teixeira. Certamente, nosso grupo jamais será desfeito.
- À minha família, que faz sempre com que tudo tenha sentido na minha vida, obrigado a todos vocês!

A todos, do Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica do Instituto Oswaldo Cruz da Fiocruz e do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da UFRJ, que certamente contribuíram para esta dissertação.

Ao CNPq, à FAPERJ e aos programas, PAPES e PDTIS da Fiocruz, pelo apoio financeiro.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

	Página
Gráfico 1 - Acidentes por serpentes do gênero <i>Bothrops</i> no estado do Rio de Janeiro 2001 a 2006	02
Tabela 1 - Metaloproteases isoladas do veneno da serpente <i>B. jararaca</i>	06
Tabela 2 - Desintegrinas descritas do veneno da serpente <i>B. jararaca</i>	08
Tabela 3 - Serinoproteases isoladas do veneno de <i>B. Jararaca</i>	09
Tabela 4 - Lectinas tipo C símile isoladas do veneno de <i>B. Jararaca</i>	10
Figura 1 - Componentes básicos de um espectrômetro de Massas.....	19
Figura 2 - Esquema representativo da 1ª etapa do proteoma do veneno da serpente <i>B. jararaca</i>	33
Figura 3 - Esquema representativo da 2ª etapa do proteoma do veneno da serpente <i>B. Jararaca</i>	35
Planilha 1 - Relação das faixas de pesos moleculares encontradas na análise da localização dos spots e planilha dos percentuais, após análise, utilizando o programa Image Master (Amersham Bioscience), realizada em gel de 2DE – <i>B. jararaca</i> , 1.8mg de veneno total..	37
Figura 4 - 2DE – <i>B.jararaca</i> , 1.8mg de veneno. Primeira dimensão em fitas de 18 cm pH 3-10; Segunda dimensão SDS-PAGE a 15% em condições redutoras	38
Figura 5 - 2DE – <i>B.jararaca</i> , 1.8mg de veneno. Primeira dimensão em fitas de 18 cm pH 4-7; Segunda dimensão SDS-PAGE a 15% em condições redutoras. Revelação azul de comassie. 357 spots detectados.....	39
Figura 6 - 2DE – <i>B.jararaca</i> , 1.8mg de veneno. Primeira dimensão em fitas de 18 cm pH 4-7; Segunda dimensão SDS-PAGE a 15% em condições redutoras. Revelação azul de comassie. 241 spots tripsinizados.....	40
Planilha 2 – Relação dos espectros de MS/MS obtidos, após análise por espectrometria de massas MALDI-TOF/TOF MS	41
Figura 7 – Avaliação dos espectros de acordo com a identificação e qualidade observadas	42
Figura 8 - 2DE – <i>B.jararaca</i> , 1.8mg de veneno. Os spots coloridos foram identificados após análise por MALDI-TOF/TOF MS	43
Planilha 3 - Total de spots detectados e planilha dos percentuais das famílias de proteínas encontradas na análise por espectrometria de massas por MALDI-TOF/TOF MS	53
Tabela 5 - Identificações obtidas após tripsinização dos spots do gel 2DE pH 4-7 do veneno da serpente <i>B. jararaca</i> e análise por MALDI-TOF/TOF MS	54
Figura 9 – Cromatografia do veneno de <i>B. jararaca</i> em coluna Superdex 200.....	69
Figura 10 – SDS-PAGE das frações coletadas na cromatografia por exclusão molecular em coluna de SUPERDEX 200 – tubos 26 a 43	69
Planilha 4 - Relação das faixas de pesos moleculares encontradas na análise da localização dos spots e gráfico dos percentuais após análise utilizando o programa Image Master (Amersham Bioscience) realizada no gel de 2DE dos Pools I,II e III.....	70
Figura 11 – Sobreposição dos géis 2DE, oriundos das frações cromatografias do Pool I versus Pool II	70
Figura 12 - Sobreposição dos géis 2DE, oriundos das frações cromatografias do Pool I versus Pool III	71

Figura 13 - Sobreposição dos géis 2DE, oriundos das frações cromatografias do Pool II versus Pool III	71
Figura 14 – 2DE – <i>B.jararaca</i> , exclusão molecular – POOL I pH 4-7	72
Tabela 6 – Identificação dos spots do Pool I de veneno de <i>B. jararaca</i>	73
Figura 15 - 2DE – <i>B.jararaca</i> , exclusão molecular – POOL II pH 4-7	75
Tabela 7 - Identificação dos spots do Pool II de veneno de <i>B. jararaca</i>	76
Figura 16 - 2DE – <i>B.jararaca</i> , exclusão molecular – POOL III pH 4-7	77
Tabela 8 - Identificação dos spots do Pool III de veneno de <i>B. jararaca</i>	78
Planilha 5 - Total de spots detectados e planilha dos percentuais das famílias de proteínas encontradas na análise por espectrometria de massas dos Pools I, II e III do veneno de <i>B. jararaca</i> por MALDI-TOF/TOF MS e LC-ESI ION-TRAP	79

LISTA DE ABREVIÇÕES

- 2DE - Eletroforese Bidimensional
- ACE – Enzima Conversora de Angiotensina
- BFB – Azul de Bromofenol
- BPP – Peptídeos Potenciadores de Bradicinina
- BSA – Soro Albumina Bovina
- CHAPS – Propanosulfonato de 3-[(3-cloroamidopropil)-dimetilamônio]
- DTT – Ditioneitol
- ESI – Ionização por Electrospray
- FAB – Fator Antibotrópico
- HPLC – Cromatografia Líquida de alta eficiência
- IAA - Iodoacetamida
- IEF - Focalização Isoelétrica
- IPG – Gradiente de pH imobilizado
- kDa – Quilodalton
- LAO – L-aminoácido Oxidase
- MALDI-TOF - Espectrometria de Massas baseada na Ionização por Desorção a Laser Auxiliada por Matriz (MALDI), e Análise por Tempo de Vôo (TOF)
- MMP - Metaloprotease de Matriz
- PCR - Reação de Polimerase em Cadeia
- PLA₂ - Fosfolipase A₂
- PMF – Peptide Mass Fingerprinting (Impressão digital por mapa de peptídeos)
- SDS- PAGE - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida usando Dodecilsulfato de Sódio
- SVMP - Metaloprotease de Veneno de Serpentes
- SVSP – Serinoprotease de Venenos de Serpentes
- TCA – Ácido Tricloroacético
- v/v – Relação volume por volume
- vWF – Fator de Von Willebrand

SUMÁRIO

	Página
Lista de figuras e tabelas	vii
Lista de abreviações	ix
Resumo	xi
Abstract	xii
I. Introdução	01
1. Classificação da Serpente <i>Bothrops jararaca</i>	01
2. Epidemiologia.....	01
3. Sintomatologia do envenenamento por serpentes.....	03
4. Características gerais dos venenos botrópicos....	04
4.1 Metaloproteases de venenos de serpentes (SVMPs).....	05
4.2 Desintegrinas.....	07
4.3 Serinoproteases de veneno de serpentes (SVSPs)	08
4.4 Lectinas do tipo C e símile.....	09
4.5 Peptídeos potenciadores de bradicinina (BPPs).....	10
4.6 Fosfolipases A ₂ (PLA ₂).....	11
4.7 L- aminoácido oxidases (LAOs).....	12
4.8 Proteínas ricas em cisteínas (CRISPs).....	12
4.9 Fatores de crescimento de nervos (FCNs).....	13
5. Terapia antiveneno.....	13
6. Venenos como ferramentas farmacológicas.....	14
7. Proteoma.....	16
8. Análise proteômica do veneno da serpente <i>Bothrops jararaca</i>	17
8.1 Banco de ESTs.....	17
8.2 Técnicas proteômicas utilizadas neste trabalho	18
8.2.1 Eletrofose bidimensional (2DE)	18
8.2.2 Identificação das proteínas por espectrometria de massa	19
9. Breve resumo de abordagens proteômicas já realizadas.....	24
II. Objetivos	28
III. Material e Métodos	29
1. Veneno da serpente <i>B. jararaca</i> utilizado	29
2. Cromatografia por exclusão molecular.....	29
3. Precipitação com ácido tricloroacético (TCA).....	29
4. Eletrofose em gel de poliacrilamina em presença de SDS (SDS-PAGE).....	30
5. Eletrofose 2D, revelação dos géis e da imagem obtida.....	30
6. Tripsinização dos spots.....	31
7. Análise por espectrometria de massa.....	32
IV. Resultados e Discussão	36
V. Conclusões	81
VI. Bibliografia	83

A serpente *Bothrops jararaca* (Viperidae) é predominante no Brasil, onde os acidentes ofídicos continuam a representar um problema de saúde pública. No Sudeste do Brasil a serpente *B. jararaca* é responsável por cerca de 90% dos acidentes ofídicos. Venenos de serpentes da família dos Viperídeos contêm proteínas que causam distúrbios hemostáticos, podendo causar efeitos locais ou sistêmicos.

O objetivo deste trabalho foi elucidar o perfil proteômico do veneno de *B. jararaca*, apresentando um mapa de referência preliminar para proteínas e peptídeos, estabelecendo desta forma, uma base para estudos comparativos de outros proteomas de venenos de serpentes.

Em função da complexidade do perfil do veneno, foram empregadas diferentes abordagens proteômicas, como: Fracionamento do veneno de *B. jararaca* por eletroforeses uni (SDS-PAGE) e bidimensional (2DE), utilizando diferentes condições e faixas de pH, seguido de identificação das cadeias polipeptídicas por espectrometria de massas (LC-ESI-ION-TRAP e MALDI-TOF-TOF) e subfracionamento por exclusão molecular, do veneno, previamente ao uso da 2DE e análise por espectrometria de massas.

Inicialmente as análises dos géis de SDS-PAGE com e sem betamercapto-etanol, demonstraram o predomínio das metaloproteases (34 e 36%), respectivamente. Foram detectados 337 e 357 spots para os géis de pH 3-10NL e 4-7 respectivamente.

Na análise por espectrometria de massas dos spots, detectados no gel de pH 4-7, um total de 72 spots foram identificados sendo 40% classificados na família das metaloproteases, 40% serinoproteases, 15% lectinas tipo C símile, 3% l-aminoácido oxidases e 1% relacionado à família das CRISP.

O subfracionamento separou o veneno em 3 picos principais: Pools I, II e III detectando-se 186, 208 e 60 spots, respectivamente. Os resultados indicam o enriquecimento em diferentes regiões do gel (em comparação com todo veneno em gel), bem como o aparecimento inesperado de componentes de baixo peso molecular no Pool I, indicando que estes componentes podem existir como oligômeros e/ou que possivelmente interagem com componentes de alto peso molecular do veneno no estado nativo. Um total de 18, 18 e 14 spots foram identificados para os Pools I, II e III, respectivamente.

As estratégias proteômicas utilizadas neste estudo, como, cromatografia por exclusão molecular, eletroforese bidimensional e espectrometria de massas, mostraram ser ferramentas para separar e identificar subpopulações de toxinas, o que facilita não só a compreensão da composição protéica dos venenos, como também a busca por novas moléculas com potencial biotecnológico.

The snake *Bothrops jararaca* (Viperidae) is predominant in Brazil, where snakebites continue to be a public health problem. In southeastern Brazil the snake *B. jararaca* is responsible for 90% of snakebite. Venoms from snakes of the family Viperidae contain proteins which cause hemostatic disorders and may cause local or systemic effects.

The objective was to elucidate the proteomic profile of *B. jararaca* snake venom presenting a preliminary reference map for proteins and peptides, thereby setting a basis for comparative studies of snake venom proteomes.

Depending on the complexity of the profile of the poison, were used proteomics approaches, such as fractionation of the venom of *B. jararaca* by electrophoresis uni (SDS-PAGE) and two-dimensional (2DE) using different conditions and ranges of pH, followed by identification of polypeptide chains by mass spectrometry (LC-ESI-ION TRAP-and MALDI-TOF-TOF) and fractionation by molecular exclusion of poison, before the use of 2DE and analysis by mass spectrometry of all detected spots.

Initially, the analysis of SDS-PAGE gels with and without β -mercaptoethanol showed the predominance of metalloproteinase (34 and 36%) respectively. 337 and 357 spots for the gels of pH 3-10NL and 4-7 respectively were detected.

In the analysis by mass spectrometry of spots detected in the gel of pH 4-7, a total of 72 spots were identified and classified in 40% of the metalloproteinase family, 40% serinoproteases, 15% C type lectins, 3% l-amino acid oxidase and 1% related to the CRISP family.

The size-exclusion chromatography separated the venom into 3 main peaks: Pools I, II and III and counting spots totaled 186, 208 and 60 spots, respectively. The results indicate the enrichment in different regions of the gel (as compared to whole venom gel) as well as the appearance of unexpected low molecular weight components in the first eluting fractions (pool I), indicating that these components might exist as oligomers and/or possibly interact with high molecular weight venom components in their native state. A total of 18, 18 and 14 spots in Pools I, II and III, respectively were identified.

The strategies used in this proteomic study, such as molecular exclusion chromatography, two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry, proved to be tools to separate and identify subpopulations of toxins, which facilitates not only the understanding of the protein composition of venoms, but also to search for new molecules with biotechnological potential.

1. Classificação da Serpente *Bothrops Jararaca*

A serpente *B. jararaca* pertence à classe Reptília, ordem Squamata, sub-ordem Ophidia. Classificada na infra-ordem Caenophidia, família Viperidae, subfamília Crotalinae, gênero *Bothrops*, espécie *Bothrops jararaca* (Mebs, 1998). Com relação ao seu aparato venenoso, utilizando a morfologia de seus dentes maxilares como referência, é uma serpente solenóglifa (Méier & Stocker, 1995).

O gênero *Bothrops* compreende cerca de 19 espécies, distribuídas por todo o território brasileiro. A espécie *Bothrops jararaca* é predominante em certas regiões do Brasil, sendo encontrada no sul da Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Gomes & Puerto, 1993).

2. Epidemiologia

Os acidentes ofídicos continuam a representar um problema de saúde pública para a coletividade, pela frequência com que ocorrem e pela morbidade (vítimas acabam com deficiência física permanente) e mortalidade que ocasionam (Pardal *et al.*, 2004; Bochner & Struchiner, 2003).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o número anual de acidentes ofídicos é pouco conhecido, porque a maioria das vítimas procura o auxílio de tratamentos tradicionais, podendo inclusive morrer em casa, não sendo registrado o acidente, mas estima-se que o mesmo possa exceder a 2,5 milhões, resultando em 125 mil mortes (Stock *et al.*, 2007; Kasturiratne *et al.*, 2008).

Os maiores índices de acidentes ofídicos ocorrem, especialmente, na África, Ásia e Américas Central e do Sul, e afetam principalmente os trabalhadores rurais e crianças. A OMS define o envenenamento, como uma “doença tropical negligenciada” (Gutiérrez *et al.*, 2006; WHO, 2007).

No Brasil, ocorrem cerca de 20 mil casos de acidentes ofídicos por ano com um coeficiente de incidência de 10,4 acidentes / 100 mil habitantes (MS/FUNASA/CENEPI, 1999; Moreno *et al.*, 2005).

Aproximadamente 85% dos casos de acidentes notificados ao Ministério da Saúde são causados pelo gênero Bothrops (Ribeiro & Jorge, 1997). No Sudeste do Brasil, a serpente *B. jararaca* é responsável por 90% dos acidentes ofídicos (Vieira *et al.*, 2004), fato que se correlaciona com a abundância em que é encontrada e com a sua distribuição geográfica no Brasil.

Com relação ao gênero Bothrops, o **gráfico 1** mostra os acidentes notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), no estado do Rio de Janeiro, no período entre os anos 2001 até 2006, apresentando um total de 2380 acidentes ao longo desses anos (http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_ofidismo.pdf).

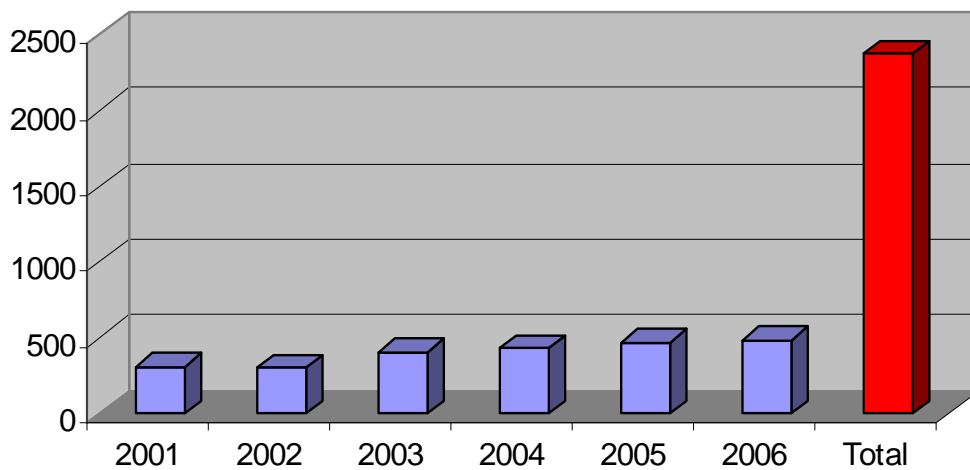


Gráfico 1 – Acidentes por serpentes do gênero Bothrops no estado do Rio de Janeiro 2001 a 2006 – Notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN

Homens são vitimados com maior frequência do que as mulheres, aproximadamente (75 e 22%), respectivamente; o que se explica pelo tipo de trabalho adotado por um e por outro sexo (geralmente trabalhadores rurais). Os membros inferiores são os mais atingidos, como observado em 75% dos casos, horário dos acidentes normalmente diurnos, ocorrendo na maioria das vezes no período de novembro a abril (Bochner & Struchiner, 2003).

3. Sintomatologia do envenenamento por serpentes

Envenenamentos por serpentes da família dos Viperídeos se caracterizam por induzir uma fisiopatologia complexa, que inclui efeitos locais e, em casos mais graves, alterações sistêmicas (Gutierrez & Lomonte, 1989).

No caso particular de venenos botrópicos, estes apresentam efeitos locais como mionecrose, hemorragias, reação de edema e dor, que são fracamente neutralizados pela soroterapia convencional antiveneno. Em casos mais severos, estes efeitos locais podem levar à perda permanente do tecido, bem como uma futura amputação (Gutierrez *et al.*, 2005).

A magnitude dos efeitos locais em envenenamentos botrópicos depende basicamente da quantidade de veneno inoculada, do tempo entre a picada e o início da soroterapia; do peso e idade do paciente; da região anatômica onde ocorreu a picada e do eventual uso de torniquete (Dos-Santos *et al.*, 1992). Mionecrosis (necrose do tecido muscular) podem ocorrer devido a dois mecanismos: a) ação direta de miotoxinas sobre a membrana plasmática de células musculares; b) indiretamente, como consequência da isquemia que se desencadeia no tecido muscular, produto de sérias alterações vasculares, como, hemorragia, trombose, lesões na parede arterial e desenvolvimento da síndrome compartimental (Gutierrez *et al.*, 2005).

Outra manifestação local importante no acidente ofídico, a hemorragia, é causada fundamentalmente por toxinas hemorrágicas ou hemorraginas, enzimas proteolíticas do tipo metaloprotease que degradam proteínas presentes na membrana basal das paredes dos vasos sanguíneos, induzindo à perda da integridade capilar, e/ou à liberação dos mediadores farmacológicos (histamina, serotonina, bradicinina) (Gutierrez & Lomonte, 1989; Gutiérrez & Rucavado, 1998).

Os venenos botrópicos também são capazes de induzir dor e hiperalgesia, fenômenos aparentemente mediados por prostaglandinas, leucotrienos, fatores de ativação plaquetária, bradicinina e/ou aminas vasoativas (Gutierrez *et al.*, 2005).

Manifestações sistêmicas são caracterizadas principalmente por distúrbios na hemostasia, caracterizados por deficiência na coagulação, alteração na agregação plaquetária e depleção de fibrinogênio (Hati *et al.*, 1999). A sequência destes eventos culmina em sangramentos de ferimentos cutâneos pré-existentes e hemorragias à distância,

como por exemplo, a gengivorragia. Pode também ser observado: sudorese, hipotensão arterial e hipotermia (Bjarnason *et al.*, 1988; Kamiguti *et al.*, 1996^a). O processo hemorrágico é muito rápido e os efeitos locais ou sistêmicos dependem das vias de administração do veneno. Picadas de profundidade intradérmicas, subcutâneas ou intramusculares produzem lesões locais, enquanto que intraperitoniais e intravenosas têm uma maior tendência a produzir hemorragias sistêmicas, com lesões em órgãos distantes do sítio injetado (Marsh, 1994). A causa mais comum de óbito é decorrente de falência renal aguda (Wen Fan & Cardoso, 1995).

4. Características gerais dos venenos botrópicos

Venenos de serpentes são misturas complexas de componentes que apresentam uma variedade de ações. A maioria desses componentes são proteínas e peptídeos, biologicamente ativos, que funcionam para matar ou imobilizar a presa, bem como para auxiliar na digestão da mesma (Serrano *et al.*, 2005).

As glândulas de veneno são tecidos altamente especializados, que possuem uma grande capacidade de produção, armazenamento e secreção do veneno. Geralmente contêm 20 ou mais diferentes classes de componentes, sendo mais de 90% de seu peso seco constituído de proteínas e peptídeos (Bjarnason & Fox, 1995). Outros componentes são cátions metálicos, carboidratos, nucleosídeos, aminas biogênicas, aminoácidos livres e lipídeos. O sódio é o cátion mais encontrado no veneno. O zinco e o cálcio estão presentes na maioria das metaloproteases atuando como co-fatores enzimáticos. Os carboidratos aparecem principalmente na forma de glicoproteínas (Markland, 1998).

De acordo com Cidade e colaboradores (2006), a análise do transcriptoma do veneno de *B. jararaca* mostrou uma clara predominância de transcritos codificados para toxinas ao invés de transcritos codificados para proteínas envolvidas em funções celulares, similarmente ao encontrado na análise transcriptômica do veneno da serpente *B. insularis* (Cidade *et al.*, 2006; Junqueira-de-Azevedo & Ho; 2002; Valente *et al.*, 2009). Dentre as toxinas encontradas, os transcritos mais frequentes foram as metaloproteases e desintegrinas, serinoproteinases, lectinas tipo C, peptídeos potenciadores de bradicinina (BPPs), fosfolipases A₂, L-aminoácido oxidases (LAOs), proteínas secretadas ricas em cisteína (CRISPs) e fatores de crescimento de nervos (svVEGF) (Cidade *et al.*, 2006).

4.1. Metaloproteases de venenos de serpentes (SVMPs)

As SVMPs são enzimas proteolíticas zinco-dependentes que pertencem à superfamília das Metzincinas. Essas proteinases contêm uma sequência conservada de ligação de zinco (HEXXHXXGXXH), seguida de uma metionina essencial à manutenção da integridade estrutural de seu sítio catalítico (“Met-turn”). Essas enzimas são inibidas por agentes quelantes, como ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e ortofenantrolina, que sequestram o zinco, inibindo, tanto a atividade proteolítica, como a atividade hemorrágica. As SVMPs são sintetizadas na glândula do veneno como zimogênios e são posteriormente processadas para a forma ativa (Fox & Serrano, 2005).

Hite e colaboradores (1994) realizaram estudos estruturais das SVMPs e classificaram-nas em 4 classes (PI – PIV), de acordo com a organização dos seus domínios estruturais (Hite *et al.*, 1994). A classe PI possui apenas o domínio metaloprotease, pouca ou nenhuma atividade hemorrágica e massas moleculares entre 20 - 30kDa; a PII, além do domínio metaloprotease, apresenta o desintegrina com massas moleculares entre 30 - 50kDa; PIII, adicionalmente, possui um domínio tipo-desintegrina, e um domínio rico em cisteína, classificadas como as mais hemorrágicas, com massas moleculares entre 50 - 80kDa, e, finalmente a classe PIV, com estrutura similar à classe PIII e com dois domínios tipo lectina adicionais, ligados por pontes dissulfeto, e massas moleculares entre 80 - 100kDa (Jia *et al.*, 1996). Os domínios pré- (sequência sinal), pró- (zimogênio) e metaloprotease são comuns a todas as metaloproteases (Hati *et al.*, 1999).

Recentemente, uma nova classificação das SVMPs foi proposta e os grupos separados nas classes: PI (P-Ia), PII (PIIa, PIIb, PIIc, PIId, D-I e PIIe) PIII (P-IIIa, P-IIIb, P-IIIc e P-IIId). O critério para esta diferença de classificação baseia-se essencialmente na presença ou ausência de diferentes domínios, tal como observado através de transcritos de RNA mensageiro (RNAm) e proteínas isoladas do veneno. Até a data, nenhum transcrito de RNAm da classe PIV foi observado e, portanto, esta classe poderia representar outra modificação pós-translacional da estrutura da classe PIII (P-IIId) (Fox & Serrano, 2008).

Em sua maioria, as SVMPs são potencialmente hemorrágicas devido a sua capacidade de degradar componentes da membrana basal e a matriz extracelular, como colágeno tipo IV, laminina, fibronectina e proteoglicanos (Gutierrez *et al.*, 2005). As hemorragias induzidas pelas SVMPs podem acontecer por dois mecanismos: a) per rhexis –

toxinas rompem a integridade das células endoteliais, por onde eritrócitos escapam; b) per diapedesis – toxinas induzem abertura das junções existentes entre as células endoteliais, por onde escapam os eritrócitos, mas não afetam a integridade das células (Gutiérrez & Lomonte, 1989). Além da hemorragia local, as SVMPs podem estar envolvidas na patogênese da mionecrose local, danos teciduais, edema e outras reações associadas à inflamação (Gutierrez & Rucavado, 2000). Na **tabela 1** são apresentadas as metaloproteases isoladas, a partir do veneno da serpente *B. jararaca*.

Proteína	Massa molecular (kDa)	Ponto isoelétrico (pI)	Classificação da metaloprotease	Atividades	Referência
Jararagina	52	4,5	PIII	Hemorrágica Inibição da agregação plaquetária	Paine <i>et al.</i> , 1992
Botropasina	48	---	PIII	Atividade proteolítica e hemorrágica	Mandelbaum <i>et al.</i> , 1982
HF1	63	---	PIII	Hemorrágica e Inibição da agregação Plaquetária	Assakura <i>et al.</i> , 1986
HF2	49	---	PIII	Hemorrágica e Inibição da agregação plaquetária	
HF3	62	---	PIII	Potencialmente hemorrágica e Inibição da agregação plaquetária	
Jararafibrase I	52	4,5	PIII		Maruyama <i>et al.</i> , 1992/1993
Jararafibrase II	21	6,5	PI	Fibrinolítica	
Jararafibrase III	20	---	PIII	Hemorrágica	
Jararafibrase IV	21	6,9	PI		
Botrolisina	24	---	PI	Hemorrágica	Tanisaki <i>et al.</i> , 1989/1998
Botrojaractivase	23	---	PI	Fibrinolítica	Berguer <i>et al.</i> , 2008

Tabela 1 - Metaloproteases isoladas do veneno da serpente *B. jararaca*.

Convém ressaltar que, similaridades entre algumas das toxinas citadas acima foram descobertas após suas sequências completas de aminoácidos serem determinadas. A sequência N-terminal da Jararafibrase I e seus produtos de degradação são idênticos a regiões análogas da Jararagina, e foi sugerido que estas podem ser a mesma molécula (Maruyama *et al.*, 2002). HF3 é a que menos apresenta homologia, com 65%, e apresenta tamanho molecular superior ao encontrado na Jararagina (Laing & Moura-da-Silva, 2005).

4.2 Desintegrinas

Foram originalmente definidas como peptídeos de baixa massa molecular (geralmente 40 - 100 aminoácidos), contendo usualmente o domínio RGD (Arginina-Glicina-Aspártico) estabilizado por pontes dissulfeto que atuam inibindo a atividade das integrinas. As integrinas são receptores da superfície celular que promovem interações célula-célula e célula-matriz extracelular (Kamiguti, 2005).

Desintegrinas contendo a sequência RGD são os melhores exemplos de inibidores plaquetários. Apresentam alta afinidade para Integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ e inibem a agregação plaquetária, pelo bloqueio da ligação do fibrinogênio e/ ou do Fator de Von Willebrand a esse receptor (Calvete *et al.*, 2005). Podem inibir a migração de neutrófilos e adesão dos mesmos ao fibrinogênio; inibem a angiogênese de tumores e metástase de células tumorais; e por último, algumas desintegrinas foram vistas induzindo a quimiotaxia pela ativação de receptores de integrinas. Desta forma, o estudo das desintegrinas pode levar ao desenvolvimento de novas drogas antitumorais, anti-trombóticas e antiinflamatórias, dentre outras possíveis aplicações (Cidade *et al.*, 2006^b).

As desintegrinas podem ser o produto da proteólise de vários precursores proteicos da classe PII das SVMPS. Estão divididas em 5 grupos estruturais, de acordo com o tamanho dos polipeptídios e o número de pontes dissulfeto; são eles:

1º grupo – Desintegrinas compostas por 49-51 aminoácidos e por 4 pontes dissulfeto.

2º grupo – Tamanho médio, com aproximadamente 70 aminoácidos e 6 pontes dissulfeto.

3º grupo – Aproximadamente 80 aminoácidos e 7 pontes dissulfeto.

As três classes anteriores são provenientes de metaloproteases da classe PII, conhecidas como as desintegrinas verdadeiras, possuindo a sequência RGD.

4º grupo – Apresentam os domínios tipo-desintegrina, apresentando a sequência XCD, com alto peso molecular, provenientes das classes PIII e PIV.

5º grupo – É composto de desintegrinas diméricas (homo e hétero-dímeros), com aproximadamente 67 aminoácidos no total, com 10 resíduos de cisteína, envolvidos na formação de quatro pontes dissulfeto intracadeias e 2 intercadeias (Fernandez *et al.*, 2005).

Na **tabela 2**, são apresentadas desintegrinas descritas do veneno da serpente *B. jararaca*.

Proteína	Grupo estrutural	Sequência	Atividades	Referência
Botrostatina	2º grupo	RGD	Inibição da agregação plaquetária	Fernandez <i>et al.</i> , 2005
Jararacina	2º grupo	RGD	Inibição da agregação plaquetária	Scarborough <i>et al.</i> , 1993 Fernandez <i>et al.</i> , 2005
Jarastatina	2º grupo	RGD	Inibição da agregação plaquetária	Coelho <i>et al.</i> , 1999
Jararina	2º grupo	RGD	Inibição da agregação plaquetária	Fernandez <i>et al.</i> , 2005
Jararagina C	4º grupo	ECD	Inibição da agregação plaquetária	Paine <i>et al.</i> , 1992 Usami <i>et al.</i> , 1994
Jaracetina	4º grupo	ECD	Inibição da agregação plaquetária	Luca <i>et al.</i> , 1995
Botrojararina (1,2 e 3)	4º grupo	ECD	Inibição da agregação plaquetária	Cidade <i>et al.</i> , 2006 ^b
Botrojararina 4	4º grupo	KCD	Inibição da agregação plaquetária	Cidade <i>et al.</i> , 2006 ^b

Tabela 2 - Desintegrinas descritas do veneno da serpente *B. jararaca*.

4.3 Serinoproteases de veneno de serpentes (SVSPs)

As SVSPs apresentam um mecanismo catalítico comum ao resto das serinoproteases, caracterizado pelo resíduo de serina que tem um papel importante na formação transitória do complexo enzima-acil, o qual é estabilizado na presença de histidina e de ácido aspártico dentro do sítio ativo. Estas são sensíveis a reagentes que modificam a serina, como fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) e diisopropilfluorofosfato (DFP) (Serrano, 1999).

Entre as SVSPs presentes no veneno botrópico, pode-se encontrar as que apresentam atividades tipo trombina e/ou fibrinolíticas. Entretanto, a maioria destas exibe atividade que leva à formação de um coágulo de fibrina anormal e nesse caso a coagulação não ocorre de fato (Markland, 1998). Algumas serinoproteases de veneno de serpente são capazes de ativar o Fator V de coagulação, a proteína C, o plasminogênio e as plaquetas (Saguchi *et al.*, 2005). Na **tabela 3**, são apresentadas SVSPs isoladas do veneno da serpente *B. jararaca*.

Proteína	Massa molecular (kDa)	Ponto isoelétrico (pI)	Atividades	Referência
Botrombina	35	5.5	Agregação plaquetária e atividade fibrinogenolítica	Nishida et al., 1994
PA-BJ	30	9,0	Agregação plaquetária	Serrano et al., 1995
BPA	25	3.5	Proteolítica	Murayama et al., 2003
KN-BJ1	38	4.5-4.7	Atividade coagulante	Serrano et al., 1998
KN-BJ2	39	4.3-4.7		
TL-BJ1	30	---	Atividade coagulante e fibrinogenolítica	Serrano et al., 2000
TL-BJ2	31	---		
TL-BJ3	32	---		
Jararassina-I	30	Entre 7.4 e 7.8	Atividade coagulante e fibrinogenolítica	Vieira et al., 2004

Tabela 3 - Serinoproteases isoladas do veneno da serpente *B. jararaca*.

4.4 Lectinas do Tipo C e símile.

Existem duas grandes classes de moléculas, relacionadas a lectinas em venenos de serpentes:

a) as lectinas verdadeiras, geralmente homodiméricas e com atividade ligante de açúcares (normalmente galactose) de forma cálcio dependente;

Descrita por Ozeki e colaboradores (1994), a *B. jararaca* lectina é um exemplo destas lectinas tipo C. Homodimérica, composta de duas subunidades de 14 kDa, de ligação à galactose, que causa hemaglutinação cálcio-dependente, mas não induz à agregação plaquetária, na presença, ou ausência de cálcio e vWF (Ozeki *et al.*, 1994).

b) as lectinas tipo C símile, que possuem atividade anticoagulante e são capazes de modular a atividade plaquetária, efeitos que as lectinas tipo C verdadeiras não apresentam, mas que não ligam açúcares. As sequências de aminoácidos das subunidades das lectinas tipo C símile são 15-40% idênticas, ao domínio que reconhece o carboidrato das lectinas tipo C verdadeiras, mas, não ligam carboidrato e, portanto, não são consideradas lectinas verdadeiras (Lu *et al.*, 2005).

As lectinas do tipo C símile podem ser divididas em 4 grupos, de acordo com a sua característica de ligação e sua atividade biológica;

1) Inibição da conversão de protrombina em trombina, pela ligação aos fatores de coagulação IX e X;

- 2) Inibição direta da ação da trombina e protrombina;
- 3) Inibição da agregação plaquetária devido à ligação da glicoproteína Ib (GPIb) presente na superfície das plaquetas;
- 4) Estimulação da agregação plaquetária;

Na **tabela 4**, são apresentadas lectinas tipo C símile isoladas do veneno da serpente *B. jararaca*.

Proteína	Massa molecular (kDa)	Ponto isoelétrico (pI)	Grupo de lectina tipo C-símile	Atividades	Referência
Botrocetina	30	4.6	4	Estimula agregação plaquetária Ligação ao fator de Von Willebrand	Usami et al., 1983
GPIb-BP	30	---	3	Inibe agregação plaquetária	Kawasaki et al., 1996
Botrojaracina (BJC)	27	4.2	2	Inibe agregação plaquetária Inibe a conversão de protrombina em trombina	Zingali et al., 1993
Jararaca IX/X-bp	30	---	1	Inibe a conversão de protrombina em trombina	Sekyia et al., 1993

Tabela 4 – Lectinas tipo C símile isoladas do veneno da serpente *B. jararaca*.

4.5 Peptídeos Potenciadores de Bradicinina (BPPs)

Os **BPPs** são uma classe de inibidores naturais da enzima conversora da angiotensina (ECA), que apresentam efeito anti-hipertensivo (Fernandez *et al.*, 2004).

A ECA é expressa em células endoteliais, epiteliais e neuroepiteliais e está envolvida na regulação da pressão sanguínea, devido à sua dupla ação, bloqueia a liberação da angiotensina II e inativa o peptídeo hipotensivo Bradicinina. Rocha e Silva e colaboradores (1949) descobriram que a Bradicinina, um peptídeo hipotensivo, é produzido quando o veneno da serpente *B. jararaca* é injetado na circulação sanguínea de mamíferos (Rocha e Silva *et al.*, 1949).

Em 1965, foi descoberto por Ferreira e colaboradores que o veneno não só gerava bradicinina, mas, também apresentava grande atividade nos efeitos hipotensivos, devido à formação dos BPPs (Ferreira *et al.*, 1970).

Já na década de 80, os BPPs foram essenciais para o desenvolvimento do primeiro inibidor comercial da ECA, o Captopril, um fármaco utilizado para o tratamento da hipertensão humana que domina o mercado internacional, com um faturamento anual de US\$ 5 bilhões de dólares (Ondetti & Cushman, 1981).

Murayama e colaboradores (1997) demonstraram a existência de um precursor dos peptídeos potenciadores de bradicinina na glândula do veneno de *B. jararaca* (Murayama *et al.*, 1997). Esse precursor contém 7 cópias de BPPs, arranjados em uma sequência em rosário, possuindo ainda na sequência C-terminal um peptídeo de 22 aminoácidos, homólogo ao peptídeo natriurético tipo -C (CNP). Mais de 18 BPPs do veneno de *B. jararaca* já foram descritos na literatura (Ianzler *et al.*, 2004).

4.6 Fosfolipases A₂ (PLA₂)

PLA₂ são enzimas cálcio dependentes, lipolíticas que clivam especificamente a ligação sn-2-acyl dos fosfolipídios, para produzir quantidades equimolares de lisofosfatídeos e ácidos graxos livres, principalmente o ácido araquidônico. Estão associadas a inúmeros efeitos farmacológicos e/ou tóxicos, podendo desencadear danos musculares, neurológicos, atividade anticoagulante e inflamação (Lizano *et al.*, 1997). Elas foram classificadas em 10 grupos (I-X), de acordo com suas estruturas primárias e localizações das pontes de enxofre. As PLA₂ de venenos de serpentes da família *Viperidae* estão classificadas dentro do grupo II (Balsinde *et al.*, 1999). Estas ainda podem ser subdivididas em: PLA₂ D49, com um resíduo de ácido aspártico num dos sítios de ligação ao cálcio e com potente ação enzimática e mionecrótica; e em PLA₂ K49, que possuem uma lisina na posição 49 e apresentam pouca ou nenhuma atividade enzimática, mas ativas na indução de mionecrose, por mecanismos ainda não completamente elucidados (Ownby *et al.*, 1999).

O veneno de *B. jararaca* apresenta uma baixa atividade fosfolipásica quando comparado com outros venenos botrópicos como, *B. moojeni*, *B. jararacussu*, *B. neuwiedi* e *B. pradoi* (Moura-da-Silva *et al.*, 1991). Moura-da-Silva e colaboradores (1991), isolaram 4 frações com peso molecular de aproximadamente 15 kDa, com diferentes atividades fosfolipásica e miotóxica, sendo estas frações denominadas **JAR 10, 11, 12 e 13**. As

frações JAR 11 e 12 apresentaram maior atividade fosfolipásica, enquanto a JAR 10 e 13 apresentaram maior atividade miotóxica (Moura-da-Silva *et al.*, 1991).

Uma fração com atividade fosfolipásica que inibe a agregação plaquetária foi descrita por Zingali e colaboradores (Zingali *et al.*, 1990). Serrano e colaboradores (1999), purificaram e caracterizaram esta fração, denominada de **BJ-PLA2**, como um fator de inibição da agregação plaquetária induzida tanto por colágeno como por ADP, que apresentou 124 aminoácidos, sendo pertencente à classe II das PLA2 (Serrano *et al.*, 1999).

4.7 L-aminoácido oxidases (LAOs)

LAOs são flavoenzimas que catalisam a deaminação oxidativa de um L-aminoácido no correspondente cetoácido, com a produção de peróxido de hidrogênio e amônia. As enzimas L-aminoácido oxidases são encontradas em diferentes organismos, tais como: bactérias, fungos, algas verdes e em venenos de serpentes, sendo nesses últimos, responsáveis por sua cor amarela (Du & Clemetson., 2002). A função de LAOs de venenos de serpentes ainda não está totalmente esclarecida, entretanto, estudos mostram que essas enzimas apresentam importantes atividades biológicas, como as apoptóticas, citotóxicas, hemorrágicas, bactericidas e de indução ou inibição de agregação plaquetária (Daltry *et al.*, 1996; Du & Clemetson., 2002).

LAOs de venenos de serpentes são, geralmente, glicoproteínas homodiméricas com peso molecular próximo de 110 kDa a 150 kDa, determinados por filtração em gel, sob condições não desnaturantes e com massa molecular de 50 kDa a 70 kDa em SDS-PAGE, em condições redutoras e não redutoras, respectivamente, normalmente apresentam-se como homodímeros associados não covalentemente (Du & Clemetson., 2002).

Até o presente momento, não foram purificadas LAOs dos venenos da serpente *B. jararaca*, mas os resultados da análise transcriptômica do veneno da mesma encontraram uma pequena porção dessas enzimas nos clusters analisados (Cidade *et al.*, 2006).

4.8 Proteínas ricas em resíduos de cisteína (CRISPs)

Estas proteínas foram primeiramente encontradas em epididimos de mamíferos e são expressas em diversos organismos e tecidos (Kierszenbaum *et al.*, 1981). São

amplamente distribuídas em venenos de serpentes; consistem em uma cadeia polipeptídica com massa molecular de 20 a 30kDa, compreendendo 16 resíduos de cisteína, que formam 8 pontes de sulfeto. Entretanto, pouca informação sobre o mecanismo de ação dessas proteínas no envenenamento é conhecido. Até agora, dois tipos de atividades foram encontrados: a inibição da contração de musculatura lisa e o bloqueio de canais de íons (Yamazaki & Morita, 2004).

4.9 Fatores de crescimento de nervos (NGF)

São proteínas solúveis que regulam a sobrevivência, crescimento e plasticidade morfológica dos neurônios, ou que atuam na síntese de proteínas importantes para funções diferenciadas destas células. Os FCNs encontrados nos venenos da serpente *B. jararaca* possuem massa molecular de aproximadamente 15 kDa, destituídos de carboidratos. Apresentam como efeito biológico mais característico um aumento na permeabilidade vascular (Junqueira de Azevedo *et al.*, 2002). Entretanto, ainda pouco se sabe em relação à atividade e à função destas moléculas no veneno.

Cabe ressaltar que nem todas as proteínas listadas acima, **SVMPs e desintegrinas, SVSPs, lectinas tipo C, BPPs, PLA₂, LAOs, CRISPs e svVEGF** estão presentes no veneno de diferentes espécies e podem variar bastante no veneno de indivíduos da mesma espécie, devido a fatores como: distribuição geográfica, dieta, sazonalidade, habitat, dimorfismo sexual e idade (Cidade *et al.*, 2006).

5. Terapia antiveneno

A preocupação com o envenenamento ofídico e seu tratamento é bem antiga. Phisalix (Phisalix & Bertrand, 1894) e Calmette (Calmette, 1894) constataram, na mesma época, que um animal poderia ser protegido contra o envenenamento, se recebesse soro de outros animais que haviam sido previamente imunizados com o veneno. No entanto, Calmette (1984) foi o primeiro a utilizar o antiveneno no tratamento de pacientes picados por serpentes. Após verificar que a substância tinha ação curativa contra a peçonha, deu-se início à fabricação do primeiro soro antiofídico, em Lile, na França. Até hoje, o único tratamento efetivo para o envenenamento sistêmico por serpentes é a administração intravenosa de soro antiofídico. A produção de soro antiofídico foi iniciada no Brasil por

Vital Brazil, no início do século 20. Foi em 1901, no Instituto Serumtherapico do Estado de São Paulo (atual Instituto Butantan) que Vital Brasil demonstrou pela primeira vez que o soro preparado contra veneno de jararaca era ineficiente em neutralizar os efeitos provocados pelo envenenamento com cascavel, comprovando assim que os antivenenos são, pelo menos, gênero-específicos, o que contrariava a teoria original de Calmette (Wen & Cardoso, 1995). Os antivenenos hoje em dia são produzidos no Brasil, pelo Instituto Butantan (São Paulo), Instituto Vital Brazil (Rio de Janeiro) e Fundação Ezequiel Dias (Minas Gerais), sendo distribuídos gratuitamente pelo Ministério da Saúde para os hospitais em todo o país (Cardoso *et al.*, 1993).

Soros antiofídicos são preparados a partir do soro de animais de grande porte, usualmente cavalos, hiperimunizados com um único veneno (ou variedade deles), que contêm numerosas moléculas, muitas delas não tóxicas. Conseqüentemente, os soros antiofídicos contêm numerosos anticorpos desnecessários, que diluem a ação efetiva dos anticorpos específicos antitoxinas (Harrison *et al.*, 2002).

A terapia antiveneno é normalmente o único tratamento aceito para envenenamentos por picadas de serpentes. Entretanto, apresenta reduzida ação para o potente dano local causado pelo envenenamento (Gutierrez *et al.*, 1998). Desta forma, metodologias alternativas são necessárias, para complementar os soros antiofídicos e tratar as lesões locais.

6. Venenos como ferramentas farmacológicas

Venenos de serpentes têm sido caracterizados como uma rica fonte de enzimas, entre os animais venenosos, demonstrando uma variedade de atividades biológicas (Tan & Ponnudurai, 1992).

Pesquisas com toxinas de origem animal têm contribuído para a compreensão, por exemplo, dos problemas vasculares, processos inflamatórios, mecanismos de dor e processos alérgicos, dentre outros (Hayashi & Camargo, 2005).

Existem vários exemplos relacionando a pesquisa básica nesta área à produção de novos fármacos, como recentes pesquisas sobre drogas anti-trombóticas desenvolvidas a partir de venenos de serpentes pela Genetech (EUA) (March & Willians, 2005).

Drogas anticonvulsivantes foram geradas a partir de neurotoxinas, presentes no veneno de serpentes do gênero *Dendroaspis* (Mambas) (Hayashi & Camargo, 2005).

Um novo analgésico, obtido a partir do veneno da cobra cascavel, tem um poder de aliviar a dor 600 vezes maior que a morfina, um dos mais conhecidos medicamentos do gênero. Obtida pelo Centro de Toxicologia Aplicada (CAT) a nova substância não causa dependência física, como a morfina, já que age em receptores diferentes. A substância, já testada e aprovada em ratos de laboratórios, deverá ser mais eficaz do que os analgésicos hoje existentes para aliviar dores crônicas provocadas por doenças como o câncer (<http://www.inova.unicamp.br/inventabrasil/camargo.htm>).

Evasin (Endogenous Vasopeptidases Inhibitors), com ação anti-hipertensiva, é um fármaco inovador desenvolvido também pela equipe do CAT do Instituto Butantã, a partir do veneno de *B. jararaca*. Apresenta como uma de suas grandes vantagens o fato de provocar menos efeitos colaterais. Além disso, a atividade do Evasin é mais seletiva que a do famoso Capoten (marca da Squibb para o Captopril), podendo tornar-se um forte concorrente deste medicamento, que rende anualmente US\$ 5 bilhões de faturamento à Squibb (<http://www.inova.unicamp.br/inventabrasil/camargo.htm>).

Diversos trabalhos na área de hemostasis têm sinalizado a contribuição das toxinas de venenos de serpentes na pesquisa básica da coagulação, contribuindo para o desenvolvimento de reagentes para diagnóstico e também para tratamento das desordens hemostáticas (March & Willians, 2005).

Botrocetina[®] (Pentapharm) é uma proteína aglutinadora de plaquetas, encontrada em altas concentrações no veneno de *B. jararaca*. Em virtude de que esta lectina requer vWF para seu efeito em plaquetas, essa propriedade foi utilizada em ensaios de quantificação de vWF (Brinkhouse *et al.*, 1988).

Reptilase, uma serinoprotease encontrada em dois venenos botrópicos (*B.jararaca* e *C.atrox*), é comumente utilizada no diagnóstico laboratorial da desfibrinogenemia, que é a condição clínica em que o nível de fibrinogênio está diminuído no organismo (March & Willians, 2005).

O veneno de *B. jararaca* foi capaz de inibir o crescimento de vários fungos como, *Cândida albicans*, *Sacharomices cerevisiae*, dentre outros. Um peptídeo classificado como de ação antimicrobiana (AMPs); foi assim denominado como PepBj, que apresentou massa

molecular de 1370 Da, confirmado após triagem do veneno de serpente por MALDI-TOF-MS (Gomes *et al.*, 2005).

Além destas funções, *B. jararaca* é uma serpente cujo veneno foi capaz de inibir o crescimento de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, causando inchamento mitocondrial e morte celular programada (apoptosis) ou necrosis. Observou-se que o crescimento do parasita foi inibido após o tratamento com veneno (10µg/ml) (Deolindo *et al.*, 2005).

Cabe ressaltar também que o veneno derivado de serpentes da família dos Viperídeos também demonstrou ter eficácia na redução de tumores (Marcinkiewicz *et al.*, 2003). Os inibidores de integrinas, as desintegrinas, são peptídeos ricos em cisteína; geralmente derivados do processamento enzimático de metaloproteases e estão presentes nos venenos de serpentes. Possuem a capacidade de ligar-se especificamente à integrinas envolvidas em interações célula-célula e célula-matriz, inibindo desta forma, processos essenciais para o desenvolvimento tumoral como proliferação celular, angiogênese e metástase (Calvete *et al.*, 2005).

Foi descrito que a jarastatina (Coelho *et al.*, 1999) foi capaz de inibir a colonização pulmonar nas células metastáticas de melanoma (Oliva *et al.*, 2007).

Foi analisado pelo Instituto Butantan o efeito da jararagina (Paine *et al.*, 1992) na morfologia, adesão, migração e invasão celular de células de melanoma. Apresentou uma importante redução nas metástases (<http://www.inova.unicamp.br/inventabrasil/camargo.htm>). Desta forma, a elucidação dos perfis proteômicos específicos dos venenos de serpentes podem apresentar grandes aplicações na medicina.

7. Proteoma

O termo proteoma foi introduzido, em 1995, para descrever todas as proteínas que são expressas por um genoma (Anderson *et al.*, 1996; Wilkins *et al.*, 1996). Enquanto o genoma representa a soma de todos os genes de um indivíduo, sendo, praticamente o mesmo durante toda a sua vida, o proteoma não é uma característica fixa e pode ser definido como, o conjunto das proteínas expressas por um organismo, tecido ou célula em um dado momento (Wilkins *et al.*, 1996).

Proteômica é o conjunto de técnicas desenvolvidas para identificar, quantificar e estudar o complexo arranjo espacial e modificações pós-traducionais das proteínas obtidas de uma célula, tecido ou mesmo um organismo (Wilkins *et al.*, 1997).

Os resultados de uma análise proteômica podem ser alterados, dependendo do estado de desenvolvimento do organismo (idade), tecido (íntegro ou lesado) ou mesmo das condições nas quais o indivíduo se encontra (fatores ambientais). Investigar diretamente o produto dos genes é uma forma de estudar doenças e qualquer problema biológico complexo (Wilkins *et al.*, 1996).

Em suma, proteômica pode ser vista como uma metodologia que tem como objetivo documentar a distribuição geral de proteínas da célula, identificar e caracterizar proteínas individuais de interesse e, principalmente, elucidar as suas associações e funções (Anderson & Anderson, 1996; Celis *et al.*, 1996; Wilkins *et al.*, 1996; Wilkins *et al.*, 1997).

Nos projetos proteômicos um dos objetivos é separar e visualizar o máximo de proteínas de uma determinada fonte. A eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (2DE) em conjunto com a espectrometria de massas são duas das tecnologias mais usadas atualmente para a análise proteômica. A 2DE é aplicada para separação, detecção e quantificação das proteínas; e a espectrometria de massas é utilizada para identificação, quantificação e determinação de modificações pós-traducionais e interações moleculares das proteínas, com o auxílio fundamental de ferramentas de bioinformática.

Quanto mais dados são gerados a partir de análises de transcriptomas e proteomas de venenos de serpentes, mais se ganha na apreciação da sua complexidade. A complexidade do veneno, no entanto, é derivada não só da estrutura genômica, mas da soma dos dados obtidos do transcriptoma com as modificações pós-traducionais observadas na análise proteômica do veneno (Fox & Serrano, 2008).

8. Análise proteômica do veneno da serpente *Bothrops jararaca*

8.1 Banco de ESTs

No sentido de efetuar o Proteoma de *B. jararaca*, foi utilizado um banco de “Expressed Sequence Tag” (ESTs), gerados a partir da glândula de veneno de *B. jararaca*, com o apoio do Laboratório de Genômica da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (Cidade *et al.*, 2006).

8.2 Técnicas proteômicas utilizadas neste trabalho

8.2.1 Eletroforese bidimensional (2DE)

A técnica de eletroforese bidimensional foi descrita originalmente, na década de 70, por O' Farrel (O' Farrell, 1974) e seu uso esteve limitado até pouco tempo, devido principalmente à baixa reprodutibilidade dos géis gerados, assim como a inexistência de técnicas eficientes para identificar as proteínas separadas. Com o surgimento da técnica de gradiente de pH imobilizado (IPG) (Bjellqvist *et al.*, 1982), conseguiu-se uma maior reprodutibilidade dos géis bidimensionais. Esta técnica, associada à espectrometria de massas, permitiu que as proteínas pudessem ser identificadas em concentrações femtomolares (10^{-15} M) (Fey & Larsen, 2001).

A 2DE combina duas técnicas de separação: a primeira separação (primeira dimensão) é a focalização isoelétrica (IEF); e a segunda dimensão é a eletroforese em gel de poliacrilamida, chamada de SDS-PAGE. Na IEF, as proteínas ou cadeias polipeptídicas são separadas em um campo elétrico, em um gradiente de pH, imobilizado em gel de poliacrilamida, onde as proteínas ou suas subunidades movimentam-se até alcançarem o pH correspondente a seu ponto isoelétrico (pI) e a carga líquida da molécula é zero. Há diversas faixas de pH disponíveis, desde ampla (3-10), como faixas estreitas (4 – 5, 5 – 5,6), sendo essa flexibilidade na escolha das faixas de pH, de grande utilidade, para separar eficientemente o maior número de proteínas possível e aumentar a focalização das proteínas da amostra.

Na segunda dimensão, as cadeias polipeptídicas são separadas por seu volume molecular, em gel de poliacrilamida, contendo o detergente dodecil sulfato de sódio (SDS). A mobilidade eletroforética se dá de acordo com o tamanho da cadeia polipeptídica, sendo restringida pelo poro da matriz de poliacrilamida, de forma que as cadeias polipeptídicas migrem a uma velocidade, inversamente proporcional ao seu tamanho. As manchas (“spots”) geradas, correspondem às diferentes espécies de subunidades ou cadeias polipeptídicas presentes na amostra, e a qualidade e quantidade relativa de cada espécie podem ser determinadas, através da revelação do gel com corantes e posterior densitometria (Anderson & Anderson, 1996).

Com relação aos métodos de coloração para proteínas, os mais usados são a coloração por azul de Coomassie e impregnação por prata sem o uso de formaldeído e

glutaraldeído (protocolo compatível com Espectrometria de massas), devido ao custo, facilidade de uso e compatibilidade com métodos de caracterização microquímica, como sequenciamento automático de aminoácidos e espectrometria de massas.

Assim, a 2DE é um método de separação eficiente, em que a maioria das proteínas de uma amostra são separadas, simultaneamente, fornecendo informações úteis sobre pI, massa molecular, expressão e abundância relativa, além de poder indicar modificações pós-traducionais pela alteração da mobilidade eletroforética (Anderson & Anderson, 1996).

8.2.2 Identificação das proteínas por espectrometria de massa

A identificação de cada “spot” do gel de poliacrilamida bidimensional, devidamente revelado pela técnica de coloração, coomassie ou prata, é feita através de uma estratégia ímpar que conjuga a precisão com elevada sensibilidade, acurácia e rapidez de resposta. Nesta abordagem, as proteínas são digeridas enzimaticamente (normalmente tripsinizadas) e sua identidade determinada por espectrometria de massas. (Steen & Mann, 2004).

A espectrometria de massas baseia-se na determinação precisa da massa molecular de íons em fase gasosa. O avanço da técnica possibilitou aplicações no estudo de proteínas, como, a determinação precisa da massa molecular, a quantificação de cisteínas, a localização de pontes dissulfeto, a determinação de modificações pós-traducionais, a determinação da sequência de aminoácidos e, principalmente, a identificação de proteínas (Larsen & Roepstorff, 2000). Os componentes básicos do espectrômetro de massas (Figura 1) são a fonte de íons (responsável pela introdução de cargas e volatilização da amostra), o analisador (separa os íons de acordo com a relação massa/carga) e o detector (transforma a corrente de íons em sinais elétricos que são processados) (Steen e Mann, 2004).

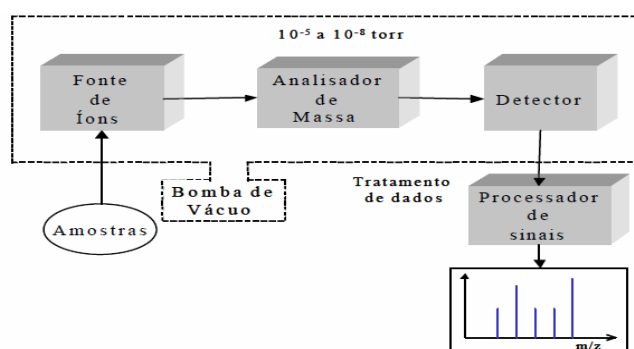


Figura 1 – Componentes básicos de um espectrômetro de massa (http://www2.dbd.puc-rio.br/pergamum/tesesabertas/0124802_03_cap_02.pdf).

Os tipos de fontes de íons mais comuns são: Eletrospray e MALDI (Ionização/Dessorção a Laser Assistida por Matriz), e os analisadores do tipo tempo de voo (TOF), “ion trap”, quadrupolo, FT e seus híbridos como o orbitrap (Steen & Mann, 2004).

Os primeiros experimentos, usando a técnica ionização por “eletrospray”, foram realizados por Chapman no final da década de 30 (Chapman, 1937); entretanto a utilização da técnica de “eletrospray”, como um método prático, ionizando a amostra para a espectrometria de massas, foi desenvolvida por Dole e colaboradores (Dole *et al.*, 1970). O trabalho de Dole consistiu em definir os parâmetros experimentais básicos, além de incluir com sucesso a ionização de amostras com alto peso molecular. A observação mais importante foi a do fenômeno das múltiplas cargas, descrito por Fenn e Mann, na década de 80, criando o modelo moderno da técnica de espectrometria de massas por ionização por eletrospray (ESI/MS) (Fenn *et al.*, 1989).

A espectrometria de massas calcula a massa da amostra, utilizando a relação de massa/carga (m/z). A ionização por “eletrospray” gera íons com múltiplas cargas. Desta forma, os valores de massa/carga observados devem ser multiplicados pela carga que esta relacionada ao número de prótons, podendo assim calcular a massa molecular de um dado peptídeo (Steen & Mann, 2004).

Podemos encontrar acoplado ao espectrômetro de massas de ionização por “eletrospray” um cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC), normalmente com colunas capilares em microescala, de diâmetros de 50 a 150 μ m, em uma coluna de fase reversa. Os peptídeos que são gerados pela digestão de proteínas não são introduzidos diretamente no espectrômetro de massas e, sim, nas colunas hidrofóbicas do HPLC de fase reversa. Peptídeos mais hidrofílicos são pouco retidos na coluna, sendo eluídos rapidamente, e os mais hidrofóbicos são retidos. Quando os peptídeos saem da coluna do HPLC, de fase reversa, estes fluem por uma agulha, são vaporizados e subsequentemente ionizados pelo uso de um forte potencial elétrico, processo chamado de ionização por “eletrospray” (Steen & Mann, 2004).

Com relação à técnica de MALDI, foi demonstrado, no início da década de 60, que a irradiação de amostras orgânicas de massa reduzida com um pulso de laser intenso, produzia íons que poderiam ter sua massa analisada com sucesso, mas limitações com relação à técnica ainda existiam. Em 1987, descobriu-se que a utilização de uma matriz na

desorção a laser poderia reverter às limitações que existiam com relação ao tamanho da amostra que era analisada (Karas *et al.*, 1987). A matriz absorve no comprimento de onda do laser, possibilitando desta forma a sublimação do analito (Beavis & Chait, 1989). O mecanismo do MALDI não é completamente explicado, mas acredita-se que este funcione de acordo com as seguintes fases: a) As moléculas do analito são co-cristalizadas com a matriz na placa de metal, que será introduzida no MALDI; b) Excitação da Matriz – O laser incide sua energia sobre os cristais matriz-analito, sendo absorvido pela matriz, levando a uma rápida excitação, formando grupos de analitos uniformes, envolvidos por moléculas da matriz que logo evaporam e liberam as moléculas do analito; c) Ionização do analito – As moléculas do analito são ionizadas por uma simples protonação pela matriz foto excitada, levando à formação de moléculas carregadas positivamente (Steen & Mann, 2004).

Dá-se o nome de MALDI-TOF à associação da fonte de ionização do tipo MALDI com o detector do tipo “time of flight” (TOF) (Beavis & Chait, 1989). O analisador do tipo TOF baseia-se no tempo que os íons levam para atravessar um campo elétrico formado dentro de um tubo. Na fonte de íons, todos os íons são acelerados na mesma energia cinética, voando até alcançarem o detector; neste caso, o tempo de voo que os íons apresentarem será exclusivamente dependente da relação massa/carga do íon produzido (Mamyrin *et al.*, 1994).

Mann e colaboradores (1993) desenvolveram uma técnica para identificar proteínas, chamada impressão digital por mapa de peptídeos (“peptide mass fingerprinting, PMF”), a partir de dados obtidos por espectrometria de massa (Mann *et al.*, 1993). Neste procedimento a proteína de interesse, em muitos casos purificada por eletroforese bidimensional, é enzimaticamente clivada (geralmente utilizando-se tripsina) e a mistura de peptídeos obtida é analisada por espectrometria de massa. O mapa peptídico obtido é processado, e, subsequentemente, seus dados submetidos a programas que permitem comparar o mapa da proteína que se quer identificar, gerado experimentalmente, com os peptídeos gerados “in silico” (teóricos), para todas as sequencias presentes nos bancos de dados. Esta técnica mostrou-se capaz de identificar proteínas, oriundas de géis 2DE, em baixas concentrações, na ordem de pmoles, tornando-se útil na identificação de proteínas com estrutura primária conhecida. Entretanto, o índice de insucesso na identificação

aumenta à medida em que cresce o número de sequências protéicas depositadas nos bancos de dados, utilizados na busca, pois aumenta a possibilidade de se encontrarem peptídeos ambíguos para duas proteínas. E também devido às modificações pós-traducionais nos peptídeos que porventura possam existir.

Após a análise inicial dos dados de MS¹, onde os valores de m/z e intensidade dos picos dos peptídeos são obtidos no espectro de massa, pôde-se colher mais dados que permitam a determinação da estrutura primária (sequência) desses peptídeos. Esta estratégia, chamada MS em tandem, MS/MS ou MS², já que acopla dois estágios de análise de MS, requer equipamentos do tipo MS/MS. Nesta técnica, o íon-mãe (ou precursor) é selecionado no primeiro MS; e, no segundo, sofre uma fragmentação, geralmente com um gás inerte, denominada de dissociação induzida por colisão (“Collision-Induced Dissociation, CID”); ou ainda, pode sofrer fragmentação, devido aos peptídeos estarem metaestáveis (“Post Source Decay PSD”) (Steen & Mann, 2004). Os novos picos produzidos pelos produtos gerados (íons-filhos) têm suas relações de m/z determinadas em um segundo analisador. De um modo geral, cerca de 2 a 3 séries de íons aparecem nos espectros de MS/MS (geralmente a, b e y), sob baixa energia de colisão. Ocorrem as séries a, b, c, quando a carga permanece na porção N-terminal da molécula e as séries x, y, z, quando a carga permanece na porção C-terminal. Os íons mais comuns e informativos são os íons b e y, gerados pela fragmentação, em baixa energia, da ligação peptídica existente entre os aminoácidos. Em analisadores do tipo quadrupolo, quadrupolo-TOF e TOF/TOF, os íons y são mais frequentemente observados; já nos tipos “íon-trap”, ambas as séries são observadas, aproximadamente na mesma intensidade (Clauser & Baker, 1999).

No espectrômetro do tipo ESI “íon-trap”, uma armadilha de íons realiza a fragmentação dos peptídeos selecionados; desta forma, a relação massa/carga dos peptídeos selecionados pode ser analisada (Steen & Mann, 2004).

Com relação ao instrumento do tipo MALDI-TOF/TOF, este apresenta uma câmara de colisão entre as duas seções de TOF; desta forma, íons de uma única carga (m/z), são selecionados na primeira seção do TOF, fragmentados na Câmara de Colisão, e as massas dos fragmentos são analisadas na segunda seção do TOF; assim, chama-se o processo de sequenciamento dos peptídeos (MS/MS) (Aebersold & Mann, 2003).

Convém ressaltar que além do PMF outras estratégias também podem ser utilizadas para a identificação de proteínas por espectrometria de massa.

A busca através de dados oriundos de MS/MS, não processados (MS/MS ion search), que foi desenvolvida no anos 90, utilizando-se dados de MS/MS, procurou resolver as dificuldades do sequenciamento de peptídeos, que desta forma poderia ser convertido em um problema de combinação com bancos de dados. Esta abordagem tornaria o problema mais simples, visto que fazer uma busca em banco de dados é mais fácil do que processar os dados. Desta forma, existem vários algoritmos que são usados para a busca de seqüências em bancos de dados com espectros provenientes de análises de MS/MS, não processados, como por exemplo, “SEQUEST”, “MASCOT” e “ProteinProspector”. Na maioria destes programas é ainda possível submeter os dados de MS juntamente com os dados de MS/MS. Uma limitação da busca em banco de dados usando somente dados de MS e MS/MS sem processamento, é a necessidade de se ter a seqüência da proteína no banco de dados ou a seqüência de proteínas bem próximas para uma identificação cruzada por homologia (Steen & Mann, 2004).

Busca por homologia de seqüência (BLAST ou MS-BLAST), caso a seqüência da proteína analisada não esteja presente no banco de dados, existe uma estratégia adicional dependente da similaridade entre a proteína de interesse e proteínas homólogas de outras espécies. Se a similaridade entre as seqüências for alta, será possível a identificação, mesmo que ela seja desconhecida, fazendo-se uma identidade cruzada com o mapa peptídico de outra proteína homóloga. Geralmente os pacotes de *softwares* para a realização de interpretação automática, são oferecidos junto com os espectrômetros de massa.

Em articulação com essas técnicas, encontra-se a Bioinformática, uma área de investigação na qual a biologia, a ciência computacional e a tecnologia da informação se fundem numa única disciplina. No âmbito da proteômica, a Bioinformática põe à disposição softwares para aplicações rotineiras, como a análise dos perfis obtidos nos géis 2DE. Permite ainda processar, comparar e catalogar um conjunto de informações complexas em bases de dados próprias e interligá-las, quando requerido, com as bases de dados genômicos (Wilkins *et al.*, 1997; Rabilloud, 2000).

9 – Breve resumo de abordagens proteômicas de venenos já realizadas

Com a evolução das metodologias proteômicas na última década, como a eletroforese bidimensional e a cromatografia multidimensional, juntamente com a espectrometria de massas, métodos de detecção computacionais aliados a dados genômicos disponíveis, tornou possível a separação e identificação de centenas de proteínas em uma única operação (Valente *et al.*, 2009).

Nawarak e colaboradores separaram e identificaram componentes de 10 venenos de serpentes, derivados das famílias Elapidae e Viperidae. Foram analisados por diferentes métodos bioquímicos, incluindo HPLC de fase reversa, SDS-PAGE, 2DE e espectrometria de massas (Nawarak *et al.*, 2003). As comparações entre os perfis proteicos dos venenos de serpente serviram para identificar proteínas exclusivas de cada espécie, visando, com o uso desta informação, aplicações terapêuticas. Os resultados obtidos por espectrometria de massas, por MALDI-TOF, e sequenciamento N-terminal foram usados na procura em bancos de dados de proteínas (NCBI e SWISS-PROT). Utilizou-se o sequenciamento N-terminal, após falha de identificação por Espectrometria de Massas de alguns spots (Nawarak *et al.*, 2003).

Nawarak e colaboradores (2004), também analisaram venenos Elapídicos e Viperídeos, utilizando cromatografia de fase-reversa (RP-HPLC), SDS-PAGE ou 2DE, associados à análise por espectrometria de massas MALDI-Q-TOF MS. Também realizaram com os mesmos venenos outro estudo, entretanto, utilizando uma coluna de afinidade Con A, para a realização da etapa cromatográfica de separação, visando analisar as glicoproteínas dos venenos que se ligavam à lectina, seguido de análise por 2DE e MALDI MS (Nawarak *et al.*, 2004).

Li e colaboradores (2004), visando ao desenvolvimento de novas metodologias para o tratamento dos acidentes ofídicos e a caracterização bioquímica do veneno das serpentes, visto que o tratamento adequado do envenenamento é completamente dependente da composição do veneno, realizaram a caracterização proteômica do veneno das serpentes *Naja naja atra* e *Agkistrodon halys* (Li *et al.*, 2004).

Estavam interessados no desenvolvimento de uma metodologia para distinguir espécies de serpentes, baseando-se na caracterização proteômica dos respectivos venenos.

O critério para escolha foi a incidência de acidentes ofídicos e abundância das mesmas na região.

Utilizaram 3 tipos de estratégias:

1. Digestão trípica do veneno total, seguida de Cromatografia líquida e análise por Espectrometria de Massas (SHOTGUN + LC-MS-MS).
2. SDS-PAGE + LC-MS-MS
3. Gel filtração, seguida de 2DE, utilizando duas técnicas de Espectrometria de Massas, LC-MS-MS e MALDI-TOF-MS, para a identificação das proteínas.

Com o uso destas metodologias foi possível identificar a partir do veneno das serpentes, 124 e 74 (proteínas e peptídeos) em *Naja naja atra* e *Agkistrodon halys*, respectivamente (Li *et al.*, 2004).

Serrano e colaboradores (2005) utilizaram-se da 2DE para examinar a complexidade do veneno de *Crotalus atrox* e *Bothrops jararaca*. Utilizaram uma variedade de tipos de protocolos de revelação, para comparar e contrastar os perfis proteicos dos venenos. Dentre eles estão, Azul de Coomassie, Prata, Sypro-Ruby e Pro-Q-Emerald (Glicoproteoma). Além disso, utilizaram anticorpos específicos nas análises por Western blot dos géis oriundos da 2DE, os venenos foram observados, caracterizando, assim, com o uso de anticorpos policlonais específicos, como: anti-botropasina, para obter um perfil da metaloproteases do veneno de *B. jararaca* e anti-atrolisina para *C. atrox*, anti-MSP1/2 (anticorpo policlonal para serinoproteinase de *B. moojeni*); para obter um perfil proteico das serino proteases de ambos os venenos; e por último, utilizou anticorpos anti-PLA₂ para obter um perfil da fosfolipases A₂ encontradas em ambos os venenos de *B. jararaca* e *C. atrox*. Além desses ensaios foi realizado um ensaio funcional, para observar a atividade gelatinolítica desses venenos, sob condições não redutoras, pela técnica de Zimografia (Serrano *et al.*, 2005).

As principais serpentes da Tunísia também tiveram seus venenos analisados por técnicas proteômicas (Bazaa *et al.*, 2005). Os venenos de *Cerastes cerastes*, *Cerastastes vipera* e *Macrovipera lebetina* foram analisados por HPLC de fase reversa, espectrometria de massas e sequenciamento N-terminal. Os autores discutiram as diferentes complexidades destes venenos, mostrando que as toxinas encontradas pertenciam a poucas famílias de proteínas.

A origem e evolução do proteoma de venenos de serpentes foram estudadas pela análise filogenética das sequências de aminoácidos das toxinas e revelaram outros componentes proteicos não classificados como toxinas (Fry, 2003).

Para explicar as reações adversas do acidente ofídico, mesmo após a administração de soro antiofídico, Kulkeaw e colaboradores (2007), realizaram o Proteoma e Imunoproteoma do veneno da serpente *Naja kaouthia* e procuraram encontrar explicações para os efeitos causados nos pacientes que sofriam um acidente ofídico, e mesmo após o tratamento ainda apresentavam problemas oriundos do envenenamento. Realizaram o proteoma do veneno da serpente, utilizando as seguintes estratégias: 2D-LC/MS-MS e 2DE – LC/MS-MS + PMF, com busca seguida em banco de dados. Os componentes antigênicos (Imunoproteoma), de toda a fração do veneno, foram estudados pela metodologia de Western Blot, em géis de SDS-PAGE e 2DE, seguido de imunorevelação com o soro antiveneno biotilado, derivado de *N. kaouthia* (Kulkeaw *et al.*, 2007).

Fox e Serrano (2008) descreveram, em uma recente revisão, as diferentes estratégias aplicadas na análise proteômica, a relação entre proteomas e transcriptomas de venenos e algumas aplicações do estudo proteômico de venenos (Fox & Serrano, 2008).

Recentemente, Gutiérrez e colaboradores discutiram os vários aspectos da produção de antivenenos, no qual a análise proteômica dos venenos de serpentes (Venômica de serpentes), pode dar um suporte relevante. Relatam que a informação obtida nestes estudos apresenta impacto no controle da qualidade dos preparos de venenos usados para produzir os antivenenos; além disso, o desenvolvimento de melhores misturas de venenos para a imunização, objetivando um aumento na eficácia da terapia do envenenamento, o que definem como Antivenômica (Gutierrez *et al.*, 2009).

Risch e colaboradores (2009) mostraram que a composição das toxinas do veneno da vípera Russell (*Daboia russelli siamensis*) correlaciona-se com a manifestação clínica do acidente ofídico e explica efeitos patológicos do veneno. Estudos proteômicos sobre este veneno são relevantes, porque o acidente ofídico pela vípera Russell é uma importante causa de mortalidade nos países do Sul da Ásia. Especialmente em Mianmar, onde esta espécie é responsável por 80% dos acidentes ofídicos, resultando em mais de 1000 mortes por ano. O conhecimento dos componentes do veneno abre o caminho para a preparação do antiveneno específico, utilizando as principais toxinas como antígenos (Risch *et al.*, 2009).

O estatuto taxonômico da serpente *Bothrops atrox* endêmica, na Venezuela, e classificada como *Bothrops colombiensis*, foi realizado por Juan Calvete e colaboradores (2009), aplicando abordagens proteômicas e antivenômicas. Uma comparação do proteoma do veneno de *B. colombiensis* e *B. atrox* não apoiou a sugestão de sinonímia entre as espécies. O mais próximo a *B. colombiensis* parece ser as toxinas de *B. asper*. Este achado pode ser relevante para a reconstrução da história natural e cladogênese de *Bothrops*, e sugere a possibilidade de utilizar indistintamente antivenenos, gerados contra *B. asper* ou *B. colombiensis*, para a gestão de acidentes ofídicos por qualquer uma destas espécies *Bothrops*, mas não os antivenenos gerados contra *B. atrox* (Calvete *et al.*, 2009).

Ao utilizarem uma abordagem transcriptômica e proteômica combinadas, Richard H. Valente e colaboradores (2009), descreveram um mapa preliminar de referência de proteínas e peptídeos expressos pela glândula de veneno da serpente *Bothrops insularis* (Valente *et al.*, 2009).

Neste trabalho, o veneno da serpente *B. jararaca* foi estudado, utilizando-se a tecnologia proteômica com o intuito de obter-se o máximo número possível de proteínas identificadas e caracterizadas.

Objetivos

O objetivo deste trabalho é elucidar o perfil proteômico do veneno da serpente *Bothrops jararaca* apresentando um mapa de referência preliminar para as proteínas e peptídeos deste veneno.

Objetivos específicos:

- Separar, identificar e caracterizar as proteínas do veneno;
- Determinar a presença de isoformas de proteínas de veneno;

C18 (SGE, Austrália) de 15cm x 300 μm (300 \AA ; 3 μm). As amostras e a fase móvel foram bombeadas, utilizando-se um fluxo de 4,5 $\mu\text{l}/\text{min}$, com uma bomba MS Surveyor (Thermo Finnigan, USA), equipada com um loop de 20 μl de injeção (Rheodyne, USA). Fase móvel A 0,1% (v/v) de ácido fórmico em água (água J.T. Baker grau HPLC); a fase móvel B foi 0,1% (v/v) de ácido fórmico em acetonitrila (grau HPLC). O gradiente para separação construído como descrito a seguir: fração não-retida, lavada com 5% de B por 5 min; após esse período, a fração retida foi eluída, utilizando-se um gradiente linear até 40% de B, em 35min; até 60% em 45 min, e até 80% de B em 48 min. Os peptídeos eluídos da coluna foram diretamente analisados em um espectrômetro de massas IonTrap LCQ Deca XP Plus (Thermo Finnigan, USA). O *ESI-Iontrap mass spectrometer* foi utilizado no modo microspray (módulo ESI): voltagem de 3,30 kV no source, gas flow 10 unidades arbitrárias (range 0-100), condições do capilar 31.0 V e 180°C, “tube lens offset” para 45.0V; “multipole 1 offset” para -6.75 V, “multipole 2 offset” para -12.0 V; “entrance lens” -82.0 V. Os espectros de eluição dos peptídeos foram obtidos primeiro um espectro total (full MS), varrendo de 400 a 2000 m/z seguido por um modo “*ZoonScan*” dos picos de maior intensidade do “fullMS scan” previamente obtido. “MS/MS scan” foram adquiridos usando-se uma

- Ativação *qz* de 0.25
- Tempo de ativação 30ms
- Energia de colisão normalizada em 35%

Em todos os experimentos, o controle de ganho automático (AGC) do instrumento foi ligado com valores de alvo (target values) de 1.0×10^8 , 4×10^7 e 1×10^8 , para *MS*, *Zoom* e *MS/MS scans*, respectivamente.

As massas dos fragmentos gerados (MS/MS) foram submetidas à pesquisa no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information), não redundante (nr), e também, no banco de dados local, banco de “Expressed Sequence Tag” (ESTs), gerados, a partir da glândula de veneno de *B. jararaca*, pelo Laboratório de Genômica da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, que realizou o transcriptoma da glândula de veneno da serpente *B. jararaca* (Cidade *et al.*, 2006), com o auxílio dos programas MASCOT e SEQUEST. Os parâmetros usados na busca foram: duas clivagens de tripsina perdidas, 0,8 Da de erro no modo MS, $\pm 0,6$ Da de erro no modo MS/MS, e as seguintes

modificações variáveis: oxidação (Met), Carbamidometilação (Cys), fosforilação (Thr, Ser, Tyr), e pyro-Glu (N-terminal Glu), amidação do C-terminal e Acetilização de N-terminal.

2ª Etapa – Subfracionamento + Eletroforese 2D + Espectrometria de Massas

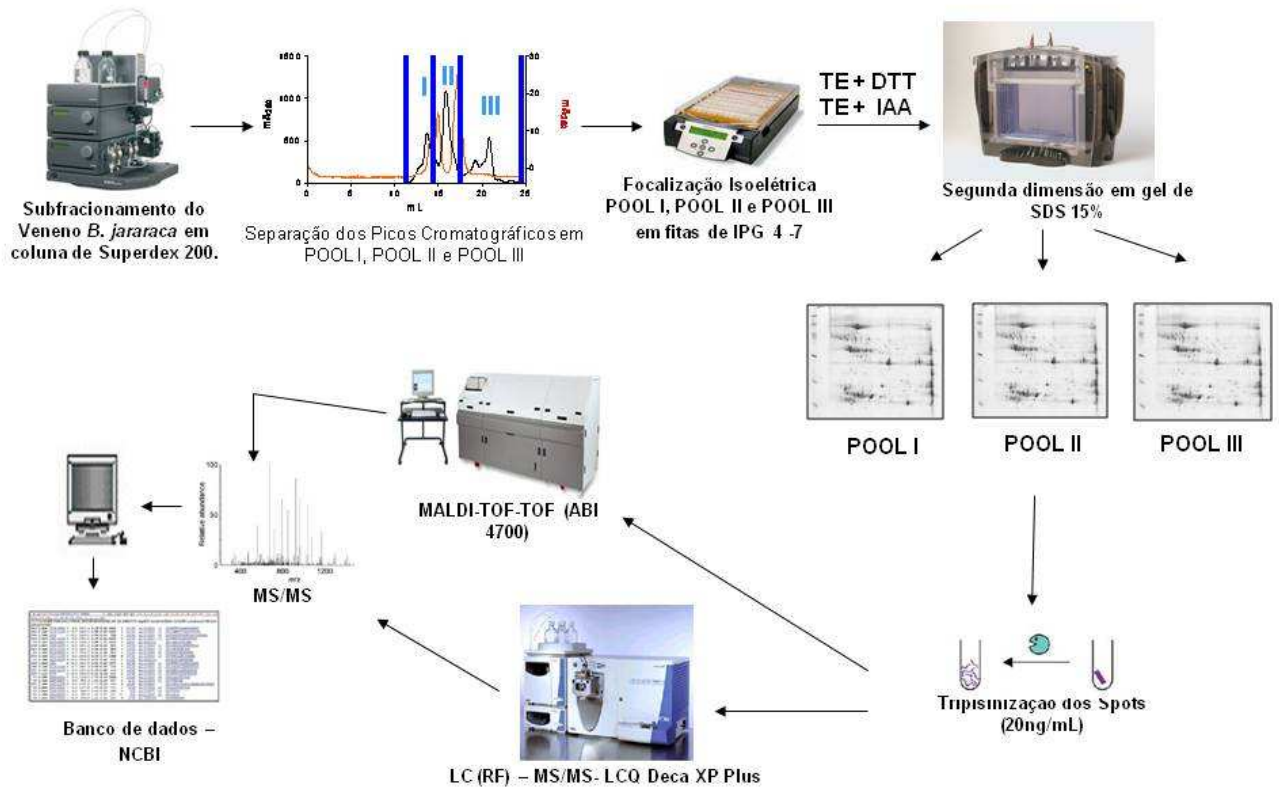


Figura 3 - Esquema representativo da 2ª etapa do proteoma do veneno da serpente *Bothrops jararaca*.

A utilização de técnicas proteômicas no estudo de amostras que apresentam uma alta complexidade no seu conteúdo protéico tem sido cada vez maior, em virtude de sua capacidade de analisar uma grande quantidade de proteínas ao mesmo tempo. Como os venenos de serpentes são misturas altamente complexas de proteínas e peptídeos, decidiu-se utilizar estas técnicas no seu estudo.

De acordo com a prévia experiência do grupo, com estudo proteômico de uma serpente relativamente próxima (*Bothrops insularis*), e, em função da complexidade do veneno desta serpente, empregou-se diferentes abordagens proteômicas (Valente *et al.*, 2009):

1º Etapa do proteoma do veneno da serpente *B. jararaca* (**Figura 2**)- Fracionamento do veneno de *B. jararaca*, em géis de 18cm por 2DE, seguido de tripsinização de todos os spots encontrados e análise por espectrometria de massas (MALDI-TOF/TOF MS).

2º Etapa do proteoma do veneno da serpente *B. jararaca* (**Figura 3**) - Técnica de subfracionamento, por exclusão molecular, previamente ao uso da 2DE, seguida de análise por espectrometria de massas (LC-ESI-ION-TRAP MS e MALDI-TOF/TOF MS).

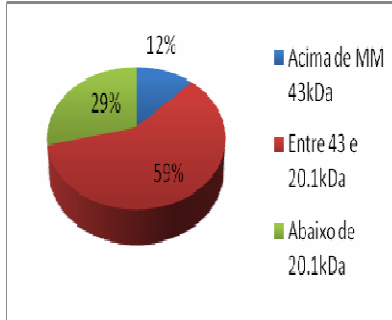
O objetivo do subfracionamento foi diminuir a complexidade e tentar minimizar o intervalo dinâmico encontrado, visto que ambos os fatores são um problema na maioria dos estudos proteômicos, que limitam circunstancialmente, a possibilidade de detecção e identificação das proteínas menos expressas.

O fracionamento inicial do veneno de *B. jararaca* pela 2DE em gel de 18 cm, faixa de pH 3-10 NL (**Figura 4**), indicou que a maioria dos spots de proteínas estavam localizados na faixa de pH de 4-7. Portanto, para melhorar a resolução dos géis bidimensionais, foram utilizadas fitas de focalização de 18cm, com intervalo de pH 4-7. Como pôde ser observado, obteve-se uma boa focalização e uma clara melhoria na resolução do gel (**Figura 5**).

A contagem dos spots, utilizando o programa Image Master (Amersham Bioscience), mostrou 337 e 357 spots para os géis de pH 3-10NL e 4-7, respectivamente, indicando novamente uma maior capacidade de separação na faixa de pH 4-7.

Com relação ao perfil bidimensional do veneno da *B. jararaca*, a distribuição das proteínas detectadas pela coloração de azul de coomassie, no gel 2DE, demonstrou que dos 357 spots, detectados no gel de pH 4-7, foram apresentados diversos spots bem resolvidos e fortemente corados, principalmente na faixa de massa molecular entre 43 e 20.1 kDa, com um total de 209 (59%) spots detectados; ainda com uma boa intensidade, encontravam-se spots na faixa de baixo peso molecular (<20.1kDa), totalizando 104 spots (29%), e apenas 44 (12%) apresentavam massa molecular superior a 43kDa (**Planilha 1**). A distribuição do ponto isoelétrico mostrou-se mais abundante na faixa mais ácida de 4-6.

2DE pH 4_7 de Veneno total de <i>B. jararaca</i>		
	Total de spots	Percentual
Acima de MM 43kDa	44	12%
Entre 43 e 20.1kDa	209	59%
Abaixo de 20.1kDa	104	29%
Total	357	



Planilha 1 – Relação das faixas de pesos moleculares encontradas na análise da localização dos spots e planilha dos percentuais, após análise, utilizando-se o programa Image Master (Amersham Bioscience), realizada em gel de 2DE – *B. jararaca*, 1.8 mg de veneno total.

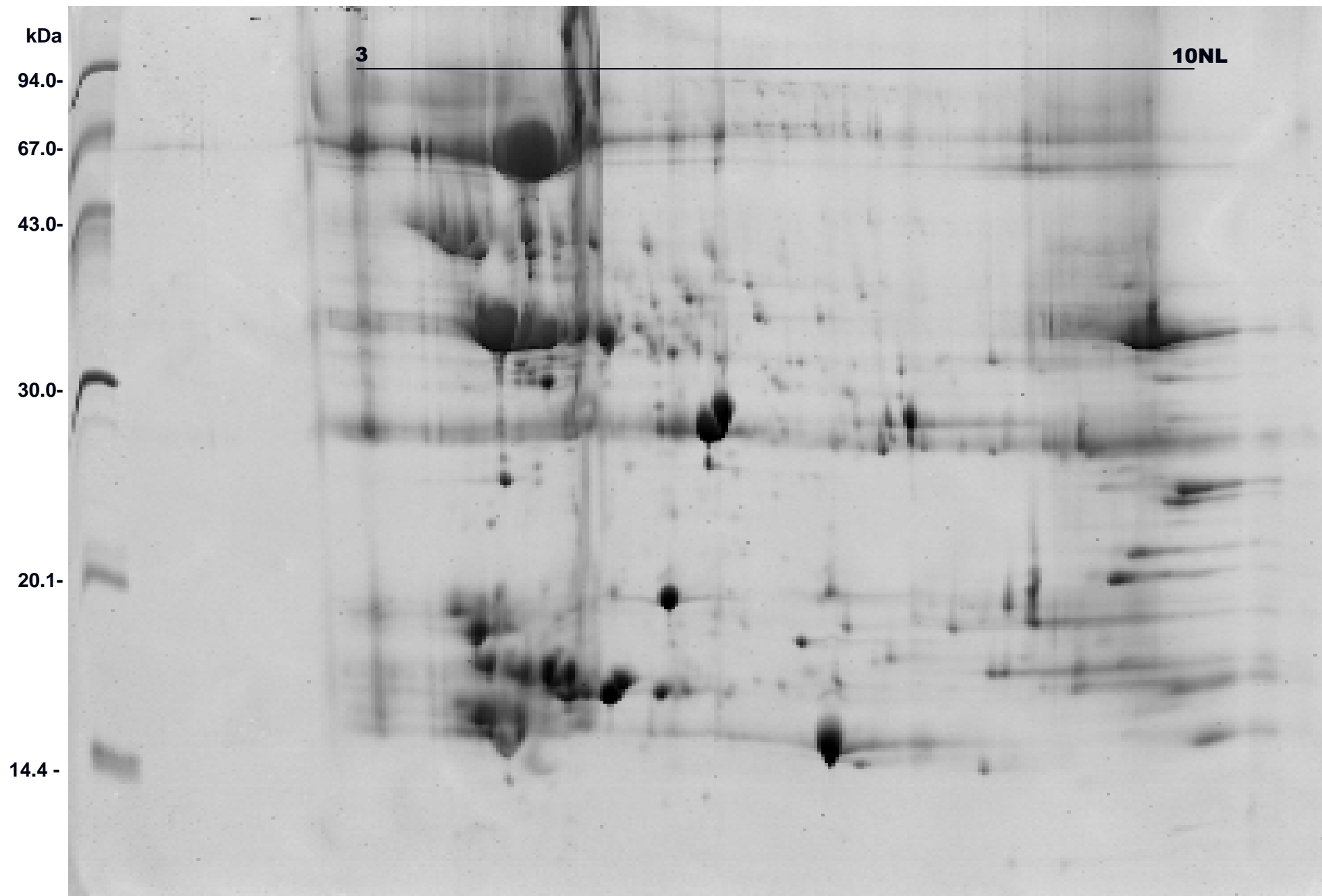


Figura 4 - 2DE - *B. jararaca*, 1.8 mg de veneno. Primeira dimensão em fitas de 18 cm pH 3-10NL; Segunda dimensão SDS-PAGE a 15% em condições redutoras. Revelação azul de Coomassie. Foram detectados 337 spots.

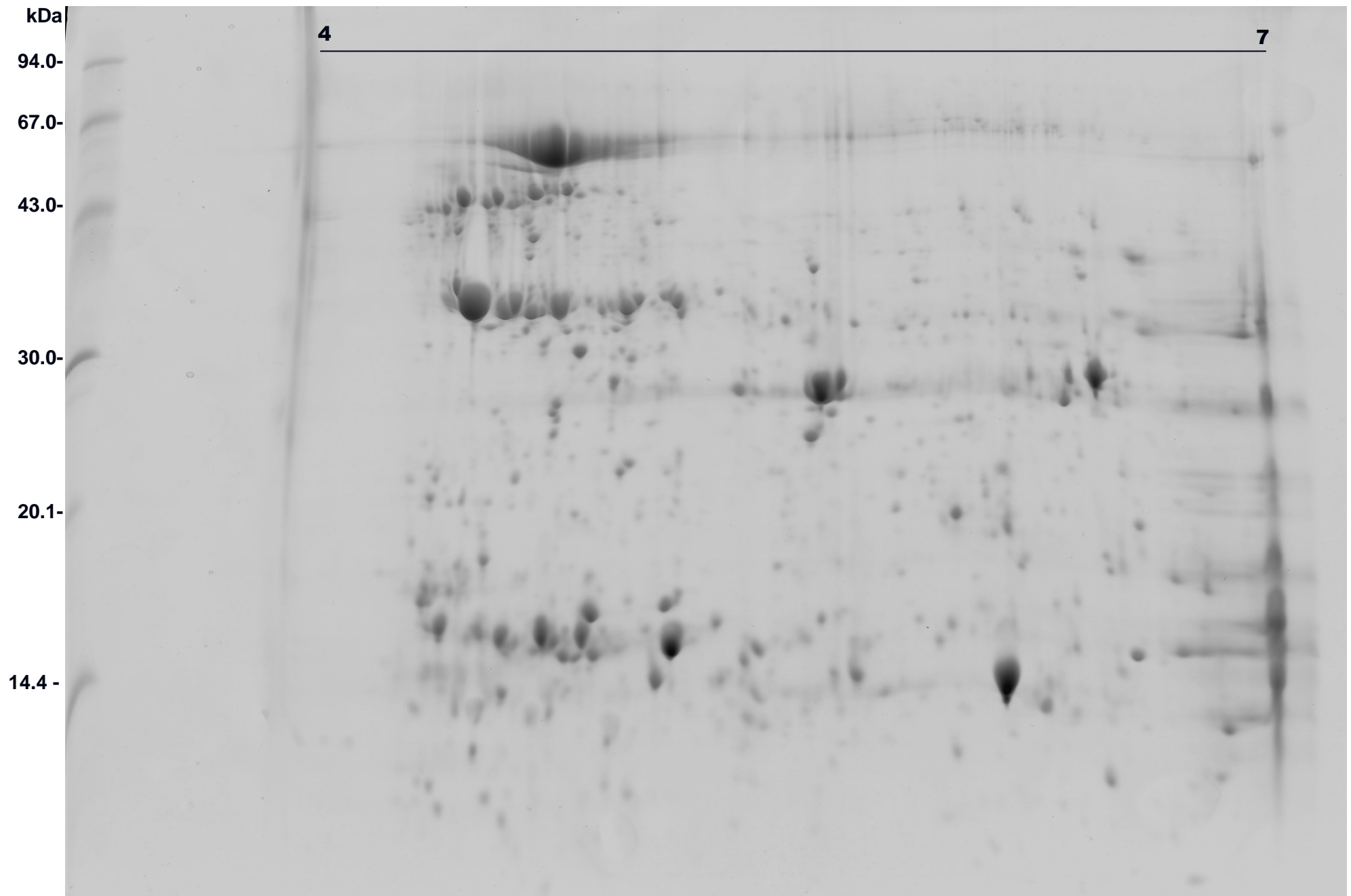


Figura 5 - 2DE - *B. jararaca*, 1,8 mg de veneno. Primeira dimensão em fitas de 18 cm pH 4-7 Segunda dimensão SDS-PAGE 15% em condições redutoras. Revelação azul de Coomassie. 357 spots detectados.

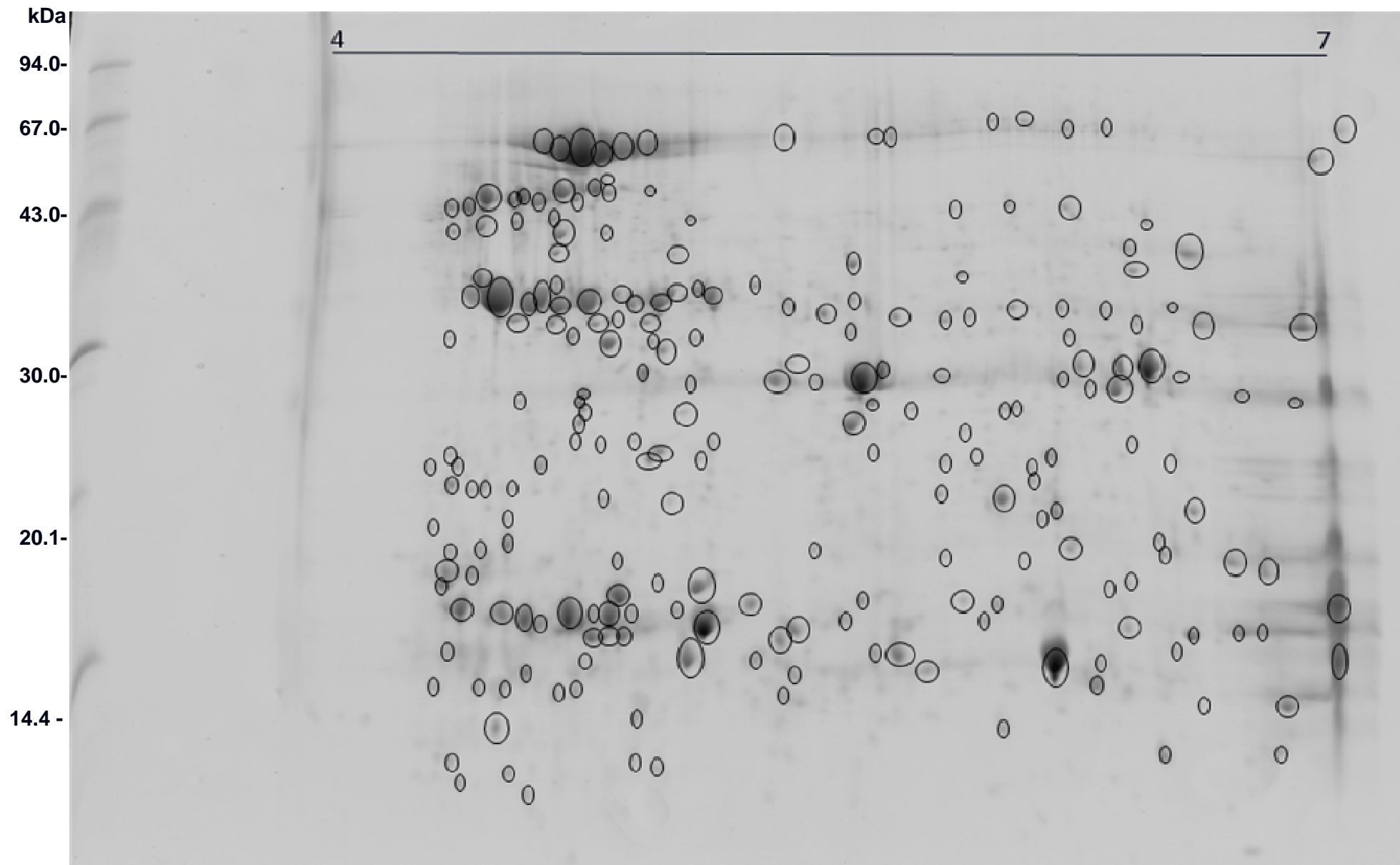
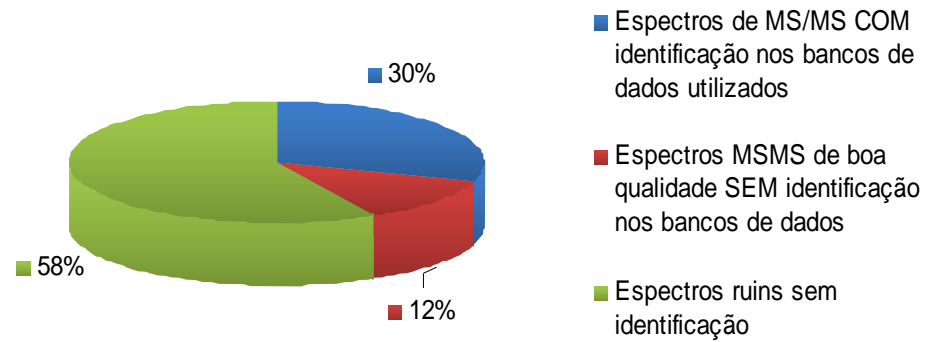


Figura 6 - 2DE - *B. jararaca*, 1.8 mg de veneno. Primeira dimensão em fitas de 18 cm pH 4-7 Segunda dimensão SDS-PAGE 15% em condições redutoras. Revelação azul de Coomassie. 241 spots tripisinizados.

Relação dos espectros de massa obtidos



Relação dos espectros obtidos	
Espectros de MS/MS COM identificação nos bancos de dados utilizados	72
Espectros MSMS de boa qualidade SEM identificação nos bancos de dados	30
Espectros ruins sem identificação	139
TOTAL de spots tripsinizados	241

Planilha 2 - Relação dos espectros MS/MS obtidos, após análise por espectrometria de massas MALDI-TOF/TOF MS.

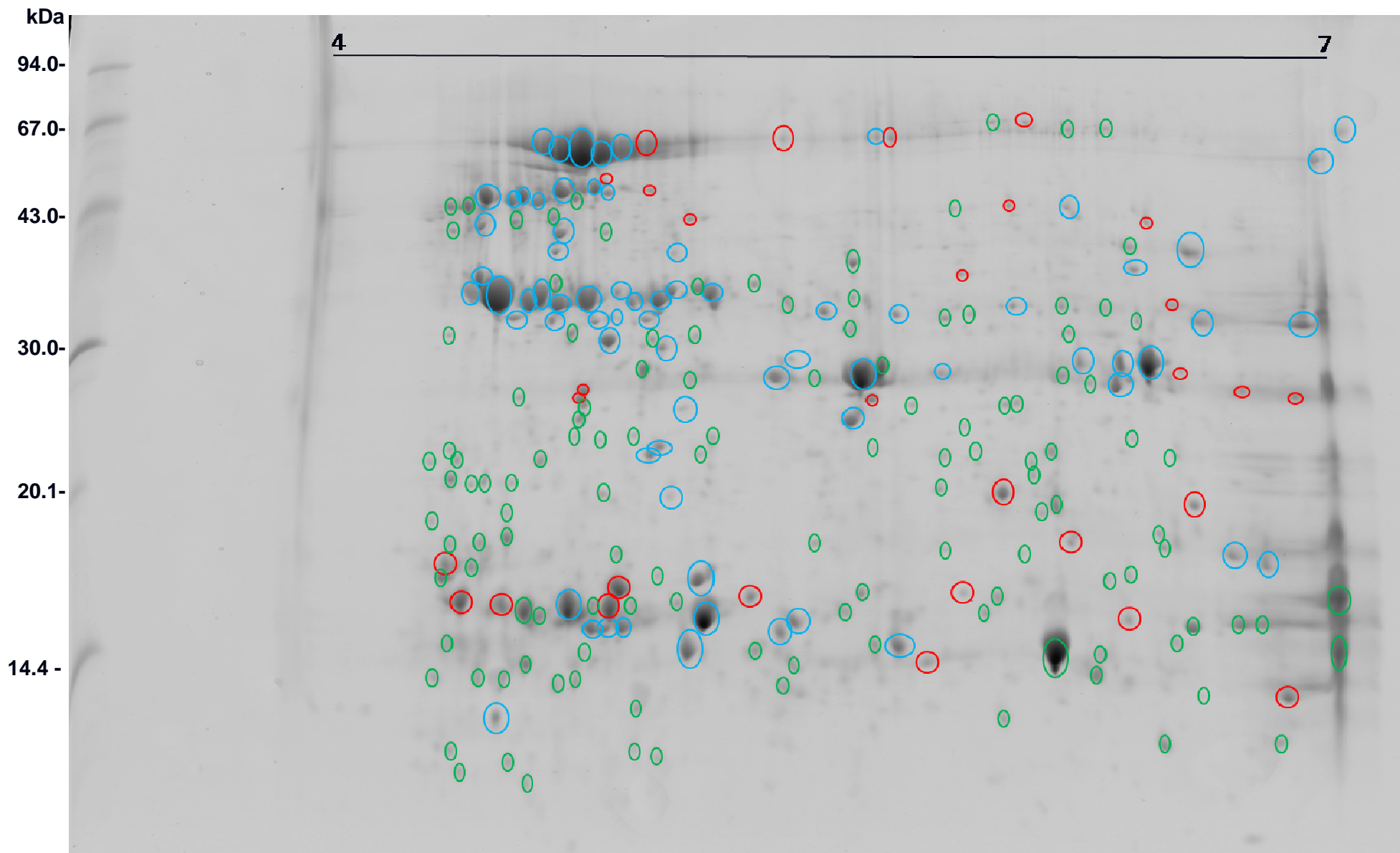


Figura 7 – Avaliação dos espectros de acordo com a identificação e qualidade observadas.
Spots em azul - ESPECTROS DE MS/MS COM IDENTIFICAÇÃO;
Spots em vermelho - ESPETROS DE MS/MS DE BOA QUALIDADE SEM IDENTIFICAÇÃO;
Spots em verde - ESPECTROS DE MS/MS RUINS SEM IDENTIFICAÇÃO.

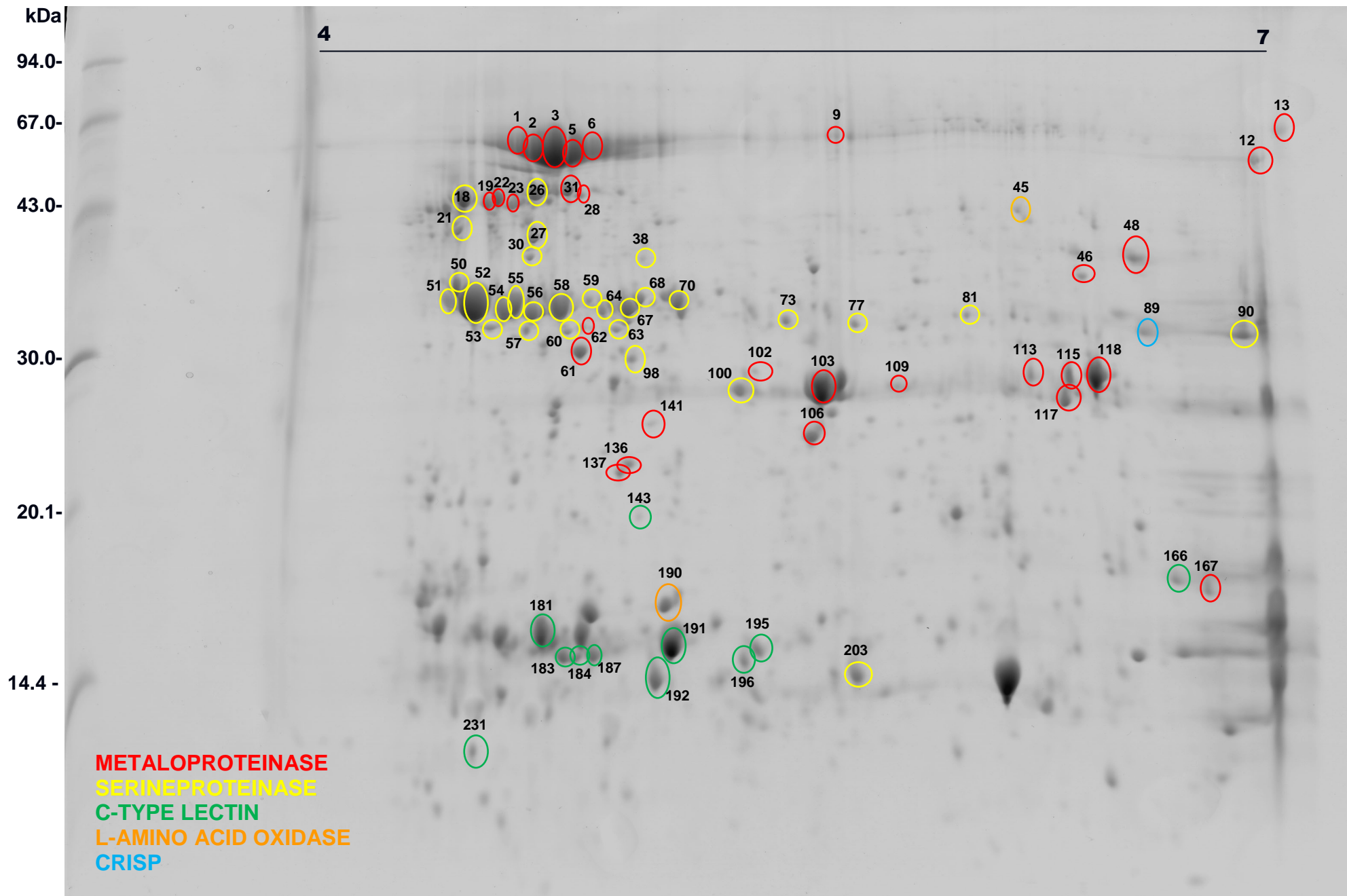


Figura 8 - 2DE - *B. jararaca*, 1.8 mg de veneno. Os spots coloridos foram identificados após tripsinização e análise por MALDI-TOF/TOF MS (Tabela 5).

1° Etapa do proteoma do veneno da serpente *B. jararaca* - Fracionamento do veneno em géis de 18cm por 2DE, seguido de tripsinização dos spots encontrados e análise por espectrometria de massas (MALDI-TOF/TOF MS).

As identificações dos diversos componentes do veneno da serpente *B. jararaca*, analisado neste trabalho foram feitas por espectrometria de massas. Inicialmente, tentativas de identificação, usando-se apenas o PMF no MALDI-TOF, não foram bem sucedidas. Este problema já havia sido relatado anteriormente por outros pesquisadores, estudando venenos de serpentes, já que as informações acerca dos componentes protéicos de venenos são escassas, tanto nos bancos de dados genômicos, como os de proteínas (Fox *et al.*, 2002).

Quando passou-se a utilizar o MALDI-TOF/TOF no modo MS/MS, conseguiu-se grande rapidez e eficiência nas análises, uma vez que as identificações passaram a ser baseadas nas sequências de aminoácidos de um ou mais peptídeos derivados das proteínas de veneno sob investigação. Os spots retirados do gel bidimensional do veneno da serpente *B. jararaca* foram previamente digeridos com tripsina. Após extração com ácido fórmico/metanol, os peptídeos trípticos foram misturados a um excesso de matriz composta de ácido α -ciano-4-hidroxinamínico e submetidos à análise no MALDI-TOF/TOF. Na identificação das proteínas, os dados oriundos da espectrometria de massas (MS/MS) foram empregados na busca banco de dados não redundantes NCBI e no banco de dados transcriptômicos de *B. jararaca*. Desta forma, nas tabelas referentes a cada gel, estão mostradas todas as identificações feitas, incluindo *pI* e a massa molecular (MM) experimental, calculados para cada spot usando o programa Image Master (Amersham Biosciences), *pI* e MM teórico, método empregado (PMF e/ou MS/MS); as sequências determinadas dos peptídeos; identificação do Banco de dados (NCBI, banco de *Bothrops jararaca*) e a família de proteína identificada.

Dentre os 357 spots detectados no gel 2DE pH 4-7, **Figura 5**, foram selecionados para serem tripsinizados 241 spots **Figura 6**, de acordo com a quantidade relativa e intensidade do spot. Dentre os 241 spots tripsinizados, a **Planilha 2**, relaciona os espectros de MS/MS de acordo com as identificações realizadas; foram obtidas 72 identificações de espectros de MS/MS utilizando os dois bancos de dados descritos; 30 espectros de MS/MS de boa qualidade, entretanto sem identificação nos bancos de dados utilizados e 139 espectros ruins e sem identificação.

Avaliando-se os spots tripsinizados de acordo com a qualidade do espectro obtido (**Figura 7**), ficou claro que, os spots de maior abundância e intensidade, conseguiram obter bons espectros de MS/MS, totalizando 102 spots quando somados (42.5%). Avaliando os 30 espectros que obtiveram boa qualidade, entretanto, não foram identificados quando correlacionados com os bancos de dados utilizados; os mesmos podem ser novas proteínas que ainda não tiveram sua sequência depositada em bancos de dados e/ou apresentam modificações pós-traducionais que não foram contempladas nos parâmetros de busca, já que apenas foi utilizado o modo automático de análise dos espectros e busca dos peptídeos; além disso, clivagens inespecíficas realizadas pela tripsina, e principalmente a ausência do genoma completo da serpente *B. jararaca* depositado, podem ter sido algumas das explicações para este ocorrido. Adicionalmente, a realização de um sequenciamento manual destes espectros poderá fornecer novas informações sobre estes espectros ainda não identificados.

Analisando os spots que tinham uma menor abundância e intensidade, pode-se relacionar este resultado, aos espectros ruins, sem identificação nos bancos de dados utilizados. Algumas hipóteses podem ser salientadas, como, relativamente uma pequena quantidade de peptídeos presente nestes spots; presença de peptídeos que não seriam bem ionizados com a matriz utilizada; interferência de sal, mesmo após etapa de desalinização, utilizando colunas de zip-tip e por último, a presença de peptídios com poucas lisinas e argininas, desta forma, a tripsina, não encontraria o sítio de clivagem dos peptídeos, e assim o modo de análise dos peptídeos utilizado (reflector), não seria capaz de detectar e obter bons espectros, após a ionização dos peptídeos.

A **Tabela 5** apresenta as identificações obtidas para os 72 spots detectados na análise por MALDI-TOF/TOF MS, do gel 2DE pH 4-7 do veneno total da serpente *B.jararaca*, onde, 29 (40%) foram classificados na família das metaloproteases; 29 (40%) classificadas nas famílias das serinoproteases; 11 (15%) como lectinas tipo C; 2 (3%) como l-aminoácido oxidases e 1 (1%) como CRISP (**planilha 3**). Estes dados estão em concordância com o encontrado na análise transcriptômica do mesmo veneno, descrito por Cidade e colaboradores (2006), que entre os transcritos mais frequentes estavam as metaloproteases (52,6%), seguido-se de serinoproteases (28,5%), lectinas tipo-C símile (não foram identificadas lectinas verdadeiras na análise transcriptômica) (8,3%), peptídeos potenciadores de Bradicinina (BPP) (6,2%), também encontraram com percentuais bem inferiores, LAOs, PLA₂ e CRISPs (Cidade *et al.*, 2006).

Entretanto, nesta abordagem não foram encontrados peptídeos referentes à família das BPPs, por serem pequenos fragmentos peptídicos, possivelmente foram perdidos e/ou não puderam ser identificados com o uso das metodologias empregadas neste estudo.

A família das metaloproteases caracterizou-se por apresentar seus spots amplamente distribuídos ao longo do gel com MM entre 67 e 14.4kDa e pI entre 5 e 7 (**Figura 8**).

Analisando-se a região de metaloproteases da classe PIII do gel de 2DE pH 4-7 do veneno de *B. jararaca*, isto é, com MM entre 67 e 43kDa, 45% dos spots caracterizados como metaloproteases foram encontrados neste quadrante. Observaram-se fileiras de spots de mesma massa e pI diferentes, sugerindo tratar-se de isoformas de uma mesma proteína. Como nenhum deles foi integralmente sequenciado, não se pode descartar a existência de pequenas diferenças em suas estruturas primárias, levando a alterações de pI. Outra possibilidade bastante provável é a existência de diferentes modificações pós-traducionais, como glicosilações, nestas metaloproteases, gerando spots de MM similares e pI diferentes. Dentre eles, destacam-se os spots 2, 3, 6, 9 e 13, com pIs entre 4.6 a 6, e MM entre 55.9 e 58.5kDa, descritos como Bothropasin (Mandelbaum *et al.*, 1982) /Jararhagin (Paine *et al.*, 1992), relativo ao cluster **JARO001002D11**, após análise nos bancos de dados de *B. jararaca* (Cidade *et al.*, 2006). A Botropasina e Jararagina já haviam sido isoladas do veneno da serpente *B. jararaca*, como apresentado na **Tabela 1**. As mesmas possuem alta homologia, e apenas pôde-se detectar alguma diferença no domínio metalo, já que os domínios tipo-desintegrina e rico em cisteína são idênticos. Desta forma, quando não era possível determinar a qual cluster de *B. jararaca*, este homólogo fazia parte, o mesmo era classificado como Bothropasin /Jararhagin (Cidade *et al.*, 2006).

Estas proteínas agem pela clivagem do fibrinogênio o que leva a um aumento da fibrinólise no plasma, resultando em hemorragia local e sistêmica (Paine *et al.*, 1992).

Os peptídeos sequenciados das metaloproteases foram alinhados contra a sequência da Jararagina pelo programa Multalin, também foi utilizada a classificação de seus domínios na identificação dos peptídeos. Em alguns casos, foram sequenciados apenas peptídeos dos domínios desintegrina e/ou rico em cisteína, o que pode indicar que o domínio metaloprotease não estava presente e, portanto, não se tratava realmente de metaloproteases, mas sim de desintegrinas e/ou domínios ricos em cisteínas originários destas metaloenzimas.

Analisando-se as seqüências de ácidos aminados encontradas, pôde-se verificar a presença de peptídios relativos ao pró-domínio no spot 9 “NKGLFSKDYSEIHYS PDGR” ao domínio Metalo “ITVKPDVDYTLNSFAEWR”, ”MYELANIVNEI(LR)/FR”, nos spots 2, 6, 9 e 13; do domínio rico em cisteína “GNYYGYCR”, nos spots 2 e 3, “MFYSNDDEHK” e “MFYSNDDEHKGMVLPGT”, nos spots 3 e 13 respectivamente.

Outro conjunto de spots, os de número 19, 22, 23, 28 e 31, com *pI* entre 4.4 e 4.8 e MM entre 43.2 e 48.1kDa, também foram descritos como Bothropasin /Jararhagin. Apresentavam peptídeos relativos ao pró-domínio “NKGLFSKDYSEIHYS PDGR”, ao domínio metalo “ITVKPDVDYTLNSFAEWR” e ”MYELANIVNEIFR”, os spots 19, 22, 23 e 28. Entretanto, no spot 31, apenas foram encontrados peptídeos relativos ao domínio rico em cisteína “GNYYGYCR”, “ENGKKIPCAPE”, “DHSPGQNNPCKMFY”, “SNDDEHKGMVLPATK” e “MFYSNDDEHKGMVLPGT”.

Além desses spots descritos, um pouco abaixo da faixa de MM da classificação das PIII, provavelmente em consequência do processamento proteolítico dos spots com maior massa molecular correspondente às PIII maduras, foi detectado um spot com a mesma classificação, o spot 46 de *pI* 6.22 e MM 40kDa, que apresentava os peptídeos relativos ao pró-domínio “NKGLFSKDYSEIHYS PDGR”, domínio metalo “ITVKPDVDYTLNSFAEWR” e ”MYELANIVNEIFR”, mas não apresentou peptídeos relativos a nenhum dos outros domínios.

Diversos spots identificados como metaloproteases não apresentaram massas moleculares compatíveis com esta classe de toxinas (PI-PIV); muito provavelmente, trata-se de fragmentos destas enzimas que existem naturalmente no veneno e/ou que foram artificialmente gerados pela manipulação do mesmo. Para minimizar possíveis artefatos, todos os procedimentos realizados com o veneno foram feitos a 4°C e o mesmo era estocado a -20°C, mas, ainda assim, estes fragmentos peptídicos foram produzidos.

Os spots 1 e 5 de *pIs* 4.60 e 4.83, com MM de 58.5 e 56.6 kDa, foram descritos como Bothropasin precursor (Mandelbaum *et al.*, 1982), relativo ao cluster **JARO001016B04**, apresentaram os peptídeos “ITVKPDVDYTLNSFAEWR” e “MYELANIVNEILR”, relativos ao domínio metalo, e os peptídeos “MFYSNDDEHKGMVLPGT” e “GNYYGYCR”, relativos ao domínio rico em cisteína, adicionalmente o spot 5 apresentou o peptídeo “HDNAQLLTAIDFNGPTIGYAYIGSMCHPK” relativo ao domínio metalo. Apenas

foi possível identificar este cluster como característico de Botropasina devido à presença de um peptídeo específico desta proteína, o “YVELFIVVDQEMVTK” característico do domínio metalo da Botropasina.

A Botropasina foi a primeira SVMP da classe P-III, a ser descrita é, uma metaloprotease de 48 kDa, que apresenta atividade hemorrágica; também causa mionecrose, e apresenta especificidade por enlaces peptídicos, em que participam leucina e fenilalanina. É uma enzima com alta atividade proteolítica, sua ação é inibida por quelantes de metais. Botropasina compartilha 95% de identidade com a Jararagina (Mandelbaum *et al.*, 1982).

O spot 61 de pI 4.83 e MM 30.2kDa, foi descrito como precursor de Jararagina, representado pelo cluster **JARO001013H03**; seus peptídeos identificados, não apresentaram homologia com o domínio metalo, mas apenas com o domínio, tipo-desintegrina “ASMSECDPAEHCTGQSSECPADV FHK”, e com o domínio rico em cisteína “MFYSNDDEHKGMVLP GTK”.

No veneno de *B. jararaca* são encontradas duas formas de Jararagina, a enzima integral PIII e a Jararagina-C, uma forma que é resultante do processamento da região C-terminal desta por proteólise, apresenta 28kDa e foi purificada a partir do veneno de *B. jararaca*, constituída pelos domínios tipo-desintegrina, e rico em cisteína, idênticos aos da Jararagina. Utilizando a MM apresentada por este spot 61, 30.2 kDa, muito provavelmente, pode-se ter identificado esta forma processada da Jararagina, já que não foi identificado nenhum domínio metalo.

A Jararagina-C, inibe a agregação plaquetária, induzida pelo colágeno e por adenosina difosfato; não apresenta o domínio catalítico das metaloproteases. Apresenta uma sequência de ligação à integrina $\alpha_2\beta_1$ composta pelos aminoácidos ECD (Glu-Cys-Asp) e, não, pelo RGD, presente nas desintegrinas clássicas (Paine *et al.*, 1992; Usami *et al.*, 1994; Moura-da-Silva *et al.*, 1999).

Os spots 62, 113 e 118, com pI 4.84, 6.23 e 6.43, MM de 32.4 kDa, 28.4 kDa e 28.2 kDa, respectivamente, foram identificados como homólogos de metaloprotease de *Bothrops jararacussu* BOJUMET III (Kashima *et al.*, 2004), relativo ao cluster **JARO001023D12**, descritos na tabela apenas como pertencentes a família das metaloproteases. Os spots 113 e 118 apresentaram o peptídeo “TLTSFG EWR” relativo ao domínio e os três spots apresentaram o peptídeo “ISHDHAQLLT TIVFDNYVIGIT”, entretanto o spot 62 não apresentou os dois primeiros peptídeos “IS”, da cadeia peptídica, podendo este ter sofrido processamento proteolítico.

Comparativamente, na análise do transcriptoma da glândula de veneno da serpente *B. jararacussu*, um dos clusters relacionados às metaloproteases, foi BOJUMET III classificado como pertencente ao grupo das PIII (Kashima *et al.*, 2004).

Quanto aos spots 102, 103, 106, 109, 115, 136, 141 e 167, com *pI* entre 6.77 e 5.37, MM entre 27.7 e 17.1 kDa, respectivamente, foram identificados, como, “Insularinase/Insularin” cluster **JARO001005F05**. Todos os spots apresentaram o peptídeo “TLTSFGGEWR”, relativo ao domínio metalo, os demais peptídeos não obtiveram nenhuma homologia quando testados contra a sequência de Jararagina.

A Insularinase/insularin é uma metaloprotease PII, presente no veneno da serpente *B. insularis*, que apresenta 476 resíduos de aminoácidos com MM de 53.3 kDa. Este precursor de PI, insularinase/insularin, contém ambos os domínios enzimático e desintegrina, que sofre processamento pós-traducional, liberando a insularinase A, que funciona como um ativador de protombina (Junqueira-de-Azevedo & Ho, 2002; Valente *et al.*, 2009). Provavelmente, em nosso caso, a proteína presente nesses spots seria uma PI de *B. jararaca* homóloga a insularinase A.

O spot 117 de *pI* 6.37 e MM 27.1 kDa foi identificado, como, *Bothrops jararaca* “bothrostatin precursor” cluster **JARO001003B09**; apresentou os peptídeos “YFSDCSYIQCWDFIMK” e “DMINVQPAAPQTLDSFGGEWR”, relativos ao domínio metalo, e os peptídeos relativos ao domínio desintegrina “YIELFLVVDHGMFMK” e “HDTGSCSCGGYSCIMAPVISHDIAK”; devido a sua massa molecular, os peptídeos contidos neste spot, provavelmente são produto de degradação do precursor da Botrostatina.

Entre as principais desintegrinas já identificadas no veneno de *B. jararaca*, encontra-se a Botrostatina, clonada a partir de biblioteca de cDNA, oriundas de metaloproteases da classe PII, mostrou-se bastante efetiva na inibição da agregação plaquetária induzida por colágeno. É classificada como desintegrina de tamanho médio, com 73 aminoácidos (2º grupo) (Fernandez *et al.*, 2005).

Os spots 12 e 48, com *pI* de 5.60 e 6.54, MM de 60.7kDa e 39.3kDa, foram identificados como vascular apoptosis-inducing protein (VAIP), cluster **JARO001012A02**. É uma metaloprotease PIII que apresenta os três domínios característicos desta enzima, zinco dependente. VAIP é capaz de degradar fibrinogênio e induzir apoptose nas células do endotélio vascular (Cidade *et al.*, 2006). Novamente, as cadeias polipeptídicas, encontradas na análise do spot 48, devem ser produto do processamento proteolítico da VAIP, presente no spot 12, o que pode ser confirmado

quando analisado o peptídeo “GAGTECQAARSECDMADLCTGR”, que estava presente no spot 12, e novamente foi identificado no spot 48, entretanto sem apresentar os 6 primeiros peptídeos “GAGTEC”. Não foi possível identificar a qual domínio pertenciam os peptídeos, utilizando a sequência da Jararagina como homólogo.

Dentre as últimas metaloproteases encontradas na análise do gel 2DE pH 4-7, encontra-se o spot 137 de pI 4.99 e MM de 22.5 kDa, identificado como “Zinc metalloproteinase jerdonitin precursor”, cluster **JARO001012B03** sua identificação foi baseada no único peptídeo encontrado para este spot “FSDCSLNQYSSDLINYYGCLLNEPLR”, o mesmo, não apresentou homologia contra a sequência de Jararagina.

“Jerdonitin” foi purificada do veneno da serpente *Trimeresurus jerdonii*. Apresenta massa molecular de 36 kDa em SDS-PAGE, e inibe a agregação plaquetária. Sua clonagem e sequenciamento revelaram que a “Jerdonitin” pertencem à classe PII das SVMs. Diferentemente de outras PII, os seus domínios metaloprotease e desintegrina não são separados, fato correlacionado a duas cisteínas presentes adicionalmente na sua estrutura, que, possivelmente, formam pontes de sulfeto e desta forma os domínios não são separados (Chen *et al.*, 2003).

Além das metaloproteases, foi possível também encontrar proteínas da família das serinoproteases, que apresentaram seus spots na faixa de MM entre 30 a 60 kDa, aproximadamente.

Um grande número de isoformas já foi descrito para serinoproteases de veneno, no qual pequenas mudanças na sequência apresentaram grande impacto na atividade (Cidade *et al.*, 2006).

Um primeiro grande número de spots foi identificado, como, “Serine protease catroxase II” da serpente *Crotalus atrox*, cujos clusters de identificação foram **JARO001046A06**, relacionados aos spots 18, 21, 54, 64, 67, 70, 90 e 203; **JARO001006C08**, relacionados aos spots, 38, 51, 52, 53, 55, 57, 58, 98 e 100, com uma faixa de pI entre 4.43 a 6.88, MM entre 43.2 e 27.3 kDa, com exceção do spot 203, cuja MM foi estimada em 14.4 kDa. Todos estes spots foram classificados como serinoprotease.

Outro grupo de spots 50, 56, 59, 60 e 73 de faixa de pI entre 4.45 a 5.47, MM entre 36.6 a 32.2kDa, cluster **JARO001023E07** foram identificados como “serine protease” da serpente *Bothrops jararacussu* (Kashima *et al.*, 2004).

Adicionalmente, os spots 26, 27, 30, 63, 77 e 81, com faixa de *pI* entre 4.68 e 6.02, MM entre 43.2 a 32.7 kDa, cluster **JARO001010G07**, foram identificados como *Bothrops jararaca* KN-BJ2.

De acordo com os dados transcriptômicos, foi o segundo grupo mais abundante (38 clusters) de serinoproteases que apresentaram homologia com KN-BJ2 (Cidade *et al.*, 2006). A variabilidade apresentada por estas serinoproteases pode ser consequência, tanto de processamento proteolítico, como de modificações na sequência de ácidos aminados e/ou modificações pós-traducionais, como, fosforilações, glicosilações, dentre outras.

KN-BJ 1 e KN-BJ 2 (38 e 39 kDa respectivamente), apresentam a mesma sequência, amino terminal, com atividade amidolítica, atividade sobre a liberação de cininas e atividade coagulante. Foram purificadas e seqüenciadas, a partir de livrarias de cDNA, de venenos de *B. jararaca*, apresentando atividade hidrolítica em substratos de peptidil-p-nitroanilida, quinínogênio canino e bovino, e fibrinogênio humano (Serrano *et al.*, 1998).

Por último, o spot 68 de *pI* 5.33 e MM de 28.6 kDa, cluster **JARO001035C09**, foi caracterizado como “Venom serine proteinase A”. A *Bothrops* protease A (BPA) foi isolada, como uma enzima proteolítica resistente ao aquecimento até 86⁰C por 10 min, e estável em pH entre 3 e 9. Essa enzima hidrolisa proteínas, como gelatina e protamina. Massa molecular de aproximadamente 25,4 kDa (Murayama *et al.*, 2003).

Nossos dados de identificação dos peptídeos, como pertencentes à família das serinoproteases, somados aos dados do transcriptoma do veneno de *B. jararaca*, que também identificou grande quantidade de cDNA codificando para serinoproteases, são complementares e corroboram com os efeitos clínicos observados derivados da ação desta família de proteínas, nos acidentes causados por estas espécies, cujo maior efeito no envenenamento é o excessivo consumo dos fatores de coagulação e formação de trombose de fibrinas anormais, resultando em última instância na ausência de coagulação do sangue (Saguchi *et al.*, 2005, Cidade *et al.*, 2006).

No caso das serinoproteases, igualmente como relatado para as metaloproteases, foi observado um grande número de isoformas e de proteínas e peptídeos, produzidos pelo processamento proteolítico.

Com relação às lectinas tipo C, descritas neste estudo, o primeiro grupo, que corresponde aos spots, 143, 166, 192, 196 e 231, cuja faixa de *pI* compreendia 4.50 a 6.67, e a faixa de MM estava entre 19.7 e 12.5 kDa, obteve identidade com o cluster

JARO001004F10, e foram descritos como “Platelet Glycoprotein Ib-binding protein alpha subunit” (GPIb-BP). A GPIb-BP (Kawasaki *et al.*, 1996) uma proteína de 30 kDa, pertencente ao grupo 3 das lectinas tipo C símile, age como um antagonista específico para GPIb. Esta toxina se liga ao GPIb, bloqueando a sua interação com o vWF (Lu *et al.*, 2005). Relacionando esses dados aos encontrados na análise transcriptômica, a maioria das lectinas tipo C encontradas foram homólogos à GPIb-BP, previamente isolada do veneno de *B. jararaca* (Cidade *et al.*, 2006).

O segundo grupo de Lectinas encontrado, quando analisados os spots, 181, 183, 184, 187, 191 e 195, de intervalo de pI entre 4.71 e 5.38 e MM entre 15.6 a 15.2 kDa, cluster **JARO001005B08**, foi relacionado a “bothojaracin chain A”.

Estudada por Zingali e colaboradores (2001), a Botrojaracina (BJC), uma lectina tipo-C símile de 27 kDa composta por duas cadeias polipeptídicas (15 e 13kDa), ligadas por pontes dissulfeto, pI entre 4.0-4.2, pertencente ao grupo 2, inibe a agregação plaquetária induzida pela trombina, e adicionalmente, possui um efeito anticoagulante resultante de dois mecanismos sinérgicos e distintos. Esta toxina forma um complexo com a trombina, através dos sítios de ligação (exositio I e II), formando um complexo não-covalente. No processo de ligação ao exositio I, inibe funções como a formação do coágulo de fibrinogênio, agregação plaquetária, ativação da proteína C e do fator V, atuando como um potente e seletivo inibidor da agregação plaquetária induzida pela trombina (Zingali *et al.*, 2001; Fenton *et al.*, 1991). Esta toxina também age como um eficiente anticoagulante, após ativação das vias intrínsecas de coagulação sanguínea, interagindo com a protrombina e reduzindo a formação da α -trombina (Fenton *et al.*, 1991).

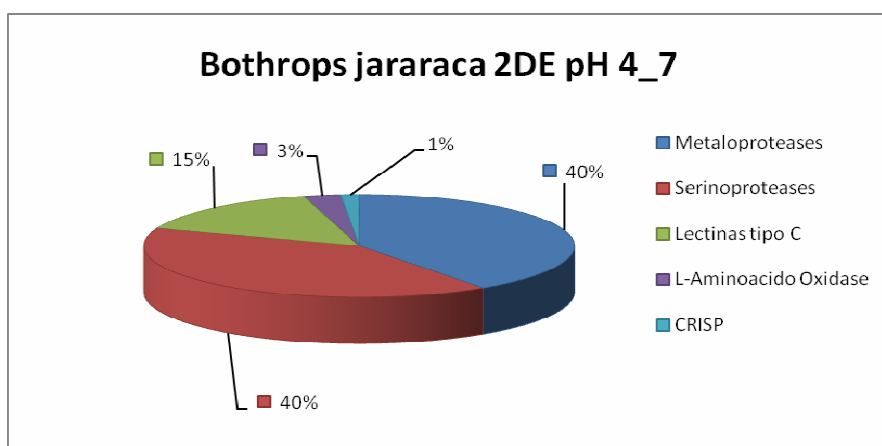
Não foram encontradas lectinas verdadeiras na análise transcriptômica do veneno de *B. jararaca*, entretanto as mesmas já foram descritas no veneno de *B. jararaca* (Ozeki *et al.*, 1994). De acordo com Cidade e colaboradores (2006), a ausência pode ter ocorrido devido à variação individual na composição de cada veneno (Cidade *et al.*, 2006). Também não foram encontradas lectinas verdadeiras, nesta análise proteômica, mesmo sendo utilizado um Pool de veneno da serpente *B. jararaca*.

Com relação as l-aminoácido oxidases encontradas, apenas foram detectados dois spots, o 45 de pI 6.18 e MM 44.8 kDa e o 190 de pI 5.09 e MM de 16.5 kDa, ambos apresentaram o cluster **JARO001003E08** e foram descritos como, “FAD-containing L-amino acid oxidase Apoxin”. As l-aminoácido oxidases são capazes de induzir apoptose; afetam as plaquetas e apresentam efeitos hemorrágicos (Daltry *et al.*,

1996). Na análise transcriptômica, apenas foi encontrada uma frequência de 0.5% de clusteres para estas toxinas (Cidade *et al.*, 2006), o que estaria de acordo com os nossos resultados proteômicos.

Por último, apenas um spot foi relacionado às proteínas da família CRISP. O spot 89 de *pI* 6.57 e *MM* de 32kDa, cluster **JARO001006E12**, e pôde-se observar peptídeos referentes à CRISPs já descritas, como a “Catrin” de *Crotalus atrox* (Yamazaki *et al.*, 2003), em que as sequências de peptídeos encontradas, obtiveram alta homologia, dentre eles os peptídeos ”WTEIIHAWHGEYK”, “YFYVCQYCPAGNIR”, e “YGTGAEPPTAVIGHYTQIVWYK”. “Catrin” inibe a despolarização induzida da contração do músculo liso arterial do rabo de cobaios, mostrando propriedades de toxinas que bloqueiam canais de cálcio (Yamazaki *et al.*, 2003). De acordo com o banco de dados de EST, gerados a partir da glândula de veneno de *B. jararaca*, na análise transcriptômica do veneno de *B. jararaca*, foram encontrados alguns clusteres referentes à família das CRISPs (Cidade *et al.*, 2006).

Não foram encontrados peptídeos que fossem descritos como pertencentes à família das fosfolipases A₂, e também, dos peptídeos potenciadores de bradicinina. Entretanto, outras abordagens foram realizadas com o objetivo de tentar detectar todas as frações que sabidamente estão presentes no veneno da serpente *B. jararaca*.



Bothrops jararaca 2DE pH 4_7	
Metaloproteases	29
Serinoproteases	29
Lectinas tipo C	11
L-Aminoacido Oxidase	2
CRISP	1
TOTAL	72

Planilha 3 – Total de spots detectados e planilha dos percentuais das famílias de proteínas encontradas na análise por espectrometria de massas por MALDI-TOF/TOF MS.

Spot	pI / MM (kDa)		Método (PMF e/ou MS/MS)	Peptídeos sequenciados	Identificação (NCBI)	Identificação (banco de dados <i>B. jararaca</i>)	Descrição da Proteína
	Experimental	Teórico					
1	4.60 / 58.5	5.15 / 70.4	MS/MS	GNYYGYCR MYELANIVNEILR MFYSNDDEHKGMVLPGT ITVKPDVDYTLNSFAEWR YVELFIVVDQEMVTK	gi 4895109	JARO001016B04	METALLOPROTEINASE PIII Bothropasin precursor
2	4.64 / 57.9	5.15 / 70.3	MS/MS	GNYYGYCR MYELANIVNEILR ITVKPDVDYTLNSFAEWR	gi 6246 gi 4895109	JARO001002D11	METALLOPROTEINASE PIII Bothropasin/Jararhagin
3	4.73 / 55.9	6.05 / 79.8	MS/MS	GNYYGYCR MFYSNDDEHK	gi 6246 gi 4895109	JARO001002D11	METALLOPROTEINASE PIII Bothropasin/Jararhagin
5	4.83 / 56.6	5.15 / 70.4	MS/MS	MYELANIVNEILR ITVKPDVDYTLNSFAEWR HDNAQLLTAIDFNGPTIGYAYIGSMCHPK GNYYGYCR YVELFIVVDQEMVTK	gi 4895109	JARO001016B04	METALLOPROTEINASE PIII Bothropasin precursor
6	4.90 / 57.3	5.21 / 66.1	MS/MS	MYELANIVNEILR ITVKPDVDYTLNSFAEWR	gi 6246 gi 4895109	JARO001002D11	METALLOPROTEINASE PIII Bothropasin/Jararhagin
9	5.35 / 61.3	5.21 / 66.1	MS/MS	MYELANIVNEIFR ITVKPDVDYTLNSFAEWR NKGLFSKDYSEIHSPDGR	gi 6246 gi 4895109	JARO001002D11	METALLOPROTEINASE PIII Bothropasin/Jararhagin
12	5.60 / 60.7	7.18 / 36.2	MS/MS	GAGTECQAARSECDMADLCTGR DVVSPVPCGNYFVEVGEEDCGSPR	gi 11320555	JARO001012A02	METALLOPROTEINASE PIII VAIP
13	4.47 / 61.7	6.05 / 79.8	MS/MS	MYELANIVNEIFR ITVKPDVDYTLNSFAEWR MFYSNDDEHKGMVLPGTK HDNAQLLTAIDFNGPTIGYAYIGSMCHPKR	gi 6246 gi 4895109	JARO001002D11	METALLOPROTEINASE PIII Bothropasin/Jararhagin

Tabela 5 – Identificações obtidas após tripsinização dos spots do gel 2DE pH 4-7 do veneno da serpente *B. jararaca* e análise por MALDI-TOF/TOF MS.

Spot	pI / MM (kDa)		Método (PMF e/ou MS/MS)	Peptídeos sequenciados	Identificação (NCBI)	Identificação (banco de dados <i>B. jararaca</i>)	Descrição da Proteína
	Experimental	Teórico					
18	4.46 / 42.2	6.08 / 20.6	MS/MS	LDSPVSNSEHIAPLSLPSPPSVGVCVCR VSDYTEWIR WDKDIMLIRLK	gi 18652952	JARO001046A06	SERINOPROTEINASE
19	4.41/43.2	5.22/66.4	MS/MS	MYELANIVNEIFR ITVKPDVDYTLNSFAEWR NKGLFSKDYSEIHYS PDGR	gi 6246 gi 4895109	JARO001002D11	METALLOPROTEINASE PIII Bothropasin/Jararhagin
21	4.69 / 47.2	6.08 / 20.6	MS/MS	LDSPVSNSEHIAPLSLPSPPSVGVCVCR VSDYTEWIR WDKDIMLIRLK	gi 18652952	JARO001046A06	SERINOPROTEINASE
22	4.70 / 45.5	6.08 / 20.6	MS/MS	MYELANIVNEIFR ITVKPDVDYTLNSFAEWR NKGLFSKDYSEIHYS PDGR	gi 6246 gi 4895109	JARO001002D11	METALLOPROTEINASE PIII Bothropasin/Jararhagin
23	4.68 / 43.7	5.21 / 66.1	MS/MS	MYELANIVNEIFR ITVKPDVDYTLNSFAEWR NKGLFSKDYSEIHYS PDGR	gi 6246 gi 4895109	JARO001002D11	METALLOPROTEINASE PIII Bothropasin/Jararhagin
26	4.67 / 43.2	8.68 / 28.5	MS/MS	VSDYTEWIR WDKDIMLIR NSAHIAPISLPSPPPIVGSVCR AAYPELPATSR IMGWGTISTSK NYTKWDK	gi 2130945	JARO001010G07	SERINOPROTEINASE Kinin-releasing and fibrinogen-clotting serine proteinase (KN-BJ 2)
27	6.92 / 54.9	8.68 / 28.5	MS/MS	VSDYTEWIR WDKDIMLIR NSAHIAPISLPSPPPIVGSVCR AAYPELPATSR IMGWGTISTSK NYTKWDK	gi 2130945	JARO001010G07	SERINOPROTEINASE Kinin-releasing and fibrinogen-clotting serine proteinase (KN-BJ 2)
28	4.70 / 45.5	5.21 / 66.1	MS/MS	MYELANIVNEIFR ITVKPDVDYTLNSFAEWR NKGLFSKDYSEIHYS PDGR	gi 6246 gi 4895109	JARO001002D11	METALLOPROTEINASE PIII Bothropasin/Jararhagin

Continuação da Tabela 5 – Identificações obtidas após tripsinização dos spots do gel 2DE pH 4-7 do veneno da serpente *B. jararaca* e análise por MALDI-TOF/TOF MS.

Spot	pI / MM (kDa)		Método (PMF e/ou MS/MS)	Peptídeos sequenciados	Identificação (NCBI)	Identificação (banco de dados <i>B. jararaca</i>)	Descrição da Proteína
	Experimental	Teórico					
30	4.68 / 39.3	9.3 / 20.3	MS/MS	VSDYTEWIR NSAHIAPISLPSPPIVGSVCR	gi 2130945	JARO001010G07	SERINOPROTEINASE Kinin-releasing and fibrinogen-clotting serine proteinase (KN-BJ 2)
31	4.79 / 48.3	5.21 / 66.1	MS/MS	GNYGYCR CSIAALILK ENGKKIPCAPE DHSPGQNNPCKMFY SNDDEHKGMVLPATK MFYSNDDEHKGMVLPGTK	gi 6246 gi 4895109	JARO001002D11	METALLOPROTEINASE PIII Bothropasin/Jararhagin
38	5.03 / 39.3	5.32 / 28.5	MS/MS	AAYPELPAEYR IMGWGSITPIQK NDDALDKDMLVLR TNPDVPHCANINLLDDAVCR	gi 18652952	JARO001006C08	SERINOPROTEINASE
45	6.18 / 44.8	5.97 / 54.8	MS/MS	ETLSVTADYVIVCTTSR VGEVINKDPGVLEYPVKPSEVGK EGWYANLGPMPR RFDEIVGGMDK SAGQLYEESLQK ETDYEEFLEIAK	gi 5565691	JARO001003E08	L-AMINO ACID OXIDASE
46	6.22 / 40.0	7.01 / 37.0	MS/MS	MYELANIVNEIFR ITVKPDVDYTLNLSFAEWR NKGLFSKDYSEIHSPDGR	gi 6246 gi 4895109	JARO001002D11	METALLOPROTEINASE PIII Bothropasin/Jararhagin
48	6.54 / 39.3	7.18 / 36.2	MS/MS	QAARSECDMADLCTGR DVVSPPPVCGNYFVEVGEECDGSPR	gi 11320555	JARO001012A02	METALLOPROTEINASE PIII VAIP
50	4.45 / 36.6	5.33 / 28.6	MS/MS	VSDYTEWIK NFQMQLGVHVK EEASLCPNRKK IMGWGTISPTK	gi 32396013	JARO001023E07	SERINOPROTEINASE
51	4.43 / 34.7	5.32 / 28.5	MS/MS	AAYPELPAEYR IMGWGSITPIQK NDDALDKDMLVLR TNPDVPHCANINLLDDAVCR	gi 18652952	JARO001006C08	SERINOPROTEINASE
52	4.50 / 34.0	5.32 / 28.5	MS/MS	AAYPELPAEYR TNPDVPHCANINLLDDAVCR LDSPVSDSEHIAPLSLPS SPPSVGSVCR TLNQDEQTR VVGGECHINEHR KPVNDSTHIVPLSLPSSPPSVGSVCR IMGWGSITPIQT	gi 18652952	JARO001006C08	SERINOPROTEINASE

Continuação da Tabela 5 – Identificações obtidas após tripsinização dos spots do gel 2DE pH 4-7 do veneno da serpente *B. jararaca* e análise por MALDI-TOF/TOF MS.

Spot	pI / MM (kDa)		Método (PMF e/ou MS/MS)	Peptídeos sequenciados	Identificação (NCBI)	Identificação (banco de dados <i>B. jararaca</i>)	Descrição da Proteína
	Experimental	Teórico					
53	4.56 / 32.4	5.61 / 27.8	MS/MS	KPEIQNEIVDLHNSLR WTEIIHAWHGEYK YFYVCQYCPAGNIR AAYPELPAEYR	gij18652952	JARO001006C08	SERINOPROTEINASE
54	4.59 / 33.4	5.32 / 28.5	MS/MS	AAYPELPAEYR IMGWGSITPIAK NDDALDKDMLVLR TNPDPVPHCANINLLDDAVCR LDSPVSNSEHIAPLSLSPSSPPSVGVSVC	gij18652952	JARO001046A06	SERINOPROTEINASE
55	4.64 / 34.8	5.32 / 28.5	MS/MS	AAYPELPAEYR IMGWGSITPIQK TNPDPVPHCANINLLDDAVCR IAPLSLSPSSPPSVGVSVC	gij18652952	JARO001006C08	SERINOPROTEINASE
56	4.67 / 33.7	5.33 / 28.6	MS/MS	IMGWGTISPTK NFQMLGVHVK AAYPWPVSVSTTLGAGILQGGK VSNSEHIAPLSLSPSSPPSVGVSVC	gij32396013	JARO001023E07	SERINOPROTEINASE
57	4.67 / 32.1	5.32 / 28.5	MS/MS	AAYPELPAEYR IMGWGSITPIQK LDSPVSDSEHIAPLSLSPSSPPSVGVSVC TNPDPVPHCANINLLDDAVCR	gij18652952	JARO001006C08	SERINOPROTEINASE
58	4.76 / 33.8	5.32 / 28.5	MS/MS	AAYPELPAEYR IMGWGSITPIQK TNPDPVPHCANINLLDDAVCR LDSPVSDSEHIAPLSLSPSSPPSVGVSVC NDDALDKDMLVLR	gij18652952	JARO001006C08	SERINOPROTEINASE
59	4.86 / 34.8	5.33 / 28.6	MS/MS	VSNSEHIAPLSLSPSSPPSVGVSVC IMGWGTISPTK	gij32396013	JARO001023E07	SERINOPROTEINASE
60	4.79 / 32.0	5.33 / 28.6	MS/MS	IMGWGTISPTK NFQMLGVHVK AAYPWPVSVSTTLGAGILQGGK VSNSEHIAPLSLSPSSPPSVGVSVC ETYPDPVPHCANINILDHAVCR	gij32396013	JARO001023E07	SERINOPROTEINASE
61	4.83 / 30.2	4.78 / 28.4	MS/MS	MFYSNDEHKGMVLPGTK ASMSECDPAEHTGQSSPCPADVFHK	gij62467	JARO001013H03	METALLOPROTEINASE P-III Jararhagin precursor

Continuação da Tabela 5 – Identificações obtidas após tripsinização dos spots do gel 2DE pH 4-7 do veneno da serpente *B. jararaca* e análise por MALDI-TOF/TOF MS.

Spot	pI / MM (kDa)		Método (PMF e/ou MS/MS)	Peptídeos sequenciados	Identificação (NCBI)	Identificação (banco de dados <i>B. jararaca</i>)	Descrição da Proteína
	Experimental	Teórico					
62	4.84 / 32.4	5.53 / 27.9	MS/MS	HAQLLTIVFDNYVIGITK	gij32306930	JARO001023D12	METALLOPROTEINASE PIII
63	4.95 / 32.2	5.33 / 28.6	MS/MS	IMGWGTISPTK VSNSEHIAPLSLPSSPPSVGVC YTEWIRSIAGNTDVTCP	gij2130945	JARO001010G07	SERINOPROTEINASE Kinin-releasing and fibrinogen-clotting serine proteinase (KN-BJ 2)
64	4.90 / 33.8	5.32 / 28.5	MS/MS	AAYPELPAEYR IMGWGSITPIQK LDSPVSDSEHIAPLSLPSSPPSVGVC TNPDPVPHCANINLLDDAVCR IMGWGSITPIAK NDDALDKDMLVLR	gij18652952	JARO001046A06	SERINOPROTEINASE
67	5.01 / 35.0	9.6 / 22.6	MS/MS	GNIVIFLGVHSLK LDSPVSNSEHIAPLSLPSVSGVC NDEKDKDIMLIR	gij18652952	JARO001046A06	SERINOPROTEINASE
68	5.09 / 35.4	5.33 / 28.6	MS/MS	VSNSEHIAPLSLPSSPPSVGVC ETYPDPVPHCANINLLDHA	gij6691472	JARO001035C09	SERINOPROTEINASE Venom serine proteinase A (BPA)
70	5.15 / 33.8	5.32 / 28.5	MS/MS	AAYPELPAEYR NPDVPHCANINLLDDAVCR	gij18652952	JARO001046A06	SERINOPROTEINASE
73	5.47 / 33.1	5.33 / 28.6	MS/MS	VSNSEHIAPLSLPSSPPSVGVC	gij32396013	JARO001023E07	SERINOPROTEINASE
77	5.68 / 32.7	5.33 / 28.6	MS/MS	IMGWGTISPTK VSNSEHIAPLSLPSSPPSVGVC	gij2130945	JARO001010G07	SERINOPROTEINASE Kinin-releasing and fibrinogen-clotting serine proteinase (KN-BJ 2)
81	6.02 / 33.6	5.33 / 28.6	MS/MS	IMGWGTISPTK VSNSEHIAPLSLPSSPPSVGVC	gij2130945	JARO001010G07	SERINOPROTEINASE Kinin-releasing and fibrinogen-clotting serine proteinase (KN-BJ 2)
89	6.57 / 32.0	7.53 / 21.8	MS/MS	WTEIIHAWHGEYK YFYVCQYCPAGNIR YGTGAEPPTAVIGHYQIVWYK	gij28972958	JARO001006E12	Cysteine-rich secretory proteins (CRISP family)
90	6.88 / 31.7	5.32 / 28.5	MS/MS	AAYPELPAEYR IMGWGSITPIQK LDSPVSDSEHIAPLSLPSSPPSVGVC TNPDPVPHCANINLLDDAVCR KPVNDSTHIVPLSLPSSPPSVGVC	gij18652952	JARO001046A06	SERINOPROTEINASE
98	4.99 / 29.7	5.32 / 28.5	MS/MS	AAYPELPAEYR IMGWGSITPIQK LDSPVSDSEHIAPLSLPSSPPSVGVC TNPDPVPHCANINLLDDAVCR NDDALDKDMLVLR KPVNDSTHIVPLSLPSSPPS	gij18652952	JARO001006C08	SERINOPROTEINASE

Continuação da Tabela 5 – Identificações obtidas após tripsinização dos spots do gel 2DE pH 4-7 do veneno da serpente *B. jararaca* e análise por MALDI-TOF/TOF MS.

Spot	pI / MM (kDa)		Método (PMF e/ou MS/MS)	Peptídeos sequenciados	Identificação (NCBI)	Identificação (banco de dados <i>B. jararaca</i>)	Descrição da Proteína
	Experimental	Teórico					
100	5.32 / 27.3	5.32 / 28.5	MS/MS	AAYPELPAEYR IMGWGSITPIQK LDSPVSDSEHIAPLSLPSPPSVGVSVC TNPDPVPHCANINLLDDAVCR NDDALDKDMLLVR KPVNDSTHIVPLSLPSSPPSVGVSVC	gij18652952	JARO001006C08	SERINOPROTEINASE
102	5.37 / 27.1	7.82 / 22.7	MS/MS	TLT SFGWEWR YNSDSNKIR	gij52426579	JARO001005F05	METALLOPROTEINASE Insularinase and insularin precursor
103	5.58 / 28.7	5.5 / 54.5	MS/MS	TLT SFGWEWR SVNVDA SLANLEVVWSK DCLCGA SLCIMSPGLTDGPSYEFSDCSK YNSLNTIR	gij52426579	JARO001005F05	METALLOPROTEINASE Insularinase and insularin precursor
106	5.55 / 24.1	5.5 / 54.5	MS/MS	TLT SFGWEWR SVNVDA SLANLEVVWSK DCLCGA SLCIMSPGLTDGPSYEFSDCSK YNSLNTIR	gij52426579	JARO001005F05	METALLOPROTEINASE Insularinase and insularin precursor
109	5.82 / 27.7	5.5 / 54.5	MS/MS	TLT SFGWEWR YNSDSNKIR	gij52426579	JARO001005F05	METALLOPROTEINASE Insularinase and insularin precursor
113	6.23 / 28.4	5.53 / 27.9	MS/MS	ISHDHAQLLTIVFDNYVIGITK TLT SFGWEWR	gij32306931	JARO001023D12	METALLOPROTEINASE PIII
115	6.34 / 28.4	5.5 / 54.5	MS/MS	TLT SFGWEWR YNSDSNKIR	gij52426579	JARO001005F05	METALLOPROTEINASE Insularinase and insularin precursor
117	6.37 / 27.1	5.48 / 54.7	MS/MS	YFSDC SYIQCWDFIMK DMINVQPAAPQTLDSFGWEWR YIELFLVVDHGMFMK HDTGSCSCGGYSCIMAPVISHDIAK	gij13194759	JARO001003B09	METALLOPROTEINASE Bothrostatin precursor
118	6.43 / 28.2	5.53 / 27.9	MS/MS	ISHDHAQLLTIVFDNYVIGITK TLT SFGWEWR	gij32306930	JARO001023D12	METALLOPROTEINASE PIII
136	4.96 / 22.1	5.5 / 54.5	MS/MS	TLT SFGWEWR YNSDSNKIR	gij52426579	JARO001005F05	METALLOPROTEINASE Insularinase and insularin precursor
137	4.99 / 22.5	4.66 / 17.9	MS/MS	FSDC SLNQYSSDLINYYGCLLNEPLR	gij87245249	JARO001012B03	METALLOPROTEINASE Jerdonitin
141	5.14 / 23.0	5.5 / 54.5	MS/MS	TLT SFGWEWR YNSDSNKIR	gij52426579	JARO001005F05	METALLOPROTEINASE Insularinase and insularin precursor
143	5.01 / 19.7	4.45 / 17.1	MS/MS	YYVWIGLR ESWDDVSWYDAER WSDYSSVSYENLVR	gij62131097	JARO001004F10	C-TYPE LECTIN Platelet Glycoprotein Ib-binding protein alpha subunit
166	6.67 / 17.5	4.45 / 17.1	MS/MS	YYVWIGLR ESWDDVSWYDAER WSDYSSVSYENLVR	gij62131097	JARO001004F10	C-TYPE LECTIN Platelet Glycoprotein Ib-binding protein alpha subunit

Continuação da Tabela 5 – Identificações obtidas após tripsinização dos spots do gel 2DE pH 4-7 do veneno da serpente *B. jararaca* e análise por MALDI-TOF/TOF MS.

Spot	pI / MM (kDa)		Método (PMF e/ou MS/MS)	Peptídeos sequenciados	Identificação (NCBI)	Identificação (banco de dados <i>B. jararaca</i>)	Descrição da Proteína
	Experimental	Teórico					
167	6.77 / 17.1	5.5 / 54.5	MS/MS	TLTSFGGEWR YNSDSNKIR	gij52426579	JARO001005F05	METALLOPROTEINASE Insularinase and insularin precursor
181	4.71 / 15.6	5.55 / 19.1	MS/MS	DFSWEWTDR GQSEVWIGLWDK EFCVELVSDTGYR	gij62131097	JARO001005B08	C-TYPE LECTIN Bothojaracin chain A precursor
183	4.77 / 15.0	5.55 / 19.1	MS/MS	DFSWEWTDR GQSEVWIGLWDK EFCVELVSDTGYR	gij62131097	JARO001005B08	C-TYPE LECTIN Bothojaracin chain A precursor
184	4.82 / 15.0	5.55 / 19.1	MS/MS	DFSWEWTDR GQSEVWIGLWDK EFCVELVSDTGYR	gij62131097	JARO001005B08	C-TYPE LECTIN Bothojaracin chain A precursor
187	4.87 / 15.8	5.55 / 19.1	MS/MS	DFSWEWTDR GQSEVWIGLWDK EFCVELVSDTGYR	gij62131097	JARO001005B08	C-TYPE LECTIN Bothojaracin chain A precursor
190	5.09 / 16.5	5.97 / 54.8	MS/MS	IYFAGEYTAQAHGWDSTIK YAMGGITTFPTYQFQHFSEALTAPVDR	gij5665691	JARO001003E08	L-AMINO ACID OXIDASE
191	5.11 / 15.2	5.55 / 19.1	MS/MS	DFSWEWTDR GQSEVWIGLWDK EFCVELVSDTGYR YKPGCHLASFHLYGESPEIAEYISDYHK	gij62131097	JARO001005B08	C-TYPE LECTIN Bothojaracin chain A precursor
192	5.07 / 14.3	4.45 / 17.1	MS/MS	YYVWIGLR ESWDDVSWYDAER WSDYSSVSYENLVR DTPFECPSDWSTHR	gij62131097	JARO001004F10	C-TYPE LECTIN Platelet Glycoprotein Ib-binding protein alpha subunit
195	5.38 / 15.2	5.55 / 19.1	MS/MS	DFSWEWTDR GQSEVWIGLWDK EFCVELVSDTGYR YKPGCHLASFHLYGESPEIAEYISDYHK	gij62131097	JARO001005B08	C-TYPE LECTIN Bothojaracin chain A precursor
196	5.34 / 14.9	4.45 / 17.1	MS/MS	YYVWIGLR ESWDDVSWYDAER WSDYSSVSYENLVR DTPFECPSDWSTHR	gij62131097	JARO001004F10	C-TYPE LECTIN Platelet Glycoprotein Ib-binding protein alpha subunit
203	5.69 / 14.4	9.01 / 11.6	MS/MS	NDDALDKDMLMLVR SEFYAWIGLR	gij18652952	JARO001046A06	SERINOPROTEINASE
231	4.50 / 12.5	4.45 / 17.1	MS/MS	YYVWIGLR ESWDDVSWYDAER WSDYSSVSYENLVR DTPFECPSDWSTHR	gij62131097	JARO001004F10	C-TYPE LECTIN Platelet Glycoprotein Ib-binding protein alpha subunit

Continuação da Tabela 5 – Identificações obtidas após tripsinização dos spots do gel 2DE pH 4-7 do veneno da serpente *B. jararaca* e análise por MALDI-TOF/TOF MS.

2ª Etapa do Proteoma do veneno da serpente *B. jararaca* - Técnica de subfracionamento por exclusão molecular + 2DE + Espectrometria de massas.

Foi realizado um subfracionamento por exclusão molecular, previamente à análise por 2DE (**Figura 9**). A cromatografia separou 3 picos principais; os mesmos foram identificados como, pools I, II e III. Foi recolhido da cromatografia um total de 50 tubos, entretanto, apenas foram analisados os tubos correspondentes à área dos Pools (tubos 26 a 43).

A **Figura 10** mostra o perfil eletroforético do SDS-PAGE, gel de 15% em condições redutoras, das frações correspondentes aos diferentes pools, obtidos na cromatografia de exclusão molecular. Pôde-se observar uma distribuição das bandas em variadas regiões de MM. O pool I (raias 26 a 31) apresentou suas bandas principalmente na região de alto peso, entre 97 e 45 kDa, com bandas bem coradas nas raias 29 e 30 (cada raia correspondia ao número do tubo coletado).

Convém ressaltar que, o aparecimento de bandas pouco intensas nas regiões entre 45 e 14.4 kDa, levou a pensar que pudesse estar ocorrendo problemas de interferência do pool I com frações do pool II, devido à sobreposição de picos no cromatograma, relacionado a um problema de resolução da técnica; entretanto, esta presença também poderia ser explicada, devido ao uso de agentes redutores, que após a quebra das pontes de sulfeto, as proteínas que apresentavam interações moleculares, como oligômeros ou dímeros, podem ter perdido esta interação e apareceram, assim, bandas em faixas não esperadas de MM.

O pool II (raias 32 a 35) apresentou suas bandas em faixas de MM, entre 66 e 20.1kDa, tendo suas bandas com maior intensidade nas raias 33 e 34; nestas raias, pôde-se observar bandas bem coradas na faixa de massa molecular entre 45 e 14.4 kDa.

Por último, o pool III (tubos 36 a 43) apresentou suas bandas na faixa de MM, abaixo de 30 kDa, obtendo como bandas mais intensas as respectivas raias 37 e 38. As raias 41 e 42 apresentaram bandas fracamente coradas na faixa correspondente a 14.4 kDa.

A contagem dos spots das 2DE, dos pools I, II e III, usando-se o programa Image Master, totalizou 186, 208 e 60 spots, respectivamente. Os perfis bidimensionais mostraram-se diferentes entre si, porém, seguiu a mesma distribuição de MM, encontrada na análise pelo SDS-PAGE. Adicionalmente, por esta metodologia, pôde-se avaliar a variação ocorrida entre a faixa de pH de cada fração.

Utilizando o programa Image Master Platinum, foram realizadas sobreposições das imagens dos géis do pool I versus pool II (**Figura 11**), pool I versus pool III (**Figura 12**) e pool II versus pool III (**Figura 13**).

Para sobrepor os géis, foram alinhados os padrões de peso molecular e as faixas de *pI* de cada gel, com o objetivo de identificar quais spots haviam sido encontrados em mais de um pool, adicionalmente spots que foram encontrados em ambos os géis também eram utilizados para uma melhor sobreposição das imagens. Na **Figura 11**, a sobreposição das imagens do gel 2DE do pool I versus pool II demonstrou que com exceção dos spots encontrados na faixa mais ácida, com MM abaixo de 20.1 kDa, os outros spots não apresentaram o mesmo perfil quando as imagens foram sobrepostas. Esta região corresponde a área do gel onde as lectinas tipo C símile e LAOs normalmente são identificadas, de acordo com dados da literatura. Nossos dados também comprovaram esta afirmativa, já que a maioria dos peptídeos identificados como lectinas tipo C símile estavam presentes nesta faixa de MM quando utilizados os resultados encontrados no gel 4-7 de veneno total da serpente *B. jararaca*, como comparativo (**Figura 8, Tabela 5**).

Na **Figura 12**, foi feita a sobreposição das imagens do gel 2DE do pool I versus pool III, e novamente encontraram-se poucos spots sobrepostos, apenas foi encontrada sobreposição na porção mais básica do gel, mostrando que cada gel apresentou um perfil bidimensional bem característico a sua etapa de eluição cromatográfica.

Por último, na **Figura 13**, quando sobrepostas às imagens do gel 2DE do pool II versus pool III, novamente poucos spots foram correlacionados, basicamente os relativos à porção mais básica do gel, na faixa de MM entre 30 e 20.1 kDa.

De acordo com a análise das proteínas detectadas nos diferentes pools (**Figuras 14, 15 e 16**), a **Figura 14** mostrou que no pool I, dos 186 spots detectados, 100 (53%) encontravam-se na faixa de peso molecular acima de 43 kDa; 46 (24%) estavam entre 43 e 20.1 kDa; e 42 (22%), abaixo de 20.1 kDa, estando as proteínas distribuídas em sua maioria na faixa mais ácida do gel, pH entre 4-5, com uma menor quantidade na faixa mais básica do gel.

No pool II (**Figura 15**), dos 208 spots detectados, apenas 3 (1%) encontravam-se na faixa acima de 43kDa, com uma grande maioria dos spots, 144 (69%) na região compreendida entre 43 e 20.1kDa e 61 (29%) abaixo de 20.1kDa, pode-se observar que os spots estavam mais espaçados, sem estarem mais concentrados em uma determinada

faixa de pH, o que corresponde, assim, a spots bem intensos por toda a faixa de pH do gel 2DE de 4-7.

Por último, o pool III (**Figura 16**), que teve menos spots detectados, apenas 60, somente 1 spot foi revelado na região de alto peso, seguido de 35 (58%), na região compreendia entre 43 e 20.1 kDa e 24 (40%), na de baixo peso; com uma quantidade relativamente grande dos spots, na faixa mais básica do gel perto do pH 7, adicionalmente estes eram, spots de coloração mais intensa; esta região foi a que pode-se obter melhores resultados com relação à análise por espectrometria de massas. Ainda foram detectados spots na região mais acida de pIs entre 4 e 5, estes últimos com massa molecular entre 20.1 e 14.4 kDa.

A **Planilha 4**, apresenta a relação das faixas de pesos moleculares encontradas na análise da localização dos spots dos pools I, II e III, juntamente com uma planilha dos percentuais obtidos após análise dos spots, utilizando-se o programa Image Master (Amersham Bioscience).

Os spots foram identificados por sequenciamento, utilizando espectrometros de massas do tipo, LC-ESI-ION TRAP MS e MALDI-TOF/TOF-MS, os dados obtidos nesta etapa estão apresentados nas **Tabelas 6, 7 e 8**, correspondentes aos pools I, II e III, respectivamente. Como esperado, proteínas da família das metaloproteases, serinoproteases, lectinas do tipo-C e l-amino oxidases foram novamente identificados; adicionalmente nesta etapa, puderam-se identificar três proteínas que ainda não haviam sido identificadas na análise do veneno total; uma proteína pertencente à família das metaloproteases do grupo das PIII (HF3) identificada no pool I, uma serinoprotease (Batroxobin), identificada no pool II e por último uma proteína pertencente à família das fosfolipases A₂ identificada no pool III. Nas tabelas referentes a cada pool, a padronização utilizada na **Tabela 5** foi mantida.

Os espectros de massas obtidos também foram avaliados, já que relativamente um pequeno número de identificações foi conseguido quando analisadas as identificações dos spots de cada pool. Desta forma, dos 186 spots detectados no pool I, 58 spots, foram selecionados e tripsinizados, de acordo com a intensidade e abundância relativa. Os espectros obtidos, na sua maioria (67%) não foram de boa qualidade, não sendo possível a identificação nos bancos de dados testados (NCBI e banco de *B. jararaca*). Pôde-se identificar 18 spots que obtiveram espectros de boa qualidade e apenas 1 spot de boa qualidade, mas sem identificação nos bancos de dados utilizados (**Figura 14**).

No pool II a mesma abordagem foi empregada, e dos 208 spots detectados, foram selecionados para tripsinização 68 spots. Novamente não foram obtidos espectros com qualidade, sem identificação nos bancos de dados utilizados (73%), identificando novamente, 18 spots com espectros de boa qualidade e apenas 2 spots de boa qualidade, mas sem identificação nos bancos de dados utilizados (**Figura 15**).

Por último, o pool III, que apresentou a menor concentração de proteínas no gel 2DE, com um total de 60 spots detectados, foram selecionados 40 spots, com 47% dos espectros ruins, identificando um total de 14 spots com espectros de boa qualidade e 7 spots, que apresentaram bons espectros, mas não foram identificados nos bancos de dados utilizados; a maioria dos spots de intensidade e abundância relativa apresentaram bons espectros, diferentemente, dos dados encontrados nos pools I e II (**Figura 16**).

Convém ressaltar que apenas foi utilizado o espectrometro de massas do tipo, LC-ESI-ION TRAP MS para poucos spots, que apresentam as sequências de peptídeos em vermelho, conforme as **Tabelas 6, 7 e 8**. Em alguns spots foram utilizado às duas metodologias LC-ESI-ION TRAP MS e MALDI-TOF/TOF-MS, para observar se, os mesmos peptídeos seriam identificados quando utilizada duas formas de ionização distintas, já que na maioria dos experimentos utilizando gel bidimensional utiliza-se a metodologia de MALDI-TOF MS, para a identificação dos spots.

Diferentemente dos resultados encontrados na análise do gel 2DE de veneno total, que apresentou uma maioria de espectros de boa qualidade, quando relacionado spots de intensidade e abundância relativa, os espectros oriundos das tripsinizações dos spots dos Pools no geral, não foram de boa qualidade.

Limitações da técnica poderiam explicar o número de spots que não foram identificados neste estudo, dentre algumas limitações podemos citar: a ausência do genoma completo da serpente *B. jararaca*, cortes inespecíficos, modificações pós-traducionais (desamidação, fosforilação, acetilação, etc), interpretação errada do espectro de massas MS/MS e contaminação com outros organismos (micoplasma ou outros).

A **Tabela 6** apresenta as identificações obtidas para os 18 spots detectados na análise por espectrometria de massas do gel 2DE pH 4-7, do pool I de veneno da serpente *B. jararaca*. Dentre eles, 5 spots (28%) foram classificados na família das metaloproteases; 9 (50%), classificadas nas famílias das serinoproteases; 2 (11%), como lectinas tipo C; e 2 (11%), identificados como l-aminoácido oxidase (**Planilha 4**).

Analisando-se a região das metaloproteases da classe PIII MM, entre 67 e 43 kDa, 100% dos spots, caracterizados como metaloproteases, encontram-se neste quadrante de MM, característica desta classe. Embora a maioria dos spots identificados nesta análise tenham sido do grupo das serinoproteases, aparentemente, o número total de metaloproteases parece maior, quando analisada a imagem do gel 2DE, utilizando os dados já discutidos, da análise e identificação dos spots do gel 2DE de veneno total de *B. jararaca*, como referência.

O spot 29 de *pI* 4.45 e MM de 78.9kDa, foi identificado como “Hemorrhagic metalloproteinase HF3” de *B. jararaca*, cluster **JARO001013A02**, apresentou os peptídeos “YFYCR”, “YIELVILADYR”, “NCRDPCCDAATCK” e “TYEIVNILNEIFR”, que não obtiveram homologia quando alinhados contra a sequência da Jararagina, para caracterização dos domínios característicos as metaloproteases.

Os fatores hemorrágicos **HF1**, metaloprotease da classe PI; **HF2 e HF3**, classe P-III, com massas moleculares de 63, 49, 62 kDa, além da ação hemorrágica são capazes de inibir a agregação plaquetária dependente de colágeno. Adicionalmente, HF3 é considerada a toxina isolada de *B. jararaca* com maior potencial hemorrágico (Assakura *et al.*, 1986; Silva *et al.*, 2004). Os peptídeos identificados neste spot foram apenas detectados pela metodologia de LC-ESI ION TRAP MS.

Dentre os spots encontram-se o 56 e 87, correspondentes a uma faixa de *pI* entre 4 e 4.87, com MM entre 56 e 78.9 kDa, descritos como, Bothropasin/jararhagin, relativos ao cluster **JARO001002D11**, após análise no banco de dados do transcriptoma de *B. jararaca*. Analisando-se as sequências de peptídeos encontradas, pôde-se detectar a presença de sequências do domínio metalo “MYELANIVNEILR”, nos spots 56 e 87; e “ITVKPDVDYTLNSFAEWR”, referente ao domínio metalo e “SGSQCGHGDCEQCK” referente ao domínio tipo desintegrina somente no spot 87. Adicionalmente, os spots 56 e 87 apresentaram peptídeos referentes ao domínio rico em cisteína “GNYYGYCR”, e apenas no spot 87, o peptídeo “KIPCAPEDVK”.

O spot 77, de *pI* 4.86 e MM de 61.7 kDa, também foi descrito como “Bothropasin precursor” (Mandelbaum *et al.*, 1982), relativo ao cluster **JARO001016B04**, apresentou os peptídeos “ITVKPDVDYTLNSFAEWR”, “MYELANIVNEILR”, “NNGDLKIK” e “KTDLLTR” relativos ao domínio metalo, e os peptídeos “MFYSNDDEHK”, “GNYYGYCR”, “KIPCAPEDVK”, “DNSPGQNNPCK” e “VCSNGHCVDVATAY” relativos ao domínio rico em cisteína,

convém relatar que, como dois métodos de análise por espectrometria de massas foram utilizados, o mesmo peptídeo foi detectado em alguns casos pelos dois métodos.

Por último, o spot 157, de *pI* 4.90 e MM de 39 kDa, relativo ao cluster **JARO001041B03**, apresentou apenas o peptídeo “RYIELVIVADHRM”, que não apresentou homologia, quando comparado à sequência da Jararagina, para poder classificar de acordo com os domínios; foi identificado como *Bothrops jararacussu* “Metalloprotease BOJUMET II”, e, descrito na tabela, como Metaloprotease.

Na análise do transcriptoma da glândula de veneno da serpente *B. jararacussu*, um dos clusteres relacionados às metaloproteases foi BOJUMET II classificado como pertencente ao grupo das PIII (Kashima *et al.*, 2004).

Com relação às serinoproteases detectadas, o maior número de spots, 185, 188, 190 e 198, que estavam na faixa de *pI* entre 4.62 e 4.87, e tinham suas MM entre 33 e 45.5 kDa, foram relativos ao cluster **JARO001006C08**, conforme os resultados já descritos acima, na análise dos spots do gel 4-7 de veneno total de *B. jararaca*.

Os spots 125, 126 e 139 que estavam na faixa de *pI* entre 5.18 a 5.47 e MM entre 42.5 e 44.5 kDa, cluster **JARO001010G07**, foram descritos como, “Kinin-releasing and fibrinogen-clotting serine proteinase” (KN-BJ 2). O mesmo cluster foi encontrado na análise do gel 4-7 de veneno total de *B. jararaca*, usando-se a 1ª etapa do proteoma do veneno como referencia.

Por último, o spot 187 de *pI* 4.75, e MM de 33 kDa, teve homologia com o cluster **JARO001023E07**, identificado como, “serine protease”, da serpente *Bothrops jararacussu* (Kashima *et al.*, 2004), conforme já descrito na análise do gel 4-7, de veneno total de *B. jararaca*.

Com relação às lectinas tipo C, encontradas no pool I, pôde-se detectar as lectinas do Tipo C- símile, spot 225 e cluster **JARO001004F10**, identificadas como “Platelet Glycoprotein Ib-binding protein alpha subunit” (Kawasaki *et al.*, 1996), bem como o cluster **JARO001005B08**, spot 246, identificado como “Bothojaracin chain A precursor” (Zingali *et al.*, 2001; Fenton *et al.*, 1991), ambas já haviam sido descritas na análise do veneno total.

Algumas hipóteses para a presença de spots de baixa massa molecular, na subfração do pool I, são novamente discutidas neste parágrafo. Primeiramente, pôde-se cogitar que as cadeias polipeptídicas, de baixa massa molecular, estejam interagindo com as de alta massa molecular; desta forma isso pode ser explicado devido a presença de lectina do tipo-C, glicoproteína ligante de plaquetas GPIb, que, na forma nativa, se

apresenta como um heterodímero; entretanto, existem dados que indicam que este tipo de proteínas podem existir também como oligômeros (Fugimura *et al.*, 1995). Outra possibilidade seria a interação das lectinas do tipo-C com componentes do veneno de alta massa molecular, como as metaloproteases PIII para gerar metaloproteases PIV (Kashima *et al.*, 2004). Além disso, não pôde ser descartada, devido a problemas de resolução da técnica utilizada, a possibilidade de contaminação do pool I, com frações do Pool II, devido à sobreposição dos picos, no cromatograma.

A **Tabela 7** apresenta as identificações obtidas para os 18 spots, detectados na análise por espectrometria de massas do gel 2DE pH 4-7 do pool II, de veneno da serpente *B. jararaca*, preferencialmente foram detectados membros da família das serinoproteases, com um total de 15 (83%), seguido de 2 (11%) e 1 (6%), de metaloproteases e lectinas do tipo C, respectivamente (**Planilha 4**).

Os spots 176 e 197 de *pI* 6.52 e MM, entre 23 e 23.7 kDa, cluster **JARO001005F05**, foram identificados como Insularinase and insularin precursor (Junqueira-de-Azevedo & Ho, 2002; Valente *et al.*, 2009).

As identificações das serinoproteases mantiveram os clusteres que já foram mencionados na análise dos outros géis, como: **JARO001006C08** (spots 55, 59, 74, 88, 92, 94 e 112); **JARO001046A06** (spots 83 e 103); **JARO001035C09** (spots 96 e 102); **JARO001010G07** (spot 21); **JARO001023E07** (spots 47 e 115).

Entretanto, peptídeos específicos para três diferentes serinoproteases foram encontrados no spot 47, de *pI* 5.62 e MM 32.2 kDa, “VSDYTEWIR”, “VVGDECNINEHR” e “EWVLTAAHCDK”, indicando que estes pertencem a proteína (ou seus fragmentos), que apresentam o mesmo *pI* e massa molecular ou, que esta é uma serinoprotease do veneno de *B. jararaca* que poderia apresentar todas as características, específicas aos três diferentes subtipos de serinoproteases, como, enzimas de coagulação, kininogenases e ativadores de plasminogênio, respectivamente aos peptídeos apresentados, podendo tratar-se de uma nova serinoprotease.

O spot 37 apresentou homologia com o cluster **JARO001001F11**, sendo descrito como *B. atrox* “Batroxobin” (Itoh *et al.*, 1988). Esta serinoprotease foi isolada, a partir do veneno das serpentes *Bothrops atrox* e *Bothrops moojeni*, por Itoh e colaboradores (1988). É uma enzima tipo-trombina que, apenas, remove o fibrinopeptídeo A do fibrinogênio. Esta enzima é geralmente usada clinicamente para o tratamento de doenças trombóticas, visto que a administração parenteral desta enzima leva à

conversão de fibrinogênio em fibrina, que é rapidamente degradada e eliminada na urina (Itoh *et al.*, 1988).

A **Tabela 8**, apresenta as identificações obtidas para os 14 spots, na análise por espectrometria de massas do gel 2DE pH 4-7 do pool III de veneno da serpente *B. jararaca*; 8 (57%) spots foram identificados, como metaloproteases; a seguir 3 (22%) lectinas tipo C; 2 (14%) serinoproteases, e 1 (7%), que pertence à família das fosfolipases A₂ (**Planilha 5**).

Convém ressaltar que, dos 8 spots identificados para metaloproteases, 6 spots (26, 34, 35, 36, 37 e 39) foram identificados, como precursores de Botrostatina, cluster **JARO001003B09**. Foram também, detectados peptídeos com um ou dois resíduos diferentes, quando comparados às sequências disponíveis nos bancos de dados utilizados, sugerindo a presença de várias isoformas ainda não caracterizadas.

Os outros 2 spots, 24 e 33, foram identificados como, Insularinase/insularin cluster **JARO001005F05**.

Com relação às lectinas tipo C encontradas, nos spots 41, 57 e 68, todos obtiveram homologia com o cluster JARO001004F10, descrito como GPIb-BP.

Adicionalmente, pode-se identificar analisando-se o spot 57, de pI 6.99 e MM de 17.8kDa, o cluster **JARO001006F07**, descrito como “Myotoxic phospholipase A₂ like”, de *Bothrops jararacussu*. Estas sequências de ácidos aminados, apenas foram detectados pela metodologia de LC-ESI ION TRAP MS. As fosfolipases A₂ são principais componentes, responsáveis pelo intenso dano local observado, após alguns acidentes botrópicos; sendo capazes de induzir efeitos inflamatórios relacionados a um aumento da permeabilidade vascular e recrutamento de neutrófilos.

Apenas 0.7% dos transcritos de toxinas, na análise do transcriptoma de *B. jararaca*, foram relativos a PLA₂, indicando uma menor participação desta família no envenenamento por esta espécie (Cidade *et al.*, 2006). Estes dados estão de acordo com os nossos resultados proteômicos.

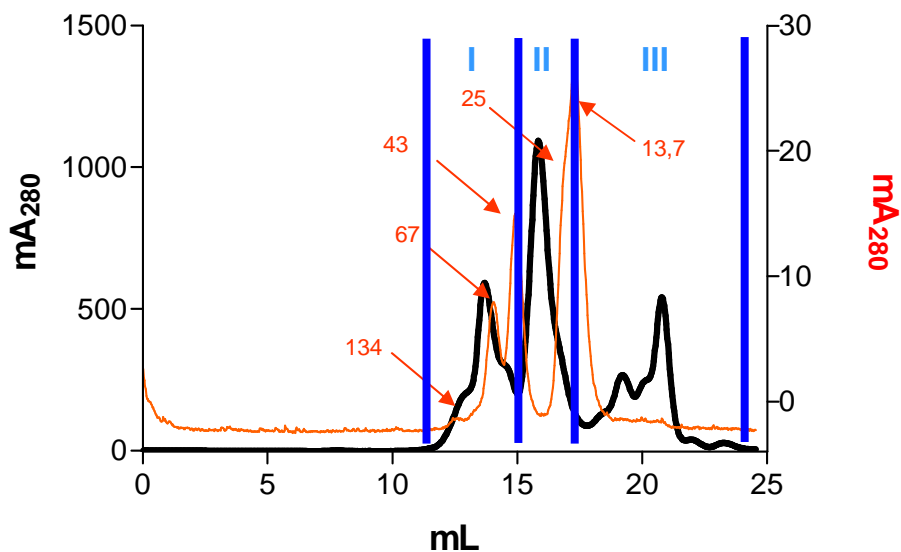


Figura 9 - Cromatografia do veneno de *B. jararaca* (10mg/mL) em coluna SUPERDEX 200 Eluente: 10mM de CaCl₂ 150mM de NaCl em água MILLI-Q. → 0.5 mL/min; 0.5 mL/tubo; loop 0.5 mL; 0.88Mpa.

Vermelho – Marcadores de massa molecular: Di BSA (134kDa), BSA (67kDa), Ovalbumina (43kDa), Quimiotripsinogênio (25kDa) e Ribonuclease (13,7kDa).

Azul – **Pool I** (tubos 24 a 31), **Pool II** (tubos 32 a 35) e **Pool III** (tubos 36 a 50)

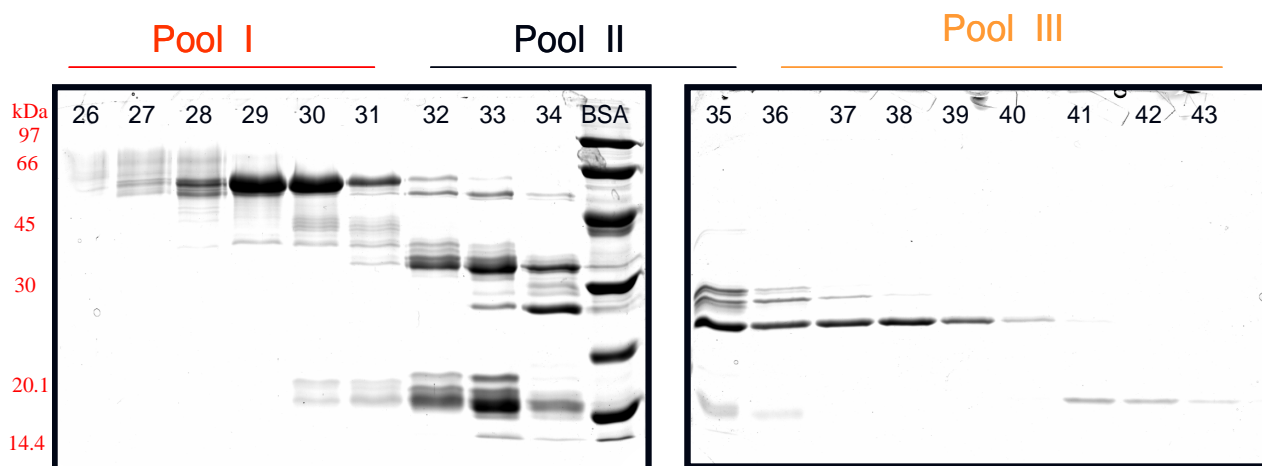
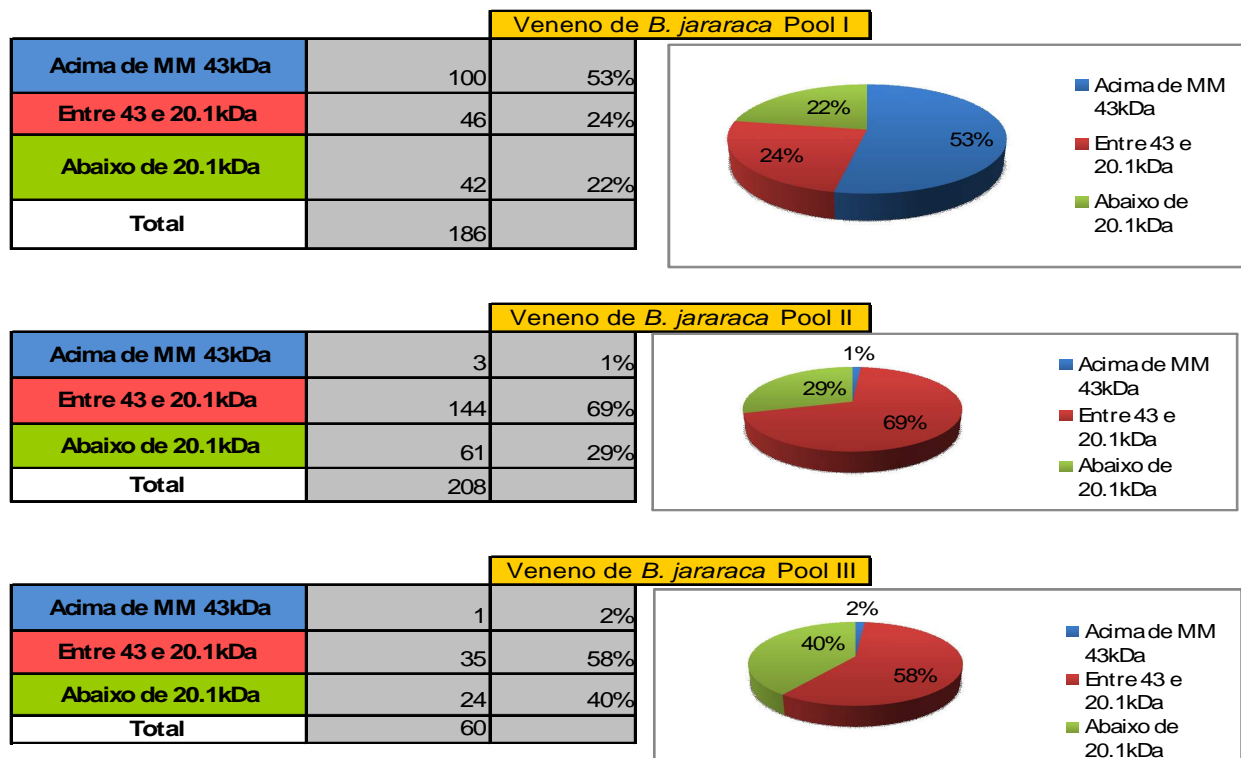


Figura 10 - SDS-PAGE, em condições redutoras, das frações coletadas na Cromatografia por exclusão molecular em coluna de SUPERDEX 200 – tubos 26 a 43



Planilha 4 – Relação das faixas de pesos moleculares encontradas na análise da localização dos spots, e gráfico dos percentuais, após análise utilizando o programa Image Master (Amersham Bioscience), realizada no gel de 2DE dos Pools I, II e III.

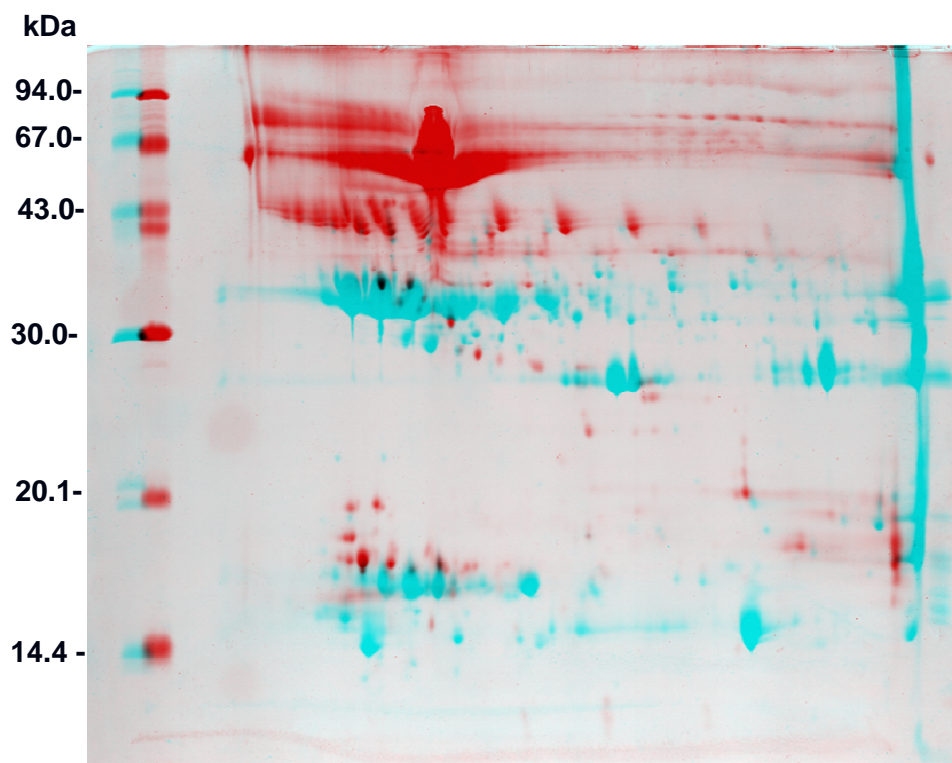


Figura 11 – Sobreposição dos géis 2DE, oriundos das frações cromatográficas do Pool I versus Pool II.

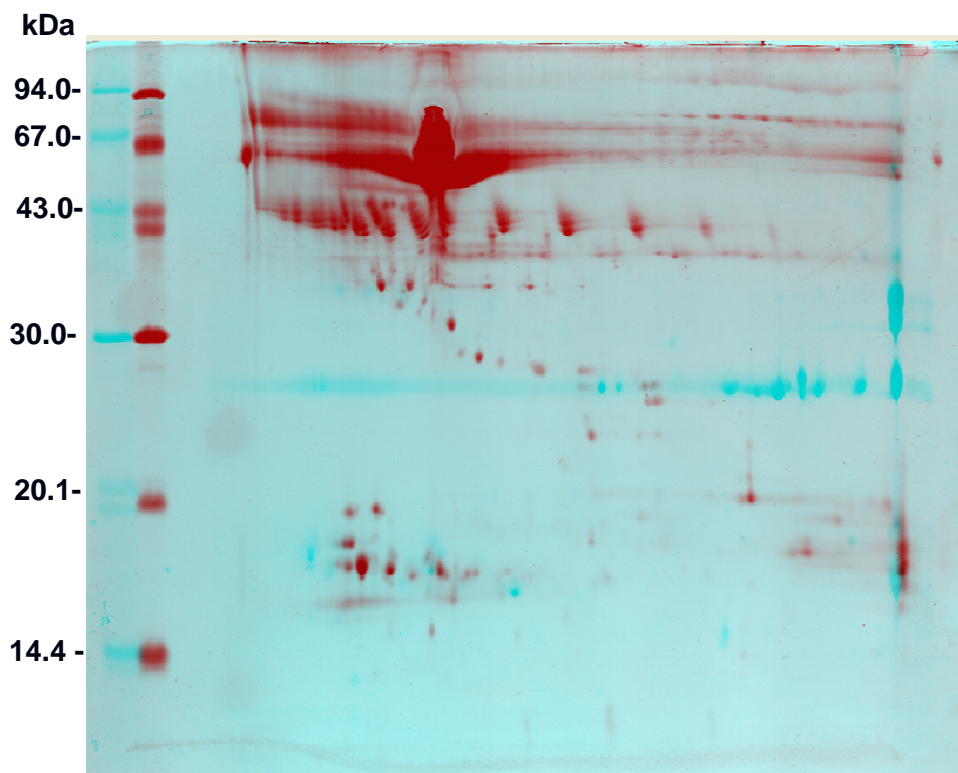


Figura 12 – Sobreposição dos géis 2DE, oriundos das frações cromatográficas do Pool I versus Pool III.

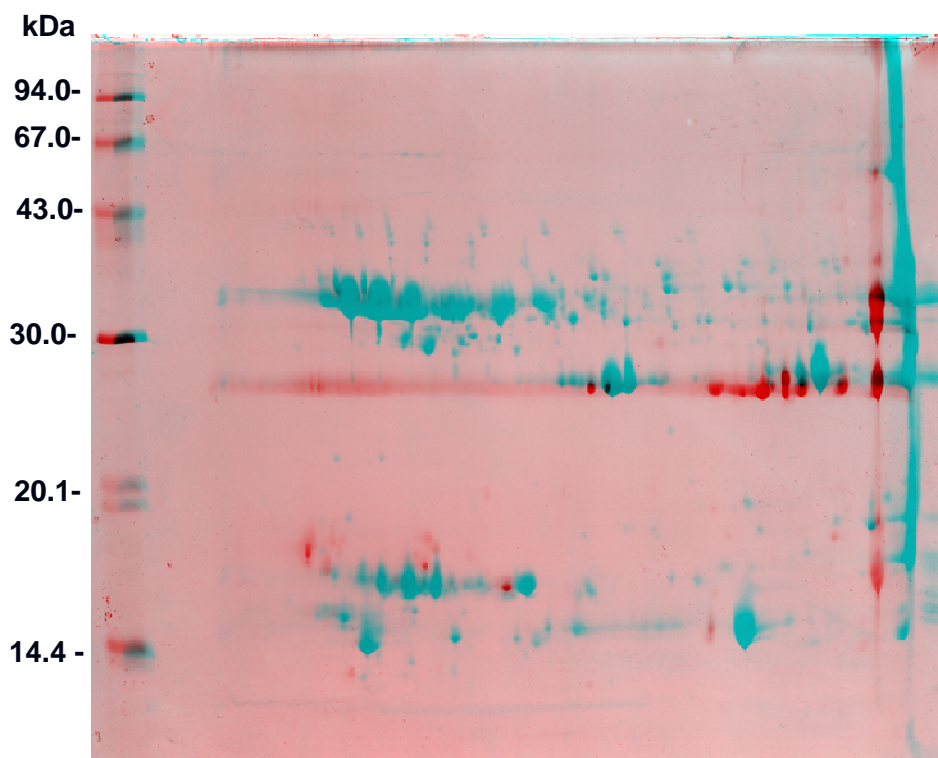


Figura 13 – Sobreposição dos géis 2DE, oriundos das frações cromatográficas do Pool II versus Pool III.

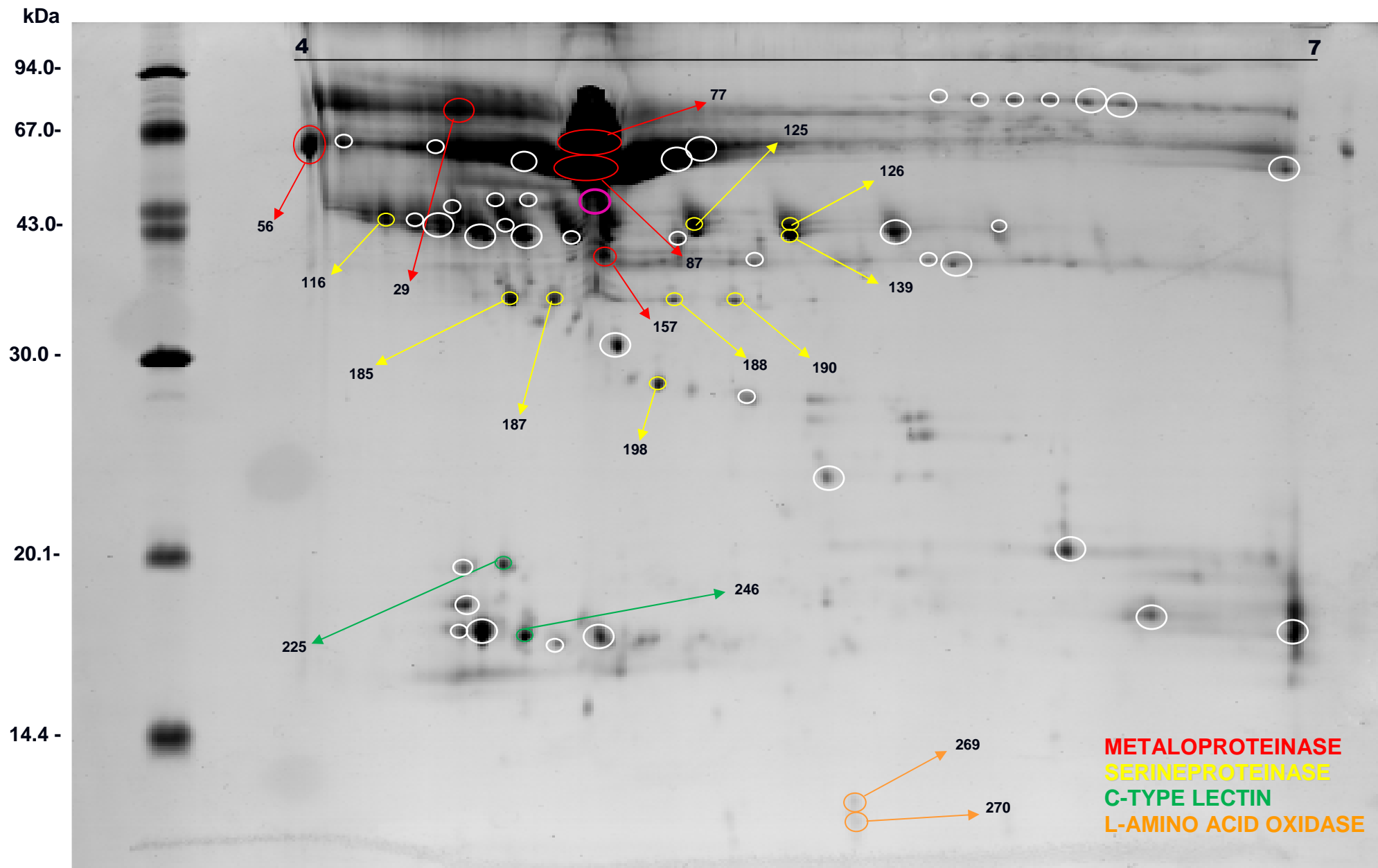


Figura 14 - 2DE - *B. jararaca*, exclusão molecular – POOL I pH 4-7;
Spots em branco – espectros ruins, sem identificação no banco de dados;
Spots em rosa – espectros de boa qualidade, sem identificação no banco de dados.

Spot	pI / MM (kDa)		Método (PMF e/ou MS/MS)	Peptídeos sequenciados	Identificação (NCBI)	Identificação (banco de dados <i>B. jararaca</i>)	Descrição da Proteína
	Experimental	Teórico					
29	4.45 / 78.9	5.15 / 70.4	MS/MS	YFYCR YIELVLADYR NCRDPCCDAATCK IYEVNILEIFR	gil31742524	JARO001013A02	METALOPROTEINASE PIII HF3
56	4.01 / 64.4	5.21 / 66.1	MS/MS	GHYYGYCR KIPCAPEDVK MYELANIVNEILR SGSQCGHGDCEQCK	gil6246 gil4895109	JARO001002D11	METALOPROTEINASE PIII Bothropasin/ Jararhagin
77	4.86 / 61.7	5.22/66.4	MS/MS	ITVKPDVDYTLNSFAEWR MFYSNDDDEHK YVELFIVDQEMVTK IINGDLKIK MYELANIVNEILR KTDLTR GHYYGYCR KIPCAPEDVK DHSFGQIHPCK MFYSNDDDEHK VCSHGHCVDVATAY MYELANIVNEILR SGSQCGHGDCEQCK YVELFIVDQEMVTK	gil4895109	JARO001016B04	METALOPROTEINASE PIII Bothropasin precursor
87	4.87 / 56	5.15 / 70.4	MS/MS	GHYYGYCR ITVKPDVDYTLNSFAEWR MYELANIVNEILR	gil6246 gil4895109	JARO001002D11	METALOPROTEINASE PIII Bothropasin/ Jararhagin
116	4.25 / 45	5.33 / 28.6	MS/MS	VIGGDECNINEHR VSDYTEWIR	gil18652952	JARO001006C08	SERINOPROTEINASE
125	5.18 / 44.5	5.21 / 66.1	MS/MS	IHLGVHSK SLALVK DIMLIR FFCLSSK IHLGVHSK WDKDIMLIR TLCAGILQGGK AAYPELPATSR IMGWGTISTSK	gil2130945	JARO001010G07	SERINOPROTEINASE Kinin-releasing and fibrinogen-clotting serine proteinase (KN-BJ 2)

Tabela 6 - Identificação dos spots do Pool I de veneno de *B. jararaca* - total de 18 spots identificados.

Peptídeos em preto – análise por MALDI-TOF/TOF

Peptídeos em vermelho – análise por LC-ESI ION-TRAP

Spot	pI / MM (kDa)		Método (PMF e/ou MS/MS)	Peptídeos sequenciados	Identificação (NCBI)	Identificação (banco de dados <i>B. jararaca</i>)	Descrição da Proteína
	Experimental	Teórico					
126	5.47 / 44	7.18 / 36.2	MS/MS	IHLGVHSK SLALVK DIMLIR FFCLSSK IHLGVHSK VWDKIMLIR TLCAGIQGGK AAYPELPATSR IMGWGTISTSK	gi 2130945	JARO001010G07	SERINOPROTEINASE Kinin-releasing and fibrinogen-clotting serine proteinase (KN-BJ 2)
139	5.47 / 42.5	9.3 / 20.3	MS/MS	KNSAHIAPISLPSSPPVIGSVCR	gi 2130945	JARO001010G07	SERINOPROTEINASE Kinin-releasing and fibrinogen-clotting serine proteinase (KN-BJ 2)
157	4.90 / 39	5.22/66.4	MS/MS	RYIELVIVADHRM	gi 32306926	JARO001041B03	METALOPROTEINASE
185	4.62 / 33	5.33 / 28.6	MS/MS	VVGDECHINEHR	gi 18652952	JARO001006C08	SERINOPROTEINASE
187	4.75 / 33	5.32 / 28.5	MS/MS	TLNQDEQTR IMGWGSITPIQK NDDALDKDMLMLVR VVGDECHINEHR	gi 32396013	JARO001023E07	SERINOPROTEINASE
188	4.70 / 45.5	5.11 / 33	MS/MS	VIGGDECHINEHR	gi 18652952	JARO001006C08	SERINOPROTEINASE
190	4.68 / 43.7	5.30 / 32	MS/MS	VIGGDECHINEHR	gi 18652952	JARO001006C08	SERINOPROTEINASE
198	4.67 / 43.2	5.07 / 25.6	MS/MS	GMVLPGTK SGSQCGHGDCCEQCK	gi 18652952	JARO001006C08	SERINOPROTEINASE
225	4.60 / 18.6	4.45 / 17.1	MS/MS	GGHLVSIESDGEA	gi 62131097	JARO001004F10	C-TYPE LECTIN Platelet Glycoprotein Ib-binding protein alpha subunit
246	6.99 / 17.5	5.55 / 19.1	MS/MS	KINQSSDLYAWGLRV	gi 62131097	JARO001005B08	C-TYPE LECTIN Bothjaracin chain A precursor
269	5.66 / 16.2	5.97 / 54.8	MS/MS	RETDYEEFLEIAKI	gi 5565691	JARO001003E08	L-AMINO ACID OXIDASE
270	5.66 / 16	5.97 / 54.8	MS/MS	RETDYEEFLEIAKI	gi 5565691	JARO001003E08	L-AMINO ACID OXIDASE

Tabela 6 - Identificação dos spots do Pool I de veneno de *B. jararaca* - total de 18 spots identificados.
Peptídeos em preto – análise por MALDI-TOF/TOF
Peptídeos em vermelho – análise por LC-ESI ION-TRAP

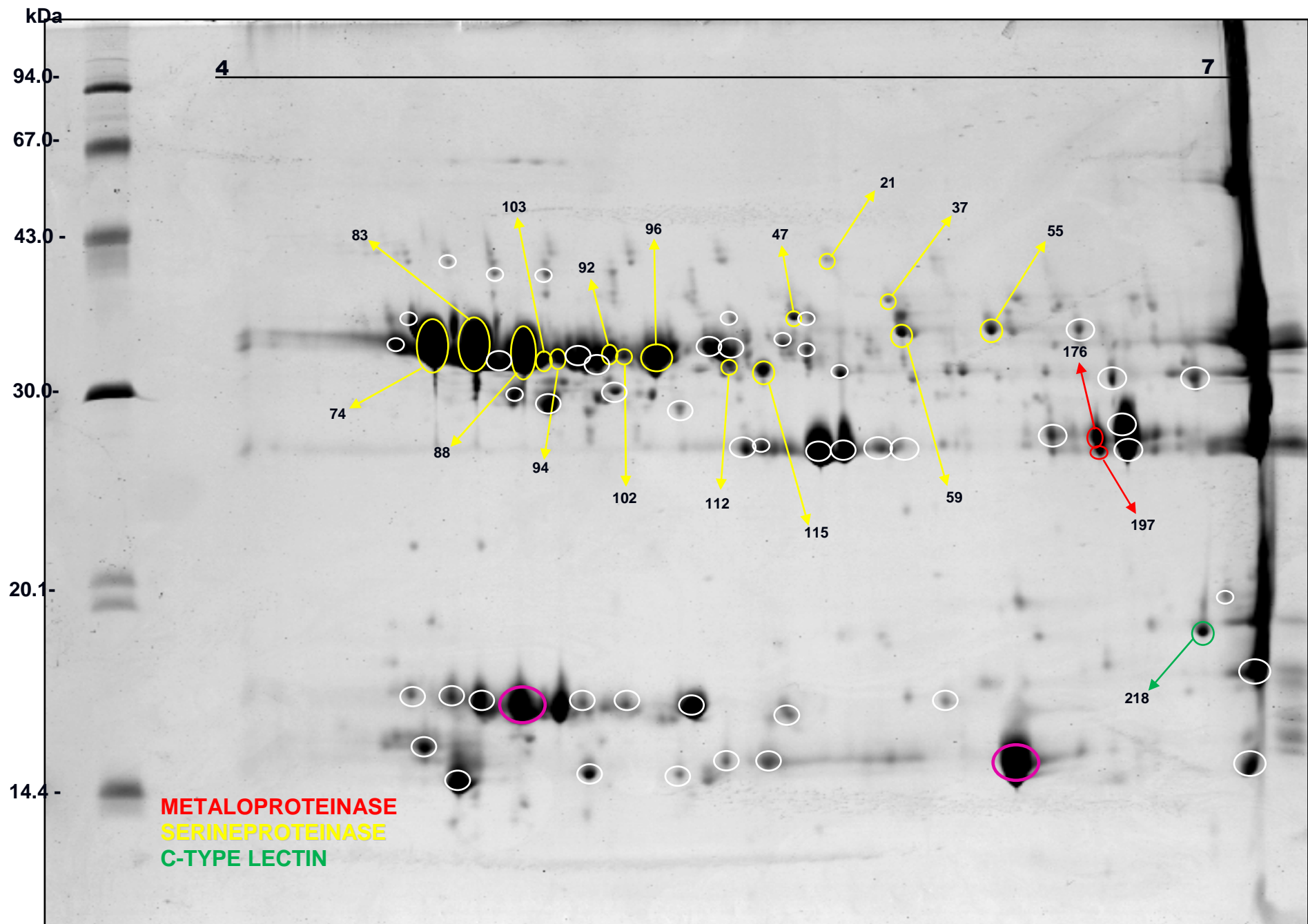


Figura 15 - 2DE - *B. jararaca*, exclusão molecular – POOL II pH 4-7;
Spots em branco – espectros ruins, sem identificação no banco de dados;
Spots em rosa – espectros de boa qualidade, sem identificação no banco de dados.

Spot	pI / MM (kDa)		Método (PMF e/ou MS/MS)	Peptídeos sequenciados	Identificação (NCBI)	Identificação (banco de dados <i>B. jararaca</i>)	Descrição da Proteína
	Experimental	Teórico					
21	5.72 / 39.7	8.68 / 28.5	MS/MS	AAYPELPATSR IMGWGTISTSK	gi 2130945	JARO001010G07	SERINOPROTEINASE Kinin-releasing and fibrinogen-clotting serine proteinase (KN-BJ 2)
37	5.90 / 34.2	5.21 / 28.6	MS/MS	HAGSVANYDEVVR EAYNGLPAK	gi 62463	JARO001001F11	SERINOPROTEINASE Batroxobin
47	5.62 / 32.2	5.33 / 28.6	MS/MS	VSDYTEWIR VVGDECNINEHR EWWLTAACDSK	gi 32396013	JARO001023E07	SERINOPROTEINASE
55	6.20 / 31	5.32 / 28.5	MS/MS	TLCAGILEGGK VVGDECNINEHR RAAYPELPATSRT VVGDECNINEHRS	gi 18652952	JARO001006C08	SERINOPROTEINASE
59	5.94 / 30.7	5.32 / 28.5	MS/MS	VVGDECNINEHRS RAAYPELPATSRT VVGDECNINEHR	gi 18652952	JARO001006C08	SERINOPROTEINASE
74	4.55 / 29.7	5.32 / 28.5	MS/MS	RAAYPELPAEYRT	gi 18652952	JARO001006C08	SERINOPROTEINASE
83	4.69 / 29.3	6.08 / 20.6	MS/MS	NDDALDK KTLNQDEQTR IMGWGSITPIQK FPNGLDKDMLIR RIMGWGSITPIQKT	gi 18652952	JARO001046A06	SERINOPROTEINASE
88	4.82 / 29	5.32 / 28.5	MS/MS	AAYPELPAEYR	gi 18652952	JARO001006C08	SERINOPROTEINASE
92	5.08 / 28.8	5.32 / 28.5	MS/MS	AAYPELPAEYR	gi 18652952	JARO001006C08	SERINOPROTEINASE
94	4.93 / 28.7	5.32 / 28.5	MS/MS	VVGDECNINEHRS	gi 18652952	JARO001006C08	SERINOPROTEINASE
96	5.21 / 28.6	5.33 / 28.6	MS/MS	VL(N/T)EDEQTR VVGDECNINEHR IMGWGTISPTK IHL(D/H)HAVCR	gi 6691472	JARO001035C09	SERINEPROTEINASE Venom serine proteinase A (BPA)
102	5.12 / 28.6	5.33 / 28.6	MS/MS	KVLNEDEQTR VVGDECNINEHR TLCAGILEGGK	gi 6691472	JARO001035C09	SERINEPROTEINASE Venom serine proteinase A (BPA)
103	4.88 / 28.4	5.32 / 28.5	MS/MS	NDDALDKDMLVLR IMGWGTISPTK	gi 18652952	JARO001046A06	SERINOPROTEINASE
112	6.77 / 30	5.32 / 28.5	MS/MS	KVLNEDEQTR IMGWGTISPTK	gi 18652952	JARO001006C08	SERINOPROTEINASE
115	5.53 / 27.5	5.32 / 28.5	MS/MS	VVGDECNINEHR TLCAGILEGGK	gi 32396013	JARO001023E07	SERINOPROTEINASE
176	6.52 / 23.7	5.5 / 54.5	MS/MS	RSVINVDASLANLEVWSKK	gi 52426579	JARO001005F05	METALLOPROTEINASE Insularinase and insularin precursor
197	6.52 / 23	5.5 / 54.5	MS/MS	RSVINVDASLANLEVWSKK	gi 52426579	JARO001005F05	METALLOPROTEINASE Insularinase and insularin precursor
218	6.83 / 18.6	4.45 / 17.1	MS/MS	KYYVWGLRI KESWDDRSEYDAERF KWSDYSSVSYENLVRG	gi 62131097	JARO001004F10	C-TYPE LECTIN Platelet Glycoprotein Ib-binding protein alpha subunit

Tabela 7 – Identificação dos spots do Pool II de veneno de *B. jararaca* - total de 18 spots identificados.

Peptídeos em preto – análise por MALDI-TOF/TOF

Peptídeos em vermelho – análise por LC-ESI ION-TRAP

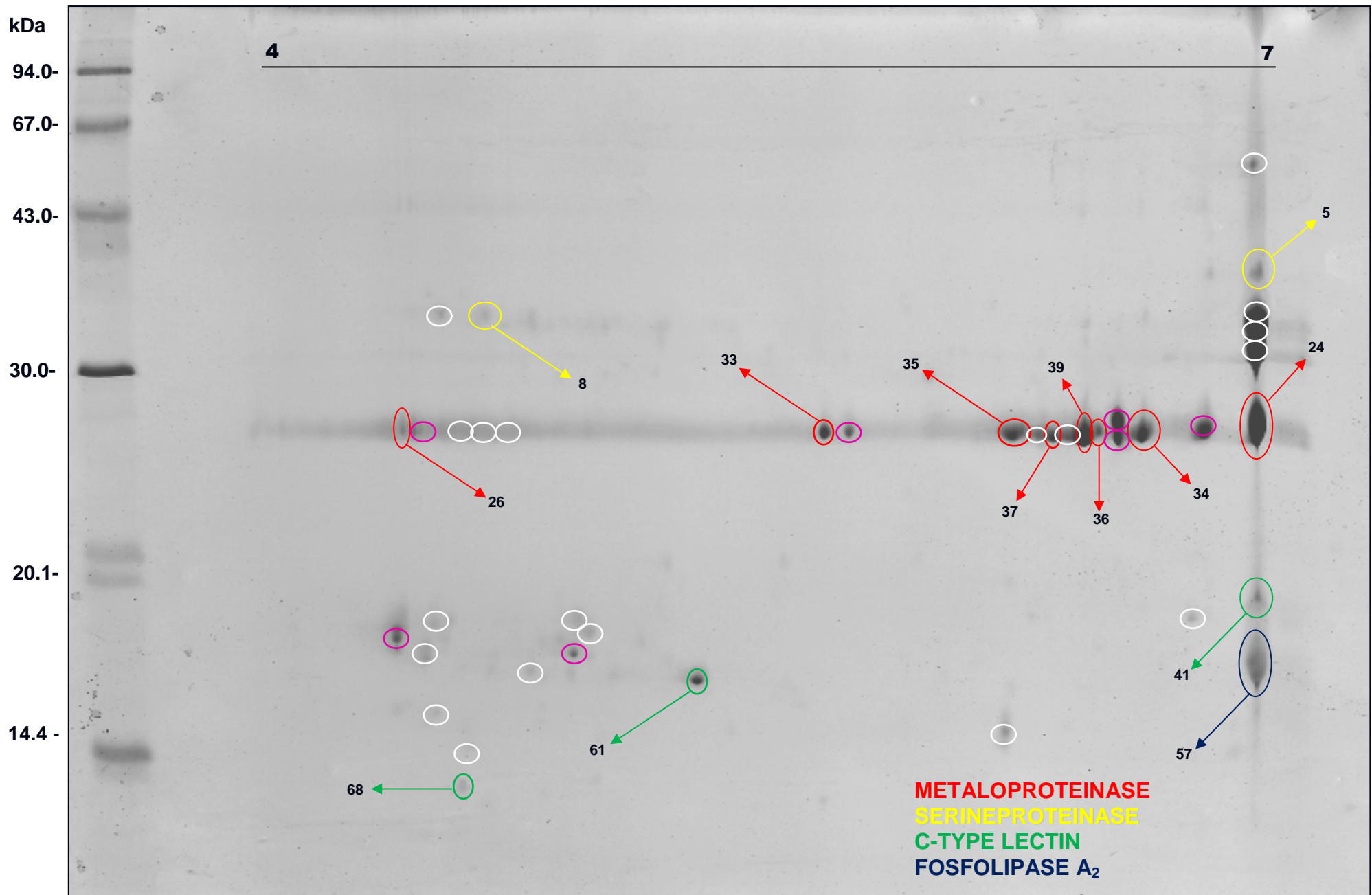


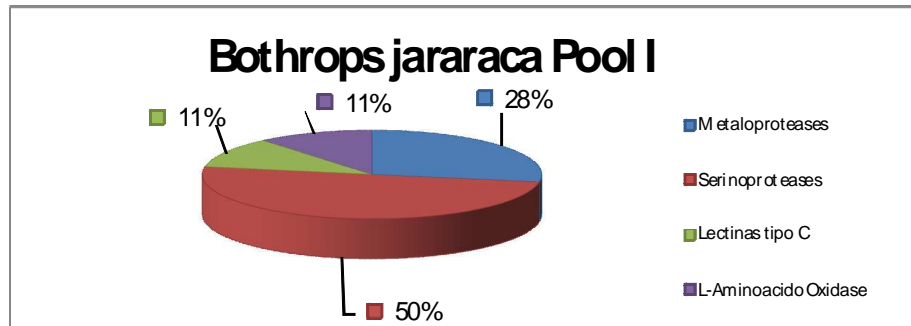
Figura 16 - 2DE - *B. jararaca*, exclusão molecular – POOL III pH 4-7;
Spots em branco – espectros ruins, sem identificação no banco de dados;
Spots em rosa – espectros de boa qualidade, sem identificação no banco de dados.

Spot	pI / MM (kDa)		Método (PMF e/ou MS/MS)	Peptídeos sequenciados	Identificação (NCBI)	Identificação (banco de dados)	Descrição da Proteína
	Experimental	Teórico					
5	6.95 / 35.4	5.33 / 28.6	MS/MS	ETYPDVPHCAK INILNHAVCR	gi 18652952	JARO001046A06	SERINOPROTEINASE
8	4.68 / 30.7	5.32 / 28.5	MS/MS	TLNQDEQTR	gi 18652952	JARO001006C08	SERINOPROTEINASE
24	6.99 / 23	7.82/22.7	MS/MS	YNS(H/D)LNTIR SFGWR TLTSFGWR	gi 52426579	JARO001005F05	METALLOPROTEINASE Insularinase and insularin precursor
26	4.43 / 23	5.48 / 54.7	MS/MS	KTDLLNR IHQMVNIMK	gi 13194759	JARO001003B09	METALLOPROTEINASE bothrostatin precursor
33	5.70 / 22.8	7.82/22.7	MS/MS	KTLTSFGWRE	gi 52426579	JARO001005F05	METALLOPROTEINASE Insularinase and insularin precursor
34	6.65 / 22.8	5.48 / 54.7	MS/MS	HDTGSCSCGGYSCIMAPVISHDIAK KTDLLNR ENPQCILNK IHQMVNIMK	gi 13194759	JARO001003B09	METALLOPROTEINASE bothrostatin precursor
35	6.26 / 22.8	5.48 / 54.7	MS/MS	IHQMVNIMK DNPQCILNK HDTGSCSCGGYSCIMAPVISHDIAK KTDLLNR ENPQCILNK	gi 13194759	JARO001003B09	METALLOPROTEINASE bothrostatin precursor
36	6.483 / 22.7	5.48 / 54.7	MS/MS	IHQMVNIMK KTDLLNR	gi 13194759	JARO001003B09	METALLOPROTEINASE bothrostatin precursor
37	6.36 / 22.7	5.48 / 54.7	MS/MS	HDTGSCSCGGYSCIMAPVISHDIAK KTDLLNR DNPQCILNK SCIMAPVISHDIAK	gi 13194759	JARO001003B09	METALLOPROTEINASE bothrostatin precursor
39	6.44 / 22.6	5.48 / 54.7	MS/MS	IHQMVNIMK DNPQCILNK HDTGSCSCGGYSCIMAPVISHDIAK KTDLLNR	gi 13194759	JARO001003B09	METALLOPROTEINASE bothrostatin precursor
41	6.99 / 18.6	4.45 / 17.1	MS/MS	DTPFECPSDWSTHR FCSEQAK CFALEK	gi 62131097	JARO001004F10	C-TYPE LECTIN Platelet Glycoprotein Ib-binding protein alpha subunit
57	6.99 / 17.8	6.8 / 16.7	MS/MS	KSYGAYGCNCGVLGRG KNIQSSDLYAWIGLRV	gi 31747339	JARO001006F07	Phospholipase A2 Myotoxic phospholipase A2-like [Bothrops jararacussu]
61	5.32 / 17.7	4.45 / 17.1	MS/MS	DTPFECPSDWSTHRQ	gi 62131097	JARO001004F10	C-TYPE LECTIN Platelet Glycoprotein Ib-binding protein alpha subunit
68	4.61 / 17	4.45 / 17.1	MS/MS	KESWDRSEYDAERF	gi 62131097	JARO001004F10	C-TYPE LECTIN Platelet Glycoprotein Ib-binding protein alpha subunit

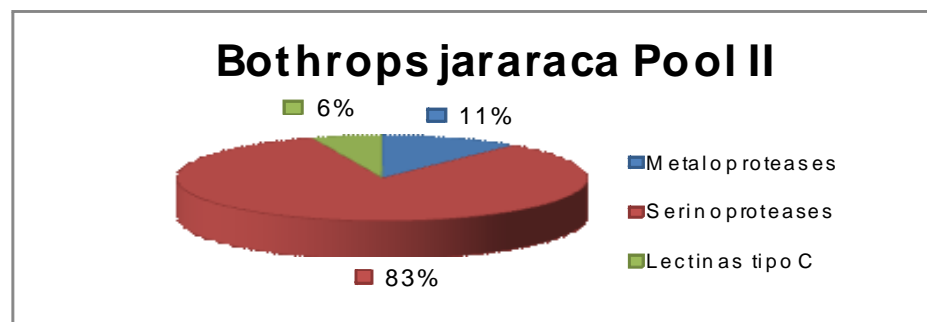
Tabela 8 – Identificação dos spots do Pool III de veneno de *B. jararaca* - total de 14 spots identificados.

Peptídeos em preto – análise por MALDI-TOF/TOF

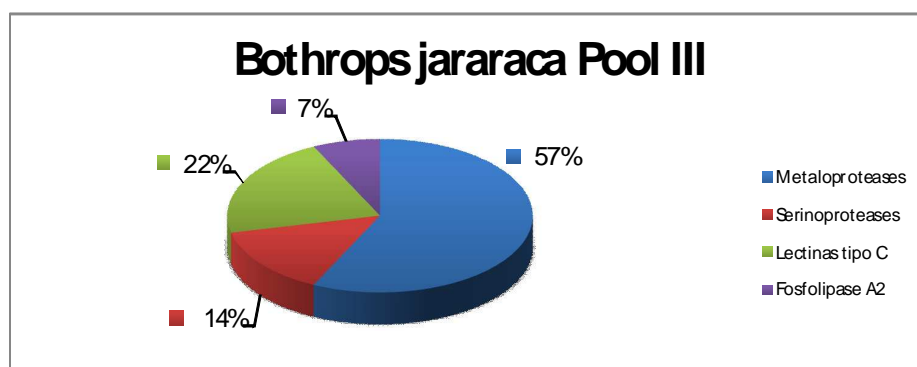
Peptídeos em vermelho – análise por LC-ESI ION-TRAP



<i>Bothrops jararaca</i> Pool I	
Metaloproteases	5
Serinoproteases	9
Lectinas tipo C	2
L-Aminoacido Oxidase	2
TOTAL	18



<i>Bothrops jararaca</i> Pool II	
Metaloproteases	2
Serinoproteases	15
Lectinas tipo C	1
TOTAL	18



<i>Bothrops jararaca</i> Pool III	
Metaloproteases	8
Serinoproteases	2
Lectinas tipo C	3
Fosfolipase A ₂	1
TOTAL	14

Planilha 5 – Total de spots detectados e planilha dos percentuais das famílias de proteínas encontradas, na análise por espectrometria de massas, dos Pools I, II e III do veneno de *B. jararaca*, por MALDI-TOF/TOF MS e LC-ESI ION-TRAP.

De um modo geral, os estudos proteômicos de venenos de serpentes visam à descrição da complexidade protéica destas importantes secreções biológicas, com o objetivo de contribuir para a melhor compreensão de seus efeitos biológicos. A aplicação da espectrometria de massas, como uma técnica proteômica para o estudo de venenos animais e toxinas, vem sendo extensivamente discutida (Valente *et al.*, 2009).

As estratégias proteômicas utilizadas neste projeto, como, cromatografia por exclusão molecular, eletroforese bidimensional e espectrometria de massas, mostraram ser ferramentas para separar e identificar subpopulações de toxinas, o que facilita não só a compreensão da composição protéica dos venenos, como também a busca por novas moléculas com potencial biotecnológico, conforme o apresentado no tópico de venenos, como ferramentas farmacológicas.

O estudo fornece um mapa de referência preliminar para as proteínas presentes no veneno total da serpente *B. jararaca*, estabelecendo bases para estudos comparativos com outros proteomas de venenos, o qual pode ajudar na busca de novos medicamentos, e levar a uma melhoria na terapêutica do envenenamento. A comparação de conteúdos de toxinas de diferentes venenos pode, por exemplo, contribuir para a escolha mais racional do Pool de venenos utilizado, na fabricação do soro antiofídico polivalente comercial.

1. A análise proteômica do veneno de *B. jararaca*, mostrou a existência de relativamente poucas famílias de proteínas neste veneno, principalmente, metaloproteases, serinoproteases e lectinas tipo C símile, além de L-aminoácido oxidases, proteínas ricas em cisteínas e fosfolipases A2. Apenas a família dos peptídeos potenciadores de bradicinina não foi identificada pelos métodos utilizados.
2. Dentre as famílias de peptídeos e proteínas, identificadas, a família das metaloproteases e serinoproteases mostraram-se as mais abundantes, seguida das, lectinas tipo-C símile, l-aminoácido oxidases, fosfolipases A2 e CRISPs.
3. As famílias das proteínas mais abundantes apresentaram uma grande diversidade, com diferentes representantes de uma mesma família, como foi observado nas metaloproteases PI e PIII.
4. Igualmente foi comprovada a variabilidade de proteínas específicas como consequência de processamentos pós-traducionais, principalmente a degradação proteolítica, como foi claramente evidenciado nas metaloproteases e serinoproteases.
5. A presença de diversas isoformas demonstradas, podem ser consequência de diferentes modificações pós-traducionais e/ou modificações na sequência de ácidos aminados.
6. O Subfracionamento, por exclusão molecular do veneno total nos Pools I, II e III mostrou que existem muitas interações entre proteínas do veneno.

7. Os dados apresentados estão em concordância com os reportados previamente no transcriptoma e também, por outros trabalhos, desta mesma serpente. Entretanto, eles são complementares, no que se refere à presença de variações pós-traducionais não detectáveis nos estudos transcriptômicos.

8. Este trabalho contribui para uma melhor compreensão da complexidade na composição do veneno desta importante serpente, podendo servir como um ponto inicial para correlações de estrutura-função de toxinas, por técnicas proteômicas.

Referências Bibliográficas

- Aebersold, R. e Mann, M. (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. 422.
- Anderson, N.G., e Anderson, N.L. (1996) Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present and future. *Electrophoresis*. 17, 443-53.
- Assakura, M.T., Reichl, A.P. e Mandelbaum, F.R. (1986) Comparison of immunological, biochemical and biophysical properties of three hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops jararaca* (jararaca). *Toxicon*. 24, 943-946.
- Assakura, M.T., Silva, C.A., Mentele, R., Camargo, A.C. e Serrano, S.M. (2003) Molecular cloning and expression of structural domains of bothropasin, a P-III metalloproteinase from the venom of *Bothrops jararaca*. *Toxicon* 41, 217-227.
- Balsinde, J., Balboa, M.A., Insel, P.A. e Dennis, E.A. (1999) Regulation and inhibition of phospholipase A₂. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 175-189.
- Barker, R.A., Ratcliffe, E., McLaughlin, M., Richards, A. E Dunnett, S.B. (2000) A role for complement in the rejection of porcine ventral mesencephalic xenografts in a rat model of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 20, 3415-3424.
- Bazaa, A., Marrakchi, N., Mohamed, E.A., Sanz, L., Calvete, J.J (2005) Snake venomomics: comparative analysis of the venom proteomes of the Tunisian snakes *Cerastes cerastes*, *cerastes vipera* and *Macrovipera lebetina*. *Proteomics*. 5, 4223-4235.
- Beavis, R.C. e Chait, B.T. (1989) Rapid Communications in Mass Spectrometry. 3, 233-237.
- Berger M, Pinto AF, Guimarães JA. (2008) Purification and functional characterization of bothrojaractivase, a prothrombin-activating metalloproteinase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon*. 51, 488-501.
- Bjarnason, J.B., Hamilton, D. e Fox, J.W. (1988) Studies on the mechanism of hemorrhage production by five proteolytic hemorrhagic toxins from *Crotalus atrox* venom. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*. 369, 121-129.
- Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Gorg A, Westermeier R, Postel W. (1982) Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods*. 4, 317-39.
- Bloom, A.L. (1991) Progress in the clinical management of haemophilia. *Thromb. Haemost.* 66, 166-177.

- Bochner, R. e Struchiner, C. J. (2003) Snake bite epidemiology in the last 100 years in Brazil: a review. *Cad. Saúde Pública* 19, 1-15.
- Calmette, A. (1894) Contribution a l'étude du venin des serpents. Immunisation des animaux et traitement de l'envenimation. *Ann. Inst. Pasteur*, 275-91.
- Calvete JJ, Marcinkiewicz C, Monleon D, Esteve V.(2005) Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. *Toxicon*. 45, 1063-1074.
- Calvete JJ, Borges A, Segura A, Flores-Díaz M, Alape-Girón A, Gutiérrez JM, Díez N, De Sousa L, Kiriakos D, Sánchez E, Faks JG, Escolano J, Sanz L (2009) Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops colombiensis*, a medically important pitviper of the *Bothrops atrox-asper* complex endemic to Venezuela: Contributing to its taxonomy and snakebite management. *J Proteomics*.72, 227–40.
- Cardoso, J.L., Fan, H.W., Franca, F.O., Jorge, M.T., Leite, R.P., Nishioka, S.A., Ávila, A., Sano-Martins, I.S., Tomy, S.C., Santoro, M.L., Chudzinski, A.M., Castro, S.C.B., Kamiguti, A.S., Kelen, E.M.A., Hirata, M.H., Miranda, R.M.S., Theakston, R.G.D. e Warrell, D.A. (1993) Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in Sao Paulo, Brazil. *Q J Med*. 86, 315-25.
- Celis, J.E., Gromov, P., Ostergaard, M., Madsen, P., Honoré, B., Dejgaard, K., Olsen, E., Vorum, H., Kristensen, D.B., Gromova, I., Haunso, A., Van Damme, J., Puype, M., Vandekerckhove, J. e Rasmussen, H.H. (1996) Human 2-D PAGE databases for proteome analysis in health and disease: <http://biobase.dk/cgi-bin/celis>. *FEBS Lett*. 398, 129-34.
- Chapman, S. (1937) *Physical Review*. 10, 184-190.
- Chippaux, J.P. (1998) Snake bites: appraisal of the global situation. *Bulletin of the World Organization*. 76, 515-524.
- Clauser, K.R., Baker, P., Burlingame, A.L (1999). "Role of accurate mass measurement (+/- 10 ppm) in protein identification strategies employing MS or MS/MS and database searching". *Anal. Chem*. 71, 2871–82.
- Cidade, DA., Simão, TA., Dávila, AM., Wagner, G., Junqueira-de-Azevedo, IL., Ho, PL., Bon, C., Zingali, RB., Albano, RM. (2006) *Bothrops jararaca* venom gland transcriptome: analysis of the gene expression pattern. *Toxicon*. 48, 437-61.
- Cidade, D.A., Wermelinger, L.S., Lôbo-Hajdu, G., Dávila, A.M., Bom, C., Zingali, R.B., Albano, R.M (2006^b) Molecular diversity of disintegrin-like domains within metalloproteinase precursors of *Bothrops jararaca*. *Toxicon*. 48, 590-9.
- Coelho, A.L.J. Freitas, M.S. Carvalho, A.L.O., Moura-Neto, V., Zingali, R.B., Barja-Fidalgo, C. (1999) Effects of jarastatin, a novel snake venom disintegrin, on

- neutrophil migration and actin cytoskeleton dynamics. *Exp. Cell. Res.*, 251, 378-387.
- Daltry, J.C., Ponnudurai, G., Shin, C.K., Tan, N.H., Thorpe, R.S., Wüster, W (1996) Electrophoretic profiles and biological activities: intraspecific variation in the venom of the Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*). *Toxicon*. 34, 67-79.
- Deolindo, P., Teixeira-Ferreira, A.S., Melo, E.J.T., Arnholt, A.C.V., Souza, W., Alves, E.W. e DaMatta, R.A. (2005) Programmed cell death in *Trypanosoma cruzi* induced by *Bothrops jararaca* venom. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 100, 33-38.
- Dole, M., Mack, L.L. e Hines, R.L. (1970) *Journal of Chemical Physics*. 49, 2240-2249.
- Du, X.Y., Clemetson, K.J (2002) Snake venom L-amino acid oxidases. *Toxicon*. 40, 659-665.
- Fen, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F. e Whitehouse, C.M. (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*. 246, 64-71.
- Fenton, J.D. 2nd., Ofosu, F.A., Moon, D.G., Maraganore, J.M. (1991) Thrombin structure and function: why thrombin is the primary target for antithrombotics. *Blood Coagul. Fibrinolysis*. 2, 69-75.
- Fey, S.J. e P.M. Larsen. (2001) 2D or not 2D. Two-dimensional electrophoresis. *Curr Opin Chem Biol*. 5, 26-33.
- Fernandez, H.J., Neshich, G. e Camargo, A.C.M. (2004) Using bradykinin-potentiating peptide structures to develop new antihypertensive drugs. *Genetics and Molecular Research*. 3, 554 -563.
- Fernandez, J. H., Silva, C. A., Assakura, M. T., Camargo, A.C.M. e Serrano, S. M. T. (2005) Molecular cloning, functional expression, and molecular modeling of bothrostatin, a new highly active disintegrin from *Bothrops jararaca* venom. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 329, 457-464.
- Ferreira, S.H., Bartelt, D.C. e Greene, L.J. (1970) Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Biochemistry*. 9, 2583-2593.
- Fox, J. W., Shannon, J. D., Stefansson, B., Kamiguti, A. S., Theakston, D. G., Serrano, S. M., Camargo, A. C. M., Sherman, N (2002) Role of discovery science in Toxinology: examples in venom proteomics. In *Perspectives in Molecular Toxinology*, Ménez, A., Ed. John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester. 97-105.
- Fox, J.W. e Serrano, S.M.T. (2005) Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. *Toxicon*. 45, 969-985.

- Fox J.W, Serrano S.M.T. (2008) Exploring snake venom proteomes: multifaceted analyses for complex toxin mixtures. *Proteomics*. 8, 909-920.
- Fry, B. G., Wuster, W., Ramjan, S. F., Jackson, T., Martelli, P., Kini, R.M (2003) Analysis of Colubroidea snake venoms by liquid chromatography with mass spectrometry: evolutionary and toxinological implications. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003, 17, 2047- 2062.
- Gomes, N. e Puerto, G. (1993) Atlas anatômico de Bothrops jararaca. Wied. 1824 (Serpentes: Viperidae). Mem Inst Butantan. 55, 69-100.
- Gomes, V.M., Carvalho, A.O., Da Cunha, M., Keller, M.N., Bloch Jr, C., Deolindo, P. e Alves, E.W. (2005) Purification and characterization of a novel peptide with antifungal activity from *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon*. 45, 817-827.
- Guimaraes-Gomes, V., Oliveira-Carvalho, A.L., Junqueira-de-Azevedo, I.L., Dutra, D.L., Pujol-Luz, M., Castro, H.C., Ho, P.L., Zingali, R.B. (2004) Cloning, characterization, and structural analysis of a C-type lectin from *Bothrops insularis* (BiL) venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 432, 1-11.
- Gutiérrez, J. .M. e Lomonte, B.(1989) Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. Mem. Inst Butantan. 51, 211-213.
- Gutiérrez, J..M. e Lomonte, B. (1995) Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon*. 33, 1405-1424.
- Gutierrez, J.M., Leon, G., Rojas, G., Lomonte, B., Rucavado, A. e Chaves, F. (1998) Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon*. 36, 1529-38.
- Gutierrez, J.M., Rucavado, A., Escalante, T. e Diaz, C. (2005) Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon*. 45, 997-1011.
- Gutiérrez JM, Theakston RDG, Warrell DA (2006) Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. *PLoS Med.* 3:e150.
- Gutiérrez JM, Lomonte B, León G, Alape-Girón A, Flores-Díaz M, Sanz L, Angulo Y, Angulo Y (2009) Snake venomomics and antivenomics: proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. *J Proteomics*. 72, 165–82.
- Hayashi, M.A.F. e Camargo, A.C.M. (2005) The Bradykinin-potentiating peptides from venom gland and brain of *Bothrops jararaca* contain highly site specific inhibitors of the somatic angiotensin-converting enzyme. *Toxicon*. 45, 1163-1170.

- Harrison, R.A., Richards, A., Laing GD. e Theakston, R.D. (2002) Simultaneous GeneGun immunisation with plasmids encoding antigen and GM-CSF: significant enhancement of murine antivenom IgG1 titres. *Vaccine*. 20, 1702-1706.
- Hati, R., Mitra, P., Sarker, S. e Bhattacharya, K.K. (1999) Snake venom hemorrhagins. *Critical Reviews in Toxicology*. 29, 1-19.
- Hite, L.A., Jia, L.G., Bjarnason, J.B. e Fox, J.W. (1994) cDNA sequences for four snake venom metalloproteinase: structure, classification and their relationship to mammalian reproductive proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 300, 182-191.
- Ho, P.L., Serrano, S.M.T., Chudzinski-Tavassi, A.M., Moura-da-Silva, A.M., Mentele, R., Caldas, C., Oliva, M.L.V., Batista, I. de. F.C. e Sarno de Oliveira, M.L. (2002) Angiostatin-like molecules are generated by snake venom metalloproteinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294, 879-885.
- Ianzer, D., Konno, K., Marques-Porto, R., Vieira Portaro, F.C., Stöcklin, R., Martins de Camargo, A.C., Pimenta, D.C (2004) 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*. 25, 1085-92.
- Itoh, N., Tanaka, N., Funakoshi, I., Kawasaki, T., Mihashi, S., Yamashina, I. (1987) The complete nucleotide sequence of the gene for batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme. *Nucleic Acids Res.* 16, 10377-8.
- Jia, L., Shimokawa, K., Bjarnason, J.B. e Fox, J.W. (1996) Snake venom metalloproteinases: structure, function and relationship to the ADAMS family of proteins. *Toxicon*. 34, 1269-1276.
- Junqueira-De-Azevedo I. L. e P. L. Ho. (2002) A survey of gene expression and diversity in the venom glands of the pitviper snake *Bothrops insularis* through the generation of expressed sequence tags (ESTs). *Gene*. 299, 279-291.
- Kamiguti, A.S., Hay, C.R.M., Theakston, R.D. e Zuzel, M. (1996a) Insights into the mechanisms of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. *Toxicon*. 34, 627-642.
- Kamiguti, A.S. (2005) Platelets as targets of snake venom metalloproteinases. *Toxicon*. 45, 1041-1049.
- Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U. e Hillenkamp, F. (1987) *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*. 78, 53-68.
- Kashima, S., Roberto, P.G., Soares, A.M., Astolfi-Filho, S., Pereira, J.O., Giuliati, S., Faria, M. Jr., Xavier, M.A., Fontes, M.R., Giglio, J.R., Franca, S.C (2004) Analysis of *Bothrops jararacussu* venomous gland transcriptome focusing on structural and functional

- aspects: I--gene expression profile of highly expressed phospholipases A₂. *Biochimie*. 86, 211-219.
- Kasturiratne A, Wickremasinghe A.R, de Silva N, Gunawardena N.K, Pathmeswaran A, Premaratna R. (2008) The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS Med*. 5:e218.
- Kawasaki, T., Fujimura, Y., Usami, Y., Susuki, M., Miura, S., Sakurai, Y., Makita, K., Taniuchi, Y., Hirano, K. e Titani, K. (1996) Complete amino acid sequence and identification of the platelet glycoprotein Ib-binding site of jararaca GPIb-BP, a snake venom protein isolated from *Bothrops jararaca*. *J. Biol. Chem.* 271, 10635-10639.
- Kierszenbaum, A.L., Lea, O., Petrusz, P., French, F.S., Tres, L.L., (1981). Isolation, culture, and immunocytochemical characterization of epididymal epithelial cells from pubertal and adult rats. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 78, 1675-1679.
- Kulkeaw, K., Chaicumpa, W., Sakolvaree, Y., Tongtawe, P., Tapchaisri, P (2007) Proteome and immunome of the venom of the Thai cobra, *Naja kaouthia*. *Toxicon*. 49, 1026-41.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 (1970). *Nature*, 227, 680-685.
- Larsen, M.R. e P. Roepstorff. (2000) Mass spectrometric identification of proteins and characterization of their post-translational modifications in proteome analysis. *Fresenius J Anal Chem*. 366, 677-90.
- Laing, G.D. e Moura-da-Silva, A.M. (2005) Jararhagin and its multiple effects on hemostasis. *Toxicon*. 45, 987-996.
- Li, S., Wang, J., Zhang, X., Ren, Y., Wang, N., Zhao, K., Chen, X., Zhao, C., Li, X., Shao, J., Yin, Y., West, M.B., Xu, N. e Liu, S. (2004) Proteomic characterization of two snake venoms: *Naja naja atra* and *Agkistrodon halys*. *Biochem. J.* 384, 119-127.
- Lizano, S., Lomonte, B., Fox, J.W. e Gutiérrez, J.M. (1997) Biochemical characterization and pharmacological properties of a phospholipase A₂ myotoxin inhibitor from the plasma of the snake *Bothrops asper*. *Biochem. J.* 326, 853-859.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-75
- Lu, Q., Navdaev, A., Clemetson, J.M., Clemetson, K.J (2005) Snake venom C-type lectins interacting with platelet receptors. Structure-function relationships and effects on haemostasis. *Toxicon* 45, 1089-1098.

- Luca, M., Ward, C.M., Ohmori, K., Andrews, R.K., Berndt, M.C., (1995) Jararhagin and jaracetin: novel snake venom inhibitors of the integrin collagen receptor alpha 2 beta 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 206, 570-576.
- Mamyrin, B.A., Karataev, V.I. e Shmikk, D.V. (1994) *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes.* 131, 1-19.
- Mandelbaum, F.R., Reichel, A.P. e Assakura, M.T. (1982) Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops jararaca* (jararaca). *Toxicon* 20, 955-972.
- Mann, M., Hojrup, P., Roepstorff, P (1993). "Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases". *Biol. Mass Spectrom.* 22, 338-345.
- March, N. e Willians, V. (2005) Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. *Toxicon.* 45, 1171-1181.
- Marcinkiewicz, C., Weinreb, P.H., Calvete, J.J., Kisiel, D.G., Mousa, S.A., Tuszynski, G.P. e Lobb, R.R. (2003) Obtustatin: a potent selective inhibitor of $\alpha_2\beta_1$ integrin *in vitro* and angiogenesis *in vivo*. *Cancer. Res.* 63, 2020-2023.
- Marsh, N. (1994) Inventory of haemorrhagic factors from snake venoms. *Thrombosis and Haemostasis.* 71, 793-797.
- Markland, F.S. (1998) Snake venoms and the hemostatic system. *Toxicon.* 36, 1749-800.
- Maruyama, M., Sugiki, M., Yoshida, E., Mihara, H. e Nakaima, N. (1992) Purification and characterization of two fibrinolytic enzymes from *Bothrops jararaca* (jararaca) venom. *Toxicon.* 30, 853-864.
- Maruyama, M., Tanigawa, M., Sugiki, M., Yoshida, E. e Mihara, H. (1993) Purification and characterization of low molecular weight fibrinolytic/hemorrhagic enzymes from snake (*B. Jararaca*) venom. *Enzyme Protein.* 47, 124-135.
- Maruyama, M., Sugiki, M., Anai, K. e Yoshida, E. (2002) N-terminal amino acid sequences and some characteristics of fibrinolytic/hemorrhagic metalloproteinases purified from *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon* 40, 1223-1226.
- Mebis, D. (1998) Enzymes in snake venoms: an overview. In : *Enzymes from snake venoms*, Bailey, G.S., Ed. Colorado : Alaken, Inc. 1-10
- Meier, J. e Stocker, K. F. (1995) Biology and distribution of venomous snakes of medical importance and the composition of snake venoms in *Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons*. J. Meier & J. White, Eds., New York, CRC Press. 367-412.

- Moura-Da-Silva, A.M., Desmond, H., Laing, G., Theakston, R.D. (1991) Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. *Toxicon*. 29, 713-723.
- Moura-da-Silva, A.M., Línica, A., Della-Casa, M.S., Kamiguti, A.S., Ho, P.L., Crampton, J.M. e Theakston, R.G.D. (1999) Jararhagin ECD-disintegrin-like domain: expression in *Escherichia coli* and inhibition of the platelet-collagen interaction. *Arch. Biochem. Biophys.* 369, 295-301.
- Moreno, E., Queiroz-Andrade, M., Lira-da-Silva, R.M. e Tavares-Neto, J. (2005) Clinical and epidemiological characteristics of snakebites in Rio Branco, Acre. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 38, 15-21.
- Murayama, N., Hayashi, M.A., Ohi, H., Ferreira, L.A., Hermann, V.V., Saito, H., Fujita, Y. (1997) Cloning and sequence analysis of a *Bothrops jararaca* cDNA encoding a precursor of seven bradykininpotentiating peptides and a C-type natriuretic peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94, 1189-1193.
- Murayama, N., Saguchi, K., Mentele, R., Assakura, M.T., Ohi, H., Fujita, Y., Camargo, A.C., Higuchi, S. e Serrano, S.M. (2003) The unusual high molecular mass of *Bothrops* protease A, a trypsin-like, serine peptidase from the venom of *Bothrops jararaca*, is due to its high carbohydrate content. *Biochim. Biophys. Acta*. 1652, 1-6.
- Nawarak, J., Sinchaikul, S., Wum C.Y., Liau, M.Y., Phutrakul, S. e Chen ST. (2003) Proteomics of snake venoms from Elapidae and Viperidae families by multidimensional chromatographic methods. *Electrophoresis*. 24, 2838-54.
- Nawarak, J., Phutrakul, S., Chen, S.T (2004) Analysis of lectin-bound glycoproteins in snake venom from the Elapidae and Viperidae families. *J. Proteome Res.* 3, 383-392.
- Nishida, S., Fujimura, Y., Miura, S., Ozeki, Y., Susuki, M. e Titani, K. (1994) Purification and characterization of bothrombin, a fibrinogen-clotting serine protease from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry*. 33, 1843-1849.
- O' Farrell, P.H. (1975) High Resolution two-dimensional Electrophoresis of proteins, *The Journal of Biological Chemistry*. 10, 4007-4021
- Ondetti, M.A. e Cushman, D.W. (1981) Angitensin converting enzyme inhibitors: biochemical properties and biological activities. In: Soffer, R.L. (Ed), *Biochemical Regulation of Blood Pressure*. Willey, New York, 165-204.
- Ownby, C.L., Selistre de Araujo, H.S., White, S.P. e Fletcher, J.E. (1999) Lysin 49 phospholipase A₂ proteins. *Toxicon*. 37, 411-445.
- Ozeki, Y., Matsui, T., Hamako, J., Suzuki, M., Fujimura, Y., Yoshida, E. (1994) C-Type galactoside binding lectin from *Bothrops jararaca* venom: comparison of its

- structure and function with those of botrocetin. Arch. Biochem. Biophys. 308, 306-310.
- Paine, M.J.L., Desmont, H.P., Theakston, R.G.D. e Crampton, J.M. (1992) Purification and molecular characterization of a high molecular weight haemorrhagic metalloprotease Jararhagin from *Bothrops jararaca* venom. J Biol Chem. 267, 22869-76.
- Paine, M.J.L., Moura-da-Silva, A.M., Theakston, R.G.D. e Crampton, J.M. (1994) Cloning of metalloproteinase genes in the carpet viper (*Echis pyramidum leakeyi*): further members of the metalloprotease/disintegrin gene family. Eur. J. Biochem. 224, 483-488.
- Pardal, P.P.O., Souza, S.M., Monteiro, M.R.C.C., Fan, H.W., Cardoso, J.L.C., França, F.Q.S., Tomy, S.C., Sano-Martins, I.S., Souza-e-Silva, M.C.C., Colombini, M., Koderá, N.F., Moura-da-Silva, A.M., Cardoso, D.F., Velarde, D.T., Kamiguti, A.S., Teakston, R.G.D., Warrel, D.A. (2004) Clinical trial of two antivenoms for the treatment of *Bothrops* and *Lachesis* bites in the north eastern Amazon region of Brazil, Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 98, 28-42.
- Phisalix, M. & Bertrand, G (1894) Sur la propriété antitoxique du sang des animaux vaccinés contre le venin de vipère. C.R. Soc. Biol. 111-15
- Rabilloud, T. (2000) Detecting proteins separated by 2-D gel electrophoresis. Anal Chem. 72, 48-55.
- Ribeiro, L.A. e Jorge, M.T. (1997) Bites by snakes in the genus *Bothrops*: a series of 3,139 cases. Rev Soc Bras Med Trop 30: 475-80.
- Risch M, Georgieva D, von Bergen M, Jehmlich N, Genov N, Arni RK, Betzel C (2009) Snake Venomics of the Siamese Russell's Viper (*Daboia russelli siamensis*) relation to pharmacological activities. J Proteomics. 72, 256-69.
- Rocha e Silva, M., Beraldo, W.T. e Rosenfeld, G. (1949) Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venom and by trypsin. Am. J. Physiol. 156, 261-270.
- Saguchi, K-i., Saguchi, Hagiwara-Saguchi, Y., Murayama, N., Ohi, H., Fujita, Y., Camargo, A.C.M., Serrano, S.M.T. e Higuchi, S. (2005) Molecular cloning of serine proteinases from *Bothrops jararaca* venom gland. Toxicon 46, 72-83.
- Scarborough, R.M., Naughton, M.A., Teng, W., Rose, J.W., Phillips, D.R., Nannizzi, L. (1993) Design of potent and specific integrin antagonists. Peptide antagonists with high specificity for glycoprotein IIb-IIIa. J. Biol. Chem. 268,1066-1073

- Sekiya, F., Atoda, H., Morita, T. (1993) Isolation and characterisation of an anticoagulant protein homologous to botrocetin from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry*. 32, 6892-6897.
- Serrano, S.M., Mentele, R., Sampaio, C.A. e Fink, E. (1995) Purification, characterization, and amino acid sequence of a serine proteinase, PA-BJ, with platelet-aggregating activity from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry*. 34, 7186-7193.
- Serrano, S.M., Hagiwagara, Y., Murayama, N., Higuchi, S., Mentele, R., Sampaio, C.A., Camargo, A.C. e Fink, E. (1998) Purification and characterization of a kinin-releasing and fibrinogen-clotting serine proteinase (KN-BJ) from the venom of *Bothrops jararaca*, and molecular cloning and sequence analysis of its cDNA. *Eur. J. Biochem.* 251, 845-853.
- Serrano, M.T.S., Reichl, A.P., Mentele, R., Auerswald, E.A., Santoro, M.L., Sampaio, C.A.M. (1999) A novel phospholipase A2, BJPLA2, from the venom of the snake *Bothrops jararaca*: Purification, primary structure analysis, and its characterization as a platelet aggregation-inhibiting factor. *Arch. Biochem. Biophys.*, 367, 26-32.
- Serrano, S.M.T. (1999) The isolation and structural and functional characterization of serine proteinases in the venom of *Bothrops jararaca*. *J. Venom Anim. Toxins*. 5, 226-235.
- Serrano, S.M., Mentele, R., Sampaio, C.A., Camargo, A.C. e Fink, E. (2000) A novel fibrinogen-clotting enzyme, TL-BT, from the venom of the snake *Bothrops jararaca*: purification and characterization. *Thromb Haemost.* 83, 438-444.
- Serrano, S.M.T., Shannon, J.D., Wang, D., Camargo, A.C.M. e Fox, J.W. (2005) A multifaceted analysis of viperid snake venoms by two-dimensional gel electrophoresis: An approach to understanding venom proteomics. *Proteomics*. 5, 501-510.
- Steen, H. e Mann, M. (2004) The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9, 699-711.
- Silva, M.B., Schattner, M., Ramos, C.R.R., Junqueira-De-Azevedo, I.L.M., Guarnieri, M.C., Lazzari, M.A., Sampaio, C.A.M., Pozner, R.G., Ventura, J.S., Ho, P.L. Chudzinski-Tavassi, A.M. (2003) A prothrombin activator from *Bothrops erythromelas* (jararaca-da-seca) snake venom: characterization and molecular cloning *Biochem. J.* 369, 129-139.
- Stock, R.P, Massougbdji A, Alagón A, Chippaux J.P (2007) Bringing antivenoms to Sub-Saharan Africa. *Nat Biotechnol* 2, 173-7.
- Stone, K.L. & Williams, K.R (1993) Enzymatic digestion of proteins and HPLC peptide isolation. In a practical guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing. Ed Matsudaira, P. 43-69.

- Tan, N.H. e Ponnudurai, G. (1992) Comparative study of the enzymatic, hemorrhagic, procoagulant and anticoagulant activities of some animal venoms. *Comp Biochem Physiol.* 103, 299-302.
- Tanizaki, M.M. Zingali, R.B. Kawazaki, H. Imajoh, S. Yamazaki, S. Suzuki, K (1989) Purification and some characteristics of a zinc metalloproteinase from the venom of *Bothrops jararaca* (jararaca). *Toxicon.* 27, 747-755.
- Tempone, A.G., Andrade, H.F Jr, Spencer, P.J., Lourenço, C.O., Rogero, J.R., Nascimento, N (2001) *Bothrops moojeni* venom kills *Leishmania* spp. with hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. *Biochem Biophys Res Commun.* 280, 620-4.
- Usami, Y., Fujimura, Y., Miura, S., Shima, H., Yoshida, E., Yoshioka, A., Hirano, K., Suzuki, M. e Titani, K. (1994) A 28Kda-protein with disintegrin-like structure (jararagin-C) purified from *Bothrops jararaca* venom inhibits collagen and ADP-induced platelet aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001, 331-339.
- Valente RH, Guimarães PR, Junqueira M, Neves-Ferreira AGC, Soares MR, Chapeaurouge A, Trugilho M, León IR, Rocha S, Oliveira-Carvalho AL, Serrão LW, Dutra D, Leão LI, Junqueira de-Azevedo I, Ho PL, Zingali RB, Perales J, Domont GB (2009) *Bothrops insularis* venomomics: a proteomic analysis supported by transcriptomic-generated sequence data. *J Proteomics*72, 241–55.
- Vieira, D.F., Watanabe, L., Sant'ana, C.D., Marcussi, S., Sampaio, S.V., Soares, A.M. e Arni, R.K. (2004) Purification and Characterization of Jararassin-I, A Thrombin-like Enzyme from *Bothrops jararaca* Snake Venom. *Bioch Bioph Acta.* 36, 798-802.
- Wen Fan, H. e Cardoso, J.L. (1995) Clinical toxinology of snake bites in South America in *Handbook of Clinical Toxinology of Animal Venoms and Poisons.* J. Meier & J. White, Eds., New York, CRC Press. 667-688.
- Wilkins, M.R., Pasquali, C., Appel, R.D., Ou, K., Golaz, O., Sanchez, J.C., Yan, JX., Gooley, A.A., Hughes, G., Humphery-Smith, I., Williams KL e Hochstrasser, D.F. (1996) From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (N Y).* 14, 61-65.
- Wilkins, M.R., Williams, K.I., Appel, R.D. e Hochstrasser, D.E. (1997) *Proteome research: new frontiers in functional genomics.* Springer-Verlag, Germany.
- World Health Organization (2007) Rabies and envenomings. A neglected public health issue: Report of a consultative meeting. Geneva: WHO; Available: http://www.who.int/bloodproducts/animal_sera/nRabies.pdf
- Yamazaki, Y., Morita, T., (2004) Structure and function of snake cysteine-rich secretory proteins. *Toxicon* 44, 227-231.

- Zao, X., Yeh, J.Z. e Narashashi, T. (2001) Post-stroke dementia: nootropic drug modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 939, 179-186.
- Zingali, R.B., Carlini, C.R., Francischetti, I.M., Guimarães, J.A. (1990) *Bothrops jararaca* snake venom: effects on platelet aggregation. *Thromb. Res.* 58, 303-316.
- Zingali, R.B., Jandrot-Perrus, M., Guillin, M.C., Bom., C. (1993) Bothrojaracin, a new thrombin inhibitor isolated from *Bothrops jararaca* venom: characterization and mechanism of thrombin inhibition. *Biochemistry* 32,10794-802.
- Zingali, R.B., Bianconi, M.L. e Monteiro, R.Q. (2001) Interaction of Bothrojaracin with Prothrombin. *Haemostasis.* 31, 273-278.