MILENE SCHMIDT DO AMARAL E LUNA

**ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE
PROTEÍNAS INDUZIDA PELA ATIVAÇÃO DA INERVAÇÃO
NORADRENÉRGICA EM GLÂNDULAS DE VENENO E ACESSÓRIA DA
SERPENTE *BOTHROPS JARARACA***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção de Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2013

MILENE SCHMIDT DO AMARAL E LUNA

**ANÁLISE PROTEÔMICA COMPARATIVA DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE
PROTEÍNAS INDUZIDA PELA ATIVAÇÃO DA INERVAÇÃO
NORADRENÉRGICA EM GLÂNDULAS DE VENENO E ACESSÓRIA DA
SERPENTE *BOTHROPS JARARACA***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção de Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Dra. Norma Yamanouye

Versão original

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Luna, Milene Schmidt do Amaral e.

Análise proteômica comparativa da expressão diferencial de proteínas induzida pela ativação da inervação noradrenérgica em glândulas de veneno e acessória da serpente *Bothrops jararaca* / Milene Schmidt do Amaral e Luna. – São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Norma Yamanouye.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Mecanismos envolvidos na produção e secreção de veneno pelo aparelho glandular de veneno de serpentes viperidae.

Versão do título para o inglês: Comparative proteomic analysis of differential expression induced by noradrenergic innervation in venom gland and accessory gland of *Bothrops jararaca* snake.

1. *Bothrops jararaca* 2. Glândula de veneno 3. Glândula acessória 4. Proteínas 5. Ciclo de produção de veneno 6. Inervação noradrenérgica I. Yamanouye, Profa. Dra. Norma II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB085/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Milene Schmidt do Amaral e Luna.

Título da Tese: Análise proteômica comparativa da expressão diferencial de proteínas induzida pela ativação da inervação noradrenérgica em glândulas de veneno e acessória da serpente *Bothrops jararaca*.

Orientador(a): Profa. Dra. Norma Yamanouye.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **138** nas fls. **74** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Norma Yamanouye, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Mecanismos envolvidos no controle da produção e secreção de veneno pelo aparelho glandular de veneno de serpente Viperidae** do qual participou(aram) o(s) alunos **Milene Schmidt do Amaral e Luna, Fernanda Sakai**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEa)** em **05.11.09**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 09 de novembro de 2009.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEa - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEa - ICB/USP
Prof^a Dr. Ariel M. Silber
Dpto. de Parasitologia
ICB - USP
asilber@usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Análise proteômica comparativa da expressão diferencial de proteínas induzida pela ativação da inervação noradrenérgica em glândulas de veneno da serpente *Bothrops jararaca*", protocolo nº 555/08, sob a responsabilidade de Norma Yamanouye e Milene Schmidt do Amaral e Luna, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de **12/11/2008**.

We certify that the research entitled "Comparative proteomic analysis of the differential expression of proteins induced by noradrenergic innervation in venom gland of snake *Bothrops jararaca*", protocol nº 555/08, under the responsibility of Norma Yamanouye and Milene Schmidt do Amaral e Luna, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 11/12/2008.

Vigência do Projeto: 01/12/2008 – 04/06/2013	Nº de animais/espécie
	35 serpentes <i>Bothrops jararaca</i> fêmeas 35 serpentes <i>Bothrops jararaca</i> machos

São Paulo, 13 de Novembro de 2008.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:

Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS
**AUTORIZAÇÃO ESPECIAL DE ACESSO E DE REMESSA DE AMOSTRA DE COMPONENTE DO
PATRIMÔNIO GENÉTICO Nº 01/2009**

O INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS, IBAMA no uso das competências que lhe foram conferidas pela Deliberação nº 040/CGEN, de 24 de setembro de 2003, resolve:

Autorizar o **Instituto Butantan**, constituído sob o CNPJ nº 61.821.344/0001-56, representado legalmente pelo Diretor Otávio de Azevedo Mercadante, inscrito sob o CPF nº 041.394.618-53, a acessar e remeter amostras de componente do patrimônio genético no âmbito dos projetos de pesquisa que compõem o portfólio de projetos do Instituto Butantan para o desenvolvimento de pesquisas científicas sem perspectiva de uso comercial, aplicação industrial ou bioprospecção.

Local de depósito de subamostra: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo e o Instituto Butantan (Deliberações do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético nº 2, de 8 de julho de 2002 e nº 147, de 29 de Junho de 2006, respectivamente).

Localização da Instituição detentora desta autorização: Av. Vital Brazil, 1500, São Paulo, SP, 05503-900.

Validade da Autorização: 23 de janeiro de 2009 a 23 de janeiro de 2011, prorrogável por mais dois anos. O Instituto Butantan deverá enviar ao Ibama relatório anual das atividades desenvolvidas no âmbito dos projetos de pesquisa autorizados, nos termos do Decreto nº 4.946/2003.

Esta autorização vincula-se às informações fornecidas e termos de compromissos assinados pelo requerente constantes no processo nº 02001.005106/2008 e demais processos pertinentes. Não estão autorizadas atividades de acesso e de remessa de componente do patrimônio genético com finalidade de bioprospecção, desenvolvimento tecnológico ou uso comercial e/ou industrial.

Caso seja identificado uso econômico de produto ou processo, passível ou não de proteção intelectual, originado das referidas amostras, obriga-se a instituição solicitante a adotar as providências cabíveis junto ao Conselho de Gestão de Patrimônio Genético, com vistas à formalização de Contrato de Utilização do Patrimônio Genético e de Repartição de Benefícios, conforme Medida Provisória nº 2.186/16, de 2001, Decretos nº 3.945/2001 e nº 4.946/2003.

Durante a vigência desta autorização, o Instituto Butantan poderá inserir novas atividades ou projetos no portfólio, desde que observe as condições estabelecidas na legislação pertinente e, no prazo de sessenta dias a partir do início da nova atividade ou projeto, comunique ao IBAMA qualquer alteração ou inserção de novas atividades ou projetos no portfólio do Instituto Butantan, conforme disposto no § 4º, art. 9º, do Decreto nº 4.946/2003.

As remessas de componentes do patrimônio genético deverão ser precedidas de assinatura dos Termos de Transferência de Material, conforme dispõe o Art. 19, inciso IV, da Medida Provisória nº 2.186-16/2001. Para a remessa ou transporte de componente do patrimônio genético para instituição sediada no exterior, o Instituto Butantan, deverá solicitar ao IBAMA licença de exportação complementar a esta Autorização Especial.

ROBERTO MESSIAS FRANCO
Presidente do Ibama

Brasília, 23 de janeiro de 2009.

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS
DIRETORIA DE USO SUSTENTÁVEL DA BIODIVERSIDADE E FLORESTAS
SCEN - Ed. Sede do Ibama - Bloco B - 70.818-900 - Brasília - DF
Cx. Postal: 09.870 - Telefone: (61) 3316.1650 - Fax: (61) 3316.1200

Ofício nº 13/2008/DBFLO

Brasília, 21 de Janeiro de 2009.

A Sua Senhoria o Diretor
Otávio de Azevedo Mercadante
Instituto Butantan
Av. Vital Brazil, 1500, São Paulo, SP
05503-900

*A Coordenação de Biodiversidade
(Fátima Freitas) para ciência e
procedimento*

Assunto: Autorização especial de acesso e remessa de amostras de componente do patrimônio genético do Instituto Butantan.

Dr. Otávio de Azevedo Mercadante
Diretor
Instituto Butantan
30.01.09

Senhor Diretor,

1. Cumprimentando-o, e reportando-me a solicitação de V. Sa. referente ao acesso e remessa de patrimônio genético, dirijo-me com o objetivo de encaminhar autorização especial de acesso e remessa de amostras de componente do patrimônio genético nº 01/2009/IBAMA, referente ao processo nº 02001.005106/2008 e demais processos listados em anexo.
2. O aludido documento permite o acesso e a remessa de amostras de componente do patrimônio genético no âmbito dos projetos de pesquisa que compõem o portfólio de projetos do Instituto Butantan. Em apenso consta relação dos projetos de pesquisa contemplados pela autorização especial de acesso e remessa nº 01/2009.
3. A Autorização Especial nº 01/2009 tem validade de 02 (dois) anos, renovável por igual período. O Instituto Butantan deverá enviar ao Ibama relatório anual das atividades desenvolvidas no âmbito dos projetos de pesquisa autorizados.

Aos meus pais, Creusa e Josué que nunca
mediram esforços para eu continuar os meus
estudos e sempre me impulsionaram a seguir os
meus caminhos. Obrigada!

A minha querida irmã Nelise por ser você
mesma, pela sua amizade, carinho e apoio
sempre.

Ao meu querido marido, dedico a você Marcio este
trabalho pelo seu amor e respeito por minhas
escolhas. Por estar ao meu lado em todos os
momentos. Por conhecer todos os meus defeitos e
mesmo assim me amar!!!

Marcela a continuação e o sentido da vida!

A forma mais pura do amor, a estrela que brilha
em minha vida.

Por você tudo vale a pena!

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é fruto de muita dedicação, trabalho e persistência. Contei com o apoio e a colaboração de muitas pessoas, as quais eu dedico meus agradecimentos especiais:

À Dra. Norma Yamanouye, minha orientadora, que me transmitiu conhecimentos valiosos, sempre me motivou e acima de tudo me ensinou a caminhar com minhas próprias pernas. Expresso minha profunda gratidão pela perfeita combinação de orientação e amizade.

Ao Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan pela oportunidade de trabalhar ao lado de pessoas agradáveis e pela convivência durante todos os anos.

Aos pesquisadores do Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan que direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan pelo fornecimento e classificação das serpentes *Bothrops jararaca*.

A Celiana, secretária do Programa de pós-graduação do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da USP que sempre esclareceu minhas dúvidas.

Ao Dr. Richard Hemmi Valente, Laboratório de Toxinologia do Instituto Oswaldo Cruz, que gentilmente me recebeu em seu laboratório e me ensinou um pouco sobre o Universo do Proteoma. Pela Paciência, dedicação e horas de Skype dispensadas para sanar minhas dúvidas. Principalmente pela identificação das proteínas por Espectrometria de Massas. Super Obrigada!

Ao Dr. Jonas Perales, chefe do Laboratório de Toxinologia do Instituto Oswaldo Cruz, que abriu as portas do seu laboratório e me recebeu com muito carinho juntamente com sua equipe.

A Dra. Ana Lúcia T. O. Nascimento do Laboratório de Biotecnologia Molecular do Instituto Butantan que disponibilizou os equipamentos de gel bidimensional antes de adquirirmos os nossos equipamentos.

A Ms. Mônica Larucci Vieira do Laboratório de Biotecnologia Molecular do Instituto Butantan que me ajudou muito no início deste projeto, na padronização da técnica de gel de eletroforese bidimensional.

Ao Dr. Marcelo Larami Santoro do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan, por disponibilizar o escâner para digitalização dos géis, na etapa inicial deste projeto e ainda ceder gentilmente uma alíquota do anticorpo contra botrocetina.

A Dra. Anita Mitico Tanaka Azevedo do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan, por disponibilizar alguns equipamentos do sistema de gel bidimensional e ainda pelas discussões científicas.

A Dra. Ana Maria Moura da Silva do Laboratório de Imunopatologia do Instituto Butantan pelas sugestões e por ceder gentilmente uma alíquota dos anticorpos contra metaloproteinase BnPI e jararagina.

Ao Dr. Inácio Junqueira de Azevedo e a Dra. Solange Serrano do Laboratório Especial de Toxinologia aplicada ambos por me conceder uma alíquota dos anticorpos contra PDI e serinoproteinase, respectivamente.

Agradecimento às amigas, Andréia, Luciana, Adriana “Dri Morena”, do laboratório de Farmacologia pela agradável convivência, pelas discussões científicas e aos Happy hours.

Agradecimento especial aos amigos Cintia e Thiago, pelos momentos agradáveis que passamos juntos que são inesquecíveis, pela amizade, paciência, sugestões, discussões científicas e não científicas e ótimas gargalhadas. Amo Vocês!

A minha amiga Beatriz Viana, muito obrigada pela amizade, convivência agradável e por me apresentar um pouquinho da sua terra através das guloseimas Paraenses.

A minha grande amiga Mariana Schmidt que sempre me escutou e me aconselhou nos momentos mais felizes, inclusive nos mais difíceis. Por estar sempre presente e muito bem humorada.

Aos meus queridos irmãos Gabriel e Julia simplesmente por existirem e estarem sempre presentes.

A minha mãe e minha vizinha querida Aurélia por me ajudarem muito nesta última etapa do Doutorado a cuidar da minha pequena.

A minha família!

Este trabalho foi realizado com o auxílio financeiro do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), através da concessão da Bolsa de Doutorado (142525/2008-1) e com o auxílio à pesquisa da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – 07-50083-9).

RESUMO

LUNA, M. S. A. **Análise proteômica comparativa da expressão diferencial de proteínas induzida pela ativação da inervação noradrenérgica em glândulas de veneno e acessória da serpente *Bothrops jararaca*.** 2013. 170 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

As glândulas de veneno de serpentes Viperidae possuem um *lumen* onde todo veneno produzido pelas células secretoras é estocado. Quando o veneno é liberado do *lumen*, as células secretoras são ativadas e mais veneno é produzido. Mostramos anteriormente que a extração de veneno promove modificações na síntese de proteínas da glândula de veneno. Nesta tese, realizamos um estudo proteômico das glândulas de veneno e acessória durante o ciclo de produção de veneno e verificamos a influência da inervação noradrenérgica na regulação da síntese de proteínas da glândula de veneno. Foram identificadas espécies de proteínas exclusivas em cada estágio. Dentre as proteínas do citoplasma, verificamos que o número de espécies de proteínas exclusivas identificadas como actina, vimentina, tropomiosina, da subunidade alfa do proteassomo, tioredoxina e da proteína 40S ribossomal aumentou após a extração de veneno. Quanto às proteínas do retículo endoplasmático, verificamos um aumento no número de proteínas exclusivas identificadas como proteína PDI e GRP78 após a extração de veneno. Em relação às proteínas secretadas, identificadas como toxinas do veneno, mostramos pela primeira vez que a maioria das toxinas do veneno já está presente no estágio quiescente da glândula. As SVSP são mais abundantes no estágio quiescente e as CTL-símile como as GPIb-BP e fator de coagulação IX/X estão presentes somente no estágio quiescente. Outras toxinas como SVMP, LAAO, PLA₂, PLI, B_j46a e disintegrina são mais abundantes nos estágios ativados da glândula, demonstrando que a produção e secreção de toxinas ocorrem de maneira não sincronizada. A inervação noradrenérgica regulou positivamente a síntese de vimentina e subunidade alfa do proteassomo e negativamente a síntese da cadeia leve da miosina, anexina A5 e ATP-sintase mitocondrial-símile. Em relação às toxinas, a inervação noradrenérgica regulou negativamente a síntese das CTL-símile como as GPIb-BP e o fator de coagulação IX/X, além das PLA₂ e da SVMP-P_{II} e positivamente a síntese de B_j46a e da SVMP-P_I. Quanto à glândula acessória, a síntese da proteína nuclear histona H2 aumentou após a extração de veneno e a síntese das proteínas HSP90 (retículo endoplasmático) e DPPIV (membrana) reduziram após a extração de veneno. Surpreendentemente, pela primeira vez, mostramos a presença de toxinas na glândula acessória como as CTLs, SVSP, SVMP, PLA₂, LAAO e ainda toxinas menos abundantes como disintegrina, GC, PN identificadas apenas na glândula acessória que não sofreu extração de veneno. Identificamos também a presença de inibidores de enzimas tais como PLI, B_j46a e o precursor do tripeptídeo pEKW. Interessante salientar que da classe das SVMP, apenas as SVMP-P_{II} e SVMP-P_{III} foram identificadas preferencialmente 4 dias após a extração de veneno. Assim como na glândula de veneno, a produção e secreção das toxinas da glândula acessória ocorrem de maneira não sincronizada. O conhecimento da composição proteômica das glândulas do aparelho glandular de veneno de serpente nos vários estágios do ciclo de produção de veneno, bem como a participação da inervação noradrenérgica nesse processo contribuirá de forma significativa para um melhor entendimento dos mecanismos de produção e secreção de veneno, contribuindo para os estudos das toxinas e suas diversidades.

Palavras-chave: *Bothrops jararaca*. Glândula de veneno. Glândula acessória. Síntese de proteínas. Ciclo de produção de veneno. Inervação noradrenérgica. Serpente. Análise proteômica.

ABSTRACT

LUNA, M. S. A. **Comparative proteomic analysis of differential expression induced by noradrenergic innervation in venom gland and accessory gland of *Bothrops jararaca* snake.** 2013. 170 p. Ph. D. thesis (Cell Biology and Tissue) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Venom gland of viperid snakes have a basal-central lumen where the venom produced by secretory cells is stored. When the venom is depleted from the lumen, secretory cells are activated and more venom is produced. In previous studies, we have shown that venom extraction promotes changes in the protein synthesis of venom gland. In this thesis, we performed a proteomic analysis of venom gland and accessory gland during venom production cycle and verify the influence of noradrenergic innervation on protein synthesis of the venom gland. We identified exclusive proteins in each stage. Among protein species of the cytoplasm, we verify that the number of exclusive protein species identified as actin, vimentin, tropomyosin, and proteasome subunit alpha type-1, thioredoxin, and 40S ribosomal increased after venom extraction. Among protein species of the endoplasmic reticulum, we verify that the number of species of protein identified as disulfide isomerase and glucose regulated protein 78 kDa increased after venom extraction. Regarding secreted proteins, specifically about venom toxins, we showed for the first time that many toxins are present in quiescent stage. SVSP are more abundant in quiescent stage and others toxins CTL-like such as GPIb-BP and coagulation factor IX/X were present only in this stage. Other toxins such as SVMP, LAAO, PLA₂, PLI, Bj46a, and disintegrin are more abundant in activated stages of venom gland, indicating the production and secretion of toxins is not synchronized. Noradrenergic innervation regulates positively the synthesis of vimentin and proteasome subunit alpha and negatively the synthesis of myosin light chain and ATP-synthase mitochondrial-like. Considering toxins, noradrenergic innervation regulates negatively the synthesis of CTL-like such as GPIb-BP, coagulation factor IX/X, PLA₂ and SVMP-II and positively the synthesis of Bj46a and SVMP-PI. In the accessory gland, the synthesis of nuclear protein histone H2 increased after venom extraction and the synthesis of proteins HSP90 (endoplasmic reticulum) and DPPIV (membrane) decreased after venom extraction. Surprisingly, we showed for the first time the presence of toxins in accessory gland such as CTLs, SVSP, SVMP, PLA₂, LAAO and in a less abundance, disintegrin, GC, PN identified only in accessory gland that not underwent venom extraction. We also identified the presence of enzyme inhibitors such as PLI, Bj46a and the precursor of the tripeptide pEKW. It is important to show that from SVMP class, only SVMP-II and SVMPI-PIII were identified and mainly in accessory gland 4 days after venom extraction. Similar to venom gland, the syntheses and secretion of new toxins are asynchronized in accessory gland. The proteomic composition of gland of snake venom apparatus on different stages of venom production cycle, and the participation noradrenergic innervation in this process will contribute to better understand the mechanisms involved in venom gland activation and consequently, venom production. These data will also contribute to the studies on snake toxins and their diversities.

Keywords: *Bothrops jararaca*. Venom gland. Accessory gland. Protein synthesis. Venom production cycle. Noradrenergic innervation. Snake. Proteomic analysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Serpente adulta de <i>Bothrops jararaca</i> em atividade sobre o solo.....	22
Figura 2 - Crânio e mandíbula de serpente com dentição solenoglifodonte.....	23
Figura 3 - Aparelho glandular de veneno da serpente <i>Bothrops jararaca</i>	24
Figura 4 - Representação esquemática das mudanças morfológicas das células secretoras da glândula de veneno da serpente <i>Vipera palestinae</i> durante o ciclo de produção de veneno.	29
Figura 5 - Remoção das glândulas de veneno e acessória da serpente <i>Bothrops jararaca</i>	40
Figura 6 - Delineamento experimental deste projeto para identificar, na serpente <i>Bothrops jararaca</i> , as proteínas da glândula principal de veneno e da glândula acessória reguladas durante o ciclo de produção de veneno e ainda as proteínas da glândula principal de veneno regulada pela inervação noradrenérgica.	41
Figura 7 - Diagrama de Venn representando a análise comparativa dos géis 2-DE de glândulas de veneno das serpentes <i>Bothrops jararaca</i> fêmeas durante o ciclo de produção de veneno..	51
Figura 8 - Gel 2-DE de SDS-poliacrilamida representativo dos diferentes spots selecionados dos extratos de glândulas de veneno das serpentes <i>Bothrops jararaca</i> fêmeas durante o ciclo de produção de veneno.	53
Figura 9 - Distribuição subcelular das proteínas identificadas em glândulas de veneno das serpentes <i>Bothrops jararaca</i>	55
Figura 10 - Aumento do número de espécies de proteínas exclusivas identificadas como citoplasmáticas, do citoesqueleto, na glândula de veneno da serpente <i>Bothrops jararaca</i> durante o ciclo de produção de veneno.	56
Figura 11 - Aumento do número de espécies de proteínas exclusivas identificadas como citoplasmáticas na glândula de veneno da serpente <i>Bothrops jararaca</i> durante o ciclo de produção de veneno.	56
Figura 12 - Aumento do número de espécies de proteínas exclusivas identificadas como do retículo endoplasmático na glândula de veneno da serpente <i>Bothrops jararaca</i> durante o ciclo de produção de veneno.	57
Figura 13 - Número de espécies de toxinas identificadas como proteínas secretadas na glândula de veneno da serpente <i>Bothrops jararaca</i> durante o ciclo de produção de veneno.	58
Figura 14 - Número de espécies de proteínas identificadas das classes de toxinas na glândula de veneno da serpente <i>Bothrops jararaca</i> durante o ciclo de produção de veneno.	60
Figura 15 - Detecção de actina nos diferentes estágios do ciclo de produção de veneno.	62
Figura 16 - Detecção da SVSP (MSP1/2) nos diferentes estágios do ciclo de produção de veneno. ..	62

Figura 17 - Diagrama de Venn representando a análise comparativa dos géis 2-DE de glândulas de veneno das serpentes <i>Bothrops jararaca</i> fêmeas no estágio ativado 4 dias e a influência da inervação noradrenérgica.	64
Figura 18 - Gel 2-DE de SDS-poliacrilamida representativo dos diferentes spots selecionados após tratamento com reserpina e agonistas de adrenoreceptores alfa e beta em glândulas de veneno das serpentes <i>Bothrops jararaca</i> fêmeas.	65
Figura 19 - Distribuição subcelular das proteínas identificadas nas glândulas de veneno da serpente <i>Bothrops jararaca</i> fêmea após tratamento com reserpina e agonistas de adrenoreceptores alfa e beta.	67
Figura 20 - Regulação da síntese das proteínas citoplasmáticas pela inervação noradrenérgica, identificadas na glândula de veneno da serpente <i>Bothrops jararaca</i>	68
Figura 21 - Síntese de ATP sintase mitocondrial-símile é regulada pela inervação noradrenérgica na glândula de veneno da serpente <i>Bothrops jararaca</i>	69
Figura 22 - Número de espécies de toxinas identificadas como proteínas secretadas na glândula de veneno da serpente <i>Bothrops jararaca</i>	70
Figura 23 - Toxinas identificadas na glândula de veneno da serpente <i>Bothrops jararaca</i> estimuladas pela inervação noradrenérgica.	71
Figura 24 - Perfil proteico dos extratos de glândulas acessórias das serpentes <i>Bothrops jararaca</i> durante o ciclo de produção de secreção.	73
Figura 25 - Distribuição subcelular das proteínas identificadas nas glândulas acessórias de serpentes <i>Bothrops jararaca</i> durante o ciclo de produção de secreção.	76
Figura 26 - Número de espécies de proteínas identificadas na glândula acessória da serpente <i>Bothrops jararaca</i> que tiveram suas sínteses alteradas durante o ciclo de produção de secreção. ..	77
Figura 27 - Número de proteínas secretadas identificadas na glândula acessória da serpente <i>Bothrops jararaca</i>	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Protocolo de focalização isoeletrica utilizado para fitas de 18 cm.....	35
Tabela 2-	Análise densitométrica das bandas dos extratos de glândulas acessórias de serpentes <i>Bothrops jararaca</i> sem extração de veneno e (0 dia) e glândulas acessórias 4 e 7 dias após a extração de veneno.....	75

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	40
1.1 Serpentes	21
1.2 <i>Bothrops jararaca</i>	22
1.3 Aparelho glandular de veneno da serpente Viperidae	23
1.4 Glândulas Salivares	25
1.5 Mecanismos de produção de veneno pela glândula principal de veneno	28
1.6 Ferramentas “ômicas”	32
2 OBJETIVOS	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1 Animais	39
3.2 Glândulas de veneno e glândulas acessórias	39
3.3 Delineamento experimental	40
3.4 Extrato proteico	41
3.5 Quantificação de proteínas	42
3.6 Análise proteômica da glândula de veneno de <i>Bothrops jararaca</i>	42
3.6.1 Reidratação das fitas	42
3.6.2 Focalização isoeletrica (1ª dimensão)	43
3.6.3 Equilíbrio das fitas	43
3.6.4 Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (2ª dimensão)	43
3.6.5 Análise das imagens	44
3.7 Análise proteômica da glândula acessória de <i>Bothrops jararaca</i>	44
3.7.1 Eletroforese em gel gradiente de SDS-poliacrilamida (1-DE)	44
3.8 Identificação das proteínas das glândulas de veneno e acessória	45
3.8.1 Digestão das proteínas em gel	45
3.8.2 Análise por espectrometria de massa	46
3.8.3 Ionização e dessorção a laser assistida por matriz em tempo de voo/tempo de voo (MALDI-TOF/TOF)	46
3.8.4 Nanocromatografia acoplada ao espectrômetro de massas de alta resolução nanoeletrospray (nanoESI-LTQ/Orbitrap XL)	47
3.8.5 Análise dos dados pelo software PEAKS	48
3.9 Western blotting	48
3.10 Análise estatística	49
4 RESULTADOS	50

4.1 Síntese proteica em glândulas de veneno durante o ciclo de produção de veneno....	51
<i>4.1.1 Identificação das proteínas da glândula de veneno durante o ciclo de produção de veneno.....</i>	<i>52</i>
4.2 Confirmação das proteínas identificadas cujas sínteses foram reguladas durante o ciclo de produção de veneno	61
4.3 Síntese proteica em glândulas de veneno reguladas pela inervação noradrenérgica	63
<i>4.3.1 Identificação das proteínas da glândula de veneno dos quais as sínteses são reguladas pela inervação noradrenérgica</i>	<i>66</i>
4.4 Perfil eletroforético da glândula acessória durante o ciclo de produção de secreção	72
4.5 Identificação das proteínas da glândula de acessória	75
5 DISCUSSÃO	80
5.1 Síntese de proteínas no ciclo de produção de veneno.....	81
5.2 Participação da inervação noradrenérgica regulando a síntese de proteínas na glândula de veneno.....	87
5.3 Síntese de proteínas da glândula acessória durante o ciclo de produção de veneno.	91
5.4 Considerações finais.....	93
6 CONCLUSÕES	95
REFERÊNCIAS	98
APÊNDICE A- Proteínas identificadas dos <i>spots</i> específicos de gel 2-DE das glândulas de veneno da serpente <i>Bothrops jararaca</i> no estágio quiescente.....	112
APÊNDICE B - Proteínas identificadas dos <i>spots</i> específicos do gel 2-DE das glândulas de veneno da serpente <i>Bothrops jararaca</i> no estágio ativado 4 dias após a extração de veneno.	121
APÊNDICE C - Proteínas identificadas de <i>spots</i> específicos de gel 2-DE das glândulas de veneno da serpente <i>Bothrops jararaca</i> no estado ativado 7 dias após a extração de veneno.	130
APÊNDICE D - Proteínas identificadas de <i>spots</i> específicos de gel 2-DE das glândulas de veneno da serpente <i>Bothrops jararaca</i> tratadas com reserpina durante 4 dias.	138
APÊNDICE E - Proteínas identificadas de <i>spots</i> específicos de gel 2-DE das glândulas de veneno da serpente <i>Bothrops jararaca</i> tratadas com reserpina, fenilefrina e isoprenalina durante 4 dias.	149
APÊNDICE F - Proteínas da glândula acessória da serpente <i>Bothrops jararaca</i> que não sofreu extração de veneno identificadas através do nanoESI-LTQ/Orbitrap XL.....	157
APÊNDICE G - Proteínas da glândula acessória da serpente <i>Bothrops jararaca</i> 4 dias após a extração de veneno identificadas através do nanoESI-LTQ/Orbitrap XL.	162
APÊNDICE H - Proteínas da glândula acessória da serpente <i>Bothrops jararaca</i> 7 dias após a extração de veneno através do nanoESI-LTQ/Orbitrap XL.	167

1 INTRODUÇÃO

1.1 Serpentes

As serpentes são animais vertebrados que pertencem à classe dos répteis e a ordem Squamata. As serpentes estão organizadas em dois grupos principais: Scolecophidia (Cobras-cegas) com aproximadamente 370 espécies e Alethinophidia ou serpentes típicas com aproximadamente 2700 espécies (VIDAL; HEDGES, 2009).

As serpentes do grupo Scolecophidia são pequenas e não têm veneno. Já o grupo Alethinophidia tem uma maior diversidade, compreende as boas, pythons e caenophidians. Todas as serpentes venenosas são encontradas no grupo Caenophidea (VIDAL; HEDGES, 2009), que incluem a superfamília Acrochordoidea de serpentes aquáticas e a superfamília Colubroidea de serpentes avançadas, sendo a mais diversificada e é composta por quatro famílias: Colubridae, Atractaspididae, Elapidae e Viperidae.

A família Viperidae, tradicionalmente, é atribuída três subfamílias: Viperinae, Azemiopinae e Crotalinae. Os representantes da subfamília Crotalinae apresentam uma característica própria e exclusiva, a fosseta loreal. A fosseta loreal é um órgão termorregulador localizado ligeiramente abaixo da linha que separa o olho da narina, um de cada lado da cabeça. Este órgão é revestido por epitélio termo sensível que capta delicadas variações de temperatura do ambiente, permitindo a serpente formar imagem infravermelha, juntamente com a luminosa (FRANCO, 2003).

A subfamília Crotalinae possui 21 gêneros e 172 espécies, dos quais 4 gêneros e 23 espécies ocorrem no Brasil. As serpentes peçonhentas no Brasil são consideradas de importância médica e encontram-se classificadas nos gêneros *Bothrops* (Wagler 1824), *Crotalus* (Linnaeus 1758), *Lachesis* (Daudin 1803) e *Micrurus* (Wagler 1824) (ARAÚJO et al., 2003; BRASIL, 1998). O gênero *Bothrops* representa o grupo mais importante de serpentes peçonhentas, com mais de 60 espécies encontradas em todo território brasileiro (incluindo os gêneros *Bothriopsis* e *Bothrocophias*) (BRASIL, 2009).

Os gêneros *Bothrops*, *Bothriopsis* e *Bothrocophias* recentemente receberam nova classificação com base em evidências morfológicas e moleculares. Nessa nova classificação proposta por Fenwick et al. (2009) 11 espécies de serpentes anteriormente incluídas no gênero *Bothrops* foram alocadas em *Bothropoides*, porém para esse trabalho optamos por manter a nomenclatura tradicional e amplamente aceita entre a comunidade científica.

Em abril de 2009 os acidentes por animais peçonhentos foram incluídos na lista de Doenças Tropicais Negligenciadas da Organização Mundial da Saúde (OMS) por

representarem um problema de saúde pública em virtude de sua alta frequência e gravidade (ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS, 2010).

No Brasil, os envenenamentos ofídicos causados pelas serpentes do gênero *Bothrops* são os mais importantes devido à alta frequência de acidentes. As serpentes desse gênero são responsáveis por 72,6% dos acidentes ofídicos que ocorrem no Brasil (BRASIL, 2009).

1.2 *Bothrops jararaca*

A serpente *Bothrops jararaca* (WIED, 1984), pertence à família Viperidae, tem o nome popular de jararaca ou jararaca-preguiçosa (Figura 1).

Esta serpente apresenta uma coloração muito variável, desde tons castanhos claros até coloração quase completamente preta. Ela é ágil, tem grande capacidade adaptativa ocupando áreas silvestres, agrícolas, suburbanas e até urbanas. Trata-se da espécie mais comum da região sudeste, habitando desde o sul da Bahia até o Rio Grande do Sul (BRASIL, 2009; CAMPBELL; LAMAR, 2004; MELGAREJO, 2003). Esta espécie é ativa principalmente no período crepuscular e noturno, podendo apresentar alguma atividade diurna, em geral associada à termorregulação comportamental (MARQUES; SAZIMA, 2004; SAZIMA, 1988).

Figura 1 - Serpente adulta de *Bothrops jararaca* em atividade sobre o solo.

Fonte: Fotografada por Branco (2001)¹.

¹ BRANCO, Enio. 2001.

Uma das principais características da família Viperidae é a presença de um aparelho inoculador de veneno altamente especializado e eficiente para captura de presas. A dentição destas serpentes é do tipo solenoglifodonte, isto é, possuem um par de dentes maxilares extremamente grandes, pontiagudos com um canal interno onde o veneno é excretado. A dentição e a cinética craniana estão associadas a um mecanismo complexo que permite uma grande abertura bucal, facilitando assim o posicionamento do dente em relação à presa (GOMES; POURTO, 1993), (Figura 2).

Figura 2 - Crânio e mandíbula de serpente com dentição solenoglifodonte.

A: visão lateral do crânio com mandíbula fechada. **B:** Crânio e mandíbula em posição de abertura bucal máxima. **pe:** presa, **pt:** pterigoide, **q:** quadrado, **md:** mandíbula.
Fonte: Gomes e Puerto, 1993.

1.3 Aparelho glandular de veneno da serpente Viperidae

Entre as serpentes peçonhentas do Brasil, a mais bem estudada quanto à estrutura do aparelho glandular de veneno e a biossíntese da peçonha são as Viperidae. A serpente *Bothrops jararaca* possui um aparelho glandular de veneno altamente especializado composto por quatro regiões distintas: a glândula principal de veneno, a glândula acessória, o ducto

primário e o ducto secundário que se conecta com o canal do dente inocular de veneno (GOMES; PUORTO, 1993) (Figura 3).

Figura 3 - Aparelho glandular de veneno da serpente *Bothrops jararaca*.

M: músculo compressor da glândula; GP: glândula principal de veneno; DP: ducto primário; GA: glândula acessória; DS: ducto secundário.

Fonte: Fotografado por Hortêncio (2006)².

As glândulas de veneno de serpentes são glândulas exócrinas presentes na cavidade oral que evoluíram a partir de glândulas salivares de ancestrais não venenosos e a sua principal função é secretar veneno para facilitar a apreensão e digestão da presa (KARDONG, 1982; ZAGO, 1971).

A glândula principal de veneno provavelmente evoluiu a partir de estruturas salivares especializadas do lábio superior, como a glândula de Duvernoy, e o músculo compressor da glândula derivado da musculatura temporal anterior. O aparelho glandular de veneno está localizado na região temporal, um em cada lado da cabeça, logo atrás dos olhos e diretamente abaixo do músculo compressor. A glândula de veneno apresenta um formato triangular e alongado, com a parte mais alongada voltada para a região anterior da cabeça (MELGAREJO, 2003).

A glândula principal de veneno está envolvida por tecido conjuntivo e é formada por epitélio secretor tubular ramificado, onde se encontram pelo menos quatro tipos celulares: células epiteliais secretoras, a mais abundante na glândula (79%), células ricas em mitocôndrias (2%), células horizontais (10%) e células escuras (9%) (MACKESSY, 1991). Uma característica importante das glândulas de veneno de serpentes Viperidae é a estocagem

² HORTÊNCIO, Thiago M. A. São Paulo, 2006.

do produto de secreção no *lumen* principal, diferindo das glândulas de serpentes da família Elapidae e de mamíferos, nas quais o produto é estocado em vesículas secretoras intracitoplasmáticas (JAMIESON; PALADE, 1967a, b; KOCHVA, 1978).

Duas estruturas presentes no aparelho glandular de veneno pouco estudadas são as glândulas acessórias e o ducto primário e ainda há controvérsias se as secreções liberadas por estas regiões podem modificar o veneno formado. Sabe-se que a luz da glândula principal de veneno conecta-se ao ducto primário e este forma uma alça e passa no interior da glândula acessória (KOCHVA; GANS, 1966). A glândula acessória é uma estrutura oval que envolve o ducto primário comprimindo-o (KOCHVA, 1978).

Recentemente, um estudo morfológico da glândula acessória da *Bothrops jararaca* mostrou que esta glândula possui um epitélio secretor simples com seis tipos celulares na região anterior: dois tipos de células secretoras, células ricas em mitocôndria que não possuem secreção, células horizontais, células basais e células escuras e um epitélio simples com somente dois tipos celulares na região posterior: células seromucosas e células horizontais. Este estudo também mostrou que as células secretoras da glândula acessória possuem uma exocitose tardia, 4 dias após a extração de veneno e assim como a glândula principal de veneno, possui um longo ciclo de produção e secreção. Devido à secreção tardia, foi sugerido que a secreção da glândula acessória não participa da formação do veneno total da serpente *Bothrops jararaca* (SAKAI; CARNEIRO; YAMANOUYE, 2012).

O ducto primário da serpente *Bothrops jararaca* apresenta um epitélio pseudo-estratificado com células secretoras colunares apresentando vesículas com diferentes eletrodensidades, células ricas em mitocôndrias, células escuras, células basais e células horizontais. A análise morfológica mostrou que o ducto primário também possui um longo ciclo de produção e secreção e que esta secreção liberada pode participar do veneno total e pode ser que esta secreção seja o motivo das controvérsias existentes na literatura (SAKAI, 2011).

1.4 Glândulas Salivares

Relacionadas com as glândulas de veneno, as glândulas salivares são glândulas exócrinas que estão localizadas na cavidade oral e tem como principal função a síntese e secreção de saliva. Os três pares de glândulas salivares maiores em mamíferos que incluem a glândula submandibular, parótida e sublingual são responsáveis por 90% da saliva total. A saliva é composta por fluídos, eletrólitos, proteínas e mucinas (PROCTOR; CARPENTER,

2007). A secreção da saliva é estimulada por vários fatores como a presença de alimentos na boca ou estímulos olfativos. Estas mensagens são transmitidas às glândulas salivares via sistema nervoso autônomo. As glândulas salivares recebem inervações simpáticas e parassimpáticas que estão diretamente envolvidas na secreção glandular. Ambos os impulsos simpáticos e parassimpáticos agem nas células secretoras simultaneamente. O estímulo via parassimpático provoca secreção de saliva abundante, muito aquosa, com pouca matéria orgânica, enquanto o estímulo via simpático promove a secreção de saliva mais viscosa rica em moléculas orgânicas (SCHNEYER et al., 1972).

A estimulação simpática que age nas células, frequentemente não causa mobilização de fluidos e tende a modular a composição da saliva pelo aumento da exocitose das vesículas secretoras das células salivares e induz contração das células mioepiteliais, de modo que a contração dessas células leva à liberação da saliva (GARRETT; THULIN, 1975; GARRET et al., 1987; PROCTOR; CARPENTER, 2007).

Os principais fatores regulatórios que demonstraram ter um papel na regulação das secreções das glândulas salivares são os neurotransmissores liberados por inervação simpática e parassimpática. Esses neurotransmissores são os primeiros mensageiros envolvidos na regulação celular da exocitose. Entre os neurotransmissores que ativam as células secretoras salivares, os principais são a acetilcolina, secretada pelos nervos parassimpáticos e a noradrenalina, secretada pelos nervos simpáticos, além de vários neuropeptídeos (BAUM, 1987; EKSTROM, 1987; EKSTROM et al., 1988; WRIGTH; LUEBKE, 1989).

A noradrenalina liberada pela estimulação simpática estimula a secreção das proteínas salivares através da sua interação com receptores adrenérgicos.

Os receptores adrenérgicos são membros da superfamília de receptores acoplados a proteína G e são classificados em adrenoceptores α e adrenoceptores β . Posteriormente através de evidências farmacológicas e moleculares mostrou-se que havia outras classes de receptores denominadas de adrenoceptores α_1 , α_2 e β , no qual foram subdivididos em três subtipos ($\alpha_{1A, 1B, 1C}$, $\alpha_{2A, 2B, 2C}$, $\beta_{1, 2 \text{ e } 3}$) (BYLUND, 1988; BYLUND et al., 1994).

Todos os três subtipos de adrenoceptores α_1 estão acoplados à proteína Gq/11, que está envolvida na ativação da enzima fosfolipase C, que participa da formação de segundos mensageiros. A fosfolipase C ativada hidrolisa o bifosfato de fosfatidilinositol (PIP₂) presente na membrana em trifosfato de inositol (IP₃) e diacilglicerol (DAG) (GRAHAM et al., 1996; VARMA; DENG, 2000). O segundo mensageiro hidrossolúvel, IP₃, migra pelo

citosol e se liga a receptores específicos de IP_3 no retículo endoplasmático e mitocôndrias, promovendo a liberação do íon Ca^{+2} no citosol. O DAG fica associado à membrana plasmática, tem a função de ativar a proteína cinase C (PKC) (XIAO et al., 2006).

O adrenoceptor β está acoplado à proteína Gs, que quando ativada estimula a via de sinalização clássica, envolvendo a ativação de adenilil ciclase, resultando no aumento da concentração de monofosfato de adenosina cíclica (AMPc). O aumento na concentração de AMPc intracelular culmina na ativação da proteína cinase dependente de AMPc (PKA). A ligação do AMPc induz mudanças conformacionais que resultam na ativação da PKA, responsável pela fosforilação de proteínas efetoras (XIAO et al., 2006). O adrenoceptor α_2 está acoplado a proteína G_i , que inibe a atividade da enzima adenilil ciclase, regulando diversas respostas celulares.

Nas glândulas salivares os adrenoceptores do tipo α_1 e β_1 , promove uma secreção viscosa rica em mucinas (BAUM, 1993; BAUM; WELLNER, 1999; PELUSO et al., 2007; QUISSEL; BARZEN, 1980). A clássica via de sinalização acoplada ao adrenoceptor α_1 que regula a secreção de fluidos, eletrólitos, amilase e mucinas envolve a formação do 1,4,5-trifosfato de inositol, que aumenta liberação de cálcio intracelular, modulando a exocitose de proteínas e mucinas (KLEIN, 2002; QUISSELL et al., 1992; QUISSELL; BARZEN; DEISHER, 1993).

A ativação do adrenoceptor β tem uma participação importante na expressão e secreção de proteínas e no desenvolvimento pós-natal em glândulas salivares (BARKA, 1990; YEH et al., 2005). Ativação dos adrenoceptores β também leva à produção de AMPc e à ativação de proteínas cinases dependentes de AMPc, ativando várias cascatas de sinalização tais como as MAPKs (QUISSELL et al., 1992; YEH et al., 2012). Os subtipos β_1 e β_2 são expressos na glândula submandibular de coelhos, sendo que o subtipo β_1 é predominante e participa da regulação da secreção de saliva, especialmente na síntese e secreção de proteínas (BAUM; WELLNER, 1999; LI et al., 2006). Em glândulas parótidas de ratos o subtipo β_1 é predominante e provavelmente é o responsável por iniciar a cascata de sinalização que leva à proliferação celular, já o subtipo β_2 parece ser essencial em fases posteriores no desenvolvimento e proliferação das glândulas salivares (YEH et al., 2012).

1.5 Mecanismos de produção de veneno pela glândula principal de veneno

A produção de veneno inicia-se após a redução do conteúdo estocado no *lumen* da glândula, seja após uma picada ou a extração manual de veneno. O início do ciclo de produção de veneno é marcado por mudanças morfológicas e bioquímicas nas células secretoras. As glândulas de veneno no estado quiescente, que não sofreram extração de veneno por um longo período, de um a dois meses, estão repletas de veneno. No estado quiescente, as células secretoras, responsáveis pela produção e secreção de veneno, estão na forma cuboide, as cisternas do Retículo Endoplasmático Rugoso (RER) estão estreitas e paralelas e o aparelho de Golgi está quiescente. Após a extração de veneno, a quantidade de veneno no *lumen* diminui e as células secretoras passam para a forma colunar, as cisternas do REG se expandem e o veneno é sintetizado (BDOLAH, 1979; BEN-SHAUL; LIFSHITZ; KOCHVA, 1971; CARNEIRO et al., 1991; DE LUCCA et al., 1974; KOCHVA, 1971; KOCHVA, 1978; MACKESSY, 1991; ORON; BDOLAH, 1973; ROTENBERG; BAMBERGER; SALOMÃO, 1991; SCHAEFFER et al., 1972a, b; ZAGO, 1971). O pico máximo da atividade sintética ocorre aproximadamente quatro dias após a extração do veneno, neste momento as células secretoras alcançam a altura máxima (CARNEIRO et al., 1991; DE LUCCA et al., 1974; KOCHVA, 1987; KOCHVA, 1978) (Figura 4). Apesar das glândulas de veneno estarem ativadas nesse estágio do ciclo, poucas vesículas são encontradas nas células secretoras, pois todo material sintetizado é exocitado e estocado no *lumen* glandular. Após este período, as células secretoras diminuem de tamanho e gradualmente a célula assume a organização do estado quiescente (BEN-SHAUL; LIFSHITZ; KOCHVA, 1971; ORON; BDOLAH, 1973). O ciclo completo de produção de veneno dura de 30 a 50 dias, sendo significativamente mais longo quando comparado ao ciclo de produção de proteínas em glândulas exócrinas de mamíferos (AMSTERDAM; OHAD; SHRAMM, 1969; JAMIESON; PALADE, 1967a, b).

Figura 4 - Representação esquemática das mudanças morfológicas das células secretoras da glândula de veneno da serpente *Vipera palestinae* durante o ciclo de produção de veneno.

Retículo endoplasmático rugoso (RER).

Fonte: Adaptado de Ben-Shaul, Lifshitz e Kochva, 1971.

O perfil de atividade sintética tem sido baseada na análise da síntese de RNAm ou de proteínas. Por exemplo, Rotenberg, Bamberger e Kochva (1971) mostraram através da incorporação ^{32}P no RNA total de glândulas de veneno de *Vipera palestinae* que a extração de veneno ativa o epitélio secretor da glândula de veneno e resulta em uma alta taxa de síntese de RNA entre o primeiro e quarto dia após a extração de veneno. Já em relação ao acúmulo de proteínas Oron e Bdolah (1978) mostraram que no primeiro dia após a extração de veneno, a maior parte das proteínas sintetizadas são provavelmente proteínas estruturais e quando as células atingem a capacidade sintética máxima a maioria das proteínas sintetizadas é do veneno.

A regulação ou controle da síntese das proteínas do veneno parece envolver um componente físico, através de variações na pressão intraluminal sobre as células epiteliais da glândula, a qual varia de acordo com o volume de veneno presente no *lumen* (KOCHVA, 1978), bem como um componente neuronal envolvendo a inervação simpática através da

estimulação de receptores α - e β -adrenérgicos (KERCHOVE et al., 2004; KERCHOVE et al., 2008; YAMANOUYE et al., 1997; YAMANOUYE et al., 2000; ZABLITH, 2007).

Os mecanismos envolvidos na regulação da síntese e secreção de toxinas pela glândula de veneno são pouco conhecidos. No entanto, nesta última década, o grupo de pesquisa coordenado por Yamanouye tem mostrado a importância da inervação noradrenérgica na produção e secreção de veneno em serpentes *Bothrops jararaca*.

Para desvendar esse papel da inervação noradrenérgica a utilização de ferramentas farmacológicas como a reserpina tem sido amplamente utilizada. A reserpina é uma droga simpatolítica, que bloqueia o transporte de noradrenalina para as vesículas sinápticas através de sua ligação à proteína transportadora (MARTINEZ-OLIVARES et al., 2006). A noradrenalina vai ser acumulada no citoplasma, onde é degradada pela enzima monoamina oxidase (MAO). Portanto, o nível de noradrenalina cai nos tecidos e ocorre o bloqueio da transmissão simpática.

Em glândulas de veneno, foi possível observar o bloqueio da atividade noradrenérgica, uma vez que reserpina foi capaz de paralisar a produção e secreção de veneno em glândulas ativadas por meio da extração de veneno e ambos os adrenoreceptores α e β , participam deste processo. A administração crônica de fenilefrina (agonista do adrenoreceptor α) e isoprenalina (agonistas de adrenoreceptor β) foram capazes de reverter à ação de reserpina, restaurando a síntese proteica do veneno, mas apenas a fenilefrina foi capaz de restaurar o processo de secreção das proteínas do veneno (YAMANOUYE et al., 1997).

Os adrenoreceptores β estão acoplados à proteína Gs, visto que sua estimulação leva a um aumento na concentração de AMPc. Além disso, a estimulação dos adrenoreceptores β ativa o influxo de cálcio via canais ativado por voltagem (VOC) e ativado por receptores (ROC), além de mobilizar cálcio de estoques sensíveis a tapsgargina (ZABLITH, 2007). Vale ressaltar que o aumento de AMPc após estimulação dos adrenoreceptores β só ocorre em células no estado quiescente (glândulas que não sofreram extração de veneno) e não no seu estágio máximo de ativação (4 dias após a extração de veneno) e o aumento da concentração citosólica de cálcio é significativamente maior em células quiescentes (YAMANOUYE et al., 2000; ZABLITH, 2007).

Os adrenoreceptores α são do subtipo α_{1D} e estão acoplado à proteína Gq, visto que sua estimulação ativa a fosfolipase C (PLC) levando à hidrólise do PIP₂, com a consequente produção do IP₃ e DAG, promovendo a liberação de cálcio dos estoques intracelulares sensíveis a tapsgargina e ativação de PKC, respectivamente. Além disso, esses receptores

ativam a cascata da cinase ativada por mitógenos ERK1/2, sendo que a etapa inicial dessa ativação é via PKC (KERCHOVE, 2004; KERCHOVE et al., 2008). Esses receptores quando estimulados são prontamente dessensibilizados, sendo essa dessensibilização de longa duração (30 dias) (KERCHOVE et al., 2004).

A descoberta de que adrenoceptores α_1 e β sofrem dessensibilização por um longo período, logo após a sua ativação, mostrou *in vivo*, a importância da estimulação desses adrenoceptores para o desencadeamento do ciclo de produção de veneno (KERCHOVE et al., 2004; YAMANOUYE et al., 2000; ZABLITH, 2007).

Posteriormente, estudos sobre a sinalização intracelular desencadeada pela estimulação dos adrenoceptores permitiu concluir que a noradrenalina é importante para a ativação da glândula de veneno (KERCHOVE et al., 2008; LUNA et al., 2009). A ativação desses receptores leva a ativação de fatores de transcrição tais como NF κ B e AP-1 que regulam a síntese de proteínas da glândula de veneno, essenciais para a ativação da mesma. Este estudo mostrou ainda que a extração de veneno promove mudanças no perfil proteico da glândula de veneno, sendo que as diferenças mais significativas foram 4 e 7 dias após a extração de veneno em serpentes fêmeas e machos, respectivamente. O tratamento com reserpina bloqueou essas mudanças e a administração concomitante de agonistas de adrenoceptores α e β restaurou o efeito de reserpina, levando a ativação da glândula de veneno e consequentemente a produção de veneno (LUNA et al., 2009). As glândulas de veneno das serpentes Viperidae são glândulas orais exócrinas, assim como as glândulas salivares, e são capazes de secretar proteínas tóxicas (KOCHVA; GANS, 1970). Essas glândulas de veneno têm a característica de possuir um *lumen* central onde o veneno produzido é armazenado e um longo ciclo de produção de veneno que leva de 30 a 50 dias para se completar, estas fases incluem um estágio de ativação após a perda do veneno do *lumen* e um estágio quiescente quando o *lumen* está cheio de veneno (KOCHVA; GANS, 1970; KOCHVA, 1987; MACKESSY, 1991; WARSHAWSKY et al., 1973; YAMANOUYE et al., 2000), diferentemente das glândulas salivares que estão constantemente ativadas.

A importância da inervação parassimpática para produção de saliva é claramente demonstrada na xerostomia (falta de saliva) que pode ocorrer em resposta a várias condições, incluindo reações adversas a medicamentos, estresse e radioterapia (BROSKY, 2007; DANIELS; WU, 2000), ou ainda em patologias que causam disfunções das glândulas salivares como a síndrome de Sjögren que leva à deterioração da membrana mucosa da boca e garganta (VON BÜLTZINGSLÖWEN et al., 2007). Agonistas de colinoceptores, como a

pilocarpina, têm sido utilizados no intuito de promover um aumento no fluxo de saliva e assim, melhorar os sintomas da xerostomia (BROSKY, 2007). Análise proteômica da saliva mostrou que a pilocarpina restaurou parcialmente a densidade e número de proteínas identificáveis na saliva de pacientes com Síndrome de Sjögren (PELUSO et al., 2007). Porém, não existem trabalhos mostrando a importância da estimulação simpática na melhoria dos sintomas da xerostomia.

As glândulas salivares, ao contrário das glândulas de veneno de serpentes Viperidae, estão constantemente ativadas dificultando o estudo dos mecanismos fisiológicos envolvidos na síntese e secreção desta glândula, contudo a glândula principal de veneno torna-se um bom modelo de estudo, uma vez que ela pode assumir dois estados de ativação: estado quiescente e estado ativado possibilitando assim estudar estes mecanismos passo a passo para um melhor entendimento sobre as patologias que afetam as glândulas salivares.

1.6 Ferramentas “ômicas”

Com o progresso da biologia molecular, está ocorrendo um grande interesse por métodos de análise em alta escala (OMICAS), no qual geram quantidades exorbitantes de dados que permitem identificar grandes redes regulatórias. No entanto, um sistema não é apenas um conjunto de genes e proteínas e suas propriedades não podem ser completamente compreendidas apenas desenhando um diagrama com suas interconexões, apesar deste diagrama ser um bom começo para se entender o funcionamento do sistema. Para estudar um sistema é necessário conhecer como suas partes, genes e proteínas se relacionam de um modo dinâmico durante uma determinada situação estudada, como cada parte se comporta nessa determinada situação e como a resposta de cada parte interfere na outra parte, assim ao final espera-se ter um diagrama dinâmico que explique como o sistema se comporta (KITANO, 2002).

O sequenciamento genômico e o consequente conhecimento da sequência completa de todos os genes são contribuições importantíssimas para se estudar melhor os organismos vivos. Porém, estas informações não são suficientes para saber quais proteínas estão sendo realmente expressas na célula, num dado momento, numa determinada condição.

Na era pós-genômica, tem ficado evidente que além das informações obtidas pela análise do genoma, é preciso ter conhecimento, por exemplo, sobre quais proteínas estão realmente sendo expressas, quando e em quais níveis esta expressão ocorre e sobre as

eventuais modificações pós-traducionais. O fato de as células de um mesmo organismo ter o mesmo genoma, mas apresentarem as mais variadas funções e morfologias, produto de diferentes composições de proteínas expressas, ilustra a importância de estudar não só a sequência dos genes, mas também a sua expressão para podermos compreender a suas funções biológicas (PANDEY; MANN, 2002). Desta forma, a proteômica, que é análise do conjunto de proteínas expressas em uma determinada célula ou tecido, num determinado momento, a partir do genoma, tornou-se uma ferramenta importante para conhecer o funcionamento celular.

A análise do proteoma é significativamente mais complicada do que o sequenciamento genômico. Estudos envolvendo proteoma incluem extração de proteínas, separação, quantificação e por último a identificação por espectrometria de massas (MS) e análises por bioinformática. A espectrometria de massas baseada no proteoma tornou-se uma poderosa ferramenta para análises qualitativas (presença/ausência) e quantitativas (intensidade de *spots*) de um grande número de proteínas.

As informações sobre o proteoma de uma amostra podem derivar da análise de proteínas intactas (proteômica *top-down*) ou de seus peptídeos (proteômica *bottom-up*). Na proteômica *bottom-up*, as proteínas de uma mistura são digeridas, e os peptídeos resultantes são analisados por MS. As limitações dessa estratégia podem estar na cobertura incompleta da sequência das proteínas, na perda das modificações pós-traducionais e nas degradações como resultado da digestão proteolítica. Já a análise *top-down* permite deduzir a estrutura primária da proteína e a maior parte das modificações pós-traducionais (WU et al., 2012). No entanto, essa estratégia é limitada pela energia de colisão necessária na fragmentação da proteína que é insuficiente para proteínas maiores que 50 kDa, ficando restrita sua aplicação à análise de proteínas purificadas (NESATYY; SUTER, 2008).

Na análise *bottom-up* de misturas complexas, são utilizados géis de eletroforese bidimensional (2-DE) ou cromatografia líquida. Atualmente a técnica de gel 2-DE é capaz de resolver um grande número de misturas complexas de proteínas, combinando a focalização isoeletrica e a massa molecular relativa de cada proteína, melhorando a identificação e a caracterização de diferentes isoformas de proteínas. O gel 2-DE tem um excelente poder de resolução de proteínas intactas (~ 2000), embora seja um processo difícil para automatizar, trabalhoso e de baixa reprodutibilidade. No entanto, ainda é uma abordagem poderosa para diferenciar isoformas de proteínas e estados de modificações pós-traducionais, e deve continuar a servir bem neste papel (MOTOYAMA; YATES, 2008). A cromatografia líquida de fase reversa acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC/MS/MS) foi

desenvolvida para automação dos métodos de análise em larga escala e utiliza diferentes características das proteínas em colunas de propriedades distintas ou em uma única coluna bifásica. A fração eluída na primeira coluna é diretamente introduzida na segunda coluna, a qual pode ser diretamente acoplada ao espectrômetro de massas. Essa técnica, chamada de MudPIT (*Multidimensional Protein Identification Technology*), está inserida no contexto da proteômica *shotgun*, em que uma maior resolução dos proteomas é possível, facilitando a identificação das proteínas menos abundantes, frequentemente perdidas quando utilizados os géis (MOTOYAMA; YATES, 2008). A identificação de proteínas por meio da espectrometria de massas depende da digestão proteolítica que produz uma coleção de peptídeos que são ionizados por técnicas de ionização suave como ionização por eletro spray (ESI – Electrospray ionization) e a ionização/dessorção a laser assistida por matriz (MALDI – Matrix-assisted laser desorption ionization) (ROTILIO et al., 2012). Após a ionização, analisadores de massas detectam as relações massa/carga (m/z) e os espectros resultantes e relacionam a abundância dos fragmentos versus a relação m/z , os quais são então confrontados nos bancos de dados para a identificação das proteínas.

Os trabalhos publicados até o momento, utilizando a análise em larga escala das proteínas por meio da abordagem proteômica de serpentes do gênero *Bothrops*, tiveram como foco principal os constituintes do veneno (SERRANO et al., 2005; TASHIMA et al., 2012; VALENTE et al., 2009; ZELANIS et al., 2011). Entre os componentes frequentemente encontrados no proteoma de venenos das serpentes viperídeas neotropicais estão: metaloproteinases, disintegrinas, serinoproteinases, fosfolipases A2, lectinas tipo C-símile, peptídeos potenciadores de bradicinina, proteínas secretadas ricas em cisteínas (CRISP - *Cysteine rich secretory protein*), fatores de crescimento como svVEGF (*snake venom Vascular Endothelium Growth Factor*) e svNGF (*snake venom Nerve Growth Factor*).

A estratégia de sequenciamento de bibliotecas de cDNA no intuito de se obter uma visão global da expressão gênica e da diversidade de toxinas nas glândulas de veneno das diferentes espécies é de extrema importância na toxinologia. Em relação às serpentes do gênero *Bothrops* existem diversos trabalhos utilizando a metodologia de análise transcriptômica por meio de ESTs (*Expressed Sequence Tags*). Junqueira-de-Azevedo e Ho (2002) foram os primeiros pesquisadores a explorar a diversidade de transcritos de glândula de veneno da espécie *Bothrops insularis*. Desde então, diversas espécies já tiveram os transcriptomas de glândula de veneno revelados, inclusive da *Bothrops jararaca* (CIDADE et al., 2006).

Contudo, a despeito da funcionalidade da glândula principal de veneno pouco se conhece. Um estudo realizado recentemente analisou as modificações na expressão gênica durante o ciclo de produção e secreção de veneno da *Bothrops jararaca* e verificou que a expressão de transcritos celulares e de toxinas é semelhante ao longo dos 15 dias do ciclo de produção de veneno avaliado, sendo o pico máximo de expressão dos transcritos no segundo dia após o início do ciclo. Além disso, mostrou que o processo de transcrição de toxinas ocorre independente da ativação dos adrenoreceptores α e β e que a ativação dos adrenoreceptores parece ser necessária para formação das vesículas secretoras. No entanto, este estudo teve como base a comparação com a biblioteca de cDNA de glândula de veneno coletada 4 dias após a extração de veneno (BASTOS, 2011).

Características importantes das proteínas contidas na glândula de veneno, no entanto, permanecem desconhecidas. Desta forma, a análise proteômica dos mecanismos celulares envolvidos no desencadeamento da síntese e secreção de veneno pelo aparelho da glandular de veneno da serpente *Bothrops jararaca* é importante para o conhecimento da funcionalidade desta glândula, bem como dar subsídios para um melhor entendimento sobre as patologias que afetam as glândulas salivares.

2OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi identificar as proteínas que são potencialmente importante para ativação da glândula principal de veneno e da glândula acessória da serpente *Bothrops jararaca* durante o ciclo de produção de veneno e as proteínas da glândula principal de veneno na qual a síntese é regulada pela inervação noradrenérgica. Para tanto, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

- Analisar as proteínas das glândulas principal de veneno de serpentes fêmeas nos estágios quiescente e ativados 4 e 7 dias após a extração de veneno, através da técnica de eletroforese 2-DE;
- Analisar as proteínas que participam da ativação da glândula principal de veneno, cujas sínteses são reguladas pela estimulação dos adrenocetores α e β , através da técnica de eletroforese 2-DE;
- Analisar o perfil proteico das glândulas acessórias de serpentes fêmeas que não sofreram extração de veneno e 4 e 7 dias após a extração de veneno e, através do gel de gradiente unidimensional;
- Identificar por espectrometria de massas as proteínas exclusivas da glândula principal de veneno nos diferentes estágios do ciclo de produção de veneno, bem como as proteínas nas quais as sínteses foram reguladas pela estimulação dos adrenocetores α e β .
- Identificar por espectrometria de massas as proteínas da glândula acessória que estão presentes nos diferentes estágios analisados.
- Relacionar os grupos de proteínas identificadas com uma função conhecida e discutir sua participação na ativação da glândula de veneno.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os ensaios realizados que envolveram as serpentes, inclusive as extrações de veneno, tiveram autorização prévia da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB, 555/2008), da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (nº 138, nas fls. 74 do livro 2) e do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA - processo nº 02001.005106/2008, Licença 01/2009).

3.1 Animais

As serpentes *Bothrops jararaca* fêmeas (WIED, 1824), de 100-400 g, foram fornecidas e classificadas pelo Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan. Essas serpentes foram tratadas segundo Breno et al. (1990) e mantidas em salas com condições ambientais controladas: fotoperíodo de 12 horas, temperatura entre 21 °C e 27 °C e umidade relativa de aproximadamente 65%.

3.2 Glândulas de veneno e glândulas acessórias

As serpentes foram previamente anestesiadas com pentobarbital sódico (30 mg/kg, s.c.), decapitadas e em seguida as glândulas de veneno e as glândulas acessórias foram coletadas e dissecadas como demonstrado na Figura 5. Após a retirada das glândulas, estas foram pressionadas com o auxílio de uma pinça, para completa remoção do veneno do *lumen*. Utilizamos as glândulas de veneno e acessórias de serpentes fêmeas que não sofreram extração de veneno (glândulas quiescentes) e de serpentes que sofreram extração de veneno 4 e 7 dias antes do sacrifício (glândulas estimuladas) ou ainda de serpentes tratadas com reserpina (20 mg/kg, s.c. 24 horas antes da extração de veneno, seguido por injeções diárias de 5 mg/kg, s.c. durante 4 dias). Algumas serpentes tratadas com reserpina receberam ainda uma dose única de isoprenalina e fenilefrina (100 mg/kg, s.c.), logo após a extração de veneno. A extração manual do veneno foi realizada de acordo com Belluomini (1968).

Figura 5 - Remoção das glândulas de veneno e acessória da serpente *Bothrops jararaca*.

a. Glândula de veneno localizada na região temporal da cabeça; **b.** Dissecção do músculo compressor da glândula (**M**) e visualização da glândula principal de veneno (**GP**), **c.** Vista do ducto primário (**DP**) e da glândula acessória (**GA**), **d.** Dissecção completa do aparelho glandular de veneno.

Fonte: Fotografado por Hortêncio (2006)³.

3.3 Delineamento experimental

Neste projeto utilizamos uma abordagem proteômica com intuito de identificar as proteínas cujas sínteses foram reguladas durante o ciclo de produção de veneno da glândula principal de veneno e da glândula acessória e ainda proteínas cujas sínteses foram reguladas pela inervação noradrenérgica da glândula principal de veneno. A Figura 6 ilustra de forma geral o delineamento experimental utilizado neste projeto.

³ HORTÊNCIO, Thiago M. São Paulo, 2006.

Figura 6 - Delineamento experimental deste projeto para identificar, na serpente *Bothrops jararaca*, as proteínas da glândula principal de veneno e da glândula acessória reguladas durante o ciclo de produção de veneno e ainda as proteínas da glândula principal de veneno regulada pela inervação noradrenérgica.

3.4 Extrato proteico

As glândulas de veneno e acessórias coletadas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e em seguida maceradas no homogeneizador de inox com nitrogênio líquido. As glândulas maceradas foram incubadas em tampão de lise (Tris-HCl 30 mM, pH 8,5, Uréia 7 M, Tiuréia 2 M, Chaps 4%) durante 60 minutos e em seguida centrifugadas à 12.000 g, 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante obtido foi removido e congelado a -80 °C para posterior análise.

3.5 Quantificação de proteínas

A concentração de proteínas dos extratos de glândulas de veneno e glândulas acessórias foi determinada pelo método de BRADFORD (1976), utilizando albumina bovina como padrão e reagente Bio-Rad assay protein (Bio-Rad, Hercules, C.A., USA). A absorbância foi lida em 620 nm, no fotômetro Multiskan EX (Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA).

3.6 Análise proteômica da glândula de veneno de *Bothrops jararaca*

A abordagem proteômica que nós optamos neste projeto para as glândulas de veneno foi à eletroforese bidimensional que é composta basicamente por duas etapas: a primeira dimensão, focalização isoeletrica e a segunda dimensão, eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS). As eletroforeses bidimensionais foram realizadas em triplicatas técnicas, sendo que para cada grupo experimental foram realizadas três réplicas biológicas, ou seja, N=3. Anteriormente à focalização isoeletrica, os extratos das glândulas de veneno (750 µg) foram precipitados com acetona na proporção 1:3 (1 volume de amostra para 3 volumes de acetona) e incubados a -20 °C durante 3 horas. Após a incubação os extratos foram centrifugados a 14.000 g por 10 minutos e o sobrenadante descartado (JIANG; HE; FOUNTOLAKIS, 2004).

3.6.1 Reidratação das fitas

O precipitado resultante da dessalinização e concentração com acetona foi solubilizado em 340 µL de solução de reidratação (Destreak, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) contendo 0,5% de tampão de gradiente de pH imobilizado (IPG) de pH 3-10 (GE Healthcare). Para reidratação foram utilizadas fitas de IPG de 18 cm e pH imobilizado variando de 3 a 10. As amostras foram aplicadas em aparato para reidratação e as fitas posicionadas sobre as amostras e deixadas em repouso *overnight* em temperatura ambiente.

3.6.2 Focalização isoeletrica (1ª dimensão)

Após a reidratação das fitas foi realizado a focalização isoeletrica a 20 °C, no sistema Ettan IPGphor II (GE Healthcare). As fitas foram submetidas inicialmente a 100 V por 15 horas para remoção de sais e impurezas e em seguida iniciado o protocolo de focalização isoeletrica descrita pelo fabricante e especificado na Tabela 1. Ao final da focalização isoeletrica foram acumulados 25.500 Vh.

Tabela 1 - Protocolo de focalização isoeletrica utilizado para fitas de 18 cm.

Etapas	Voltagem (V)	Volt-hora (kVh)
1ª Fase	100	1500 em 15 h
2ª Fase	500	500
3ª Fase Gradiente	1000	800
4ª Fase Gradiente	10000	16500
5ª Fase	10000	6200

3.6.3 Equilíbrio das fitas

Após a focalização, as fitas foram reduzidas com solução de equilíbrio (Tris-HCl 75 mM pH 8,8, uréia 6 M, SDS 2%, glicerol 29,3%, azul de bromofenol 0,002%) contendo ditioneitol (DTT) 1%, durante 15 minutos à temperatura ambiente, e em seguida alquiladas com solução de equilíbrio contendo iodoacetamida 2,5% durante 15 minutos à temperatura ambiente, sob agitação constante.

3.6.4 Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (2ª dimensão)

A eletroforese em gel de poliactilamida 12,5% na presença de SDS foi realizada de acordo com o método descrito por Laemmli (1970), utilizando o sistema vertical Ettan DALTsix (GE Healthcare). As fitas foram posicionadas sobre o gel e cobertas com solução selante (agarose 0,5% e azul de bromofenol 0,002% em tampão de corrida [Tris base 250 mM, glicina 192 mM, SDS 1%]) para fixação da fita e visualização da corrida. O padrão de peso molecular utilizado foi Kaleidoscope Prestained Standarts (Bio-Rad). As proteínas foram coradas com Coomassie Azul Brilhante G (CBB-G) durante 4 dias.

3.6.5 *Análise das imagens*

As imagens dos géis foram digitalizadas utilizando o digitalizador ImageScanner III (GE Healthcare) com resolução de 300 pontos por polegada (pdi) e analisadas através do software Image Master-2D Platinum versão 7.0 (GE Healthcare). Os *spots* foram automaticamente detectados e manualmente editados quando necessário para remover os precipitados do corante. Somente os *spots* diferencialmente expressos em cada grupo, presentes em todos os géis de cada grupo experimental e que apresentavam $p < 0,05$ foram considerados na análise.

3.7 *Análise proteômica da glândula acessória de Bothrops jararaca*

A abordagem proteômica que optamos para as glândulas acessórias foi a eletroforese em gel gradiente unidimensional, pelo fato destas glândulas terem um tamanho pequeno (3.3 ± 0.1 mm, N=4) e obtermos uma baixa quantidade de proteínas (150 µg/mg de tecido), impossibilitando a realização dos ensaios em gel 2-DE e em triplicatas.

3.7.1 *Eletroforese em gel gradiente de SDS-poliacrilamida (1-DE)*

As proteínas dos extratos totais das glândulas acessórias (30 µg de proteína) foram desnaturadas e completamente dissociadas em tampão de amostra (SDS 4%, glicerol 20%, β-mercaptoetanol 10%, tris pH 6.8, 50 mM, azul de bromofenol 0,05%) em condições redutoras, em banho-maria fervente durante 5 minutos e foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida, gradiente de 4% a 20%, na presença de SDS, segundo o método descrito por Laemmli (1970), utilizando o sistema de gel de eletroforese vertical Mini-PROTEAN Tetra cell (Bio-Rad). As proteínas foram coradas com CBB-G. A densidade de cada banda obtida na eletroforese foi quantificada através do software Quantity One (Bio-Rad). Nesta abordagem, optamos por identificar todas as bandas do perfil proteico, para isso, as colunas de cada grupo experimental foram divididas em 15 bandas.

3.8 Identificação das proteínas das glândulas de veneno e acessória

3.8.1 Digestão das proteínas em gel

Os *spots* das proteínas de interesse presentes no gel bidimensional e as bandas presentes no gel em gradiente foram recortados com uma lâmina de bisturi e transferidos para um tubo de cônico, previamente lavado com metanol, água e metanol. Todos os tubos cônicos utilizados foram previamente lavados e todas as soluções utilizadas foram preparadas no momento do uso.

Para descoloração dos pedaços de géis com Coomassie Blue G, estes foram incubados com 400 µL da solução descorante (acetonitrila 50% e bicarbonato de amônio 25 mM, pH 8.0) sob agitação durante 15 minutos e a solução descartada. O procedimento foi repetido duas vezes e deixado *overnight* para completa remoção do corante e detergente.

Os pedaços de gel foram cortados em tamanho menor e desidratados em 200 µL de acetonitrila 100% durante 10 minutos. O procedimento foi repetido até que o gel ficasse opaco. Em seguida, a solução de acetonitrila foi removida o gel foi seco no sistema de centrifugação a vácuo (SpeedVac concentrator, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany).

Somente para os pedaços de géis de glândulas acessórias (gel unidimensional) foram realizadas as etapas seguintes: os pedaços de géis foram incubados em 100 µL de solução redutora (DTT 65 mM em bicarbonato de amônio 100 mM) durante 30 minutos a 56 °C. Decorrido o tempo de reidratação com a solução redutora, a solução foi removida e os pedaços de géis foram incubados em 100 µL de solução alquilante (iodoacetamida 200 mM em bicarbonato de amônio 100 mM) durante 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, a solução alquilante foi removida e os pedaços de géis foram lavados com 200 µL de bicarbonato de amônio 100 mM. A solução de bicarbonato de amônio foi removida e os pedaços de gel foram desidratados com 200 µL de acetonitrila 100%. Em seguida, a acetonitrila foi removida e as etapas de lavagem e desidratação citadas anteriormente foram repetidas e os pedaços de gel foram secos no sistema de centrifugação a vácuo (SpeedVac concentrator, Thermo Fisher Scientific).

Após esta etapa ou a descoloração dos géis, todos os pedaços de géis (glândulas de veneno e acessórias) foram reidratados em 15 µL de solução de tripsina (20 ng/µL em tampão de bicarbonato amônio 40 mM, pH 8.0) e incubados a 4 °C durante 45 minutos. O excesso de tripsina foi removido e 20 µL de bicarbonato de amônio 40 mM, pH 8.0 foram adicionados e

incubados *overnight* a 37 °C. Logo em seguida, os pedaços de géis foram incubados a 56 °C durante 45 minutos.

Após a etapa de digestão, cada hidrolisado foi submetido à sonicação por 10 minutos, seguido por ciclos de vortex de 20 segundos e o sobrenadante transferido para tubos cônicos. Aos pedaços de géis foram adicionados 30 µL da solução de extração (acetonitrila 50% e ácido fórmico 5%) e incubados durante 15 minutos. O procedimento foi repetido duas vezes e todos sobrenadantes foram coletados e armazenados. No final, os extratos hidrolisados foram concentrados através de centrifugação a vácuo e armazenado a -20 °C para posterior análise no nanoESI-LTQ/Orbitrap XL (Thermo Fischer Scientific).

3.8.2 *Análise por espectrometria de massa*

As amostras obtidas foram inicialmente resuspendidas em 1,5 µL de solução aquosa de ácido trifluoracético 0,1% em acetonitrila 60%, em seguida foram sonicadas por 10 minutos e desalinizadas com Zip Tip C18 (Millipore, Darmstadt, Germany), de acordo com as instruções do fabricante. Os espectros de massas foram adquiridos nos espectrômetros de massas modelo AB Sciex MALDI-TOF/TOF 5800 ou nanoESI-LTQ/Orbitrap XL do Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz, no Laboratório de Toxinologia.

3.8.3 *Ionização e dessorção a laser assistida por matriz em tempo de voo/tempo de voo (MALDI-TOF/TOF)*

A fração de 0,3 µL de amostra contendo os peptídeos eluídos da coluna de Zip Tip foram misturados a solução de matriz saturada na proporção de 1:1 (10 mg/ml ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico em acetonitrila 50% e ácido trifluoracético 0,1%) na placa de Maldi e mantido em temperatura ambiente até a secagem completa. Os dados brutos da identificação de proteínas foram obtidos no espectrômetro de massas MALDI-TOF/TOF 5800 (AB Sciex, Foster City, C.A., USA). Ambos os dados de MS e MS/MS foram adquiridos com taxas de aquisição de laser de até 400 Hz no modo MS e 1.000 Hz no modo MS/MS. Tipicamente, 2000 tiros são acumulados por espectro em ambos os modos MS e MS/MS. Até 10 sinais de íons mais intensos com uma razão de sinal/ruído superiores a 30 foram selecionados como precursores de MS/MS de aquisição, excluindo os sinais de íons comuns da matriz. Calibração externa do modo MS foi realizada utilizando uma mistura de quatro peptídeos:

des-Arg1-bradykinin (m/z 904.468); angiotensin I (m/z 1296.685); Glu1-fibrinopeptide B (m/z 1570.677) e ACTH (18–39) (m/z 2465.199). O espectro MS/MS foi calibrado externamente utilizando massas de fragmento de íons observados no espectro MS/MS da angiotensina I. Seguindo a aquisição de dados, uma lista dos picos foi obtida dos dados brutos de MS/MS utilizando a ferramenta ABI Extractor (Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, O.N., Canada) para posteriores análises no software PEAKS 5.3.

3.8.4 Nanocromatografia acoplada ao espectrômetro de massas de alta resolução nanoeletrospray (nanoESI-LTQ/Orbitrap XL)

Para fração de 1 μ L da amostra tripsínica desalinizada, 9 μ L da solução de ácido fórmico 1% (v/v) foram adicionados. A partir da solução resultante, 4 μ L foram inicialmente aplicados na coluna de 2 cm de comprimento (100 μ m diâmetro interno) empacotada com a matriz 200 A Magic C18 AQ de 5 μ m (Michrom Bioresources, Alburn, C.A., USA) seguido pela separação em coluna de 10,5 cm de comprimento (75 μ m diâmetro interno) empacotada com a mesma matriz, diretamente sobre o PicoTip 15 μ m (New Objective, Cambridge, M.A., USA). A cromatografia foi realizada no equipamento EASY-nLC II (Thermo Fisher Scientific). As amostras foram aplicadas na coluna com um fluxo de 2000 nL/min e para a separação cromatográfica foi utilizado um fluxo de 200 nL/min. A fase móvel A foi 0,1% (v/v) de ácido fórmico em água, enquanto que a fase B foi 0,1% (v/v) de ácido fórmico em acetonitrila e as condições gradientes foram as seguintes: 2 a 40% de B em 32 minutos; até 80% de B em 4 minutos, mantendo esta concentração por mais 2 minutos, antes do reequilíbrio da coluna. Os peptídeos eluídos foram diretamente introduzidos no espectrômetro de massas nanoLTQ/Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific) para análise. A fonte de tensão foi definida para 1,9 kV, temperatura capilar de 200 °C e a voltagem do tubo da lente para 100 V. Os valores alvos para o *Ion trap* completo e MSn AGC (*Automatic Gain control*) foram de 30.000 e 10.000 respectivamente, enquanto que o valor alvo do FTMS (*Fourier Transform Mass Analysers*) AGC foi definido para 500.000. O espectro MS1 foi adquirido no analisador Orbitrap (m/z 300 a 1.700) com a resolução de 60.000 (para m/z 445.1200). Para cada espectro, os 10 íons mais intensos foram submetidos à fragmentação CID (*collision induced dissociation*) (sinal mínimo exigido 10.000; largura de isolamento de 2,5; energia de colisão normalizada de 35,0; ativação Q de 0,25 e tempo de ativação de 30 ms) seguido pela aquisição no MS2 do analisador linear. A opção de exclusão dinâmica foi ativada e habilitada com os seguintes valores definidos para cada parâmetro (repetição da contagem = 1; duração

da repetição = 30 s; tamanho da lista de exclusão = 500; duração da exclusão = 45 s e largura da massa de exclusão = 10 ppm).

3.8.5 *Análise dos dados pelo software PEAKS*

Todos os dados gerados para as glândulas de veneno foram analisados pelo software PEAKS versão 5.3 realizada em 19 de Agosto de 2011 (Bioinformatics Solutions Inc). Para as glândulas acessórias, os dados gerados foram analisados pelo software PEAKS versão 6 realizada em 4 de Abril de 2012. Primeiramente, os dados brutos foram submetidos ao refinamento, onde se procedeu à correção da massa do precursor e dos processos *peak centroiding*, *charge deconvolution* e *deisotoping*. Para as análises posteriores foram utilizados os limites de tolerância para os valores de massa dos íons precursores (em ppm) e para os íons fragmentos (em Da) para as diferentes abordagens de espectrometria de massas utilizadas: MALDI-TOF/TOF (100 ppm e 0,3 Da); nanoESI-LQT/Orbitrap XL (20 ppm e 0,6 Da). Além disso, foi considerada a digestão enzimática do tipo semi-trípica e foi aceito no máximo duas clivagens por proteína. Todos os dados foram submetidos inicialmente à busca pela ferramenta *De Novo*, permitindo-se modificações variáveis em cistina (+57.02 Da – carbamidometilação) e metionina, histidina e triptofano (+15,99 Da – oxidação), sendo aceito o máximo de duas modificações por peptídeo. Em seguida, foi realizada a busca mediante a ferramenta de pesquisa PEAKS DB, estabelecendo a massa do precursor como monoisotópica e permitindo uma modificação variável em cisteína (+57.02 Da), sendo aceitáveis no máximo duas modificações por peptídeo. Todas as buscas foram realizadas contra dois bancos de dados públicos NCBI não redundante, compostos por uma compilação de sequências proteicas descritas para Serpentes e Metazoa. A gama de detecção falsa (FDR – *False Discovery Rate*) foi estimada através do uso da ferramenta *decoy*. Finalmente, os dados de todas as buscas foram consolidados e somente os resultados no qual o FDR estimado foi menor ou igual a 1% foram aceitos como identificações confiáveis.

3.9 Western blotting

Para confirmação da expressão das proteínas identificadas por espectrometria de massa foi realizado ensaio de *Western blotting* utilizando anticorpos policlonais distintos:

1. Anti-actina, uma proteína de citoesqueleto, de procedência Sigma-Aldrich, St. Louis, M.O., USA.

2. Anti-MSP1/2, uma proteína serinoproteinases que foi gentilmente cedida pela Dra. Solange M. T. Serrano, do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantan (SERRANO et al., 1993).

Após a 1-DE, as bandas proteicas foram transferidas para membrana de nitrocelulose de acordo com Towbin et al. (1979), através da utilização do sistema Mini-PROTEAN TGX (Bio-Rad). Após a transferência, as membranas foram imersas em solução 0,5% de Vermelho de Ponceau em ácido acético 1% para verificar a correta transferência das proteínas. As membranas foram lavadas com água destilada e incubadas em solução de bloqueio (leite desnatado 5% em tampão fosfato salina [$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1,5 mM, Na_2HPO_4 8 mM, NaCl 140 mM, Tween 20 0,5%]) *overnight*. O anticorpo primário contra actina foi utilizado na diluição 1:500 e incubado durante 2 horas em temperatura ambiente, sob agitação. O anticorpo primário anti-MSP1/2 foi utilizado na diluição 1:500 e incubado *overnight* à 4 °C. Após as incubações com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas com tampão de lavagem (Tween-20 0,2% e tampão fosfato salina 10%). O anticorpo secundário (anti-IgG de coelho conjugada à peroxidase, KPL, Gaithersburg, Maryland, USA) foi utilizado na diluição 1:2.000 e incubado durante 30 minutos à temperatura ambiente, sob agitação. Em seguida, as membranas foram lavadas com tampão de lavagem. Para revelação foi utilizado o reagente de quimioluminescência SuperSignal West Pico (Thermo Fisher Scientific) e imediatamente após a incubação foi realizada a revelação através do fotodocumentador ChemiDoc XRS (Bio-Rad).

Após a eletroforese unidimensional a densidade das bandas foi quantificada através do software Quantity One (Bio-Rad).

3.10 Análise estatística

Os resultados apresentados estão expressos na forma de média $\pm$ erro padrão da média e estes dados foram gerados no software Excel. A diferença estatística entre mais de duas médias foi analisada pelo teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Mann-Whitney para avaliar as diferenças entre os grupos. O nível de significância aceito foi de 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Síntese proteica em glândulas de veneno durante o ciclo de produção de veneno

A análise dos géis realizada no software Platinum 7.0 nos permitiu uma comparação entre os diferentes estágios do ciclo de produção de veneno. Foi possível constatar uma expressiva diferença entre os perfis proteicos das glândulas de veneno das serpentes *Bothrops jararaca* no estágio quiescente, ativadas 4 e 7 dias após a extração de veneno por eletroforese em gel bidimensional (2-DE).

No estágio quiescente foram encontrados 93 *spots* exclusivos, enquanto que nos estágios ativados 4 e 7 dias após a extração de veneno foram encontrados 148 e 243 *spots* exclusivos, respectivamente, como demonstra o digrama de Venn (Figura 7). Quando comparado os três grupos experimentais apenas 3 *spots* foram encontrados em comum. A análise entre os estágios quiescente e ativado 4 dias após a extração de veneno mostrou 8 *spots* presentes em ambas as condições e entre o estágio quiescente e ativado 7 dias após a extração de veneno mostrou 10 *spots* presentes em ambas as condições. Entre os estágios ativados 4 e 7 dias após a extração de veneno foram encontrados 10 *spots* em comum (Figura 7).

Figura 7 - Diagrama de Venn representando a análise comparativa dos géis 2-DE de glândulas de veneno das serpentes *Bothrops jararaca* fêmeas durante o ciclo de produção de veneno.

Os dados apresentados de cada grupo estudado são resultados da análise de nove géis (triplicatas biológicas (N=3) e as corridas realizadas em triplicatas técnicas).

Por exemplo, analisando os géis visualmente, é possível perceber alguns *spots* específicos com alta densidade tais como um *spot* grande de aproximadamente 78 kDa e ainda alguns *spots* menores de aproximadamente de 32 kDa no estágio quiescente, não estão presentes nos estágios ativados do ciclo (Figura 8).

4.1.1 Identificação das proteínas da glândula de veneno durante o ciclo de produção de veneno

A partir da detecção dos *spots* exclusivos de cada condição estudada, foram selecionados e submetidos à digestão tripsínica os *spots* que apresentavam uma densidade maior ou igual a 0,02 (Figura 8). Primeiramente, todos os *spots* selecionados foram identificados por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF/TOF (AB Sciex 5800). No entanto, foram aceitos somente as proteínas que obtiveram o Peaks Score acima de 60% e ao menos um peptídeo sequenciado com o Peaks Score igual ou maior que 99%. Como alguns *spots* identificados não foram aceitos, estes *spots* foram submetidos a outro espectrômetro de massas do tipo ESI-LTQ/Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific), onde foi possível uma melhor identificação das proteínas. É interessante ressaltar que o espectrômetro de massas ESI-LTQ/Orbitrap XL é um equipamento mais sensível e isso possibilitou a identificação de mais de uma proteína por *spot* digerido.

Todas as buscas realizadas foram feitas contra o mesmo banco de dados usado pelo PEAKS v 5.3. Finalmente, os dados de todas as buscas foram consolidados e somente os resultados no qual o FDR estimado foi menor ou igual a 1% foi considerado como uma identificação confiável. As informações das proteínas identificadas foram coletadas no banco de dados UniProt (<http://uniprot.org>). A relação das proteínas identificadas, assim como outras informações pode ser obtida nos apêndices 1-3 deste trabalho.

Figura 8 - Gel 2-DE de SDS-poliacrilamida representativo dos diferentes spots selecionados dos extratos de glândulas de veneno das serpentes *Bothrops jararaca* fêmeas durante o ciclo de produção de veneno.

Extratos de glândula de veneno no estágio quiescente (A), estágio ativado 4 dias (B) e 7 dias (C) após a extração de veneno. Géis corados com CBB-G. Ensaios realizados em triplicata biológica (N=3) e as corridas realizadas em triplicatas técnicas.

Nos géis 2-DE de extrato de glândulas de veneno no estágio quiescente foram selecionados 72 *spots* e todos foram identificados, no entanto, no estágio ativado 4 dias foram selecionados 94 *spots* nos quais 77 foram identificados e no estágio ativado 7 dias foram selecionados 72 *spots* e 68 destes foram identificados. Os *spots* identificados estão marcados na Figura 8. Com base nestas identificações, as proteínas encontradas foram agrupadas de acordo com a sua localização subcelular.

Durante o ciclo de produção de veneno, proteínas de diversos compartimentos celulares foram identificadas, tais como: do citoplasma, da mitocôndria, do retículo endoplasmático, da membrana celular e ainda proteínas de secreção. Comparando as porcentagens de proteínas de cada compartimento subcelular em relação ao total identificado em cada estágio do ciclo de produção de veneno, podemos notar que houve um aumento na identificação de proteínas do citoplasma 4 e 7 dias após a extração de veneno e da membrana celular 4 dias após a extração de veneno, no entanto, ocorreu uma redução na identificação das proteínas mitocondriais nos estágios ativados da glândula de veneno, como demonstrado na Figura 9A, B, C. Para nossa surpresa a porcentagem de proteínas secretadas também diminuiu nos estágios ativados da glândula de veneno (Figura 9A, B, C).

Analisando cada compartimento subcelular separadamente, podemos notar diferenças na síntese de algumas proteínas do citoplasma e do retículo endoplasmático. Dentre as proteínas do citoplasma, verificamos que o número de espécies de proteínas exclusivas identificadas como actina, vimentina e tropomiosina (proteínas do citoesqueleto) e da subunidade alfa do proteassomo, tioredoxina e da proteína 40S ribossomal aumentou após a extração de veneno (Figura 10 e 11).

Em relação às proteínas do retículo endoplasmático, verificamos um aumento no número de espécies de proteínas exclusivas identificadas como Proteína disulfide isomerase (PDI) 4 dias após a extração de veneno e da Proteína 78 kDa regulada por Glucose (GRP78) 7 dias após a extração de veneno quando comparadas com o estágio quiescente como demonstra a Figura 12.

Figura 9 - Distribuição subcelular das proteínas identificadas em glândulas de veneno das serpentes *Bothrops jararaca*.

Glândulas de veneno no estágio quiescente (**A**), ativado 4 dias (**B**) e ativado 7 dias (**C**) após a extração de veneno. A classificação das proteínas foi obtida no banco de dados UniProt.

Figura 10 - Aumento do número de espécies de proteínas exclusivas identificadas como citoplasmáticas, do citoesqueleto, na glândula de veneno da serpente *Bothrops jararaca* durante o ciclo de produção de veneno.

Glândula de veneno no estágio quiescente (0 d), estágio ativado 4 dias (4 d) e 7 dias (7 d) após a extração de veneno. Os números acima das colunas indicam o número de espécies de proteínas identificadas.

Figura 11 - Aumento do número de espécies de proteínas exclusivas identificadas como citoplasmáticas na glândula de veneno da serpente *Bothrops jararaca* durante o ciclo de produção de veneno.

Glândula de veneno no estágio quiescente (0 d), estágio ativado 4 dias (4 d) e 7 dias (7 d) após a extração de veneno. Os números acima das colunas indicam o número de espécies de proteínas identificadas.

Figura 12 - Aumento do número de espécies de proteínas exclusivas identificadas como do retículo endoplasmático na glândula de veneno da serpente *Bothrops jararaca* durante o ciclo de produção de veneno.

Glândula de veneno no estágio quiescente (0 d), estágio ativado 4 dias (4 d) e 7 dias (7 d) após a extração de veneno. Proteína dissulfeto isomerase (PDI), Proteína 78 kDa regulada por glucose (GRP78). Os números acima das colunas indicam o número de espécies de proteínas identificadas.

Em relação às proteínas secretadas, mais especificamente às toxinas do veneno, notamos que a síntese ocorre de maneira não sincronizada. Mostramos pela primeira vez que a maioria das toxinas do veneno já está presente no estágio quiescente da glândula de veneno, tais como as lectinas tipo C, serinoproteinases de veneno de serpente (SVSP), proteínas secretadas ricas em cisteínas (CRISP), metaloproteinases de veneno de serpentes (SVMP), fosfolipases A₂ (PLA₂), L-aminoácido oxidases (LAAO) e disintegrinas (Figura 13). É importante salientar que todas as precauções foram tomadas para completa remoção do veneno, antes da dissecação das glândulas. Uma vez que analisamos somente os *spots* exclusivos de cada estágio, as toxinas identificadas no estágio quiescente não podem ser devidas à presença de toxinas residuais no *lumen* da glândula. Além disso, se houvesse a presença de algum veneno no interior do *lumen*, estas toxinas também seriam detectadas em outros estágios do ciclo e não seriam identificadas como exclusivas de cada estágio.

O número total de espécies de proteínas identificadas como lectinas tipo C-símile (CTLs-símile) e SVSP foi maior no estágio quiescente, diminuindo nos estágios ativados da glândula de veneno, ao passo que o número de espécies de proteínas identificadas como SVMP, PLA₂, LAAO, inibidores de fosfolipases A₂ (PLI), fator anti-hemorrágico Bj46a, inibidor de metaloproteinase (Bj46a) e disintegrina aumentou nos estágios ativados da

glândula de veneno. No entanto, não encontramos diferenças na síntese das proteínas CRISPs entre os estágios quiescente e ativado da glândula de veneno (Figura 13).

Figura 13 - Número de espécies de toxinas identificadas como proteínas secretadas na glândula de veneno da serpente *Bothrops jararaca* durante o ciclo de produção de veneno.

Glândula de veneno no estágio quiescente (0 d), estágio ativado 4 dias (4 d) e 7 dias (7 d) após a extração de veneno. Diferentes classes de toxinas foram identificadas: Lectinas tipo C, Serinoproteínases (SVSP), Proteínas secretadas ricas em cisteína (CRISP), Metaloproteínases (SVMP), Fosfolípases A₂ (PLA₂), L-aminoácido oxidase (LAAO), Inibidores de fosfolípases A₂ (PLI), Fator Anti-hemorrágico Bj46a (Bj46a). Os números acima das colunas indicam o número de espécies de proteínas identificadas.

Na família das lectinas tipo C, identificamos as lectinas tipo C verdadeiras (CTLs) e as lectinas tipo C-símile (CTL-símile), nas quais foram identificadas a lectina galactose específica, bothroinsularina, proteína ligadora da glicoproteína-Ib (GPIb-BP) e o fator de coagulação IX/X. Interessantemente, as GPIb-BP e o fator de coagulação IX/X foram identificados exclusivamente no estágio quiescente, ao passo que a lectina galactose específica foi identificada apenas nos estágios ativados da glândula de veneno. As CTLs estão presentes no estágio quiescente, no entanto, sua síntese é aumentada nos estágios ativados da glândula de veneno (4 e 7 dias). As bothroinsularinas estão presentes no estado quiescente e o número de espécies de proteínas específicas identificadas como bothroinsularinas diminuiu no 4º dia após a extração de veneno, retornando aos níveis mais elevados (33% acima do detectado no estado quiescente) no 7º após a extração de veneno (Figura 14A).

Em relação à família das SVSP identificadas, estas são na sua maioria de caráter ácido (Figura 14B). As metaloproteinases estão entre as enzimas proteolíticas mais abundantes no veneno dos viperídeos e são divididas em três classes: SVMP-PI, SVMP-PII e SVMP-PIII de acordo com seus domínios funcionais (FOX; SERRANO, 2008). As diferentes classes de metaloproteinases foram detectadas e apesar de todas estarem presentes no estado quiescente, um maior número de espécies de proteínas exclusivas identificadas como SVMP-PI e SVMP-PII foi detectado no sétimo dia de ativação da glândula de veneno, sendo que, SVMP-PII foi identificada preferencialmente no sétimo dia de ativação (Figura 14C). Surpreendentemente, o número de espécies de proteínas específicas identificadas como SVMP-PIII diminuiu no 4º dia após a extração de veneno, retornando aos níveis mais elevados (25% acima do detectado no estado quiescente) no 7º dia de ativação da glândula de veneno (Figura 14C).

Estes dados demonstram novamente que a produção e secreção das toxinas ocorrem de maneira independente uma da outra, ou seja, o acúmulo das toxinas não ocorre de forma paralela.

Figura 14 - Número de espécies de proteínas identificadas das classes de toxinas na glândula de veneno da serpente *Bothrops jararaca* durante o ciclo de produção de veneno.

Glândula de veneno no estágio quiescente (0 d), estágio ativado 4 dias (4 d) e 7 dias (7 d) após a extração de veneno. **(A)** Toxinas da família das lectinas. **(B)** Classificação das serinoproteases do veneno de serpentes (SVSP) de acordo com ponto isoelétrico (pI). **(C)** Toxinas da família das metaloproteases do veneno de serpentes (SVMP). Proteína ligante da glicoproteína-Ib (GPIIb-BP). Os números acima das colunas indicam o número de espécies de proteínas identificadas.

4.2 Confirmação das proteínas identificadas cujas sínteses foram reguladas durante o ciclo de produção de veneno

Após a identificação de proteínas de diferentes compartimentos subcelulares nas quais a síntese foi regulada durante o ciclo de produção de veneno, duas proteínas (actina e SVSPs) foram selecionadas para confirmar os dados obtidos pela espectrometria de massas, utilizando a metodologia de *Western Blotting*.

Verificamos que a densidade da banda correspondente à actina aumentou significativamente nos estágios ativados da glândula de veneno (Figura 15A, B). A densidade mensurada de actina no estágio quiescente foi de $4.574,3 \pm 1.116,8$ enquanto que no estágio ativado 4 dias e 7 dias a densidade foi de $10.280,7 \pm 1.964,9$ e $11.441,3 \pm 903,7$ respectivamente ($p < 0,05$, $n=3$).

A densidade das bandas correspondentes às SVSPs foi significativamente reduzida no estágio ativado da glândula de veneno ($p < 0,05$, $n=3$). A densidade da banda no estágio quiescente foi de $1.782,7 \pm 240,7$ enquanto que no estágio ativado 4 dias e 7 dias a densidade foi de $591,7 \pm 333,5$ e $518,7 \pm 148,2$ respectivamente (Figura 16A, B).

Os resultados obtidos no *Western blotting* foram consistentes com os dados encontrados na espectrometria de massas. Embora os anticorpos utilizados reconheçam todas as espécies de proteínas escolhidas para esse ensaio e não somente as espécies das proteínas específicas de cada estágio, os *spots* em comum aos três grupos estudados foram poucos, não interferindo na mensuração dos dados.

Figura 15 - Detecção de actina nos diferentes estágios do ciclo de produção de veneno.

Extrato de glândula de veneno da serpente *Bothrops jararaca* no estágio quiescente (0d), estágio ativado 4 dias (4d) e 7 dias (7d) após a extração de veneno. Ensaio de *western blotting* (A). (B) Densitometria das bandas correspondentes à actina. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (N=3). O asterisco (*) indica diferença estatística significativa em relação ao estágio quiescente (ANOVA, $p < 0,05$).

Figura 16 - Detecção da SVSP (MSP1/2) nos diferentes estágios do ciclo de produção de veneno.

Extrato de glândula de veneno da serpente *Bothrops jararaca* no estágio quiescente (0d), estágio ativado 4 dias (4d) e 7 dias (7d) após a extração de veneno. (A) Ensaio de *western blotting*. (B) Densitometria das bandas correspondentes à SVSP. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (N=3). O asterisco (*) indica diferença estatística significativa em relação ao estágio quiescente (ANOVA, $p < 0,05$).

4.3 Síntese proteica em glândulas de veneno reguladas pela inervação noradrenérgica

Mostramos anteriormente que a estimulação da inervação simpática por extração de veneno leva à ativação de adrenorreceptores alfa e beta que por sua vez desencadeiam uma complexa sinalização intracelular, culminando com a ativação de fatores de transcrição (KERCHOVE et al., 2008; LUNA et al., 2009; YAMANOUYE et al., 2000). Para avaliar a participação da inervação noradrenérgica na expressão gênica e consequente síntese de proteínas da glândula de veneno, bem como do veneno, tratamos um grupo de animais com reserpina durante 4 dias para depletar os estoques de noradrenalina e tratamos outro grupo de animais com reserpina e agonistas de adrenorreceptores α e β para verificar se o efeito causado pela reserpina é revertido, como já demonstrado anteriormente por nosso grupo (KERCHOVE et al., 2004; KERCHOVE et al., 2008; LUNA et al., 2009; YAMANOUYE et al., 1997). Portanto, para as análises a seguir, utilizamos as glândulas de veneno de serpentes ativadas 4 dias pela extração de veneno como nosso controle experimental.

Avaliando os perfis eletroforéticos dos extratos de glândulas de veneno ativadas 4 dias após a extração de veneno e os extratos de glândulas de veneno tratadas com reserpina por 4 dias (Res 4d) e tratadas com reserpina por 4 dias e ainda uma única dose de fenilefrina e isoprenalina (RFI), podemos visualizar uma expressiva diferença entre os perfis proteicos.

A análise comparativa dos géis no software Platinum 7.0 mostrou que no estágio ativado 4 dias existem 331 *spots* exclusivos, no tratamento com reserpina foram encontrados 87 *spots* e no tratamento com RFI foram encontrados 162 *spots* exclusivos (Figura 17). A análise comparativa entre o estágio ativado 4 dias e o tratamento com reserpina mostrou 16 *spots* presentes em ambas condições, entre o estágio ativado 4 dias e o tratamento RFI foram encontrados 71 *spots* em comum e entre os tratamentos reserpina 4 dias e RFI foram encontrados 22 *spots* em comum. Foram encontrados 10 *spots* em comum aos três grupos experimentais avaliados (Figura 17).

Figura 17 - Diagrama de Venn representando a análise comparativa dos géis 2-DE de glândulas de veneno das serpentes *Bothrops jararaca* fêmeas no estágio ativado 4 dias e a influência da inervação noradrenérgica.

Glândulas de veneno no estágio ativado 4 dias após a extração de veneno (4 dias), serpentes tratadas com reserpina durante 4 dias (Res 4d), serpentes tratadas com reserpina durante 4 dias e receberam uma única dose de fenilefrina e isoprenalina (RFI). Os dados apresentados de cada grupo estudado são resultados da análise de nove géis (triplicatas biológicas [N=3] e as corridas realizadas em triplicatas técnicas).

Visualmente, podemos notar que o tratamento com reserpina, promoveu um aumento expressivo da quantidade de *spots* de aproximadamente 18 kDa e o tratamento com os agonistas de adrenocetores alfa e beta reduziu a quantidade destes *spots* como na glândula no quarto dia de ativação (Figura 18). A quantidade desses *spots* de aproximadamente 18 kDa encontrados nas glândulas de veneno do grupo tratado com reserpina é muito semelhante ao do grupo de glândulas no estágio de quiescência (Figura 8A e 18B).

Figura 18 - Gel 2-DE de SDS-poliacrilamida representativo dos diferentes spots selecionados após tratamento com reserpina e agonistas de adrenoreceptores alfa e beta em glândulas de veneno das serpentes *Bothrops jararaca* fêmeas.

Glândulas de veneno no estágio ativado 4 dias após a extração de veneno (A), tratadas com reserpina durante 4 dias (B) e tratadas com reserpina mais fenilefrina e isoprenalina (C). Géis corados com CBB-G. Ensaios realizados em triplicatas biológicas (N=3) e as corridas realizadas em triplicatas técnicas.

4.3.1 Identificação das proteínas da glândula de veneno dos quais as sínteses são reguladas pela inervação noradrenérgica

Após a análise comparativa entre os grupos experimentais, passamos para etapa de identificação dos *spots* exclusivos de cada condição estudada. Foram selecionados e submetidos à digestão tripsínica os *spots* que apresentavam uma densidade maior ou igual a 0,02.

Os mesmos critérios utilizados para identificação dos *spots* descrito no item 4.1.1 foram utilizados. As informações das proteínas identificadas foram coletadas no banco de dados UniProt (<http://uniprot.org>). A relação das proteínas identificadas, assim como outras informações, pode ser obtida nas tabelas 4 e 5 no apêndice deste trabalho.

Selecionamos para identificação 109 *spots* do gel 2-DE do extrato de glândulas de veneno de serpentes tratadas com reserpina e desses 101 *spots* foram identificados, já do extrato de glândulas das serpentes tratadas com reserpina, fenilefrina e isoprenalina foram selecionados 63 *spots* e todos foram identificados. As proteínas identificadas foram agrupadas de acordo com a localização subcelular obtida no banco de dados UniProt.

Comparando as porcentagens de proteínas de cada compartimento subcelular em relação ao total identificado em cada grupo, verificamos que houve um aumento na porcentagem das proteínas do citoplasma e mitocôndria e redução na porcentagem das proteínas da membrana celular e do retículo endoplasmático no grupo tratado com reserpina, no entanto, o tratamento com agonistas de adrenoceptores não reverteu o efeito de reserpina (Figura 19), não evidenciando, dessa forma, a participação da inervação noradrenérgica.

Figura 19 - Distribuição subcelular das proteínas identificadas nas glândulas de veneno da serpente *Bothrops jararaca* fêmea após tratamento com reserpina e agonistas de adrenoreceptores alfa e beta.

Glândulas de veneno no estágio ativado 4 dias após a extração de veneno (**A**), tratadas com reserpina (**B**), tratadas com reserpina, fenilefrina e isoprenalina (RFI) (**C**). A classificação das proteínas foi obtida no banco de dados UniProt.

Porém, analisando os compartimentos subcelulares separadamente, notamos que após o tratamento com reserpina houve uma diminuição do número de espécies de proteínas identificadas como vimentina, uma proteína do citoesqueleto e a administração de agonistas de adrenoreceptores alfa e beta reverteu o efeito da reserpina (Figura 20). Portanto, a estimulação da inervação noradrenérgica pela extração do veneno, provavelmente está regulando positivamente a síntese de vimentina.

Outras proteínas citoplasmáticas que parecem ter sua síntese regulada pela ativação da inervação noradrenérgica são a subunidade alfa do proteassomo, a anexina A5 e a cadeia leve da miosina. Após o tratamento com reserpina o número espécies de proteínas identificadas como subunidade alfa do proteassomo reduziu e como anexina A5 e da cadeia leve da miosina aumentou. O subsequente tratamento com agonistas de adrenoreceptores alfa e beta reverteu esse efeito, sugerindo que a estimulação da inervação noradrenérgica regula a síntese dessas proteínas (Figura 20).

Figura 20 - Regulação da síntese das proteínas citoplasmáticas pela inervação noradrenérgica, identificadas na glândula de veneno da serpente *Bothrops jararaca*.

Glândula de veneno ativada 4 dias após a extração de veneno (4 d), tratada com reserpina por 4 dias (Res 4 d), tratada com reserpina, fenilefrina e isoprenalina (RFI). A síntese das proteínas vimentina (proteína do citoesqueleto) e da subunidade alfa do proteassomo foi regulada positivamente e das proteínas anexina A5 e da cadeia leve de miosina foi regulada negativamente. Os números acima das colunas indicam o número de espécies de proteínas identificadas.

A síntese da proteína mitocondrial, ATP sintase mitocondrial-símile parece ser regulada negativamente, visto que o tratamento com reserpina promoveu um aumento do número de espécies de proteínas identificadas e a administração de agonistas de adrenoreceptores alfa e beta reverteu parcialmente o efeito da reserpina (Figura 21).

Figura 21 - Síntese de ATP sintase mitocondrial-símile é regulada pela inervação noradrenérgica na glândula de veneno da serpente *Bothrops jararaca*.

Glândula de veneno no estágio ativado 4 dias após a extração de veneno (4 d), tratada com reserpina por 4 dias (Res 4 d) e tratada com reserpina, fenilefrina e isoprenalina (RFI). Os números acima das colunas indicam o número de espécies de proteínas identificadas

A participação da inervação noradrenérgica também foi analisada na regulação da síntese de toxinas da glândula de veneno. Analisando as classes de toxinas individualmente, verificamos que o tratamento com reserpina promoveu aumento no número de espécies de proteínas identificadas como lectinas do tipo C e das PLA₂ e após o tratamento com os agonistas este número foi reduzido novamente, sugerindo a participação da inervação noradrenérgica. Por outro lado, o número espécies de proteínas identificadas como fator anti-hemorrágico Bj46a foi menor em glândulas de serpentes tratadas com reserpina e quando a serpente reserpinizada foi tratada com os agonistas de adrenoreceptores houve uma reversão parcial desse efeito (Figura 22).

Figura 22 - Número de espécies de toxinas identificadas como proteínas secretadas na glândula de veneno da serpente *Bothrops jararaca*.

Glândulas de veneno no estágio ativado 4 dias (4 d) após a extração de veneno, tratadas com reserpina por 4 dias (Res 4 d) e tratadas com reserpina, fenilefrina e isoprenalina. Diferentes classes de toxinas foram identificadas: Lectina tipo C, Serinoproteínas do veneno de serpentes (SVSP), Proteínas Secretadas Ricas em Cisteínas (CRISP), Metaloproteínas do veneno de serpentes (SVMP), Fosfolipases A₂ (PLA₂), L-aminoácido oxidase (LAAO), Inibidores de Fosfolipases A₂ (PLI), Fator Anti-hemorrágico Bj46a (Bj46a). Observe que a síntese de CTLs e PLA₂ foi regulada negativamente e Bj46a foi regulado positivamente pela inervação noradrenérgica. Os números acima das colunas indicam o número de espécies de proteínas identificadas.

Avaliando a classe das toxinas lectinas tipo C separadamente, somente as CTLs-símbles foram reguladas, ou seja, notamos que o número de espécies de proteínas identificadas como GPIb-BP e do fator de coagulação IX/X aumentou significativamente após o tratamento com reserpina (Figura 23A), assemelhando-se ao estado quiescente da glândula de veneno (Figura 14A). As classes das SVMP também foram analisadas, e após o tratamento com reserpina o número de espécies de proteínas identificadas como SVMP-P_{II} aumentou e como SVMP-P_I diminuiu quando comparado com 4 dias após extração de veneno. Quando realizado o tratamento com os agonistas de adrenoreceptores alfa e beta, o número espécies de proteínas identificadas como SVMP-P_{II} reduziu e como SVMP-P_I aumentou, sugerindo que a inervação noradrenérgica está regulando positivamente a síntese de SVMP-P_I e negativamente a síntese de SVMP-P_{II} e (Figura 23B). Em relação à SVMP-P_{III}, o tratamento com reserpina aumentou o número das espécies de proteína, no entanto, o posterior tratamento

com os agonistas de adrenoreceptores alfa e beta não reverteu esse efeito, indicando que a estimulação da inervação noradrenérgica não está envolvida na síntese dessa toxina.

Figura 23 - Toxinas identificadas na glândula de veneno da serpente *Bothrops jararaca* estimuladas pela inervação noradrenérgica.

Glândula de veneno no estágio ativado 4 dias (4 d) após a extração de veneno, tratadas com reserpina por 4 dias (Res 4 d) e tratadas com reserpina, fenilefrina e isoprenalina. (A) Toxinas da família das CTL-símile. (B) Toxinas da classe das metaloproteínas do veneno de serpentes (SVMP). Proteína ligante da glicoproteína-Ib (GPIIb-BP). Os números acima das colunas indicam o número de espécies de proteínas identificadas

4.4 Perfil eletroforético da glândula acessória durante o ciclo de produção de secreção

As glândulas acessórias pertencem ao aparelho glandular de veneno e pouquíssimos estudos existem sobre esta estrutura. Recentemente através do estudo morfológico da glândula acessória foi possível evidenciar que esta glândula também apresenta um longo ciclo de produção de secreção e que a secreção da glândula acessória só inicia uma hora após a extração de veneno, sendo que a secreção máxima ocorre 4 dias após a extração de veneno, sugerindo que ela não contribui para o veneno total (SAKAI; CARNEIRO; YAMANOUYE, 2012). Sabemos ainda que a extração de veneno leva à ativação da glândula de veneno promovendo alterações no perfil proteico desta glândula, sendo as diferenças mais significativas encontradas 4 e 7 dias após a extração de veneno para glândulas de serpentes fêmeas e machos, respectivamente (LUNA et al., 2009). Em vista destes dados, nós fomos verificar se a extração de veneno altera o perfil proteico desta glândula. Através do 1-DE foram identificadas alterações no perfil proteico. Notamos, por exemplo, que bandas proteicas de 125 e 113 kDa aumentaram a densidade durante o ciclo de produção de secreção, e a presença de duas bandas de 19 e 16 kDa que tiveram sua densidade reduzida após a extração de veneno (Figura 24 e Tabela 2).

Figura 24 - Perfil proteico dos extratos de glândulas acessórias das serpentes *Bothrops jararaca* durante o ciclo de produção de secreção.

Glândula acessória sem extração de veneno (0 d) e glândulas acessórias 4 dias (4 d) e 7 dias (7 d) após a extração de veneno. A relação numérica é referente às fatias de bandas do gel 1-DE do extrato de glândula acessória que foram submetidas ao ESI-LTQ/Orbitrap XL. Massa relativa em kDa.

Tabela 2 - Análise densitométrica das bandas dos extratos de glândulas acessórias de serpentes *Bothrops jararaca* sem extração de veneno (0 dia) e glândulas acessórias 4 e 7 dias após a extração de veneno.

Número da banda	Peso Molecular (kDa)	Densidade das bandas		
		0 dia	4 dias	7 dias
1	211	14,46	17,39	18,97
2	125	16,99	44,47	64,99
3	113	17,45	34,35	51,97
4	97	28,07	34,39	27,02
5	75	41,81	43,62	46,54
6	68	48,06	52,53	65,81
7	59	60,82	64,49	67,29
8	54	73,01	74,01	80,69
9	44	65,61	74,18	71,72
10	38	47,87	37,96	56,51
11	32	31,86	39,02	38,92
12	26	28,67	47,12	37,15
13	19	31,82	27,17	23,76
14	16	27,15	17,82	16,76
15	12	20,08	37,55	32,00

As densidades na tabela escritas em vermelho aumentaram após a extração de veneno e as densidades escritas em azul diminuíram após a extração de veneno.

4.5 Identificação das proteínas da glândula de acessória

Na literatura não existem dados referentes às proteínas da glândula acessória, portanto, para uma melhor análise desta estrutura, todas as bandas proteicas foram recortadas e submetidas à espectrometria de massas do tipo ESI-LTQ/Orbitrap XL. Para identificação destas bandas, o gel foi fatiado sequencialmente e estas estão enumeradas como demonstrado na Figura 24. As proteínas identificadas foram classificadas de acordo com a localização subcelular obtida no banco de dados UniProt (www.uniprot.org.br) e a relação destes dados pode ser visualizada nos apêndices 6-8 presentes deste trabalho.

Somente as proteínas que obtiveram como resultado o FDR menor ou igual a 1% foram consideradas como uma identificação confiável. A porcentagem de proteínas identificadas de cada compartimento subcelular foi avaliada sobre o número total de proteínas identificadas. Notamos uma redução na porcentagem de proteínas do retículo endoplasmático e um aumento na porcentagem de proteínas nucleares e mitocondriais após a extração de veneno. Surpreendentemente, identificamos também uma grande quantidade de proteínas secretadas, identificadas como toxinas, na glândula acessória em todos os grupos estudados, como podem ser visualizadas na Figura 25 (A, B, C).

Figura 25 - Distribuição subcelular das proteínas identificadas nas glândulas acessórias de serpentes *Bothrops jararaca* durante o ciclo de produção de secreção.

(A) Glândula acessória sem extração de veneno (0 d), glândulas acessórias 4 dias (4 d) (B) e 7 dias (7 d) (C) após extração de veneno. A classificação das proteínas foi obtida no banco de dados UniProt.

Avaliando cada compartimento subcelular separadamente notamos que o número de proteína nuclear identificada como histona H2 aumentou após a extração de veneno (Figura 26). E a síntese das proteínas de membrana identificada como dipeptidil peptidase 4b (DPPIV) e de proteínas do retículo endoplasmático identificado como *heat shock* 90 (HSP90) reduziu após a extração de veneno, como demonstrado na Figura 26.

Figura 26 - Número de espécies de proteínas identificadas na glândula acessória da serpente *Bothrops jararaca* que tiveram suas sínteses alteradas durante o ciclo de produção de secreção.

Glândula acessória sem extração de veneno (0 d), glândulas acessórias 4 dias (4 d) e 7 dias (7 d) após a extração de veneno. Histona H2 (proteína nuclear), dipeptidil peptidase 4b (DPPIV, proteína de membrana) e Heat shock 90 (proteína do retículo endoplasmático). Os números acima das colunas indicam o número de espécies de proteínas identificadas.

Em relação às proteínas secretadas da glândula acessória, a porcentagem de espécies de proteínas identificadas como proteínas do veneno, reduziu após o início do ciclo de produção de veneno, como podemos notar na Figura 25.

Analisando as proteínas identificadas dentro de cada classe de toxina, notamos que a expressão também ocorre de maneira não sincronizada. Pela primeira vez estamos mostrando que glândula acessória secreta toxinas, igualmente as identificadas na glândula principal de veneno (Figura 13). Assim como mostrado na glândula de veneno, as toxinas também estão presentes na glândula acessória que não sofreram extração de veneno, tais como lectinas tipo C, SVSP, SVMP, PLA₂, LAAO, PLI, Bj46a e disintegrinas, além das proteínas glutaminil ciclase (GC), peptídeo natriurético (PN) e o precursor do tri-peptídeo inibidores de

metaloproteinases (pEKW) identificadas apenas na glândula acessória não sofreram extração (Figura 27A).

Quatro dias após a extração de veneno notamos que o número de espécies de proteínas identificadas como toxinas reduziu, exceto das SVMP-II e SVMP-PIII e do Bj46a. Sete dias após a extração de veneno, verificamos que o número de espécies de proteínas identificadas como –lectinas tipo C foi semelhante à glândula acessória sem extração de veneno e as proteínas identificadas como PLI tiveram um aumento discreto (Figura 27A e C). As CTLs foram identificadas somente no 7º dia após extração de veneno. Entre as CTLs-símbles todas foram identificadas na glândula acessória de serpentes que não sofreram extração de veneno, no entanto, somente as GPIB-BP foram identificadas no 4º dia após a extração de veneno, as demais CTL-símbles foram identificadas na glândula acessória também no 7º dia após extração de veneno (Figura 27B).

Analisando as classes das SVMP identificadas na glândula acessória, notamos que ao contrário das CTL-símbles, as classes de SVMP-II e SVMP-PIII foram identificadas preferencialmente no 4º dia após a extração de veneno, no entanto, nenhuma SVMP-PI foi identificada nessa glândula (Figura 27C).

Figura 27 - Número de proteínas secretadas identificadas na glândula acessória da serpente *Bothrops jararaca*.

Glândulas acessórias sem extração de veneno (0 d), glândulas acessórias 4 dias (4 d) e 7 dias (7 d) após a extração de veneno. (A) Diferentes classes de toxinas identificadas. (B) Classe das Lectinas tipo C. (C) Classe das metaloproteínas do veneno de serpentes (SVMP). Proteínas identificadas como Serinoproteínas do veneno de serpentes (SVSP), Metaloproteínas do veneno de serpentes (SVMP), Fosfolipases A₂ (PLA₂), L-aminoácido oxidase (LAAO), Inibidores de Fosfolipases A₂ (PLI), Fator Anti-hemorrágico Bj46a (Bj46a), Glutaminil ciclase (GC), Peptídeo natriurético (PN) e o precursor do tri-peptídeo inibidor de metaloproteínas (pEKW). Os números acima das colunas indicam o número de espécies de proteínas identificadas.

5 DISCUSSÃO

O estudo do proteoma das glândulas principal de veneno e acessória da serpente *Bothrops jararaca* revelou vários dados inéditos. A detecção de toxinas do veneno no estado quiescente da glândula principal de veneno e na glândula acessória e a participação da inervação noradrenérgica na regulação da síntese de várias proteínas da glândula de veneno, bem como das toxinas, trazem novos conceitos para os mecanismos de produção e secreção de veneno. Esses dados muito contribuirão para a compreensão dos mecanismos celulares envolvidos no desencadeamento da síntese e secreção de veneno, ou seja, para a funcionalidade dessas glândulas e para o estudo da diversidade de toxinas presentes no veneno.

5.1 Síntese de proteínas no ciclo de produção de veneno

Sabemos da importância da inervação noradrenérgica no desencadeamento do ciclo de produção e secreção de veneno, no entanto, pouco se conhece sobre as proteínas que participam da ativação da glândula para produção e secreção de veneno. A nossa primeira análise dos *spots* específicos presentes em cada estágio do ciclo de veneno avaliado, já nos mostrou que está ocorrendo uma regulação na síntese das proteínas da glândula de veneno corroborando com dados mostrados anteriormente por nosso grupo (LUNA et al., 2009).

Neste estudo, mostramos pela primeira vez que a maioria das toxinas estão presentes no estágio quiescente da glândula de veneno e que algumas proteínas como a GPIb-BP e o fator de coagulação IX/X estão presentes apenas no estágio quiescente da glândula de veneno. Mostramos ainda que após a extração de veneno a síntese das serinoproteinases e lectinas tipo C diminuiu e a síntese das SVMP, PLA₂, LAAO, PLI, fator anti-hemorrágico Bj46a e disintegrinas aumentou. Além disso, ocorreu um aumento na síntese de algumas proteínas citoplasmáticas como a subunidade alfa do proteassomo e tioredoxina, proteína 40S ribossomal e actina, vimentina e tropomiosina após o início do ciclo de produção de veneno. A síntese das proteínas do retículo endoplasmático como PDI e GRP78 também aumentaram após o início do ciclo de produção de veneno.

Sabemos que as células secretoras da glândula de veneno de serpentes Viperidae passam por mudanças morfológicas que são reguladas pela quantidade de veneno acumulada no *lúmen* da glândula (BEN-SHAUL et al., 1971; KOCHVA; GANS, 1970; KOCHVA, 1978; ORON; BDOLAH, 1973) e pelo sistema nervoso simpático

(YAMANOUYE et al., 1997). Durante primeira semana após a extração de veneno, as cisternas do retículo endoplasmático das células secretoras estão expandidas, resultando em um aumento do volume e altura da célula. Essas alterações morfológicas são acompanhadas por um aumento de membrana de várias organelas e de mitocôndrias (CARNEIRO et al., 1991). O aumento de atividade celular requer um aumento da síntese de proteínas para a manutenção da homeostase celular, bem como a síntese de novas toxinas. Portanto, modificações pós-traducionais, a síntese, degradação e secreção de proteínas são processos importantes na homeostasia celular que garantem o controle de qualidade das proteínas recém-sintetizadas e o seu endereçamento correto. Portanto, o aumento no número de espécies de proteínas como actina, vimentina, tropomiosina, subunidade alfa do proteassomo, proteína 40S ribossomal, tioredoxina, PDI e GRP78 nos estágios ativados da glândula de veneno sugere que estas proteínas podem estar atuando de forma a implementar o processo de síntese e secreção nas células secretoras da glândula de veneno devido ao aumento de atividade das células secretoras

Dentre as proteínas citoplasmáticas, identificamos proteínas do citoesqueleto como a actina, a vimentina e a tropomiosina. O citoesqueleto é uma rede altamente complexa de três filamentos intracelulares: microfilamentos, filamentos intermediários e microtúbulos (WETTESTEIN et al., 2012). A actina é o maior elemento estrutural do citoesqueleto e está envolvida na organização do citoesqueleto e na regulação da secreção de saliva (KONGO et al., 2008; NASHIDA et al., 2004; PERRIN et al., 1992; SEGAWA et al., 1998). A polimerização globular dos monômeros de actina-G formam os filamentos de actina-F, o qual tem um papel importante nas funções celulares mais complexas incluindo o transporte intracelular de organelas e vesículas, citocinese, apoptose e motilidade celular. As tropomiosinas pertencem a uma família de proteínas associadas às actinas e que tem a função de estabilizar os filamentos de actina, prevenindo a despolimerização e tornando os filamentos mais fortes e menos suscetíveis a quebra. Estas propriedades são importantes para as células não musculares, onde os filamentos de actina se agrupam rapidamente, movem-se e se dissociam em diferentes tempos e lugares (COOPER, 2002; LESS et al., 2011).

A vimentina é a principal proteína do filamento intermediário das células mesenquimais é altamente conservada nos vertebrados, e apresenta um padrão de expressão variável durante o desenvolvimento e a diferenciação (COGLI et al., 2013). A vimentina exerce um papel importante nos processos fisiopatológicos tanto na homeostase da célula normal como na inflamação, apoptose entre outras injúrias. A

vimentina age como um organizador de várias proteínas críticas envolvidas na adesão, migração e sinalização intracelular, além disso, também podem atuar como um potente regulador da transcrição, interagindo e sequestrando fatores transcripcionais e dessa forma, cooperando com fatores de transcrição como AP-1 e junD (IVASKA et al., 2007).

Em células acinares de parótida no estado basal, as proteínas do citoesqueleto fodrina e actina parecem ser uma continuação da membrana plasmática na maioria das células e quando estimuladas com secretagogos, as proteínas praticamente desaparecem. Estas alterações ocorrem em paralelo com a secreção de amilase (PERRIN et al., 1992). Estudos que investigam o papel do citoesqueleto e de proteínas motoras no processo secretório de glândulas salivares, mostraram que a secreção de amilase depende da integridade dos microfilamentos, uma vez que o tratamento com jaspakinolide e citochalasin D, agente estabilizador e desestabilizador de actina respectivamente, diminuíram a secreção de amilase induzida por ambos agonistas de adrenoceptor beta e colinérgico-muscarínico (BUSCH et al., 2002; NASHIDA et al., 2004). Além disso, isoprenalina induz a secreção e a reorganização do citoesqueleto via um aumento de cálcio citosólico livre e AMPc em células acinares de parótida (PERRIN et al., 1992).

Em nosso trabalho, mostramos que a síntese de proteínas do citoesqueleto em glândulas de veneno está aumentada nos estágios ativados. Portanto, nossos resultados sugerem que a reorganização do citoesqueleto tem um papel importante na ativação da glândula de veneno e a secreção de veneno.

As proteínas PDI e GRP78 são chaperonas presentes no retículo endoplasmático que são recrutadas quando a homeostase do retículo endoplasmático está alterada (WANG et al., 2012). As PDIs constituem uma família estruturalmente relacionada com enzimas na qual catalisam a formação de pontes dissulfeto, redução ou isomerização de proteínas recém-sintetizadas no *lumen* do retículo endoplasmático. A expressão de PDI é rapidamente induzida sob diferentes estresses ao retículo endoplasmático indicando um papel importante da PDI no controle de qualidade que se estende além de ligações dissulfeto (DORNER et al., 1990; MAATTANEN et al., 2010). GRP78 é encontrada em uma variedade de células secretoras, portanto, podem ter diferentes funções como nas modificações pós-traducionais, no agrupamento e no empacotamento de proteínas antes delas serem secretadas e também podem participar do mecanismo secretório (BEATON; WILKINS; WHEELER, 1997; MUNRO; PELHAM, 1986).

Após a extração de veneno, a glândula de veneno é ativada e um novo ciclo de produção e secreção é iniciado, em outras palavras, as células secretoras estão com uma alta taxa de síntese proteica. Portanto, o aumento de síntese de PDI e GRP78 nas glândulas ativadas pode ter um papel importante coordenando o dobramento, modificações pós-traducionais e transporte de proteínas na glândula de veneno e provavelmente estão envolvidas no processo de síntese e secreção de veneno. Nossos dados corroboram com um estudo realizado recentemente onde sugere que o transcriptoma do veneno pode ser um representativo do transcriptoma das glândulas de veneno. Neste estudo foi mostrado que a expressão de PDI está aumentada nos estados ativados da glândula de veneno (CURRIER et al., 2012).

As células estão frequentemente expostas a agentes químicos e físicos que podem levar a uma formação incorreta das proteínas e com isso a formação de agregados proteicos, morte celular e estresse oxidativo. Nas células eucarióticas a degradação das proteínas intracelulares ocorre no sistema ubiquitina-proteassomo, um sistema não lisossomal de degradação de proteínas. Nos casos onde o estresse oxidativo não é muito severo, enzimas como a tioredoxina (Trx) são recrutadas para reduzir as proteínas oxidadas (KRIEGENBURG et al., 2011). A Trx é uma proteína de 12 kDa, encontrada principalmente no citoplasma e ocasionalmente no núcleo. TRX é uma proteína antioxidante ubíqua muito conhecida por sua atividade disulfide redutase, no entanto a Trx também é capaz de realizar transnitrosilação e desnitrosilação (processos definidos como a transferência e remoção de óxido nítrico de substratos) em espécies de proteínas, interações proteína-proteína e modificações pós-traducionais (para revisão ver WU et al., 2011). Estes dados sugerem que a alta síntese de Trx identificada nos estágios ativados da glândula de veneno pode estar relacionada com a estrutura correta das proteínas e as modificações pós-traducionais das proteínas recém-sintetizadas.

Por outro lado, quando o dano proteico é severo ou irreversível, as proteínas são direcionadas para degradação no sistema ubiquitina-proteassomo, servindo como um controle geral da qualidade da proteína na célula. O proteassomo 26S é uma molécula estável, composta por dois subcomplexos: a subunidade catalítica 20S e a subunidade regulatória 19S. O subcomplexo 20S possui sete subunidades alfa ($\alpha 1$ - $\alpha 7$) e sete subunidades beta ($\beta 1$ - $\beta 7$). O proteassomo 26S é responsável pela degradação de proteínas oxidadas e ubiquitinadas (para revisão ver KRIEGENBURG et al., 2011, MATYSKIELA; MARTIN, 2013). Na glândula de veneno ativada, identificamos um aumento das espécies de subunidade alfa do proteassomo e estas subunidades

especificamente são importantes no controle da abertura do poro do proteassomo, ou seja, elas regulam o acesso à parte interna da cavidade do proteassomo (MATYSKIELA; MARTIN, 2013).

Os ribossomos estão entre as maquinarias moleculares mais importantes em todas as células para a síntese de proteínas. Nos eucariotos, as subunidades ribossomais 40S e a 60S se ligam no códon iniciador do RNAm, e no iniciador metionil do RNAt no sítio do peptidil (P), dando início ao processo de tradução. Através da microscopia de congelamento, foi demonstrado que a subunidade 40S liga-se aos fatores de iniciação (eIF1 e eIF1A) e estabilizam as alterações conformacionais que abrem os canais para o RNAm e iniciam a tradução (PASSMORE et al., 2007). Portanto, o aumento das espécies de proteínas ribossomais nos estágios ativados da glândula de veneno, provavelmente está relacionado com o aumento da síntese de novas proteínas/toxinas nesta glândula.

Diversos estudos têm demonstrado que após a extração de veneno, ou seja, a liberação do veneno do *lumen* da glândula promove alterações morfológicas e bioquímicas no epitélio secretor. A atividade sintética máxima das células secretoras tem sido observada entre 4º e 8º dia após o início do ciclo de produção de veneno e neste estágio foi encontrado uma alta concentração de RNAm (BEN-SHAUL; LIFSHITZ; KOCHVA, 1971, CARNEIRO et al., 1991, DE LUCCA et al., 1974, KOCHVA, 1978, ORON; BDOLAH, 1973, ROTENBERG; BAMBERGER; KOCHVA, 1971). Pouco se conhece sobre a síntese de toxinas do veneno, no entanto, parece que a síntese e secreção para o *lumen* de diferentes toxinas ocorrem de maneira não sincronizada (BROWN et al., 1975). Em relação às toxinas identificadas, mostramos pela primeira vez que a maior parte das toxinas está presente no estágio quiescente e que algumas delas estão presentes exclusivamente neste estágio, tais como a GPIb-BP o fator de coagulação IX/X e a enzima trombina-símile. A presença de SVMP no estágio quiescente também foi demonstrada na glândula de veneno de serpentes *Bothrops jararaca* através da técnica de microscopia eletrônica (CARNEIRO et al., 2002). Além disso, Currier et al (2012) observaram pouca diferença na composição do veneno e atividade enzimática do veneno analisado desde do dia 0-1 até o considerado maduro (25dias). Esses dados sugerem que após a extração de veneno, as toxinas presentes no estado quiescente são exocitadas para o *lumen*, visto que as proteínas envolvidas na secreção estão aumentadas nos estágios ativados da glândula de veneno.

Diferentes espécies de toxinas foram identificadas no estágio ativado da glândula de veneno como espécies de SVMP-II no estágio ativado 7 dias, no entanto, algumas delas são mais abundantes no estágio quiescente como espécies de SVSP. Como a maior parte dos estudos moleculares e de transcriptoma utilizam as glândulas de veneno ativada 4 dias, provavelmente estes estudos estão perdendo informações importantes sobre a diversidade das toxinas. Provavelmente a transcrição do DNA destas toxinas presentes no estágio quiescente ocorra posteriormente. Considerando que apenas os *spots* específicos em cada estágio foram identificados, os dados presentes neste estudo, indicam claramente que as diferentes espécies de toxinas são secretadas de forma independente uma da outra, sugerindo que a síntese e secreção de toxinas ocorrem de maneira não sincronizada, corroborando com os dados já demonstrados por Oron e Bdolah, 1973. Por outro lado, recentemente, um estudo avaliou a dinâmica de expressão gênica do veneno após a extração de veneno analisando o RNAm presente no veneno, mostrou que o pico de expressão de RNAm de diversas classes de toxinas do veneno ocorre de forma paralela entre o 3º e 7º dia após o início do ciclo de produção de veneno (CURRIER et al., 2012).

Outra classe de toxina identificada na glândula de veneno foi das proteínas do veneno ricas em cisteína (CRISP-Vs), porém a sua síntese não foi alterada durante o ciclo de produção de veneno. As CRISP-Vs pertencem à família das CRISPs – cysteine-rich secretory protein (RAMAZANOVA et al., 2008), que compreendem uma classe de proteínas inicialmente encontradas no epidídimo de mamíferos e expressas em uma variedade de organismos (OOKUMA et al., 2003; SCHREIBER et al., 1997). As CRISPs são proteínas de cadeia única, com massa molecular entre 20 kDa a 30 kDa e uma grande quantidade de resíduos de cisteína fortemente conservados em sua estrutura (YAMAZAKI; MORITA, 2004). A principal função reportada para toxinas pertencentes a esta classe é o bloqueio de canais iônicos, como canais de cálcio, por exemplo, comprometendo a atividade de contração da musculatura lisa, ou ainda que possam ter atividade neurotóxica (RAMAZANOVA et al., 2008).

Outro dado interessante encontrado neste estudo foi a identificação de inibidores de metaloproteinases, B_j46a e de fosfolipases A₂ em glândulas de veneno ativadas. A presença de inibidores de metaloproteinases foi descrita somente no plasma de serpentes, sendo essa proteína sintetizada no fígado (VALENTE et al., 2001). Inibidores de metaloproteinases estão presentes no plasma de vários animais, como por exemplo, o da *Bothrops jararaca*, que é naturalmente resistente ao envenenamento e são

consideradas parte do sistema imune destes animais (para revisão ver VALENTE et al., 2009; NEVES-FERREIRA et al., 2009). Uma explicação possível para presença destes inibidores nas glândulas de veneno ativadas 4 e 7 dias (Figura 13) seria uma contaminação cruzada com o veneno da serpente durante a dissecação da glândula. No entanto, se fosse este o caso, provavelmente estes inibidores seriam detectados nas glândulas quiescentes, o que não ocorreu. Outra possibilidade seria uma contaminação cruzada com o sangue durante a extração de veneno que ocorreu 4 e 7 dias antes da síntese de proteínas. Para evitar esta possibilidade, nós utilizamos apenas glândulas de veneno íntegras, ou seja, sem danos visíveis (hematomas ou inchaços). Por outro lado, o veneno acumulado dentro do *lumen* da glândula é uma mistura complexa de proteínas e para o controle da toxicidade do veneno muitos fatores já foram descritos como protetores das glândulas de veneno. As propriedades físico-químicas do veneno como as altas concentrações de citrato e o baixo pH (MACKESSY; BAXTER, 2006; ODELL et al., 1998; SOUSA et al., 2001; VILJOEN; BOTES, 1979) além da secreção de enzimas inativas precursoras de zimogênios e a expressão de peptídeos endógenos como as inibidores específicos de enzimas do veneno (WAGSTAFF et al., 2008). A presença destes inibidores na glândula de veneno da serpente *Bothrops jararaca* é maior nas glândulas de veneno ativadas 4 dias, portanto, podem estar atuando na manutenção das metaloproteinases e PLA₂ miotóxicas na forma inativa dentro do *lumen* e assim promovendo um novo mecanismo de controle da toxicidade do veneno durante a síntese e a estocagem do veneno. Dados recentes não publicados, dos nossos colaboradores determinaram que a interação entre o BJ46a (SVMPI) e a jararhagina (P-III SVMP) tem uma constante de dissociação (K_d) baixa na ordem de nanomolar. Este tipo de associação é uma interação não covalente muito forte que não pode ser facilmente quebrada e a eficácia do veneno pode ser prejudicada. Portanto, parece que a presença destes inibidores estabiliza e inativa a autólise das proteínas, assim protegendo as serpentes contra os próprios componentes do veneno.

5.2 Participação da inervação noradrenérgica regulando a síntese de proteínas na glândula de veneno

A reserpina tem sido utilizada como ferramenta farmacológica para desvendar o papel da inervação simpática em glândulas salivares ou de veneno. Em ratos, o tratamento crônico com esta droga promove alterações morfológicas e funcionais

irreversíveis em glândulas salivares, similar às alterações encontradas em pacientes com fibrose cística (MARTINEZ et al., 1975a,b; WATSON et al., 1984). Em serpentes, o tratamento crônico com reserpina promoveu alterações morfológicas e bloqueou a produção e secreção de veneno em glândulas ativadas pela extração de veneno. No entanto esse efeito foi revertido com a posterior administração crônica de isoprenalina e fenilefrina, restaurando a síntese proteica do veneno, mas apenas a fenilefrina é capaz de restaurar o processo de secreção de proteínas do veneno (YAMANOUYE et al., 1997). Dados anteriores do laboratório mostraram também que após a extração de veneno, a noradrenalina é liberada e atuando em adrenoreceptores α e β ativa a glândula de veneno (KERCHOVE et al., 2004; LUNA et al., 2009; YAMANOUYE et al., 2000; ZABLITH, 2007). A ativação desses receptores desencadeia a sinalização intracelular culminando na ativação de fatores de transcrição NF κ B e AP-1 que irão regular a síntese de proteínas, ativando a glândula de veneno (KERCHOVE et al., 2008; LUNA et al., 2009; ZABLITH, 2007).

Com a utilização da reserpina verificamos que a inervação noradrenérgica regula a síntese de proteínas importantes para a ativação da glândula de veneno para a produção e secreção de toxinas. O tratamento com reserpina promoveu uma redução na quantidade de *spots* específicos presentes na glândula de veneno e após o tratamento com os agonistas de adrenoreceptores alfa e beta verificamos um aumento na quantidade de *spots* específicos, e um aumento na quantidade de *spots* específicos entre a glândula de veneno ativada 4 dias e a glândula tratada com reserpina e agonistas de adrenoreceptores α e β , sugerindo a participação da inervação noradrenérgica na regulação da síntese de proteínas da glândula de veneno, corroborando com dados mostrados anteriormente por nosso grupo (LUNA et al., 2009).

A estimulação da inervação noradrenérgica promoveu uma regulação da síntese das proteínas do citoplasma tais como vimentina, tropomiosina, subunidade alfa do proteassomo, anexina A5, da cadeia leve da miosina e da proteína mitocondrial ATP sintase mitocondrial-símile. A respeito das toxinas do veneno, a estimulação da inervação noradrenérgica promoveu uma regulação negativa na síntese de algumas toxinas como a GPIb-BP, o fator de coagulação IX/X, a PLA₂ e da SVMP-P11. Não podemos descartar que a estimulação da inervação noradrenérgica promova a exocitose de GPIb-BP, o fator de coagulação IX/X, proteínas presentes somente no estado quiescente. Além disso, a estimulação da inervação noradrenérgica promoveu uma

regulação positiva na síntese do inibidor de metaloproteinase fator anti-hemorrágico Bj46a e da SVMP-PI.

A vimentina, como descrito acima, exerce um papel importante nos processos fisiológicos tanto na homeostase da célula normal como na inflamação, apoptose entre outras injúrias. Mostramos a participação da inervação noradrenérgica na síntese de vimentina, visto que o tratamento crônico com reserpina promoveu uma redução na síntese de vimentina e a subsequente administração dos agonistas de adrenoreceptores alfa e beta reverteu este efeito. Como visto anteriormente, a noradrenalina é capaz de ativar fatores de transcrição em glândula de veneno tais como AP-1 (LUNA et al., 2009) e somado ao fato da vimentina ser um potente regulador da transcrição, cooperando com fatores de transcrição como AP-1 e junD (IVASKA et al., 2007), sugere o envolvimento da vimentina na regulação do processo de síntese de proteínas na glândula de veneno.

A síntese da cadeia leve da miosina também foi regulada pela inervação noradrenérgica. Miosina é uma proteína motora dos microfilamentos e a sua presença já foi detectada em tecidos secretórios como ilhas pancreáticas, glândulas salivares e pituitárias de porcos e são muito semelhantes às miosinas de músculo liso, apresentando cadeias pesadas e leves (OSTLUND; LEUNG; KIPNIS, 1978). Diversos estudos indicam que a actina participa ativamente do transporte das vesículas secretoras e este movimento exige a presença de proteínas motoras como a miosina, formando um complexo actina-miosina. Em glândulas exócrinas o complexo actina-miosina pode atuar como uma proteína de sustentação para estabilizar e prevenir o rompimento das mesmas, no qual pode ser causado por um aumento da pressão hidrostática (PORAT-SHLIOM et al., 2012). Portanto, nossos resultados sugerem que a inervação noradrenergica está modulando a síntese da miosina. Como discutido anteriormente, o sistema ubiquitina-proteassomo pode ser recrutado para remoção de proteínas com danos severos e irreversíveis, servindo como um controle geral do conteúdo proteico e da qualidade da célula. A inervação noradrenérgica também atua regulando positivamente a síntese da subunidade alfa do proteassomo, sugerindo um papel importante dessa inervação para os processos de proteólise via proteassomo, atuando no controle do conteúdo proteico através da degradação de proteínas oxidadas e ubiquitinadas (para revisão ver KRIEGENBURG et al., 2011, MATYSKIELA; MARTIN, 2013).

A anexina A5 é uma proteína citosólica de 35,7 kDa, que se liga, de forma reversível, com as fosfatidilserinas (PS) expressas em membranas de modo dependente

de cálcio. As anexinas são uma família de proteínas que se ligam à membrana e tem uma participação importante nas propriedades estruturais e atividades biológicas associadas à membrana. Apesar de ser uma proteína citosólica, a A5 já foi encontrada em superfícies celulares e na circulação, indicando que ela é liberada para o meio extracelular, no entanto, sua liberação ocorre por uma via secretória não convencional, visto que não possui a sequência de nucleotídeos no seu RNAm que as direcione para a via secretória via aparelho de Golgi. Dessa forma, a A5 tem várias funções fisiológicas dependendo de sua localização e concentração local. Devido a sua capacidade de se ligar à PS, a A5 tem um papel relevante na apoptose, hemostasia, trombose, inflamação e nos processos imunológicos (GENDEREN et al., 2008).

Além disso, estudos imuno-citoquímicos para verificar a localização da anexina A5, mostram claramente uma distribuição específica da proteína entre as células endócrinas estudadas, sugerindo que a A5 pode contribuir para o processo de secreção (KAWAMINAMI et al., 1998).

O aumento da síntese de A5 nas glândulas de veneno reserpinizadas, sugere que está ocorrendo uma regulação negativa da A5 pela estimulação da inervação noredrenérgica, sugerindo que essa inervação está modulando o processo de secreção.

As mitocôndrias são responsáveis pela produção de mais de 90% da energia na forma de ATP utilizada pelas células dos eucariotos. Nas glândulas de veneno a síntese da proteína ATP-sintase mitocondrial-símile foi regulada negativamente pela inervação noradrenérgica, parecendo não contribuir com o funcionamento da mitocôndria. No entanto, em células acinares da parótida, uma grande quantidade de mitocôndrias está localizada na região perinuclear e as mitocôndrias podem estar regulando uma variedade de funções nucleares facilitando uma efetiva secreção em células acinares da parótida (BRUCE et al., 2004)

Com relação às toxinas identificadas, mostramos pela primeira vez que a inervação noradrenérgica está regulando a síntese das toxinas como as lectinas tipo C, PLA₂ e Bj46a. A respeito da classe das lectinas tipo C, quando analisadas separadamente, notamos que as CTL-símile GPIb-BP e o fator de coagulação IX/X estão presentes apenas nas glândulas de veneno reserpinizadas. Estes dados são similares aos obtidos em glândulas de veneno quiescentes, sugerindo que a inervação noradrenérgica pode estar atuando na regulação da síntese e produção destas proteínas, ou ainda pode estar promovendo a exocitose dessas toxinas já presentes no estado quiescente da glândula. A inervação noradrenérgica também está regulando

positivamente a síntese de SVMP-PI e negativamente a síntese de SVMP-PII. Estes dados mostram claramente que estas toxinas estão sendo reguladas pela inervação noradrenérgica. Provavelmente, a síntese de outras toxinas é regulada por outros neurotransmissores.

5.2 Síntese de proteínas da glândula acessória durante o ciclo de produção de veneno

A glândula acessória é uma estrutura pouco conhecida e estudada apesar de pertencer ao aparelho glandular de veneno. As secreções liberadas por esta região não sabe se pode modificar o veneno formado. Sabe-se que a luz da glândula principal de veneno conecta-se ao ducto primário e este forma uma alça e passa no interior da glândula acessória (KOCHVA; GANS, 1966).

O estudo morfológico realizado da glândula acessória da *Bothrops jararaca* mostrou que esta glândula possui uma exocitose tardia, 4 dias após a extração de veneno do tipo apócrina. Devido à secreção tardia, foi demonstrado que a secreção da glândula acessória não participa da formação do veneno total da serpente *Bothrops jararaca* (SAKAI; CARNEIRO; YAMANOUYE, 2012).

A identificação das proteínas presentes nesta glândula assim como identificação das proteínas nas quais as sínteses são reguladas durante o ciclo de produção e secreção acrescenta novas informações a esta estrutura pouco conhecida. Mostramos pela primeira vez a presença de toxinas do veneno como Lectinas tipo C, SVSP, SVMP, PLA₂, LAAO, PLI, Bj46a, precursor de pEKW, GC, PN e disintegrinas e que estas toxinas assim, como na glândula de veneno tem sua síntese regulada durante o ciclo de produção de veneno. Além disso, as proteínas HSP90, a Histona H2 e a DPPIV tiveram sua síntese regulada durante o ciclo de produção de veneno.

As proteínas *Heat shock* (HSPs) são expressas ou estão aumentadas nas células em resposta a vários estímulos biológicos. As HSPs são conhecidas como chaperonas auxiliando na conformação correta das proteínas, durante a síntese, transporte e degradação das proteínas. Em glândulas parótidas a HSP90 provavelmente esta envolvida na síntese e transporte de proteínas (VANMUYLDER et al., 2000). HSP90 é capaz de associar-se direta ou indiretamente com microtúbulos e microfilamentos, portanto, também participa da reorganização do citoesqueleto (CZAR et al., 1996; MATSUBARA et al., 1990). Nas glândulas acessórias foi demonstrado que no 4º dia

após a extração de veneno, as células mucosas apresentam uma exocitose maciça, com rompimento da membrana apical, semelhante a uma secreção apócrina, com isso parte do conteúdo citoplasmático é perdido. No 7º dia após a extração de veneno uma regeneração das células já está ocorrendo (SAKAI; CARNEIRO; YAMANOUYE, 2012). Provavelmente a redução na síntese das proteínas HSP90 e DPPIV após a extração de veneno estão relacionadas com essa perda de conteúdo citoplasmático. Além disso, o aumento da síntese de histona H2 na glândula acessória 7 dias após a extração de veneno, sugere seu envolvimento no reestabelecimento da célula, regulando a transcrição e síntese de proteínas, consequentemente regulando a produção e secreção desta glândula.

Um estudo morfológico da glândula acessória realizado durante o ciclo de secreção mostrou que a secreção da glândula acessória ocorre 1 hora após a extração de veneno, sugerindo que a secreção desta glândula pouco contribui para o veneno total (SAKAI; CARNEIRO; YAMANOUYE, 2012). No entanto, nossos dados interessante mostraram a presença de diversas toxinas do veneno em todos os estágios da glândula acessória avaliados. Além disso, identificamos a presença de dois tipos de inibidores de metaloproteinases na glândula acessória, Bj46a e o precursor do tri-peptídeo inibidor piroglutamato-lisina-triptofano (pEKW). Em glândulas acessórias, o Bj46a assim como na glândula de veneno teve sua síntese aumentada após a extração de veneno, já o pEKW foi encontrado apenas nas glândulas acessórias e apenas nas glândulas que não sofreram extração de veneno.

O tri-peptídeo inibidor pEKW está presente em concentrações milimolares (4,5 mM) no veneno de diversas serpentes, como por exemplo a serpente *Bothrops asper*, e também na própria *Bothrops jararaca* (FRANCIS; KAISER, 1993; MARQUES-PORTO et al., 2008) atua inibindo a atividade das metaloproteinases. Além disso, estudos demonstraram que a perda deste tri-peptídeo deixa o veneno muito mais tóxico (MACKESSY; WILLIAMS; ASHTON, 2003). Os tri-peptídeos inibidores juntamente com outros mecanismos como as altas concentrações de hidrolases, tais como o baixo pH do veneno e a alta concentração do íon citrato na glândula inibem as enzimas do veneno, estabilizando e inibindo a autólise das proteínas (MUNEKIYO; MACKESSY, 2005). Os resultados obtidos na identificação das proteínas da glândula acessória nos leva a pensar que a secreção desta glândula pode estar auxiliando a proteger a integridade da glândula de veneno, uma vez que esta glândula estoca veneno no seu *lumen* por longos períodos, ou seja, o aumento da síntese e secreção de inibidores

enzimáticos estaria protegendo a serpente contra um potencial dano causado pelos próprios componentes do veneno. É interessante notar que a secreção da glândula no 4º dia após a extração de veneno coincide com o início da secreção do veneno recém-sintetizado.

5.3 Considerações finais

O estudo proteômico da glândula principal de veneno, bem como da acessória mostrou que em todos os estágios estudados as toxinas estão presentes nessas glândulas e que após a extração de veneno ocorre uma síntese não sincronizada de toxinas, bem como a síntese de proteínas importantes para o processo de síntese e secreção. Interessante ressaltar que inibidores de fosfolipases A₂ e de metaloproteinases foram detectados nessas glândulas, sendo que maior quantidade nas glândulas acessória.

Em relação aos mecanismos que controlam a síntese e secreção de veneno, estes são regulados parcialmente pela inervação noradregérgica, que está atuando tanto na síntese de proteínas estruturais importantes para o processo de síntese e secreção, bem como promovendo exocitose das toxinas presentes na glândula de veneno no estado quiescente.

Apesar dos estudos morfológicos sugerirem que a secreção da glândula acessória não participa do veneno total devido a exocitose tardia (SAKAI et al., 2012), o estudo proteômico mostra que essa glândula produz toxinas e inibidores de fosfolipases e metaloproteinases, sugerindo que a secreção dessa glândula, apesar de ocorrer mais tardiamente, 4 dias após a extração de veneno, deve participar sim do veneno total, bem como proteger a glândula dos efeitos tóxicos do veneno.

A maioria dos estudos de biologia molecular e de transcriptoma utilizam somente a glândula principal de veneno de 3 a 4 dias após a extração de veneno, devido ao pico de atividade sintética das células secretoras (CARNEIRO et al., 1991; DE LUCCA et al., 1974; KOCHVA, 1987; KOCHVA, 1978). Neste trabalho mostramos que a síntese de toxinas tanto na glândula principal de veneno como na acessória ocorre de maneira não sincronizada, portanto os estudos realizados anteriormente podem ter perdido informações importantes sobre a diversidade de toxinas, além do fato de não incluírem a glândula acessória. Os dados obtidos neste trabalho fornecem informações inéditas trazendo novos conhecimentos sobre os mecanismos celulares envolvidos no

desencadeamento da síntese e secreção de veneno e podem contribuir de forma significativa para o estudo das toxinas de suas diversidades.

6 CONCLUSÕES

Os resultados desta tese mostraram que:

1. A análise proteômica das glândulas de veneno da serpente *Bothrops jararaca* revelou perfis distintos entre os estágios quiescentes e ativados, ou ainda após os tratamentos com reserpina e agonistas de adrenoreceptores alfa e beta;
2. Proteínas citoplasmáticas e do retículo endoplasmático estão sendo reguladas durante o ciclo de produção de veneno;
3. Grande parte das toxinas está presente no estágio quiescente da glândula de veneno e algumas toxinas estão presentes exclusivamente neste estágio, no entanto outras são mais abundantes nos estágios ativados da glândula de veneno, mostrando que a síntese de toxinas ocorre de maneira não sincronizada;
4. A estimulação da inervação noradrenérgica regula a síntese de proteínas citoplasmáticas e mitocondriais, além da síntese de algumas toxinas;
5. A estimulação da inervação noradrenérgica, através da ativação dos adrenoreceptores α e β , pode promover a exocitose de toxinas já sintetizadas presentes no *lumen* da glândula de veneno, bem como promover a síntese de novas toxinas;
6. Na glândula acessória, após a extração de veneno, a síntese de algumas proteínas envolvidas na produção e secreção, bem como de toxinas foi regulada;
7. Diversas toxinas foram identificadas na glândula acessória, assim como a presença de inibidores endógenos de metaloproteinases e de fosfolipases A₂ foram detectadas;
8. A produção e secreção das toxinas da glândula acessória também ocorrem de maneira não sincronizada.

Em conclusão, os dados obtidos nessa tese demonstram que durante a ativação da glândula de veneno várias proteínas envolvidas no processo de síntese e secreção de proteínas estão sendo reguladas. Além disso, mostramos pela primeira vez a presença de várias toxinas no estado dito como quiescente e que a síntese de toxinas ocorre de maneira não sincronizada. A estimulação da inervação noradrenérgica é importante para modular a síntese de proteínas envolvidas no processo de síntese e secreção, bem como de algumas toxinas.

A glândula acessória, apesar de ter uma exocitose tardia, é capaz de sintetizar e secretar toxinas, bem como inibidores de metaloproteinases e fosfolipase A₂ que podem estar agindo protegendo a glândula de veneno de seus efeitos tóxicos. Proteínas da

glândula acessória também tiveram sua síntese regulada nos diferentes tempos estudados e parecem estar envolvidas no restabelecimento celular devido a perda de conteúdo citoplasmático após a secreção apócrina que ocorre nessa glândula.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS⁴

- AMSTERDAM, A.; OHAD, I.; SHRAMM, M. M. Dynamic changes in the ultrastructure of acinar of the rat parotid gland during the secretory cycle. **J. Cell Biol.**, v. 41, n. 3, p. 753-773, 1969.
- ARAÚJO, F. A. A.; SANTALÚCIA, M.; CABRAL, F. R. Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. In: CARDOSO, J. L. R.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAS JR, V. (Ed.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Savier, FAPESP, 2003. p. 6-12.
- BARKA, T. β -adrenergic affects on salivary glands: growth and gene regulation. **Acta Histochem. Cytochem.**, v. 23, p. 245-255, 1990.
- BASTOS, C. M. V. **Análise da expressão gênica diferencial das glândulas de veneno de Bothrops jararaca (Serpentes: Viperidae)**. 2011. 157 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- BAUM, B. J. Principles of saliva secretion. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 694, p. 17-23, 1993.
- BAUM, B. J. Regulation of salivary secretion. In: SCREEBNY, L. M. (Ed.). **The salivary system**. Boca Raton, FL: CRC Press Inc, 1987. p. 123-134.
- BAUM, B. J.; WELLNER, R. B. Neural mechanisms of salivary gland and secretion: receptors in salivary glands. In: GARRET, J. R.; EKSTRÖM, J.; ANDERSON, L. C. (Ed.). **Front oral biology**. Basel: Karger, 1999. v. 11, p. 44-58.
- BDOLAH, A. The venom glands of snakes and venom secretion. In: LEE, C. Y. (Ed.). **Snake Venom**. Berlin: Springer Verlag, 1979. v. 52. p. 41-57.
- BEATON, A.; WILKINS, R. J.; WHEELER, T. Lactation-associated and prolactin-responsive changes in protein synthesis in mouse mammary cells. **Tissue and Cell**, v. 29, n. 5, p. 509-516, 1997.
- BELLOUMINI, H .E. Extraction and quantities of venom obtained from some Brazilian snakes. In: BUHERL, W.; BUCKLEY, V.; DEULOFEU, V. (Ed.). **Venomous animals and their venoms**. New York: Academic Press; 1968. p. 97-117.
- BEN-SHAUL, Y.; LIFSHITZ, S. H.; KOCHVA, E. Ultrastructural aspects of secretion in the venom glands of *Vipera palaestinae*. In: DE VRIES, A.; KOCHVA, E. (Ed.). **Toxins of animal of plants origin**. London: Gordon and Breach, 1971. p. 87-107.

⁴De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração**. Rio de Janeiro, 2002.

BRADFORD M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 7. ed. Brasília, DF, 2009. 816 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento dos acidentes por animais peçonhentos**. Brasília, DF: Fundação Nacional de Saúde, 1998. 131 p.

BRENO, M. C.; YAMANOUYE, N.; PREZOTO, B. C.; LAZARI, M. F. M.; TOFFOLETTO, O.; PICARELLI, Z. P. Maintenance of the snake *Bothrops jararaca* (Wied, 1824) in captivity. **The Snake**, v. 22, p. 126-130, 1990.

BROSKY, M. E. The role of saliva in oral health: strategies for prevention and management of xerostomia. **J. Support. Oncol.**, v. 5, p. 215-225, 2007.

BROWN, R. S.; BROWN, M. B.; BDOLAH, A.; KOCHVA, E. Accumulation of some secretory enzymes in venom glands of *V. palaestinae*. **Am. J. Physiol.**, v. 229, n. 6, p. 1675-1679, 1975.

BRUCE, J. I. E.; GIOVANNUCCI, D. R.; BLINDER, G.; SHUTTLEWORTH, T. J.; YULE, D. I. Modulation of $[Ca^{2+}]_i$ signaling dynamics and metabolism by perinuclear mitochondria in mouse parotid acinar cells. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 13, p. 12909-12917, 2004.

BUSCH, L.; STERIN-BORDA, L.; BORDA, E. Differences in the regulatory mechanism of amylase release by rat parotid and submandibular glands. **Arch. Oral Biol.**, v. 47, n. 10, p. 717-722, 2002.

BYLUND, D. B.; EIKENBERG, D. C.; HIEBLE, J. P.; LANGER, S. Z.; LEFKOWITZ, R. J.; MINNEMAN, K. P.; MOLINOFF, P. B.; RUFFOLO, R. R. JR.; TRENDELENBURG, U. International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. **Pharmacol. Rev.**, v. 46, n. 2, p. 121-126, 1994.

BYLUND, D. B.; RAY-PRENGER, C.; MURPHY, T. J. Alpha-2A and alpha-2B adrenergic receptor subtypes: antagonist binding in tissue and cell lines containing only one subtype. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 245, n. 2, p. 600-607, 1988.

CARNEIRO, S. M.; ASSAKURA, M. T.; BARRENCE, F. A. C.; CARDOSO, S. R. T.; CAMARGO, A. C. M.; SESSO, A. Immunolocalization of venom metaloproteases in venom glands of adult and of newborn snakes of *Bothrops jararaca*. **Tissue Cell.**, v. 34, n. 6, p. 381-389, 2002.

CARNEIRO, S. M.; FERNANDES, W.; DELLA CASA, M. S.; SESSO, A. Cytochemical analysis of acid phosphatase activity in the venom secretory cells of *Bothrops jararaca*. **Tissue Cell.**, v. 33, n. 4, p. 311-317, 2001.

CARNEIRO, S. M.; PINTO, V. R.; JARED, C.; LULA, L. A.; FARIA, F. P.; SESSO, A. Morphometric studies on venom secretory cells from *Bothrops jararacussu* (Jararacuçu) before and after venom extraction. **Toxicon**, v. 29, n. 6, p. 569-580, 1991.

CHIPPAUX J. P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, v. 29, n. 11, p. 1279-12303, 1991.

CIDADE, D. A. P.; SIMÃO, T. A.; DÁVILA, A. M. R.; WAGNER, G.; JUNQUEIRA-DE AZEVEDO, I. L. M.; HO, P. L.; BON, C.; ZINGALI, R. B.; ALBANO, R. M. *Bothrops jararaca* venom gland transcriptome: Analysis of the gene expression pattern. **Toxicon**, v. 48, p. 437-461, 2006.

COGLI, L.; PROGIDA, C.; BRAMATO, R.; BUCCI, C. Vimentin phosphorylation and assembly are regulated by the small GTPase. **BBA Mol. Cell Biol.**, v. 1833, n. 6, p. 1283-1293, 2013.

COOPER, J. A. Actin dynamics: Tropomyosin provides stability. **Curr. Biol.**, v. 12, p. R523-R525, 2002.

CURRIER, R. B.; CALVETE, J. J.; SANZ, L.; HARRISON, R. A.; ROWLEY, P. D.; WAGSTAFF, S. C. Unusual stability of messenger RNA in snake venom reveals gene expression dynamics of venom replenishment. **Plos One**, v. 7, n. 8, p. 1-10, 2012.

CZAR, M. J.; WELSH, M. J.; PRATT, W. B. Immunofluorescence localization of the 90-kDa heat-shock protein cytoskeleton. **Eur. J. Cell Biol.**, v. 70, n. 4, p. 322-330, 1996.

DANIELS, T. E.; WU, A. J. Xerostomia – Clinical evaluation and treatment in general practice. **J. Calif. Dent. Assoc.**, v. 28, p. 933-941, 2000.

DE LUCCA, F. L.; HADDAD, A.; KOCHVA, E.; ROTHCHILD, A. M.; VALERI, V. Protein synthesis and morphological changes in the secretory epithelium of the venom gland of *Crotalus durissus terrificus* at different times after manual extraction of venom. **Toxicon**, v. 12, n. 4, p. 361-368, 1974.

DORNER, A. J.; WASLEY, L. C.; RANEY, P.; HAUGEJORDEN, S.; GREEN, M.; KAUFAMAN, R. J. The stress response in Chinese hamster ovary cells. Regulation of ERp72 and protein disulfide isomerase expression and secretion. **J. Biol. Chem.**, v. 265, n. 35, p. 22029-22034, 1990.

EKSTROM, J. Neuropeptides and secretion. **J. Dent. Rev.**, v. 66, p. 524-530, 1987.

EKSTROM, J.; EKMAN, R.; HAKASON, R.; LUTS, A.; SUNDLER, F.; TOBIN, G. Effects of capsaicin pretreatment on neuropeptides and salivary secretion of rat parotid glands. **Br. J. Pharmacol.**, v. 97, p. 1031-1038, 1988.

FENWICK, A. M.; GUTBERLET JR, R. L.; EVANS, J. A.; PARKINSON, C. L. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). **Zool. J. Linnean Society**, v. 156, p. 617-640, 2009.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **FEBS J.**, v. 275, n. 12, p. 3016-3030, 2008.

FRANCIS, B.; KAISER, I. I. Inhibition of metalloproteinases in *Bothrops asper* venom by endogenous peptides. **Toxicon**, v. 31, n. 7, p. 889-899, 1993.

FRANCO, F. L. Origem e diversidade das serpentes. In: CARDOSO, J. L. R.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAS JR, V. (Ed.). **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003. p. 13-32.

GARRETT, J. R. The proper role of nerves in salivary secretion – a review. **J. Dent. Res.**, v. 66, p. 387-397, 1987.

GARRETT, J. R.; THULIN, A. Changes in parotid acinar cells accompanying salivary secretion in rats on sympathetic or parasympathetic nerve stimulation. **Cell Tissue Res.**, v. 159, p. 179-193, 1975.

GENDEREN, H. O.; KENIS, H.; HOFSTRA, L.; NARULA, J.; REUTELINGSPERGER, C. P. M. Extracellular annexin A5: Functions of phosphatidylserine-binding and two dimensional crystallization. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1783, p. 953-963, 2008.

GOMES, N.; POURTO, G. Atlas anatômico de *Bothrops jararaca* Wied, 1824 (Serpentes: Viperidae). **Mem. Inst. Butantan**, v. 55, p. 69-100, 1993.

GONÇALVES, L. R.; YAMANOUYE, N.; NUÑEZ-BURGOS, G. B.; FURTADO, M. F.; BRITTO, L. R.; NICOLAU, J. Detection of calcium-binding proteins in venom and Duvernoy's glands of South American snakes and their secretions. **Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.**, v. 118, n. 2, p. 207-211, 1997.

GRAHAM, R. M.; PEREZ, D. M.; HWA, J.; PIASCIK, M. T. Alpha 1-adrenergic receptor subtypes. Molecular structure, function and signaling. **Circ. Res.**, v. 78, n. 5, p. 737-749, 1996.

IVASKA, J.; PALLARI, H. M.; NEEVO, J.; ERIKSSON, J. E. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. **Exp. Cell Res.**, v. 313, n. 10, p. 2050-2062, 2007.

JAMIESON, J. D.; PALADE, G. E. Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell I. Role of the peripheral elements of the Golgi complex. **J. Cell Biol.**, 34, n. 2, p. 577-596, 1967a.

JAMIESON, J. D.; PALADE, G. E. Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell II. Transport to condensing vacuoles and zymogen granules. **J. Cell Biol.**, v. 34, n. 2, p. 597-615, 1967b.

JIANG, L.; HE, L.; FOUNTOULAKIS, M. Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomics analysis. **J. Chroma.**, v. 1023, n. 2, p. 317-320, 2004.

JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; HO, P. L. 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**, v. 299, n. 1-2, p. 279-291, 2002.

KARDONG, K. V. The evolution of snakes apparatus in snakes from colubrids to viperids & elapids. **Mem. Inst. Butantan**, v. 46, p. 105-118, 1982.

KASTURIRATNE, A.; WICKREMASINGHE, A. R.; SILVA, N.; GUNAWARDENA, N. K.; PATHMESWARAN, A.; PREMARATNA, R.; SAVIOLI, L.; LALLOO, D. G.; SILVA, H. J. The global burden of snakebite: A literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. **PLoS Medicine**, v. 5, n. 11, p. 1591-1604, 2008.

KAWAMINAMI, M. YAMAGUCHI, K.; MIYAGAWA, S.; NUMAZAWA, S. IOKA, H.; KURUSU, S. HASHIMOTO, I. Ovariectomy enhances the expression and nuclear translocation of annexin 5 in rat anterior pituitary gonadotrophs. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 141, n. 1-2, p. 73-78, 1998.

KERCHOVE, C. M.; CARNEIRO, S. M.; MARKUS, R. P.; YAMANOUYE, N. Stimulation of the α -adrenoceptor triggers the venom production cycle in the venom gland of *Bothrops jararaca*. **J. Exp. Biol.**, v. 207, n. 3, p. 411-416, 2004.

KERCHOVE, C. M.; LUNA, M. S.; ZABLITH, M. B.; LAZARI, M. F.; SMAILI, S. S.; YAMANOUYE, N. Alpha1-adrenoceptors trigger the snake venom production cycle in secretory cells by activating phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis and ERK signaling pathway. **Comp. Biochem. Physiol. A**, v. 150, p. 431-437, 2008.

KITANO, H. Systems biology: a brief overview. **Science**, v. 295, n. 5560, p. 1662-1664, 2002.

KLEIN, R. M. Development, structure and function of the salivary glands. In: AVERY, J. K. **Oral development and history**. Stuttgart: Thieme, 2002. p. 321-330.

KOCHVA E. A quantitative study of venom secretion by *Vipera palaestinae*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 9, p. 381-390, 1960.

KOCHVA E. The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. **Toxicon**, v. 25, n. 1, p. 65-106, 1987.

KOCHVA E.; GANS, C. The structure of the venom gland and secretion of venom in viperid snakes. In: REWELL, F. E.; RUSSELL, P. R. **Animal toxins**. Oxford: Pergamon Press, 1967. p. 195-203.

KOCHVA, E. Oral glands of the Reptilia. In: GANS, C. (Ed.). **Biology of the reptilia**. London: Academic Press, 1978. v. 8b. p. 43-161.

KOCHVA, E.; GANS, C. Histology and histochemistry of venom glands of some crotaline snakes. **Copeia**, v. 3, p. 506-515, 1966.

KOCHVA, E.; GANS, C. Salivary glands of snakes. **Clin. Toxicol.**, v. 3, n. 3, p. 363-387, 1970.

KONGO, H.; HIRONO, C.; SUGITA, M.; IWASA, Y.; SHIBA, Y. Involvement of cytoskeletal integrity of the regulation of Cl^- and amylase secretion from rat parotid acinar cells. **Biom. Res.**, v. 29, n. 3, p. 131-139, 2008.

KRIEGENBURG, F.; POULSEN, E. G.; KOCH, A.; KRÜGER, E.; HARTMANN, P. Redox control of the ubiquitin-proteasome system: from molecular mechanisms to functional significance. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 15, n. 8, p. 2265-2299, 2011.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the heat of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LAWSON, R.; SLOWINSKI, J. B.; CROTHER, B. I.; BURBRINK, F. T. Phylogeny of the Colubroidea (Serpentes): new evidence from mitochondrial and nuclear genes. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 37, n. 2, p. 581-601, 2005.

LEES, J. G.; BACH, C. T. T.; O'NEILL, G. M. Interior decoration. Tropomyosin in actin dynamics and cell migration. **Cell Adh. Migr.**, v. 5, n. 2, p. 181-186, 2011.

LI, Y. M.; ZHANG, Y.; XIANG, B.; ZHANG, Y. Y.; WU, L. L.; YU, G. Y. Expression and functional analysis of β -adrenoceptor subtypes in rabbit submandibular gland. **Life Sci.**, v. 79, p. 2091-2098, 2006.

LUNA, M. S. A.; HORTENCIO, T. M. A.; FERREIRA, S. Z.; YAMANOUYE, N. Sympathetic outflow activates the venom of the snake *Bothrops jararaca* by regulating the activation of transcription factors and the synthesis of the venom gland proteins. **J. Exp. Biol.**, v. 212, n. 10, p. 1535-1543, 2009.

MAATTANEN, P.; GEHRING, K.; BERGERON, J. J.; THOMAS, D. Y. Protein quality control in the ER: the recognition misfolded protein. **Semin. Cell Dev. Biol.**, v. 21, n. 5, p. 500-511, 2010.

MACKESSY, S. P. Morphology and ultrastructure of the venom gland of the Northern Pacific rattlesnake *Crotalus viridis oreganus*. **J. Morphol.**, v. 208, p. 109-128, 1991.

MACKESSY, S. P.; WILLIAMS, K.; ASHTON, K. Characterization of the venom of the midget faded rattlesnake (*Crotalus viridis concolor*): a case of venom paedomorphosis? **Copeia**, v. 4, p. 769-782, 2003.

MACKESSY, S. P.; BAXTER, L. M. Bioweapons synthesis and storage: The venom gland of front-fanged snakes. **Zoologischer Anzeiger**, v. 245, p. 147-159, 2006.

MARCHI, F.; HADDAD, A.; DE LUCCA, F. L. Radioautographic and biochemical studies of secretion of venom protein in the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **J. Exp. Zool.**, v. 203, n. 3, p. 429-442, 1978.

MARQUES, O. A. V.; SAZIMA, I. História natural dos répteis da Estação Ecológica Juréia-Itatins, In: MARQUES, O. A. V.; DULEBA, W. (Ed.). **Estação Ecológica Juréia-Itatins. Ambiente físico, flora e fauna**. São Paulo: Holos, 2004. p. 212-236.

MARQUES-PORTO, R.; LEBRUN, I.; PIMENTA, D. C. Self-proteolysis regulation in the *Bothrops jararaca* venom: The metallopeptidases and their intrinsic peptide inhibitor. **Comp. Biochem. Physiol. C**, v. 147, p. 424-433, 2008.

MARTINEZ, J. R.; ADSHEAD, P. C.; QUISSELL, D. O.; BARBERO, G. J. The chronically reserpinized rats as a possible model for cystic fibrosis. I. Submaxillary gland morphology and ultrastructure. **Pediatr. Res.**, v. 9, p. 463-469, 1975a.

MARTINEZ, J. R.; ADSHEAD, P. C.; QUISSELL, D. O.; BARBERO, G. J. The chronically reserpinized rats as a possible model for cystic fibrosis. II. Comparison and cilioinhibitory effects of submaxillary saliva. **Pediatr. Res.**, v. 9, p. 470-475, 1975b.

MARTINEZ-OLIVARES, R.; VILLANUEVA, I.; RACOTTA, R.; PIÑON, M. Depletion and recovery of catecholamines in several organs of rats treated with reserpine. **Auton. Neurosci. Basic Clin.**, v. 128, n. 1-2, p. 64-69, 2006.

MATSUBARA, O.; KASUGA, T.; MARUMO, F.; ITOH, H.; TASHIMA, Y. Localization of 90-kDa heat shock protein in the kidney. **Kidney Int.**, v. 38, n. 5, p. 830-834, 1990.

MATYSKIELA, M. E.; MARTIN, A. Design principles of a universal protein degradation machine. **J. Mol. Biol.**, v. 425, n. 2, p. 199-213, 2013.

MELGAREJO, A. R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: _____. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003. p. 33-61.

MOTOYAMA, A.; YATES, J. R. Multidimensional LC separations in shotgun proteomics. **Anal. Chem.**, v. 80, n. 19, p. 7187-7193, 2008.

MUNEKIYO, S. M.; MACKESSY, S. P. Presence of peptide inhibitors in rattlesnake venoms and their effects on endogenous metalloproteases. **Toxicon**, v. 45, p. 255-263, 2005.

MUNRO, S.; PELHAM, H. R. B. An Hsp70like protein in the ER: identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. **Cell**, v. 46, n. 2, p. 291-300, 1986.

NASHIDA, T.; YOSHIE, S.; IMAI, A.; SHIMOMURA, H. Presence of cytoskeleton proteins in parotid glands and their roles during secretion. **Arch. Oral Biol.**, v. 49, n. 2, p. 975-982, 2004.

NESATYY, V. J.; SUTER, M. J. F. Analysis of environmental stress response on the proteome level. **Mass Spec. Rev.**, v. 27, n. 20, p. 556-574, 2008.

NEVES-FERREIRA, A. G. C.; VALENTE, R. H.; PERALES, J.; DOMONT, G. B. In: MACKESSY S. P. (Ed.). **Reptile venoms and toxins**. New York: Taylor and Francis; CRC Press, 2009. p. 259-284.

ODELL, G. V.; FERRY, E. C.; VICK, L. M.; FENTON, A. W.; DECKER, L. S.; COWELL, R. L.; OWNBY, C. L.; GUTIERREZ, J. M. Citrate inhibition of snake venom proteases. **Toxicon**, v. 36, n. 12, p. 1801-1806, 1998.

OOKUMA, S.; FUKUDA, M.; NISHIDA, E. Identification of a DAF-16 transcriptional target gene, scl-1, that regulates longevity and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. **Curr. Biol.**, v. 13, n. 3, p. 427-431, 2003.

ORON, U.; BDOLAH, A. Regulation of protein synthesis in venom gland of viperid snakes. **J. Cell Biol.**, v.56, p. 1771-1790, 1973.

ORON, U.; KINAMON, S.; BDOLAH, A. Asynchrony in the synthesis of secretory proteins in the venom gland of the snake *Vipera palaestinae*. **Biochem. J.**, v. 174, n. 3, p. 733-739, 1978.

OSTLUND, R. E. JR.; LEUNG, J. T.; KIPNIS, D. N. Myosins of secretory tissues. **J. Cell. Biol.**, v. 73, n. 3, p. 827-836, 1978.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v. 405, n. 6788, p. 837-846, 2000.

PASSMORE, L. A.; SCHMEING, T. M.; MAAG, D.; APPLEFIELD, D. J.; ACKER, M. G.; ALGIRE, M. A.; LORSCH, J. R.; RAMAKRISHNAN, V. The eukaryotic translation initiation factors eIF1 and eIF1A induce an open conformation of the 40S ribosome. **Mol. Cell.**, v. 26, n. 1, p. 41-50, 2007.

PELUSO, G.; DE SANTIS, M.; INZITARI, R.; FINALI, C.; CABRAS, T.; MESSANA, I.; CASTAGNOLA, M.; FERRACCIOLI, G. F. Proteomic study of salivary peptides and proteins in patients with Sjögren's syndrome before and after pilocarpine treatment. **Arthritis and Rheum.**, v. 56, n. 7, p. 2216-2222, 2007.

PERRIN, D.; MOLLER, K.; HANKE, K.; SOLING, H.D. cAMP and Ca²⁺-mediated secretion in parotid acinar cells is associated with reversible changes in the organization of the cytoskeleton. **J. Cell Biol.**, v. 116, n. 1, p. 127-134, 1992.

PORAT-SHLIOM, N.; MILBERG, O.; MASEDUNSKAS, A.; WEIGERT, R. Multiple roles for the actin cytoskeleton during regulated exocytosis. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 70, n. 12, 2012.

PROCTOR, G. B.; CARPENTER, G. H. Regulation of salivary gland function by autonomic nerves. **Auton. Neurosci.**, v. 133, n. 1, p. 3-18, 2007.

PYRON, R.A. et al., The phylogeny of advanced snakes (Colubroidea), with discovery of a new subfamily and comparison of support methods for likelihood trees. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 58, p. 329-342, 2011.

QUISSEL, D. O.; BARZEN, K. A. Secretory response of dispersed rat submandibular cells. II. Mucin secretion. **Am. J. Physiol.**, v. 238, n. 3, p. C99-C106, 1980.

QUISSELL, D. O.; BARZEN, K. A.; DEISHER, L. M. Rat submandibular and parotid protein phosphorylation and exocytosis: Effect of site-selective cAMP analogs. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 4, p. 443-448, 1993.

QUISSELL, D. O.; WATSON, E.; DOWD, F. J. Signal transduction mechanisms involved in salivary gland regulated exocytosis. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 3, n. 1-2, p. 83-107, 1992.

RAMAZANOVA, A. S.; STARKOV, V. G.; OSIPOV, A. V.; ZIGANSHIN, R. H.; FILKIN, S. Y.; TSETLIN, V. I.; UTKIN, Y. N. Cysteine-rich venom proteins from the snakes of

Viperinae subfamily – molecular cloning and phylogenetic relationship. **Toxicon**, v. 53, p. 162-168, 2008.

ROTENBERG, D.; BAMBERGER, E. S.; KOCHVA, E. Studies on ribonucleic acid synthesis in the venom glands of *Vipera palaestinae* (Ophidia, Reptilia). **Biochem. J.**, v. 121, n. 4, 609-612, 1971.

SAKAI, F. **Glândula acessória e ducto primário de serpente *Bothrops jararaca* durante o ciclo de produção de veneno: Um estudo morfológico.** 2011. 76 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

SAKAI, F.; CARNEIRO, S. M.; YAMANOUYE, N. Morphological study of accessory gland of *Bothrops jararaca* and its secretory cycle. **Toxicon**, v. 59, n. 3, p. 393–401, 2012.

SALOMÃO, M.G. **Estrutura e secreção das glândulas de Duvernoy de *Sibynomorphus mikani* (Colubridae, Dipsadinae) e das glândulas de veneno de *Bothrops jararaca* (Viperidae, Crotalinae) e *Micrurus frontalis* (Elapidae, Elapinae) e a influência dos estados de alimentação e jejum.** 1991. 122 f. Tese (Doutorado em Zoologia) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991.

SAZIMA, I. Estudo da biologia comportamental da jararaca, *Bothrops jararaca*, com uso de marcas naturais. **Mem. Inst. Butantan**, v. 50, p. 83-99, 1988.

SCHAEFFER, R. C. Jr.; BERNICK, S.; ROSENQUIST, H.; RUSSELL, F. E. The histochemistry of the venom glands of the rattlesnake *Crotalus viridis helleri* – I Lipid and non-specific esterase. **Toxicon**, v. 10, n. 2, p. 183-186, 1972a.

SCHAEFFER, R. C. Jr.; BERNICK, S.; ROSENQUIST, H.; RUSSELL, F. E. The histochemistry of the venom glands of the rattlesnake *Crotalus viridis helleri* – II Monoamine oxidase, acid and alkaline phosphatase. **Toxicon**, v. 10, n. 2, p. 295-297, 1972b.

SCHNEYER, L. H.; YOUNG, J. A.; SCHNEYER, C. A. Salivary secretions of electrolytes. **Physiol. Rev.**, v. 52, p. 720-777, 1972.

SCHREIBER, M. C.; KARLO, J. C.; KOVALICK, G. E. A novel cDNA from *Drosophila* encoding a protein with similarity to mammalian cysteine-rich secretory proteins, wasp venom antigen5, and plant group 1 pathogenesis-related proteins. **Gene**, v. 191, n. 2, p. 135-141, 1997.

SEGAWA, A.; RIVA, A.; LOFFREDO, F.; CONGIU, T.; YAMASHIMA, S.; TESTA RIVA, F. Cytoskeletal regulation of human salivary secretion studied by high resolution electron microscopy and confocal laser microscopy. **Eur. J. Morphol.**, v. 36, p. 41-45, 1998.

SERRANO, S. M.; MATOS, M. F. C.; MANDELBAUM, F. R.; SAMPAIO, C. A. M. Basic proteinases from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom-I. Isolation and activity of two proteinases, MSP1 and MSP2, on synthetic substrates and on platelet aggregation. **Toxicon**, v. 31, n. 4, p. 471-481, 1993.

SERRANO, S. M. T.; SHANNON, J. D.; WANG, D.; CAMARGO, A. C. M.; FOX, J. W. A multifaceted analysis of viperid snake venoms by two-dimensional gel electrophoresis: An approach to understanding venom proteomics. **Proteomics**, v. 5, n. 2, p. 501-510, 2005.

SOUSA, J.; MONTEIRO, R. Q.; CASTRO, H. C.; ZINGALI, R. B.; P. Proteolytic action of *Bothrops jararaca* venom upon its own constituents. **Toxicon**, v. 39, p. 787-792, 2001.

SOUZA, W. Doenças negligenciadas. In: _____. **Ciência e tecnologia para o desenvolvimento nacional: estudos estratégicos**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 2010. p. 56.

TASHIMA, A. K.; ZELANIS, A.; KITANO, E. S.; LANZER, D.; MELO, R. L.; RIOLI, V.; SANT'ANNA, S. S.; SCHENBERG, A. C.; CAMARGO, A. C.; SERRANO, S. M. Peptidomics of three *Bothrops* snakes venoms: insights into the molecular diversification of proteomes and peptidomes. **Mol. Cell Proteomics**, v. 11, n. 11, p. 1245-1262, 2012.

TOWBIN, H.; STAEGELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some application. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

VALENTE, R. H.; DRAGULEV, B.; PERALES, J.; FOX, J. W.; DOMONT, G. B. Cloning and characterization of Bj46a, a snake venom metalloproteinase inhibitor from *Bothrops jararaca* serum. **Eur. J. Biochem.**, v. 268, n. 10, p. 3042-3052, 2001.

VALENTE, R. H.; NEVES-FERREIRA, A. G. C.; CAFFARENA, E. R.; DOMONT, G. B.; PERALES, J. In: LIMA M. E.; PIMENTA, A. M. C.; MARTIN-EAUCLAIRE, M. F.; ZINGALI, R.; ROCHAT, H. (Eds). **Animal Toxins: State of the Art**. Perspectives on Health and Biotechnology. Belo Horizonte: UFMG, 2009. p. 547-558.

VANDENPLAS, M. L.; VANDENPLAS, S.; BREBNER, K.; BESTER, A. J.; BOYD, C. D. Characterization of the messenger RNA population coding for components of viperid snake venom. **Toxicon**, v. 23, n. 2, p. 289-305, 1985.

VANMUYLDER, N.; EVRARD, L.; DAELEMANS, P.; DOUROV, N. Chaperones in the parotid gland: Localization of heat shock proteins in humans adult salivary glands. **Cells Tiss. Organs**, v. 167, p. 199-205, 2000.

VARMA, D. R.; DENG, X. F. Cardiovascular alpha 1-adrenoceptors subtypes: function and signaling. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 78, n. 4, p. 267-292, 2000.

VIDAL, N. HEDGES, S. B. The molecular evolutionary tree of lizards, snakes, and amphisbaenians. **C. R. Biologies**, v. 332, n. 2-3, p. 129-139, 2009.

VILJOEN, C. C.; BOTES, D. P. Influence pH on the kinetic and spectral properties of phospholipase A₂ from *Bitis gabonica* (Gaboon adder) snake venom. **Toxicon**, v. 17, p. 77-87, 1979.

VON BÜLTZINGSLÖWEN, I.; SOLLECITO, T. P.; FOX, P. C.; DANIELS, T.; JONSSON, R.; LOCKHART, P. B.; WRAY, D. BRENNAN, M. T.; CARROZZO, M.; GANDERA, B.; FUJIBAYASHI, T.; NAVAZESH, M.; RHODUS, N. L.; SCHIODT, M. Salivary

dysfunction associated with systemic diseases: systematic review and clinical management recommendations. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 103, n. S57, p. e1-15, 2007.

WAGSTAFF, S. C.; FAVREAU, P.; CHENEVAL, O.; LAING, G. D.; WILKINSON, M. C.; MILLER, R. L.; STÖCKLIN, R.; HARRISON, R. A. Molecular characterization of endogenous snake venom metalloproteinase inhibitors. **Bioch. Biophys. Res. Commun.**, v. 365, n. 4, p. 650-656, 2008.

WANG, X.; PATTISON, J. S.; SU, H. Posttranslational modifications and quality control. **Circ. Res.**, v. 112, p. 367-381, 2013.

WARSHAWSKY, H.; HADDAD, A.; GONÇALVES, R. P.; VALERI, V.; DE LUCCA, F. L. Fine structure of the venom gland epithelium of the South American rattlesnake and radioautographic studies of protein formation by secretory cells. **Am. J. Anat.**, v. 138, p. 79-120, 1973.

WATSON, E.; DOWD, F.; JACOBSONS, K.; HORWITZS, H. Reserpinization: Effects on parotid gland function. **J. Dent. Res.**, v. 63, n. 2, p. 82-86, 1984.

WETTESTEIN, G.; BELLAYE, P. S.; MICHEAU, O.; BONNIAUD, P. H. Small heat shock proteins and the cytoskeleton: An essential interplay for cell integrity? **Intern. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 44, p. 1680-1686, 2012.

WRIGTH, L. L.; LUEBKE, J. L. Somatostatin-, vasoactive intestinal polypeptide- and neuropeptide Y-like immunoreactivity in eye- and submandibular gland-projecting sympathetic neurons. **Brain Res.**, v. 494, n. 2, p. 267-275, 1989.

WU, C.; PARROTT, A.M.; FU, C.; LIU, T.; MARINO, S.M.; GLADYSHEV, V.N.; JAIN, M.R.; BAYKAL, A.T.; LI, Q.; OKA, S.; SADOSHIMA, J.; BEUVE, A.; SIMMONS, W.J.; LI, H. Thioredoxin 1-mediated post-translational modifications: reduction, transnitrosylation, denitrosylation, and related proteomics methodologies. **Antioxid. Redox Signal**, v. 15, n. 9, p. 2565-2604, 2011.

WU, Q.; YUAN, H.; ZHANG, L.; ZHANG, Y. Recent advances on multidimensional liquid chromatography-mass spectrometry for proteomics: From qualitative to quantitative analysis – A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 731, p. 1-10, 2012.

XIAO, D.; BUCHHOLZ, J. N.; ZHANG, L. Pregnancy attenuates uterine artery pressure-dependent vascular tone: role of PKC/ERK pathway. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 290, n. 6, p. H2337-H2343, 2006.

YAMANOUYE, N.; BRITTO, L. R. G.; CARNEIRO, S. M.; MARKUS, R. P. Control of venom production and secretion by sympathetic outflow in the snake *Bothrops jararaca*. **J. Exp. Biol.**, v. 200, n. 19, p. 2547-2556, 1997.

YAMANOUYE, N.; CARNEIRO, S. M.; SCRIVANO, C. N.; MARKUS, R. P. Characterization of β -adrenoceptors responsible for venom production in the venom gland of the snake (*Bothrops jararaca*). **Life Sci.**, v. 67, n. 3, p. 217-226, 2000.

YAMAZAKI, Y.; MORITA, T. Structure and function of snake venom cysteine-rich secretory proteins. **Toxicon**, v. 44, n. 3, p. 227-231, 2004.

YEH, C. K.; GHOSH, P. M.; DANG, H.; LIU, Q.; LIN, A. L.; ZHANG, B. X.; KATZ, M. S. Beta-adrenergic-responsive activation of extracellular signal-regulated protein kinases in salivary cells: role of epidermal growth factor receptor and cAMP. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 288, n. 6, p. c1357-1366, 2005.

YEH, C. K.; CHANDRASEKAR, B.; LIN, A. L.; DANG, H.; KAMAT, A.; ZHU, B.; KATZ, M. S. Cellular signals underlying β -adrenergic receptor mediated salivary gland enlargement. **Differentiation**, v. 83, n. 1, p. 68-76, 2012.

ZABLITH, M. B. **Vias de sinalização desencadeadas pela estimulação do adrenoceptor β em células secretoras da glândula de veneno da serpente *Bothrops jararaca***. 2007. 78 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

ZAGO, D. A. **Estudo morfológico e histoquímico de glândulas salivares relacionadas com a evolução da função venenosa nos ofídios**. 1971. 69 f. Tese (Doutorado em Histologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1971.

ZELANIS, A.; TASHIMA, A. K.; PINTO, A. F.; LEME, A.F.; STUGINSKI, D. R.; FURTADO, M. F.; SHERMAN, N. E.; HO, P. L.; FOX, J. W.; SERRANO, S. M. *Bothrops jararaca* venom proteome rearrangement upon neonate to adult transition. **Proteomics**, v. 11, n. 21, p. 4218-4242, 2011.

APÊNDICE A

APÊNDICE A- Proteínas identificadas dos *spots* específicos de gel 2-DE das glândulas de veneno da serpente *Bothrops jararaca* no estágio quiescente.

Nº <i>Spot</i> 0 dia	Proteína	Número acesso	Proteína -10lgP	Cobertura %	Peptídeo	Organismo	Localização celular	Processo biológico
1*	Similar to GRP94	149637905	382.14	5	4	Ornithorhynchus anatinus	Retículo endoplasmático	Protein folding, Anti-apoptosis
2*	78 kDa glucose regulated protein	47085775	95.87	13	6	Danio rerio	Retículo endoplasmático	ER overload response
	HSP70	63146078	104.86	14	7	Oxyuranus scutellatus	Citoplasma	Stress response
3#	Ecto-5'-nucleotidase	211926756	77.68	9	4	Gloydius b. brevicaudus	Membrana	Nucleotide catabolic process
4*	HSP70	63146078	104.86	14	7	Oxyuranus scutellatus	Citoplasma	Stress response
5*	78 kDa glucose regulated protein	47085775	95.87	13	6	Danio rerio	Retículo endoplasmático	ER overload response
	HSP70	63146078	104.86	14	7	Oxyuranus scutellatus	Citoplasma	Stress response
6*	Calreticulin	44969651	1539.71	8	5	Gallus gallus	Retículo endoplasmático	Protein folding
7*	Calreticulin	387014936	79.96			Crotalus admanteus	Retículo endoplasmático	Protein folding
8*	Putative calreticulin variant 2	197129213	582.99	10	2	Taeniopygia guttata	Retículo endoplasmático	Protein folding
	Zinc metalloproteinase-disintegrin BITM06A	82214993	122.22	21	12	Bothrops insularis	Secretada - PIII	Proteolysis
9*	Chain A, The three dimensional structure of Bothropasin	253722676	1045.59	7	2	Bothrops jararaca	Secretada - PIII	Cell adhesion
	Protein disulfide isomerase	63146076	892.07	6	2	Oxyuranus scutellatus	Retículo endoplasmático	Homeostasis, Metabolic and apoptotic process
10*	L-amino-acid oxidase	195927838	3233.06	15	8	Bothropoides pauloensis	Secretada - LAAO	Apoptosis, Cytolysis, Hemolysis
11#	Protein disulfide isomerase A6	327261299	150.07	46	7	Anolis carolinensis	Retículo endoplasmático	Homeostasis, Metabolic and apoptotic process
	Glutaminyl-peptide cyclotransferase	82121485	79.60	18	4	Bothrops jararaca	Secretada	Proteolysis
	HSP70	63146078	113.32	10	6	Oxyuranus scutellatus	Citoplasma	Stress response

APÊNDICE A- Proteínas identificadas dos *spots* específicos de gel 2-DE das glândulas de veneno da serpente *Bothrops jararaca* no estágio quiescente.

(continuação)								
N° <i>Spot</i> 0 dia	Proteína	Número acesso	Proteína -10lgP	Cobertura %	Peptídeo	Organismo	Localização celular	Processo biológico
12*	L-amino acid oxidase	347602324	74.93	10	5	Bothropoides pauloensis	Secretada - LAAO	Apoptosis, Cytolysis, Hemolysis
13#	Protein disulfide isomerase A6	327261299	162.90	43	8	Anolis carolinensis	Retículo endoplasmático	Homeostasis, Metabolic and apoptotic process
	ATP synthase subunit beta, mitochondrial-like	327264485	112.53	19	4	Meleagris gallopavo	Mitocôndria	ATP synthesis, Transport
14#	Protein disulfide isomerase A6	327261299	173.59	51	11	Anolis carolinensis	Retículo endoplasmático	Homeostasis, Metabolic and apoptotic process
	Zinc metalloproteinase-disintegrin	82197476	121.35	14	7	Bothrops insularis	Secretada - PII	Cell adhesion
	ATP synthase subunit beta, mitochondrial-like	327264485	102.71	19	4	Meleagris gallopavo	Mitocôndria	ATP synthesis, Transport
15#	Protein disulfide isomerase A6	327261299	150.07	46	7	Anolis carolinensis	Retículo endoplasmático	Homeostasis, Metabolic and apoptotic process
	Glutaminyl-peptide cyclotransferase	82121485	79.60	18	4	Bothrops jararaca	Secretada - GC	Proteolysis
	HSP70	63146078	113.32	10	6	Oxyuranus scutellatus	Citoplasma	Stress response
16#	Zinc metalloproteinase disintegrin BITM06A	82214993	112.33	24	9	Bothrops insularis	Secretada - PIII	Proteolysis
	Precursor Protein disulfide isomerase A3-precursor	387017522	279.09	26	5	Crotalus adamanteus	Retículo endoplasmático	Homeostasis, Metabolic and apoptotic process
17#	Chain A, The three dimensional structure of Bothropasin	253722676	511.33	6	2	Bothrops jararaca	Secretada - PIII	Cell adhesion
	Precursor Protein disulfide isomerase A3-precursor	387017522	304.29	33	6	Crotalus adamanteus	Retículo endoplasmático	Homeostasis, Metabolic and apoptotic process
18#	Precursor Protein disulfide isomerase A3-precursor	387017522	335.26	33	7	Crotalus adamanteus	Retículo endoplasmático	Homeostasis, Metabolic and apoptotic process

APÊNDICE A- Proteínas identificadas dos *spots* específicos de gel 2-DE das glândulas de veneno da serpente *Bothrops jararaca* no estágio quiescente.

(continuação)

N° <i>Spot</i> 0 dia	Proteína	Número acesso	Proteína -10lgP	Cobertura %	Peptídeo	Organismo	Localização celular	Processo biológico
	Chain B, The three dimensional structure of Bothropasin	209870468	55.15	4	1	Bothrops jararaca	Secretada - PIII	Proteolysis
19#	Vascular Apoptosis-Inducing Protein- 1	82220669	60.90	6	2	Crotalus atrox	Secretada - PIII	Apoptosis
	ATP Synthase subunit alpha, mitochondrial-like	327259463	100.99	18	5	Meleagris gallopavo	Mitocôndria	ATP synthesis, Transport
20#	Zinc metalloprotease-disintegrin halysase	82211845	126.83	11	8	Gloydius halys	Secretada - PIII	Apoptosis
21*	Vascular Apoptosis-Inducing Protein- 1	82220669	60.90	6	2	Crotalus atrox	Secretada - PIII	Apoptosis, Cell adhesion
22*	Beta actin	52078486	1031.62	19	3	Oxyuranus scutellatus	Citoplasma	Structural element, organization
23*	Beta actin	296434064	154.95	20	4	Gloydius brevicaudus	Citoplasma	Structural element, organization
	Actin, alpha skeletal muscle	67462115	181.97	16	5	Atractaspis microlepidota	Citoplasma	Skeletal muscle fiber development
24*	Beta-actin	52078486	1015.64	19	3	Oxyuranus scutellatus	Citoplasma	Structural element, organization
	Actin, alpha skeletal muscle	67462115	1015.64	9	3	Atractaspis microlepidota	Citoplasma	Skeletal muscle fiber development
25#	Venom serine protease BthaT	82173559	83.07	14	3	Bothrops alternatus	Secretada - SVSP ácido	Proteolysis
	Thrombin-like enzyme bothrombin	14285806	92.65	16	4	Bothrops jararaca	Secretada - SVSP ácido	Proteolysis
26#	Venom Serine protease BthaTL	82173559	816.65	12	3	Bothrops alternatus	Secretada - SVSP ácido	Proteolysis
	Thrombin-like enzyme bothrombin	14285806	121.02	45	11	Bothrops jararaca	Secretada - SVSP ácido	Proteolysis
27#	Thrombin-like enzyme bothrombin	14285806	65.44	16	4	Bothrops jararaca	Secretada - SVSP ácido	Proteolysis
	Venom Serine protease BthaTL	82173559	849.41	6	2	Bothrops alternatus	Secretada - SVSP ácido	Proteolysis

APÊNDICE A- Proteínas identificadas dos *spots* específicos de gel 2-DE das glândulas de veneno da serpente *Bothrops jararaca* no estágio quiescente.

(continuação)

N° <i>Spot</i> 0 dia	Proteína	Número acesso	Proteína -10lgP	Cobertura %	Peptídeo	Organismo	Localização celular	Processo biológico
28*	Venom serine proteinase HS112	82233396	892.07	13	2	Bothrops jararaca	Secretada - SVSP neutro	Proteolysis
	Venom Serine protease BthaTL	82173559	535.32	6	2	Bothrops alternatus	Secretada - SVSP neutro	Proteolysis
29*	Thrombin-like enzyme bothrombin	14285806	61.00	13	3	Bothrops jararaca	Secretada - SVSP neutro	Proteolysis
	Serine proteinase BITS01A	82244284	77.30	7	2	Bothrops insularis	Secretada - SVSP neutro	Proteolysis
30*	Venom serine proteinase HS114	82233395	1108.63	19	4	Bothrops jararaca	Secretada - SVSP neutro	Proteolysis
31#	Thrombin-like enzyme	123883734	93.69	18	6	Lachesis stenophrys	Secretada - SVSP neutro	Proteolysis
	Venom serine proteinase HS112	82233396	892.07	13	2	Bothrops jararaca	Secretada - SVSP neutro	Proteolysis
32*	Annexin A2-like isoform 1	327284494	89.76	18	5	Anolis carolinensis	Secretada	Fibrinolysis
33*	Annexin A2-like isoform 1	327284494	89.76	18	5	Anolis carolinensis	Secretada	Fibrinolysis
	Venom serine proteinase HS112	82233396	73.20	35	7	Bothrops jararaca	Secretada - SVSP básico	Proteolysis
	Thrombin-like enzyme bothrombin	14285806	61.03	32	4	Bothrops jararaca	Secretada - SVSP básico	Proteolysis
34*	Annexin A2-like isoform 1	327284494	89.76	18	5	Anolis carolinensis	Secretada	Fibrinolysis
35#	C-type lectin BiL	82126834	61.67	32	4	Bothrops insularis	Secretada - CTL	Hemagglutinating activity
	Bothroinsularin subunit alpha	229621684	117.25	61	8	Bothrops insularis	Secretada - CTL	Blood coagulation cascade inhibiting
36*	Venom serine protease homolog	82240434	100.37	24	6	Bothrops jararacussu	Secretada - SVSP básico	Proteolysis
37*	Venom serine protease homolog	82240434	88.80	24	6	Bothrops jararacussu	Secretada - SVSP básico	Proteolysis
38#	Venom serine protease homolog	82240434	81.24	19	6	Bothrops jararacussu	Secretada - SVSP ácido	Proteolysis
	Venom plasminogen activator LV-PA	123891732	104.18	24	10	Lachesis muta muta	Secretada - SVSP ácido	Regulation of blood pressure
39#	Venom serine protease homolog	82240434	81.24	19	6	Bothrops jararacussu	Secretada - SVSP ácido	Proteolysis
	Tropomyosin beta chain isoform 1, partial	380793471	131.53	40	14	Macaca mulatta	Citoplasma	Muscle contraction
40*	Venom serine proteinase HS114	82233395	1611.23	19	4	Bothrops jararaca	Secretada - SVSP ácido	Proteolysis

APÊNDICE A- Proteínas identificadas dos *spots* específicos de gel 2-DE das glândulas de veneno da serpente *Bothrops jararaca* no estágio quiescente.

(continuação)

N° <i>Spot</i> 0 dia	Proteína	Número acesso	Proteína -10lgP	Cobertura %	Peptídeo	Organismo	Localização celular	Processo biológico
41*	Venom serine proteinase HS114	82233395	1119.79	19	4	Bothrops jararaca	Secretada - SVSP ácido	Proteolysis
42*	Venom serine protease BthaTL	82173559	164.20	49	27	Bothrops alternatus	Secretada - SVSP ácido	Proteolysis
	Thrombin-like enzyme bothrombin	14285806	104.97	32	9	Bothrops jararaca	Secretada - SVSP ácido	Proteolysis
43*	Cysteine-rich secretory protein Ch-CRPIb	190195315	67.78	18	3	Crotalus horridus	Secretada - CRISP	-
44*	Cysteine-rich secretory protein Ch-CRPIb	190195315	67.78	18	3	Crotalus horridus	Secretada - CRISP	-
45*	14-3-3 protein theta-like	327261224	52.60	10	2	Anolis carolinensis	Citoplasma	Protein targeting, Signal transduction
46*	Zinc metalloproteinase/disintegrin contains: metalloproteinase jararafibrase-2	82219563	1037.21	9	2	Bothrops jararaca	Secretada - PII	Cell adhesion
47*	Zinc metalloproteinase BnP2	172044592	48.22	32	2	Bothropoides pauloensis	Secretada - PI	Apoptosis
48#	Triosephosphate isomerase 1	90200404	61.02	17	3	Sus scrofa Xiphophorus maculatus	Citoplasma	Gluconeogenesis, Glucolysis
49*	Glutathione S-transferase Mu 1- like	327270916	43.41	8	2	Anolis carolinensis	Citoplasma	Glutathione metabolic process
50#	Venom serine protease homolog	82240434	88.80	24	6	Bothrops jararacussu	Secretada - SVSP ácido	Proteólises
51#	Nucleoside diphosphate kinase	20376446	164.41	66	10	Bothrops insularis	Citoplasma	Nucleotide metabolism
	Zinc metalloproteinase BITM02A	82214994	107.22	19	6	Bothrops insularis	Secretada - PI	Proteolysis
	Similar to tyrosine 3/tryptophan 5 -monooxygenase activation protein, zeta polypeptide isoform5	73974186	96.63	32	5	Canis lúpus familiaris	Mitocôndria	Negative regulation of transcription, Signal transduction
52#	L-amino acid oxidase precursor	347602324	138.12	15	9	Bothropoides pauloensis	Secretada - LAAO	Apoptosis, Cytolysis, Hemolysis

APÊNDICE A- Proteínas identificadas dos *spots* específicos de gel 2-DE das glândulas de veneno da serpente *Bothrops jararaca* no estágio quiescente.

(continuação)

N° <i>Spot</i> 0 dia	Proteína	Número acesso	Proteína -10lgP	Cobertura %	Peptídeo	Organismo	Localização celular	Processo biológico
	Cysteine rich secretory protein	358801543	84.16	42	3	Crolalus oreganus helleri	Secretada - CRISP	-
53*	Phospholipase A2 2	292630844	261.88	18	3	Bothrops asper	Secretada - PLA ₂	Inflammatory response
54*	Glycoprotein IB-binding protein subunit α	82116886	94.82	35	5	Bothrops jararaca	Secretada - CTL	Hemostasis impairing toxin Platelet aggregation inhibiting toxin
55*	Glycoprotein IB-binding protein subunit α	82116886	94.82	35	5	Bothrops jararaca	Secretada - CTL	Hemostasis impairing toxin, Platelet aggregation inhibiting toxin
56*	Glycoprotein IB-binding protein subunit α	82116886	84.08	35	5	Bothrops jararaca	Secretada - CTL	Hemostasis impairing toxin Platelet aggregation inhibiting toxin
57*	Glycoprotein IB-binding protein subunit α	82116886	84.08	35	5	Bothrops jararaca	Secretada - CTL	Hemostasis impairing toxin Platelet aggregation inhibiting toxin
58*	Glycoprotein IB-binding protein subunit α	82116887	94.82	35	5	Bothrops jararaca	Secretada - CTL	Hemostasis impairing toxin Platelet aggregation inhibiting toxin
59*	Annexin A2	168983833	731.52	18	3	Mus musculus	Secretada	Protein folding
	Venom gland cyclophilin	38374146	120.56	64	11	Bitis gabonica	Citoplasma	
60#	Venom gland cyclophilin	38374146	212.95	9	2	Bitis gabonica	Citoplasma	Protein folding
61#	Phospholipase A2 2	158518414	146.95	72	10	Bothrops insularis	Secretada - PLA ₂	Inflammatory response
62*	C-type lectin BiL	82126834	2220.46	34	7	Bothrops insularis	Secretada - CTL	Hemagglutinating activity
	Bothroinsularin subunit alpha	229621684	1050.11	25	3	Bothrops insularis	Secretada - CTL	Blood coagulation cascade inhibiting
63*	C-type lectin BiL	82126834	61.67	32	4	Bothrops insularis	Secretada - CTL	Hemagglutinating activity
64#	Glycoprotein IB-binding protein	82116883	76.61	35	5	Bothrops jararaca	Secretada - CTL	Hemostasis impairing toxin

APÊNDICE A- Proteínas identificadas dos *spots* específicos de gel 2-DE das glândulas de veneno da serpente *Bothrops jararaca* no estágio quiescente.

								(continuação)
N° <i>Spot</i> 0 dia	Proteína	Número acesso	Proteína -10lgP	Cobertura %	Peptídeo	Organismo	Localização celular	Processo biológico
	subunit β							Platelet aggregation inhibiting toxin
	Disintegrin jarastatin	123905785	99.32	58	8	Bothrops jararaca	Secretada	Apoptosis, cell adhesion, chemotaxis
65#	Glycoprotein IB-binding protein subunit β	82116883	892.07	20	2	Bothrops jararaca	Secretada - CTL	Hemostasis impairing toxin Platelet aggregation inhibiting toxin
	Bothroinsularin subunit beta	229621685	57.20	22	2	Bothrops insularis	Secretada - CTL	Blood coagulation cascade inhibiting
66*	Glycoprotein IB-binding protein subunit β	82116883	70.07	35	3	Bothrops jararaca	Secretada - CTL	Hemostasis impairing toxin Platelet aggregation inhibiting toxin
67*	Glycoprotein IB-binding protein subunit β	82116883	70.07	35	3	Bothrops jararaca	Secretada - CTL	Hemostasis impairing toxin Platelet aggregation inhibiting toxin
68*	Glycoprotein IB-binding protein subunit β	82116883	76.61	35	3	Bothrops jararaca	Secretada - CTL	Hemostasis impairing toxin Platelet aggregation inhibiting toxin
69*	Glycoprotein IB-binding protein subunit β	82116883	70.07	35	3	Bothrops jararaca	Secretada - CTL	Hemostasis impairing toxin Platelet aggregation inhibiting toxin
70#	Coagulation factor IX/factor X-binding protein subunit B	2851436	137.82	58	9	Trimeresurus flavoviridis	Secretada - CTL	Blood coagulation cascade inhibiting toxin
	Glycoprotein IB-binding protein subunit β	82116883	121.92	61	3	Bothrops jararaca	Secretada - CTL	Hemostasis impairing toxin Platelet aggregation inhibiting toxin

APÊNDICE A- Proteínas identificadas dos *spots* específicos de gel 2-DE das glândulas de veneno da serpente *Bothrops jararaca* no estágio quiescente.

(continuação)

N° <i>Spot</i> 0 dia	Proteína	Número acesso	Proteína -10lgP	Cobertura %	Peptídeo	Organismo	Localização celular	Processo biológico
71#	Coagulation factor IX/ factor X-binding protein subunit beta	82116580	43.33	50	1	Bothrops jararaca	Secretada - CTL	<u>Blood coagulation cascade</u> <u>inhibiting toxin</u>
	Glycoprotein IB-binding protein subunit β	82116883	93.69	42	4	Bothrops jararaca	Secretada - CTL	<u>Hemostasis impairing toxin</u> <u>Platelet aggregation inhibiting</u> <u>toxin</u>
72#	Snake venom vascular endothelial growth factor toxin	48428663	32.71	13	1	Bothrops jararaca	Secretada - svVEGF	Angiogenesis, Differentiation

Nota: (*) Dados obtidos no banco de dados Metazoa nr 19082011 e Proteopeptidome_NCBInr_29042012 do MALDI-TOF/TOF

(#) Dados obtidos no banco de dados Metazoa nr 19082011 e Proteopeptidome_NCBInr_29042012 do Orbitrap

Retículo endoplasmático (ER), Lectinas tipo C (CTL), Serinoproteinases (SVSP), Proteínas secretadas ricas em cisteína (CRISP), Classes de Metaloproteinases (PI, PII, PIII), Fosfolipases A2 (PLA2), L-aminoácido oxidase (LAO), Glutaminil Ciclotransferase, (GC), Fator de crescimento do endotélio vascular de serpente (svVEGF).

APÊNDICE B

APÊNDICE B - Proteínas identificadas dos *spots* específicos do gel 2-DE das glândulas de veneno da serpente *Bothrops jararaca* no estágio ativado 4 dias após a extração de veneno.

Nº <i>Spot</i> 4 dias	Proteína	Número acesso	Proteína -10lgP	Cobertura %	Peptídeo	Organismo	Localização Celular	Processo Biológico
1*	Similar to GRP94	149637905	1513.94	8	7	Ornithorhynchus anatinus	Retículo endoplasmático	Protein folding, Anti-apoptosis
2*	Botroxtatin-1	205278803	540.72	7	2	Bothrops jararaca	Secretada - PIII	-
3#	Calreticulin	44969651	140.41	45	20	Gallus gallus	Retículo endoplasmático	Protein folding
	Anti-hemorrhagic fator BJ46a	48428681	96.88	33	10	Bothrops jararaca	Secretada	Negative regulation of proteolysis
4*	78 kDa glucose regulated protein	47085775	2054.93	11	5	Danio rerio	Retículo endoplasmático	ER overload response
5*	Similar heat shock protein isoform 2	126309857	691.16	6	3	Monodelphis domestica	Citoplasma	Stress response
	Zinc metalloproteinase BnP2	172044592	222.23	29	2	Bothropoides pauloensis	Secretada - PI	Apoptosis
6#	HSP70	63146078	161.76	44	21	Oxyuranus scutellatus	Citoplasma	Stress response
	L-amino acid oxidase precursor	195927838	146.12	34	18	Bothropoides pauloensis	Secretada - LAAO	Apoptosis, Cytolysis,
	Ecto-5'-nucleotidase	211926756	112.78	19	9	Gloydus b. brevicaudus	Membrana	Hemolysis Nucleotide catabolic process
7#	L-amino-acid oxidase precursor	195927838	175.77	37	18	Bothropoides pauloensis	Secretada - LAAO	Apoptosis, Cytolysis,
	Ecto-5-nucleotidase	211926754	164.45	30	14	Gloydus b. brevicaudus	Membrana	Hemolysis
	HSP70	63146078	141.88	20	10	Oxyuranus scutellatus	Citoplasma	Nucleotide catabolic process Stress response
8*	L-amino-acid oxidase	82127389	690.10	6	3	Bothrops moojeni	Secretada - LAAO	Apoptosis, Cytolysis, Hemolysis
9*	L-amino-acid oxidase	82127389	1159.00	9	4	Bothrops moojeni	Secretada - LAAO	Apoptosis, Cytolysis, Hemolysis
10*	L-amino-acid oxidase	82127389	742.02	7	3	Bothrops moojeni	Secretada - LAAO	Apoptosis, Cytolysis, Hemolysis
11#	L-amino-acid oxidase	82127389	246.58	4	2	Bothrops moojeni	Secretada - LAAO	Apoptosis, Cytolysis, Hemolysis

APÊNDICE B - Proteínas identificadas dos *spots* específicos do gel 2-DE das glândulas de veneno da serpente *Bothrops jararaca* no estágio ativado 4 dias após a extração de veneno.

(continuação)

Nº <i>Spot</i> 4 dias	Proteína	Número acesso	Proteína -10lgP	Cobertura %	Peptídeo	Organismo	Localização Celular	Processo Biológico
12#	L-amino-acid oxidase	82127389	1115.92	8	4	Bothrops moojeni	Secretada - LAAO	Apoptosis, Cytolysis, Hemolysis
13#	Protein disulfide isomerase	63146076	1854.11	12	5	Oxyuranus scutellatus	Retículo endoplasmático	Homeostasis, Metabolic and apoptotic process
	Ant-ihemorrhagic fator BJ46a	48428681	109.5	29	6	Bothrops jararaca	Secretada	Negative regulation of proteolysis
14#	L-amino-acid oxidase	82127389	1501.57	11	5	Bothrops moojeni	Secretada - LAAO	Apoptosis, Cytolysis, Hemolysis
	Protein disulfide isomerase	63146076	211.54	48	27	Oxyuranus scutellatus	Retículo endoplasmático	Homeostasis, Metabolic and apoptotic process
	Anti-hemorrhagic fator BJ46a	48428681	187.67	47	24	Bothrops jararaca	Secretada	Negative regulation of proteolysis
15*	Protein disulfide isomerase family A, member 3	148226947	238.30	3	2	Xenopus laevis	Retículo endoplasmático	Homeostasis, Metabolic and apoptotic process
16*	Protein disulfide isomerase family A, member 3	148226947	555.50	3	2	Xenopus laevis	Retículo endoplasmático	Homeostasis, Metabolic and apoptotic process
17#	Protein disulfide isomerase family A3-like	327288524	108.97	20	8	Anolis carolinensis	Retículo endoplasmático	Homeostasis, Metabolic and apoptotic process
	L-amino acid oxidase	82127389	102.84	22	8	Bothrops moojeni	Secretada - LAAO	Apoptosis, Cytolysis, Hemolysis
18*	Protein disulfide isomerase family A, member 3	148226947	554.69	3	2	Xenopus laevis	Retículo endoplasmático	Homeostasis, Metabolic and apoptotic process
19#	Protein disulfide isomerase associated 3	149023097	96.58	13	4	Rattus norvegicus	Retículo endoplasmático	Homeostasis, Metabolic and apoptotic process
	L-amino acid oxidase precursor	195927838	87.54	20	5	Bothropoides pauloensis	Secretada - LAAO	Apoptosis, Cytolysis, Hemolysis

APÊNDICE B - Proteínas identificadas dos *spots* específicos do gel 2-DE das glândulas de veneno da serpente *Bothrops jararaca* no estágio ativado 4 dias após a extração de veneno.

(continuação)

Nº <i>Spot</i> 4 dias	Proteína	Número acesso	Proteína -10lgP	Cobertura %	Peptídeo	Organismo	Localização Celular	Processo Biológico
20#	Venom serine proteinase HS114	82233395	80.28	34	4	Bothrops jararaca	Secretada - SVSP básico	Proteolysis
	Zinc metalloprotease-disintegrin halysase	82211845	112.78	15	10	Gloydius halys	Secretada - PIII	Apoptosis
21#	Vimentin	17386168	138.38	25	12	Daboia russellii	Citoesqueleto	Intermediate filament organization
	Protein disulfide isomerase A6-like	327261229	78.75	20	5	Anolis carolinensis	Retículo endoplasmático	Homeostasis, Metabolic and apoptotic process
22#	Anti-hemorrhagic fator BJ46a	48428681	116.81	26	8	Bothrops jararaca	Secretada	Negative regulation of proteolysis
23#	Gamma enolase	197101563	196.25	9	2	Pongo abelii	Citoplasma	Glycolysis
24*	Gamma enolase	197101563	243.90	9	2	Pongo abelii	Citoplasma	Glycolysis
25#	Vimentin	17386168	186.95	42	20	Daboia russellii	Citoesqueleto	Intermediate filament organization
	Actin, alpha skeletal muscle	67462115	156.53	42	14	Atractaspis microlepidota	Citoesqueleto	Structural element, organization
	Protein disulfide isomerase	63146076	145.21	23	14	Oxyuranus scutellatus	Retículo endoplasmático	Homeostasis, Metabolic and apoptotic process
26*	Beta actin	296434064	1340.60	19	3	Gloydius brevicaudus	Citoesqueleto	Structural element, organization
	Actin, alpha skeletal muscle	67462115	1003.24	9	3	Atractaspis microlepidota	Citoesqueleto	Skeletal muscle fiber development
27*	Beta actin	49868	1974.69	23	6	Mus musculus	Citoesqueleto	Structural element, organization
28*	Gamma actin	809561	1694.62	22	6	Mus musculus	Citoesqueleto	Structural element,
	Beta actin	49868	1692.76	23	6	Mus musculus	Citoesqueleto	organization

APÊNDICE B - Proteínas identificadas dos *spots* específicos do gel 2-DE das glândulas de veneno da serpente *Bothrops jararaca* no estágio ativado 4 dias após a extração de veneno.

(continuação)

Nº <i>Spot</i> 4 dias	Proteína	Número acesso	Proteína -10lgP	Cobertura %	Peptídeo	Organismo	Localização Celular	Processo Biológico
29*	Beta actin	49868	1714.93	23	6	Mus musculus	Citoesqueleto	Structural element, organization
	Alpha muscle actin	1703139	633.61	11	3	Styela clava	Citoesqueleto	Skeletal muscle fiber development
30*	Beta actin	296434064	1340.60	19	3	Gloydius brevicaudus	Citoesqueleto	Structural element, organization
	Actin, alpha skeletal muscle	67462115	1128.07	13	4	Atractaspis microlepidota	Citoesqueleto	organization
31*	Citrate synthase Mitochondrial	116243059	834.26	12	5	Amblyrhynchus cristatus	Mitocôndria	Cellular carbohydrate metabolic process
	Isocitrate dehydrogenase 1	52345632	524.85	5	2	Xenopus tropicalis	Citoplasma	Isocitrate metabolic process
32#	Medium-chain specific acyl-coA dehydrogenase, Mitochondrial-like	377276681	152.88	37	8	Macropus eugenii	Mitocôndria	Lipid metabolism
	Actin, alpha skeletal muscle	67462115	101.76	19	6	Atractaspis microlepidota	Citoesqueleto	Skeletal muscle fiber development
33#	Venom serine proteinase HS114	82233395	124.03	51	10	Bothrops jararaca	Secretada - SVSP ácido	Proteolysis
	Tropomyosin beta chain isoform 2	47519616	97.70	23	5	Homo sapiens	Citoesqueleto	Muscle contraction
	Plasminogen-activating proteinase	123891732	61.97	31	3	Lachesis muta muta	Secretada - SVSP ácido	Proteolysis, Regulation blood pressure
34*	Venom serine proteinase HS114	82233395	1340.60	22	3	Bothrops jararaca	Secretada - SVSP ácido	Proteolysis
	Cytoskeletal tropomyosin	833603	80.77	8	2	Coturnix coturnix	Citoesqueleto	Muscle contraction
35#	Venom serine proteinase HS114	82233395	2068.66	34	6	Bothrops jararaca	Secretada - SVSP ácido	Proteolysis
36#	Venom serine proteinase HS114	82233395	1585.41	29	5	Bothrops jararaca	Secretada - SVSP ácido	Proteolysis
	Tropomyosion-1 alpha chain	221219564	102.41	28	11	Salmo salar	Citoesqueleto	Muscle contraction
37#	Venom serine proteinase HS114	82233395	2063.65	69	24	Bothrops jararaca	Secretada - SVSP ácido	Proteolysis
	Plasminogen-activating proteinase	123891732	116.79	30	15	Lachesis muta muta	Secretada - SVSP ácido	Proteolysis, Regulation blood pressure

APÊNDICE B - Proteínas identificadas dos *spots* específicos do gel 2-DE das glândulas de veneno da serpente *Bothrops jararaca* no estágio ativado 4 dias após a extração de veneno.

(continuação)

Nº <i>Spot</i> 4 dias	Proteína	Número acesso	Proteína -10lgP	Cobertura %	Peptídeo	Organismo	Localização Celular	Processo Biológico
38#	Protein disulfide isomerase	63146076	154.32	44	17	Oxyuranus scutellatus	Retículo endoplasmático	Cell Homeostasis, Metabolic and apoptotic process
	Venom serine proteinase-like	123883733	107.16	42	15	Bothrops asper	Secretada - SVSP ácido	Proteolysis
39*	Venom serine proteinase HS114	8223395	1165.17	22	4	Bothrops jararaca	Secretada - SVSP ácido	Proteolysis
40#	Lipocortin V	2981437	74.50	15	5	Rattus norvegicus	Citoplasma	Blood coagulation, Homeostasis
	Venom serine proteinase HS114	8223395	110.81	51	9	Bothrops jararaca	Secretada - SVSP ácido	Proteolysis
	Plasminogen-activating proteinase	123891732	103.92	33	10	Lachesis muta	Secretada - SVSP ácido	Proteolysis, Regulation blood pressure
41*	Annexin A2	45382533	1339.47	15	6	Gallus gallus	Secretada	Fibrinolysis
42*	Annexin A2	45382533	1165.11	12	5	Gallus gallus	Secretada	Fibrinolysis
43#	Annexin A2	45382533	1025.90	12	4	Gallus gallus	Secretada	Fibrinolysis
	Similar to gag polyprotein	149410850	646.82	9	3	Ornithorhynchus anatinus	Membrana	Structural molecule activity
	Venom serine protease homolog	82240434	94.17	17	4	Bothrops jararacussu	Secretada - SVSP básico	Metabolic process
44*	Cysteine rich secretory protein Da-CRPb	190195339	892.07	12	2	Deinagkistrodon acutus	Secretada - CRISP	-
45*	Cysteine rich secretory protein Da-CRPb	190195339	1340.60	16	3	Deinagkistrodon acutus	Secretada - CRISP	
46*	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	194375063	1013.51	15	3	Homo sapiens	Membrana	Adenylate cyclase-activating G-protein coupled receptor pathway
47*	Voltage-dependent anion selective channel protein 2-like	327276833	1340.60	13	3	Anolis carolinensis	Mitocôndria	Ion transport
48#	Plasminogen activator Haly-HA	156630858	121.96	15	9	Gloydus brevicaudus	Secretada - SVSP neutro	Proteolysis, Regulation blood pressure
	Serine proteinase isoform 4	109254944	115.92	16	8	Sistrurus catenatus	Secretada - SVSP neutro	Proteolysis

APÊNDICE B - Proteínas identificadas dos *spots* específicos do gel 2-DE das glândulas de veneno da serpente *Bothrops jararaca* no estágio ativado 4 dias após a extração de veneno.

(continuação)

Nº <i>Spot</i> 4 dias	Proteína	Número acesso	Proteína -10lgP	Cobertura %	Peptídeo	Organismo	Localização Celular	Processo Biológico
						edwardsi		
49#	Proteasome subunit alpha type-6-like C-type lectin BiL	327263622 82126834	79.54 67.18	23 30	4 4	Anolis carolinensis Bothrops insularis	Citoplasma Secretada - CTL	Ubiquitin-dependent protein catabolic process Hemagglutinating activity
50#	Cysteine-rich secretory protein Da-CRPb	190195339	65.40	28	3	Deinagkistrodon acutus	Secretada - CRISP	-
51#	Protein disulfide isoemrase Gluthatione S-transferase Mu 1-like	63146076 327270920	151.12 91.53	40 32	16 5	Oxyuranus scutellatus Anolis carolinensis	Retículo endoplasmático Citoplasma	Homeostasis, Metabolic and apoptotic process Gluthatione metabolic process
52*	Gamma phospholipase A2 inhibitor Zinc metalloproteinase BnP2	157885066 172044592	1444.23 566.31	22 29	4 2	Bothrops jararaca Bothropoides pauloensis	Secretada - PLI Secretada - PI	Regulation of phospholipase A2 activity Apoptosis
53#	Zinc metalloproteinase-disintegrin HF3	82219706	100.51	19	8	Bothrops jararaca	Secretada - PIHI	Proteolysis
54*	Zinc metalloproteinase BnP2	172044592	966.29	29	2	Bothropoides pauloensis	Secretada - PI	Apoptosis
55*	Zinc metalloproteinase bothrojaractivase	187655925	551.37	37	2	Bothrops jararaca	Secretada - PI	Proteolysis
56*	Zinc metalloproteinase bothrojaractivase	187655925	524.92	37	2	Bothrops jararaca	Secretada - PI	Proteolysis
57#	Zinc metalloproteinase BnP2	172044592	133.65	93	9	Bothropoides pauloensis	Secretada - PI	Apoptosis
58#	Zinc metalloproteinase bothrojaractivase Proteasome-like protein	187655925 71725697	550.15 97.36	37 25	2 4	Bothrops jararaca Oxyuranus scutellatus	Secretada - PI Citoplasma	Proteolysis Ubiquitin-dependent protein catabolic process

APÊNDICE B - Proteínas identificadas dos *spots* específicos do gel 2-DE das glândulas de veneno da serpente *Bothrops jararaca* no estágio ativado 4 dias após a extração de veneno.

(continuação)

Nº <i>Spot</i> 4 dias	Proteína	Número acesso	Proteína -10lgP	Cobertura %	Peptídeo	Organismo	Localização Celular	Processo Biológico
59#	Alpha-type phospholipase A2 inhibitor	215275475	526.74	12	2	<i>Bothrops jararaca</i>	Secretada - PLI	Regulation of phospholipase A2 activity
60*	Alpha-type phospholipase A2 inhibitor	215275475	579.71	12	2	<i>Bothrops jararaca</i>	Secretada - PLI	Regulation of phospholipase A2 activity
61*	Translocon-associated protein-like protein	71725701	892.07	19	2	<i>Oxyuranus scutellatus</i>	Retículo endoplasmático	Cotranslational protein targeting to membrane
62#	Actin, alpha skeletal muscle	67462115	119.00	30	7	<i>Atractaspis microlepidota</i>	Citoesqueleto	Skeletal muscle fiber
	Venom gland cyclophilin	38374146	151.76	48	6	<i>Bitis gabonica</i>	Citoplasma	development Protein folding
63*	Thioredoxin domain-contain protein 12	119672905	892.07	12	2	<i>Danio rerio</i>	Citoplasma	Cell redox homeostasis
64#	Venom gland cyclophilin	38374146	200.46	67	19	<i>Bitis gabonica</i>	Citoplasma	Protein folding
65#	C-type lectin BiL	82126834	97.68	27	3	<i>Bothrops insularis</i>	Secretada - CTL	Hemagglutinating activity
66#	C-type lectin BiL	82126834	1403.99	30	6	<i>Bothrops insularis</i>	Secretada - CTL	Hemagglutinating activity
	Galactose-specific lectin	34922459	186.32	70	22	<i>Bothrops jararacussu</i>	Secretada - CTL	Hemagglutinating activity
67*	Thioredoxin	20140734	627.17	23	3	<i>Ophiophagus hannah</i>	Citoplasma	Cell redox homeostase
68#	C-type lectin BiL	82126834	1234.18	24	5	<i>Bothrops insularis</i>	Secretada - CTL	Hemagglutinating activity
	Galactose-specific lectin	34922459	143.20	87	18	<i>Bothrops jararacussu</i>	Secretada - CTL	Hemagglutinating activity
69#	C-type lectin BiL	82126834	810.60	17	4	<i>Bothrops insularis</i>	Secretada - CTL	Hemagglutinating activity
	Galactose-specific lectin	34922459	71.12	58	6	<i>Bothrops jararacussu</i>	Secretada - CTL	Hemagglutinating activity
70#	Phospholipase A2 homolog 2	17865560	135.12	57	9	<i>Bothrops moojeni</i>	Secretada - PLA ₂	Inflammatory response
	C-type lectin BiL	82126834	119.32	44	6	<i>Bothrops insularis</i>	Secretada - CTL	Hemagglutinating activity
71#	40S Ribosomal protein S12-like	293347028	97.67	21	6	<i>Rattus novergicus</i>	Citoplasma	Translation
	Bothroinsularin subunit beta	229621685	76.19	34	4	<i>Bothrops insularis</i>	Secretada - CTL	Blood coagulation cascade inhibiting

APÊNDICE B - Proteínas identificadas dos *spots* específicos do gel 2-DE das glândulas de veneno da serpente *Bothrops jararaca* no estágio ativado 4 dias após a extração de veneno.

(continuação)

Nº <i>Spot</i> 4 dias	Proteína	Número acesso	Proteína -10lgP	Cobertura %	Peptídeo	Organismo	Localização Celular	Processo Biológico
72#	Galectin-1-like	327272244	176.12	61	18	Anolis carolinensis	Secretada - CTL	Carbohydrate binding
	Venom serine proteinase HS114	82233395	99.77	22	5	Bothrops jararaca	Secretada - SVSP neutro	Proteolysis
73*	Phospholipase A2 homolog 2	17865560	128.87	62	12	Bothrops moojeni	Secretada - PLA ₂	Inflammatory response
	Ribosomal protein S15 isoform	18000277	108.09	50	6	Lapemis hardwickii	Citoplasma	Translation
74#	Cytochrome c	119388034	55.42	20	3	Crotalus atrox	Mitocôndria	Electron transport
	Venom gland cyclophilin	38374146	96.87	24	4	Bitis gabonica	Citoplasma	Protein folding
75#	Protein disulfide isomerase	63146076	128.49	32	131	Oxyuranus scutellatus	Retículo endoplasmático	Homeostasis, Metabolic and apoptotic process
	Myotoxin II precursor	7673017	74.81	25	3	Bothrops moojeni	Secretada - PLA ₂	Sodium channel inhibitor activity
76#	Phospholipase A2 homolog 2	17865560	81.39	45	4	Bothrops moojeni	Secretada - PLA ₂	Inflammatory response
77#	Protein disulfide isomerase	63146076	96.33	30	4	Oxyuranus scutellatus	Retículo endoplasmático	Homeostasis, Metabolic and apoptotic process

Nota: (*) Dados obtidos no banco de dados Metazoa nr 19082011 e Proteopeptidome_NCBInr_29042012 do MALDI-TOF/TOF

(#) Dados obtidos no banco de dados Metazoa nr 19082011 e Proteopeptidome_NCBInr_29042012 do Orbitrap

Retículo endoplasmático (ER), Lectinas tipo C (CTL), Serinoproteinases (SVSP), Proteínas secretadas ricas em cisteína (CRISP), Classe das metaloproteinases (PI, PII, PIII), Fosfolipases A2 (PLA₂), L-aminoácido oxidase (LAAO), Inibidores de Fosfolipases A2 (PLI).

APÊNDICE C

APÊNDICE C - Proteínas identificadas de *spots* específicos de gel 2-DE das glândulas de veneno da serpente *Bothrops jararaca* no estado ativado 7 dias após a extração de veneno.

Nº <i>Spot</i> 7 dias	Proteína	Número acesso	Protein -10lgP	Cobertura %	Peptídeo	Organismo	Localização Celular	Processo Biológico
1#	Endoplasmín	17865698	170.69	35	29	Sus scrofa	Retículo endoplasmático	Protein folding
	Zinc metalloproteinase-disintegrin	82214993	95.84	28	10	Bothrops insularis	Secretada - PIII	Proteolysis
	BITM06A							
2*	Zinc metalloproteinase-disintegrin bothropasin	82190823	288.30	12	5	Bothrops jararaca	Secretada - PIII	Cell adhesion
3#	Calreticulin	44969651	190.46	68	26	Gallus gallus	Retículo endoplasmático	Protein folding
	Ant-ihemorrágico fator B _j 46a	48428681	192.01	44	23	Bothrops jararaca	Secretada	Negative regulation of proteolysis
4#	Calreticulin	44969651	158.43	43	24	Gallus gallus	Retículo endoplasmático	Protein folding
	Anti-hemorrágico fator B _j 46a	48428681	147.51	41	14	Bothrops jararaca	Secretada	Negative regulation of proteolysis
5#	78 kDa glucose regulated protein	47085775	134.60	39	27	Danio rerio	Retículo endoplasmático	ER overload response
	Zinc metalloproteinase-disintegrin bothropasin	82190823	77.16	12	4	Bothrops jararaca	Secretada - PIII	Cell adhesion
6#	HSP70	63146078	183.94	46	31	Oxyuranus scutellatus	Citoplasma	Stress response
	78 kDa glucose-regulated protein	47085775	120.84	37	19	Danio rerio	Retículo endoplasmático	ER overload response
7#	HSP70	63146078	193.56	53	38	Oxyuranus scutellatus	Citoplasma	Stress response
	L-amino acid oxidase precursor	82127389	179.66	49	89	Bothrops moojeni	Secretada - LAAO	Apoptosis, Cytolysis, Hemolysis
	78 kDa glucose-regulated protein	47085775	107.34	32	15	Danio rerio	Retículo endoplasmático	ER overload response
8#	L-amino acid oxidase precursor	82127389	103.22	25	11	Bothrops moojeni	Secretada - LAAO	Apoptosis, Cytolysis, Hemolysis
	HSP70	63146078	125.95	13	7	Oxyuranus scutellatus	Citoplasma	Stress response
9#	L-amino acid oxidase precursor	195927838	185.75	39	22	Bothropoides pauloensis	Secretada - LAAO	Apoptosis, Cytolysis, Hemolysis
	Zinc metalloproteinase-disintegrin BITM02A	82214994	133.62	20	10	Bothrops insularis	Secretada - PIII	Proteolysis
10*	Zinc metalloproteinase-disintegrin	82214993	48.85	5	2	Bothrops insularis	Secretada - PIII	Cell adhesion

APÊNDICE C - Proteínas identificadas de *spots* específicos de gel 2-DE das glândulas de veneno da serpente *Bothrops jararaca* no estado ativado 7 dias após a extração de veneno.

								(continuação)
Nº <i>Spot</i> 7 dias	Proteína	Número acesso	Protein -10lgP	Cobertura %	Peptídeo	Organismo	Localização Celular	Processo Biológico
BITM06A								
11#	Metalloproteinase jararafibrase-2	82219563	177.20	58	52	Bothrops jararaca	Secretada - PII	Cell adhesion
	Protein disulfide isomerase	63146076	152.04	67	24	Oxyuranus scutellatus	Retículo endoplasmático	Homeostasis, Metabolic and apoptotic process
12#	Protein disulfide isomerase family A3	327288524	155.52	68	25	Anolis carolinensis	Retículo endoplasmático	Homeostasis, Metabolic and apoptotic process
	Metalloproteinase jararafibrase 2	82219563	147.20	43	26	Bothrops jararaca	Secretada - PII	Cell adhesion
	Vascular apoptosis-inducing protein 2A	144905068	115.13	20	13	Crotalus atrox	Secretada - PIII	Apoptosis
13#	Metalloproteinase jararafibrase-2	82219563	147.20	43	26	Bothrops jararaca	Secretada - PII	Cell adhesion
	Zinc metalloproteinase-disintegrin	82214993	133.40	35	22	Bothrops insularis	Secretada - PIII	Proteolysis
	BITM06A							
14#	Protein disulfide isomerase family A3	327288524	79.70	20	5	Anolis carolinensis	Retículo endoplasmático	Homeostasis, Metabolic and apoptotic process
	Protein disulfide isomerase family A3	327288524	183.31	26	6	Anolis carolinensis	Retículo endoplasmático	Homeostasis, Metabolic and apoptotic process
	Metalloproteinase jararafibrase 2	82219563	73.14	7	2	Bothrops jararaca	Secretada - PII	Cell adhesion
	Vascular apoptosis-inducing protein 2A	144905068	119.03	24	13	Crotalus atrox	Secretada - PIII	Apoptosis
15#	Metalloproteinase jararafibrase 2	82219563	118.40	37	9	Bothrops jararaca	Secretada - PII	Cell adhesion
	Protein disulfide isomerase associated 3 precursor	199599757	104.4	20	7	Otolemur garnettii	Retículo endoplasmático	Homeostasis, Metabolic and Apoptotic process
16*	Metalloproteinase insularinase A	82197476	95.89	17	3	Bothrops insularis	Secretada - PII	Cell adhesion
17#	Metalloproteinase insularinase A	82197476	115.38	29	15	Bothrops insularis	Secretada - PII	Cell adhesion

APÊNDICE C - Proteínas identificadas de *spots* específicos de gel 2-DE das glândulas de veneno da serpente *Bothrops jararaca* no estado ativado 7 dias após a extração de veneno.

								(continuação)
Nº <i>Spot</i> 7 dias	Proteína	Número acesso	Protein -10lgP	Cobertura %	Peptídeo	Organismo	Localização Celular	Processo Biológico
18#	Metalloproteinase insularinase A	82197476	134.56	40	24	<i>Bothrops insularis</i>	Secretada - PII	Cell adhesion
19*	Metalloproteinase insularinase A	82197476	143.11	14	5	<i>Bothrops insularis</i>	Secretada - PII	Cell adhesion
20*	Metalloproteinase insularinase A	82197476	135.54	15	5	<i>Bothrops insularis</i>	Secretada - PII	Cell adhesion
21*	Metalloproteinase insularinase A	82197476	122.87	14	5	<i>Bothrops insularis</i>	Secretada - PII	Cell adhesion
22*	Beta actin	58198383	151.05	25	4	<i>Pseudonaja textilis</i>	Citoesqueleto	Structural element, organization
23*	Actin, alpha skeletal muscle	67462115	80.20	7	2	<i>Atractaspis microlepidota</i>	Citoesqueleto	Skeletal muscle fiber development
24*	Beta actin	58198383	268.11	25	4	<i>Pseudonaja textilis</i>	Citoesqueleto	Structural element, organization
25*	Actin, alpha skeletal muscle	67462115	122.04	13	3	<i>Atractaspis microlepidota</i>	Citoesqueleto	Skeletal muscle fiber development
26*	Actin, alpha skeletal muscle	67462115	192.53	16	5	<i>Atractaspis microlepidota</i>	Citoesqueleto	Skeletal muscle fiber development
	Beta actin	58198383	186.94	25	4	<i>Pseudonaja textilis</i>	Citoesqueleto	Structural element, organization
27*	Actin, alpha skeletal muscle	67462115	175.71	62	42	<i>Atractaspis microlepidota</i>	Citoesqueleto	Skeletal muscle fiber development
	Beta actin	296434064	181.05	71	41	<i>Gloydius brevicaudus</i>	Citoesqueleto	Structural element, organization
28*	Beta actin	58198383	124.65	25	3	<i>Pseudonaja textilis</i>	Citoesqueleto	Structural element, organization
29#	Actin, alpha cardiac muscle 1	335279921	121.13	12	2	<i>Sus scrofa</i>	Citoesqueleto	Skeletal muscle fiber development
30#	Venom serine proteinase-like	123883733	127.50	40	16	<i>Bothrops asper</i>	Secretada - SVSP ácido	Metabolic process
31#	Protein disulfide isomerase	63146076	146.15	34	19	<i>Oxyuranus scutellatus</i>	Retículo endoplasmático	Homeostasis, Metabolic and Apoptotic process
	Kinin-releasing and fibrinogen-clotting serine proteinase 2	13959622	138.46	60	20	<i>Bothrops jararaca</i>	Secretada - SVSP ácido	Proteolysis, Regulation of blood pressure
32#	Vimentin	17386168	148.56	35	17	<i>Daboia russellii</i>	Citoesqueleto	Intermediate filament organization
	Protein disulfide isomerase	63146076	136.06	35	17	<i>Oxyuranus scutellatus</i>	Retículo endoplasmático	Homeostasis, Metabolic and Apoptotic process
	Venom serine proteinase-like	123883733	131.02	35	17	<i>Bothrops asper</i>	Secretada - SVSP ácido	Metabolic process
	78 kDa glucose regulated protein	47085775	126.52	16	13	<i>Danio rerio</i>	Retículo endoplasmático	ER overload response

APÊNDICE C - Proteínas identificadas de *spots* específicos de gel 2-DE das glândulas de veneno da serpente *Bothrops jararaca* no estado ativado 7 dias após a extração de veneno.

								(continuação)
Nº <i>Spot</i> 7 dias	Proteína	Número acesso	Protein -10lgP	Cobertura %	Peptídeo	Organismo	Localização Celular	Processo Biológico
33#	Venom serine proteinase-like	123883733	98.12	22	5	<i>Bothrops asper</i>	Secretada - SVSP ácido	Metabolic process
34#	Venom serine proteinase HS114	82233395	108.90	47	15	<i>Bothrops jararaca</i>	Secretada - SVSP neutro	Proteolysis
	40S ribosomal protein S2	71725683	84.80	34	9	<i>Oxyuranus scutellatus</i>	Citoplasma	Translation
35#	Venom serine proteinase HS114	82233395	145.83	47	18	<i>Bothrops jararaca</i>	Secretada - SP neutro	Proteolysis
	40S ribosomal protein S2	71725683	113.72	43	11	<i>Oxyuranus scutellatus</i>	Citoplasma	Translation
36#	Venom serine proteinase HS114	82233395	132.36	52	10	<i>Bothrops jararaca</i>	Secretada - SVSP neutro	Proteolysis
	Zinc metalloproteinase BnP2	17044592	100.38	74	4	<i>Bothropoides pauloensis</i>	Secretada - PI	Apoptosis
37#	Zinc metalloproteinase BnP2	17044592	104.36	93	7	<i>Bothropoides pauloensis</i>	Secretada - PI	Apoptosis
	Venom serine proteinase HS114	82233395	102.61	30	10	<i>Bothrops jararaca</i>	Secretada - SVSP neutro	Proteolysis
	40S ribosomal protein S2	71725683	98.77	38	10	<i>Oxyuranus scutellatus</i>	Citoplasma	Translation
38#	Proteasome subunit alpha type 1	197632007	123.16	48	10	<i>Drosophila melanogaster</i>	Citoplasma	Ubiquitin-dependent protein Catabolic process
	Cysteine rich secretory protein Ch-CRPb	190195307	91.16	28	7	<i>Deinagkistrodon acutus</i>	Secretada - CRISP	-
39#	Cysteine rich secretory protein Da-CRPb	190195339	113.66	31	7	<i>Deinagkistrodon acutus</i>	Secretada - CRISP	-
	Proteasome subunit alpha type-1	5101945	112.87	39	6	<i>Drosophila melanogaster</i>	Citoplasma	Ubiquitin-dependent protein catabolic process
40*	Cysteine rich secretory protein Da-CRPb	190195339	84.00	15	2	<i>Deinagkistrodon acutus</i>	Secretada - CRISP	-
41#	Gamma-phospholipase A2 inhibitor	157885068	41.96	15	2	<i>Bothrops jararaca</i>	Secretada - PLI	Regulation of phospholipase A2 activity
42#	Triosephosphate isomerase	45382061	125.87	53	14	<i>Gallus gallus</i>	Citoplasma	Gluconeogenesis, Glycolysis
	Zinc metalloproteinase BnP2	17044592	94.29	74	5	<i>Bothropoides pauloensis</i>	Secretada - PI	Apoptosis

APÊNDICE C - Proteínas identificadas de *spots* específicos de gel 2-DE das glândulas de veneno da serpente *Bothrops jararaca* no estado ativado 7 dias após a extração de veneno.

(continuação)								
Nº <i>Spot</i>	Proteína	Número	Protein	Cobertura	Peptídeo	Organismo	Localização Celular	Processo Biológico
7 dias		acesso	-10lgP	%				
43#	Zinc metalloproteinase BnP1	172044591	104.26	76	8	Bothropoides pauloensis	Secretada - PI	Apoptosis
	Gamma-phospholipase A2 inhibitor	157885068	103.99	47	8	Bothrops jararaca	Secretada - PLI	Regulation of phospholipase A2 activity
44#	Zinc metalloproteinase BnP2	17044592	73.99	32	2	Bothropoides pauloensis	Secretada - PI	Apoptosis
45#	Zinc metalloproteinase BnP2	17044592	162.62	93	13	Bothropoides pauloensis	Secretada - PI	Apoptosis
46#	Zinc metalloproteinase BnP2	17044592	136.80	84	7	Bothropoides pauloensis	Secretada - PI	Apoptosis
47#	Alpha phospholipase A2 inhibitor	215275475	115.93	58	18	Bothrops jararaca	Secretada - PLI	Regulation of phospholipase A2 activity
	Zinc metalloproteinase-disintegrin BITM06A	82214993	107.36	29	14	Bothrops insularis	Secretada - PIII	Proteolysis
48#	Alpha phospholipase A2 inhibitor	215275475	110.37	61	18	Bothrops jararaca	Secretada - PLI	Regulation of phospholipase A2 activity
	Zinc metalloproteinase BnP1	187608847	103.48	31	11	Bothropoides pauloensis	Secretada - PI	Apoptosis
49#	Alpha-type phospholipase A2 inhibitor	215275475	95.06	30	3	Bothrops jararaca	Secretada - PLI	Regulation of phospholipase A2 activity
50#	Alpha phospholipase A2 inhibitor precursor	167547111	124.34	58	16	Bothrops jararaca	Secretada - PLI	Regulation of phospholipase A2 activity
	Zinc metalloproteinase BnP1	187608847	105.66	26	9	Bothropoides pauloensis	Secretada - PI	Apoptosis
51#	Alpha phospholipase A2 inhibitor precursor	167547111	117.24	52	14	Bothrops jararaca	Secretada - PLI	Regulation of phospholipase A2 activity
	Zinc metalloproteinase BITM02A	82214994	119.68	33	12	Bothrops insularis	Secretada - PI	Proteolysis
	Protein disulfide isoemrase	63146076	112.85	30	9	Oxyuranus scutellatus	Retículo endoplasmático	Homeostasis, Metabolic and Apoptotic process
52#	Nucleoside diphosphate kinase B	66864901	95.28	46	9	Canis lúpus familiaris	Citoplasma	Nucleotide metabolism
	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	126277042	62.62	25	4	Crotalus adamanteus	Citoplasma	isomerase

APÊNDICE C - Proteínas identificadas de *spots* específicos de gel 2-DE das glândulas de veneno da serpente *Bothrops jararaca* no estado ativado 7 dias após a extração de veneno.

								(continuação)
Nº <i>Spot</i> 7 dias	Proteína	Número acesso	Protein -10lgP	Cobertura %	Peptídeo	Organismo	Localização Celular	Processo Biológico
B-like								
53*	Zinc metalloproteinase-disintegrin bothropasin	82190823	108.51	16	7	<i>Bothrops jararaca</i>	Secretada - PIII	Cell adhesion
	Nucleoside diphosphate kinase A	325197188	105.03	35	5	<i>Macaca mulatta</i>	Citoplasma	Biosynthetic process
54#	C-type lectin	41353970	102.69	27	4	<i>Bothrops insularis</i>	Secretada - CTL	Hemagglutinating activity
	Bothroinsularin subunit alpha	229621684	77.02	23	3	<i>Bothrops insularis</i>	Secretada - CTL	Blood coagulation
	Vimentin	17386168	109.02	10	4	<i>Daboia russellii</i>	Citoesqueleto	Intermediate filament organization
55#	C-type lectin BiL	82126834	136.43	47	7	<i>Bothrops insularis</i>	Secretada - CTL	Hemagglutinating activity
	Bothroinsularin subunit beta	229621685	120.00	34	6	<i>Bothrops insularis</i>	Secretada - CTL	Blood coagulation cascade inhibiting
	Vimentin	17386168	110.72	14	5	<i>Daboia russellii</i>	Citoesqueleto	Intermediate filament organization
56#	C-type lectin BiL	82126834	90.12	15	3	<i>Bothrops insularis</i>	Secretada - CTL	Hemagglutinating activity
57#	C-type lectin BiL	82126834	196.16	83	30	<i>Bothrops insularis</i>	Secretada - CTL	Hemagglutinating activity
	Galactose-specific lectin	34922459	175.28	78	23	<i>Bothrops jararacussu</i>	Secretada - CTL	Hemagglutinating activity
58#	C-type lectin BiL	82126834	157.25	72	16	<i>Bothrops insularis</i>	Secretada - CTL	Hemagglutinating activity
	L-amino acid oxidase precursor	195927838	100.97	12	5	<i>Bothropoides pauloensis</i>	Secretada - LAAO	Apoptosis, Cytolysis, Hemolysis
59#	C-type lectin BiL	82126834	205.49	85	32	<i>Bothrops insularis</i>	Secretada - CTL	Hemagglutinating activity
	Galactose-specific lectin	34922459	182.64	89	24	<i>Bothrops jararacussu</i>	Secretada - CTL	Hemagglutinating activity
60#	Disintegrin	29501768	88.58	74	5	<i>Bothrops alternatus</i>	Secretada	Cell adhesion
	Bothroinsularin subunit beta	229621685	88.42	49	4	<i>Bothrops insularis</i>	Secretada - CTL	Blood coagulation cascade inhibiting
61#	Disintegrin	29501768	102.09	78	8	<i>Bothrops alternatus</i>	Secretada	Cell adhesion
62#	C-type lectin BiL	41353970	160.56	72	19	<i>Bothrops insularis</i>	Secretada - CTL	Hemagglutinating activity
	Bothroinsularin subunit beta	229621685	145.66	47	6	<i>Bothrops insularis</i>	Secretada - CTL	Blood coagulation cascade inhibiting

APÊNDICE C - Proteínas identificadas de *spots* específicos de gel 2-DE das glândulas de veneno da serpente *Bothrops jararaca* no estado ativado 7 dias após a extração de veneno.

								(continuação)
Nº <i>Spot</i>	Proteína	Número	Protein	Cobertura	Peptídeo	Organismo	Localização Celular	Processo Biológico
7 dias		acesso	-10lgP	%				
63#	Thioredoxin	20140734	52.27	17	2	Ophiophagus hannah	Citoplasma	Cell redox homeostasis
64#	Snake venom vascular endothelial growth factor toxin	48428663	95.91	36	8	Bothrops jararaca	Secretada - svVEGF	Angiogenesis/Differentiation
	Thioredoxin	20140734	88.73	43	6	Ophiophagus hannah	Citoplasma	Cell redox homeostasis
65#	Thioredoxin	20140734	119.00	59	18	Ophiophagus hannah	Citoplasma	Cell redox homeostasis
66#	Ribosomal protein S14	5441520	86.81	43	3	Canis lupus	Citoplasma	Translation
67#	C-type lectin	338855286	74.06	22	7	Crotalus adamanteus	Secretada - CTL	Carbohydrate binding
	Cytochrome c	119388033	86.94	38	4	Crotalus adamanteus	Mitocôndria	Electron transport
68#	Cytochrome c	119388033	76.75	17	2	Crotalus adamanteus	Mitocôndria	Electron transport
	Thioredoxin	20140734	59.80	23	2	Ophiophagus hannah	Citoplasma	Cell redox homeostasis

Nota: (*) Dados obtidos no banco de dados Metazoa nr 19082011 e Proteopeptidome_NCBInr_29042012 do MALDI-TOF/TOF

(#) Dados obtidos no banco de dados Metazoa nr 19082011 e Proteopeptidome_NCBInr_29042012 do Orbitrap

Retículo endoplasmático (ER), Lectinas tipo C (CTL), Serinoproteinases (SVSP), Proteínas secretadas ricas em cisteína (CRISP), Classes de Metaloproteinases (PI, PII, PIII), L-aminoácido oxidase (LAAO), Inibidores de Fosfolipases A2 (PLI), Fator de crescimento do endotélio vascular de serpente (svVEGF).

APÊNDICE D

APÊNDICE D - Proteínas identificadas de *spots* específicos de gel 2-DE das glândulas de veneno da serpente *Bothrops jararaca* tratadas com reserpina durante 4 dias.

Nº <i>Spot</i> Res 4d	Proteína	Número acesso	Proteína -10lgP	Cobertura %	Peptídeo	Organismo	Localização Celular	Processo Biológico
1#	Endoplasmin-like	327272356	97.66	27	5	Anolis carolinensis	Retículo endoplasmático	Stress response
2*	Calreticulin-like	326935595	69.72	15	4	Meleagris gallopavo	Retículo endoplasmático	Protein folding
3#	PDI	63146076	247.39	14	8	Oxyuranus scutellatus	Retículo endoplasmático	Homeostasis, Metabolic and apoptotic process
4#	PDI	63146076	114.47	40	16	Oxyuranus scutellatus	Retículo endoplasmático	Homeostasis, Metabolic and apoptotic process
	Batroxstatin-1	205278803	96.30	42	14	Bothrops jararaca	Secretada - PIII	Apoptosis, Cell adhesion, proteolysis
5#	Protein disulfide isomerase family A3	148226947	177.80	58	14	Xenopus laevis	Retículo endoplasmático	Homeostasis, Metabolic and apoptotic process
	L-amino acid oxidase precursor	195927838	121.36	18	6	Bothropoides pauloensis	Secretada - LAAO	Apoptosis, Cytolysis, Hemolysis
6#	Protein disulfide isomerase family A3 precursor	45383890	117.42	33	4	Gallus gallus	Retículo endoplasmático	Homeostasis, Metabolic and apoptotic process
	L-amino acid oxidase precursor	195927838	129.75	25	9	Bothropoides pauloensis	Secretada - LAAO	Apoptosis, Cytolysis, Hemolysis
	Zinc metalloproteinase-disintegrin jararhagin	231997	112.74	17	11	Bothrops jararaca	Secretada - PIII	Apoptosis, Cell adhesion, Inflammatory response
7*	Protein disulfide isomerase associated 3 precursor	148226947	84.46	19	7	Xenopus laevis	Retículo endoplasmático Secretada - LAAO	Homeostasis, Metabolic and apoptotic process
	L-amino acid oxidase	195927838	84.64	18	6	Bothropoides pauloensis		Apoptosis, Cytolysis, Hemolysis
8*	Protein disulfide isomerase associated 3 precursor	148226947	81.00	20	2	Xenopus laevis	Retículo endoplasmático	Homeostasis, Metabolic and apoptotic process
	L-amino acid oxidase	195927838	129.38	14	7	Bothropoides pauloensis	Secretada - LAAO	Apoptosis, Cytolysis, Hemolysis
9#	L-amino acid oxidase	82127389	85.42	16	5	Bothrops moojeni	Secretada - LAAO	Apoptosis, Cytolysis, Hemolysis
10#	Alpha enolase	5305427	124.23	14	4	Python regius	Citoplasma	Glycolysis
	Enolase 3, beta muscle	56206030	107.45	36	2	Mus musculus	Citoplasma	Glycolysis

APÊNDICE D - Proteínas identificadas de *spots* específicos de gel 2-DE das glândulas de veneno da serpente *Bothrops jararaca* tratadas com reserpina durante 4 dias.

(continuação)

Nº <i>Spot</i> Res 4d	Proteína	Número acesso	Proteína -10lgP	Cobertura %	Peptídeo	Organismo	Localização Celular	Processo Biológico
11#	Zinc metalloproteinase-disintegrin batroxstatin-2	395455159	108.01	39	11	<i>Bothrops atrox</i>	Secretada - PIII	Apoptosis, Cell adhesion, proteolysis
	ATP synthase alpha subunit	118562410	95.52	25	4	<i>Elaphe quadrivirgata</i>	Mitocôndria	ATP synthesis, Transport
12#	ATP synthase alpha subunit	118562410	93.19	23	2	<i>Elaphe quadrivirgata</i>	Mitocôndria	ATP synthesis, Transport
13#	Zinc metalloproteinase-disintegrin batroxstatin-2	395455159	134.33	39	9	<i>Bothrops atrox</i>	Secretada - PIII	Apoptosis, Cell adhesion, proteolysis
	ATP synthase alpha subunit	118562410	102.80	25	4	<i>Elaphe quadrivirgata</i>	Mitocôndria	ATP synthesis, Transport
14#	Zinc metalloproteinase-disintegrin batroxstatin-2	395455159	97.49	25	6	<i>Bothrops atrox</i>	Secretada - PIII	Apoptosis, Cell adhesion, proteolysis
	ATP synthase alpha subunit	118562410	104.71	26	4	<i>Elaphe quadrivirgata</i>	Mitocôndria	ATP synthesis, Transport
15#	Beta actin	58198383	139.00	25	4	<i>Pseudonaja textilis</i>	Citoplasma	Structural element organization
	Actin, alpha skeletal muscle	67462115	131.05	16	5	<i>Atractaspis microlepidota</i>	Citoplasma	Skeletal muscle fiber development
16#	Beta actin	58198383	166.55	25	4	<i>Pseudonaja textilis</i>	Citoplasma	Structural element organization
	Alpha actin	15825436	164.92	16	4	<i>Atractaspis microlepidota</i>	Citoplasma	Structural element organization
17*	Isocitrate dehydrogenase [NADP] Citoplasmic-like	327270553	95.08	29	7	<i>Anolis carolinensis</i>	Citoplasma	Isocitrate metabolic process
	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial-like	327276681	120.04	40	6	<i>Anolis carolinensis</i>	Mitocôndria	Lipid metabolism
18#	Protein disulfide isomerase	63146076	123.42	13	7	<i>Oxyuranus scutellatus</i>	Retículo endoplasmático	Homeostasis, Metabolic and apoptotic process
19*	Actin, alpha skeletal muscle	67462115	77.93	19	6	<i>Atractaspis microlepidota</i>	Citoplasma	Skeletal muscle fiber development
	Beta actin	296434064	65.38	13	4	<i>Gloydus brevicaudus</i>	Citoplasma	Structural element organization
20#	Venom metalloproteinase jararin	87245249	104.41	38	7	<i>Bothrops jararaca</i>	Secretada - PII	Cell adhesion
21*	Annexin A2	168983833	126.06	19	3	<i>Mus musculus</i>	Secretada	Fibrinolysis
22*	Annexin A2	168983833	125.26	19	3	<i>Mus musculus</i>	Secretada	Fibrinolysis
23*	Glyceraldehyde-3-phosphate	160385820	59.90	13	2	<i>Mustela putorius furo</i>	Citoplasma	Glycolysis

APÊNDICE D - Proteínas identificadas de *spots* específicos de gel 2-DE das glândulas de veneno da serpente *Bothrops jararaca* tratadas com reserpina durante 4 dias.

(continuação)

Nº <i>Spot</i> Res 4d	Proteína	Número acesso	Proteína -10lgP	Cobertura %	Peptídeo	Organismo	Localização Celular	Processo Biológico
	dehydrogenase							
24#	Platelet aggregating serine peptidase	34148047	95.41	33	10	Bothrops jararaca	Secretada - SVSP ácido	Proteolysis
25*	Venom serine proteinase HS114	82233395	167.57	60	20	Bothrops jararaca	Secretada - SVSP ácido	Proteolysis
	Tropomyosin beta chain-like isoform 1	348570236	138.16	35	12	Cavia porcellus	Citoplasma	Muscle contraction
26*	Venom serine proteinase HS114	82233395	211.54	68	46	Bothrops jararaca	Secretada - SVSP ácido	Proteolysis
	Tropomyosin beta chain-like isoform 1	348570236	138.88	35	9	Cavia porcellus	Citoplasma	Muscle contraction
	PDI	63146076	131.95	23	12	Oxyuranus scutellatus	Retículo endoplasmático	Homeostasis, Metabolic and apoptotic process
27*	Venom serine proteinase HS114	82233395	116.50	27	4	Bothrops jararaca	Secretada - SVSP ácido	Proteolysis
28#	Venom serine proteinase HS114	82233395	200.07	36	7	Bothrops jararaca	Secretada - SVSP ácido	Proteolysis
29#	Venom serine proteinase HS114	82233395	105.76	34	7	Bothrops jararaca	Secretada - SVSP ácido	Proteolysis
30#	Venom serine proteinase HS114	82233395	150.69	56	17	Bothrops jararaca	Secretada - SVSP ácido	Proteolysis
	Alpha actin	52078484	100.07	32	6	Oxyuranus scutellatus	Citoplasma	Structural element organization
31#	Venom serine proteinase HS114	82233395	172.75	69	26	Bothrops jararaca	Secretada - SVSP ácido	Proteolysis
	Beta actin	52078486	111.30	35	6	Oxyuranus scutellatus	Citoplasma	Structural element organization
32*	Lipocortin V	2981437	48.20	11	2	Rattus norvegicus	Citoplasma	Blood coagulation, Hemostasis
33*	Annexin 5	224049201	76.31	11	2	Taeniopygia guttata	Citoplasma	Blood coagulation, Hemostasis
34*	Annexin A5-like	327274168	52.23	16	2	Anolis carolinensis	Citoplasma	Blood coagulation, Hemostasis
	40S ribosomal protein S2	71725683	50.06	16	2	Oxyuranus scutellatus	Citoplasma	Translation
35*	Annexin A5-like	327274168	52.18	13	2	Anolis carolinensis	Citoplasma	Blood coagulation, Hemostasis
36*	Cysteine rich secretory protein Da-CRPb	190195339	107.92	23	4	Deinagkistrodon acutus	Secretada - CRISP	-
37*	Cysteine rich secretory protein Ch-CRPIb	190195315	107.72	23	4	Crotalus horridus	Secretada - CRISP	-
38*	Voltage-dependent anion selective channel 2	296439786	98.47	30	2	Mesocricetus auratus	Mitocôndria	Ion transport

APÊNDICE D - Proteínas identificadas de *spots* específicos de gel 2-DE das glândulas de veneno da serpente *Bothrops jararaca* tratadas com reserpina durante 4 dias.

(continuação)

Nº <i>Spot</i> Res 4d	Proteína	Número acesso	Proteína -10lgP	Cobertura %	Peptídeo	Organismo	Localização Celular	Processo Biológico
39*	14-3-3 protein epsilon	209156034	98.15	47	9	Salmo salar	Citoplasma	Protein targeting
	Tropomyosin beta chain isoform 1, partial	380793471	87.62	14	3	Macaca mulatta	Citoplasma	Muscle contraction
40#	Tropomyosin beta chain isoform 1, partial	380793471	82.02	11	3	Macaca mulatta	Citoplasma	Muscle contraction
41#	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein , epsilon polypeptide	224076320	89.16	34	5	Taeniopygia guttata	Mitocôndria	Protein targeting to mitochondria
42#	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide	224076320	75.63	26	3	Taeniopygia guttata	Mitocôndria	Protein targeting to mitochondria
	Mitochondrial ATP synthase subunit beta	323650230	48.43	14	2	Perca flavescens	Mitocôndria	ATP synthesis, Transport
	Actin, alpha skeletal muscle	67462115	144.81	27	8	Atractaspis microlepidota	Citoplasma	Skeletal muscle fiber development
43#	Serine proteinase	76365438	70.04	18	5	Crotalus durissus	Secretada - SVSP neutro	Proteolysis
44#	Plasminogen activator Haly-PA	156630858	115.18	21	11	Gloydius brevicaudus	Secretada - SVSP neutro	Proteolysis, Regulation blood pressure
	Serine proteinase	123895843	87.45	24	7	Crotalus durissus	Secretada - SVSP neutro	Proteolysis
45*	Calbidin D28k	55003506	96.5		4	Sorghum bicolor	Citoplasma	Calcium ion transport, homeostasis
46#	Metalloproteinase jararafibrase-2	82219563	94.29	9	5	Bothrops jararaca	Secretada - PII	Cell adhesion
47#	Metalloproteinase jararafibrase-2	82219563	89.74	11	6	Bothrops jararaca	Secretada - PII	Cell adhesion
	Rho GDP dissociation inhibitor alpha	61553152	47.67	16	2	Bos taurus	Citoplasma	Regulation GTPase activity
48#	Metalloproteinase jararafibrase-2	82219563	123.90	22	15	Bothrops jararaca	Secretada - PII	Cell adhesion
	Beta actin	52078486	98.42	35	5	Oxyuranus scutellatus	Citoplasma	Structural element organization
	Rho GDP dissociation inhibitor alpha	61553152	43.10	21	2	Bos taurus	Citoplasma	Regulation GTPase activity

APÊNDICE D - Proteínas identificadas de *spots* específicos de gel 2-DE das glândulas de veneno da serpente *Bothrops jararaca* tratadas com reserpina durante 4 dias.

(continuação)

Nº <i>Spot</i> Res 4d	Proteína	Número acesso	Proteína -10lgP	Cobertura %	Peptídeo	Organismo	Localização Celular	Processo Biológico
49#	Gamma-phospholipase A2 inhibitor	157885066	87.00	28	4	<i>Bothrops jararaca</i>	Secretada - PI	Regulation of phospholipase A2 activity
50#	Zinc metalloproteinase BnP1	172044591	87.95	47	5	<i>Bothropoides pauloensis</i>	Secretada - PI	Apoptosis
51#	Zinc metalloproteinase BnP2	172044592	96.64	32	2	<i>Bothropoides pauloensis</i>	Secretada - PI	Apoptosis
52*	Sticholysin-2	2815496	53.76	35	3	<i>Stoichactis helianthus</i>	Secretada	Cytolysis, Hemolysis, Ion transport
	Metalloproteinase jararafibrase-2	82219563	62.02	19	4	<i>Bothrops jararaca</i>	Secretada - PII	Cell adhesion
53*	Metalloproteinase jararafibrase-2	82219563	176.97	33	27	<i>Bothrops jararaca</i>	Secretada - PII	Cell adhesion
54#	Metalloproteinase jararafibrase-2	82219563	183.25	28	35	<i>Bothrops jararaca</i>	Secretada - PII	Cell adhesion
55#	Gluthatione S-transferase pi 1-like	327260614	152.20	45	8	<i>Anolis carolinensis</i>	Citoplasma	Gluthatione metabolic process
	Metalloproteinase jararafibrase-2	82219563	120.51	22	14	<i>Bothrops jararaca</i>	Secretada - PII	Cell adhesion
56#	Gluthatione S-transferase pi 1-like	327260614	205.97	57	21	<i>Anolis carolinensis</i>	Citoplasma	Gluthatione metabolic process
	Metalloproteinase jararafibrase-2	82219563	155.93	23	16	<i>Bothrops jararaca</i>	Secretada - PII	Cell adhesion
57*	Putative proteasome subunit alpha type 2	224045021	68.16	41	3	<i>Taeniopygia guttata</i>	Citoplasma	Ubiquitin-dependent protein catabolic process
58*	Gluthatione S-transferase Mu 1-like	327270920	111.84	36	8	<i>Anolis carolinensis</i>	Citoplasma	Gluthatione metabolic process
59*	Zinc metalloproteinase BnP2	172044592	96.40	51	3	<i>Bothropoides pauloensis</i>	Secretada - PI	Apoptosis
60#	Zinc metalloproteinase BITM02A	82214994	81.25	15	3	<i>Bothrops jararaca</i>	Secretada - PI	Negative regulation of transcription
61#	Myosin light polypeptide 6-like isoform 2	335288113	49.96	23	2	<i>Sus scrofa</i>	Citoplasma	Muscle contraction
62#	Myosin light chain	DV556847	141.13	27	5	<i>Deinagkistrodon acutus</i>	Citoplasma	Muscle contraction
63#	Actin, alpha skeletal muscle	67462115	67.15	8	3	<i>Atractaspis microlepidota</i>	Citoplasma	Skeletal muscle fiber development
64#	Sticholysin-2	2815496	64.19	58	3	<i>Stoichactis helianthus</i>	Secretada	Cytolysis, Ion transport
65#	Zinc metalloproteinase-disintegrin jararhagin	231997	94.00	23	12	<i>Bothrops jararaca</i>	Secretada - PIII	Apoptosis, Cell adhesion, Inflammatory response

APÊNDICE D - Proteínas identificadas de *spots* específicos de gel 2-DE das glândulas de veneno da serpente *Bothrops jararaca* tratadas com reserpina durante 4 dias.

(continuação)

Nº <i>Spot</i> Res 4d	Proteína	Número acesso	Proteína -10lgP	Cobertura %	Peptídeo	Organismo	Localização Celular	Processo Biológico
	Alpha-type phospholipase A2 inhibitor	215275475	83.64	48	9	Bothrops jararaca	Secretada - PLI	Regulation of phospholipase A2 activity
66#	ATP synthase subunit d, mitochondrial isoform 1	118099965	136.34	46	7	Gallus gallus	Mitocôndria	ATP synthesis, Transport
	Alpha-type phospholipase A2 inhibitor	215275475	100.15	22	4	Bothrops jararaca	Secretada - PLI	Regulation of phospholipase A2 activity
67*	Alpha-type phospholipase A2 inhibitor	215275475	91.46	22	3	Bothrops jararaca	Secretada - PLI	Regulation of phospholipase A2 activity
68*	Alpha-type phospholipase A2 inhibitor	167547111	65.99	30	3	Bothrops jararaca	Secretada - PLI	Regulation of phospholipase A2 activity
69#	DJ-1	66267686	66.52	33	4	Crocodylus niloticus	Citoplasma	
70#	Myosin light chain	52078482	143.72	37	8	Oxyuranus scutellatus	Citoplasma	Muscle contraction
	Calcium-binding protein p22	56118996	55.79	36	3	Gallus gallus	Citoplasma	Differentiation
71*	Translocon-associated protein-like protein	71725701	157.41	27	3	Oxyuranus scutellatus	Retículo endoplasmático	Cotranslational protein targeting to Membrane
72#	Nucleoside diphosphate kinase B	325197199	59.81	36	4	Macaca mulatta	Citoplasma	Differentiation, Endocytosis
73*	Glycoprotein IB-binding protein α	82116886	128.80	35	4	Bothrops jararaca	Secretada - CTL	Hemostasis impairing toxin, Platelet aggregation inhibiting toxin
74#	Glycoprotein IB-binding protein α	82116886	77.26	32	4	Bothrops jararaca	Secretada - CTL	Hemostasis impairing toxin, Platelet aggregation inhibiting toxin
	ATP synthase alpha subunit	118562410	112.65	25	4	Elaphe quadrivirgata	Mitocôndria	ATP synthesis, Transport
75*	Glycoprotein IB-binding protein α	82116886	106.67	25	3	Bothrops jararaca	Secretada - CTL	Hemostasis impairing toxin, Platelet aggregation inhibiting toxin

APÊNDICE D - Proteínas identificadas de *spots* específicos de gel 2-DE das glândulas de veneno da serpente *Bothrops jararaca* tratadas com reserpina durante 4 dias.

(continuação)

Nº <i>Spot</i> Res 4d	Proteína	Número acesso	Proteína -10lgP	Cobertura %	Peptídeo	Organismo	Localização Celular	Processo Biológico
76*	Glycoprotein IB-binding protein α	82116886	137.11	25	3	Bothrops jararaca	Secretada - CTL	Hemostasis impairing toxin, Platelet aggregation inhibiting toxin
77*	Glycoprotein IB-binding protein α	82116886	75.32	25	2	Bothrops jararaca	Secretada - CTL	Hemostasis impairing toxin, Platelet aggregation inhibiting toxin
78*	Cofilin-1	51592135	108.94	27	3	Sus scrofa	Citoplasma	Actin filament organization
79*	Glycoprotein IB-binding protein α	82116886	83.2	15	2	Bothrops jararaca	Secretada - CTL	Hemostasis impairing toxin, Platelet aggregation inhibiting toxin
80*	Glycoprotein IB-binding protein α	82116886	83.8	15	2	Bothrops jararaca	Secretada - CTL	Hemostasis impairing toxin, Platelet aggregation inhibiting toxin
81*	Venom gland cyclophilin	38374146	96.96	11	2	Bitis gabonica	Citoplasma	Protein folding
	Glycoprotein IB-binding protein α	82116886	62.87	35	3	Bothrops jararaca	Secretada - CTL	Hemostasis impairing toxin, Platelet aggregation inhibiting toxin
82*	Glycoprotein IB-binding protein α	82116886	101.75	25	3	Bothrops jararaca	Secretada - CTL	Hemostasis impairing toxin, Platelet aggregation inhibiting toxin
83*	Venom gland cyclophilin	38374146	183.13	59	20	Bitis gabonica	Citoplasma	Protein folding
	Glycoprotein IB-binding protein α	82116886	118.23	41	7	Bothrops jararaca	Secretada - CTL	Hemostasis impairing toxin, Platelet aggregation inhibiting toxin
84*	Phospholipase A2 precursor	86450426	114.11	55	6	Bothrops jararaca	Secretada - PLA2	Inflammatory response
	C-type lectin BiL	82126834	88.07	27	5	Bothrops insularis	Secretada - CTL	Hemagglutinating activity

APÊNDICE D - Proteínas identificadas de *spots* específicos de gel 2-DE das glândulas de veneno da serpente *Bothrops jararaca* tratadas com reserpina durante 4 dias.

(continuação)

Nº <i>Spot</i> Res 4d	Proteína	Número acesso	Proteína -10lgP	Cobertura %	Peptídeo	Organismo	Localização Celular	Processo Biológico
85*	Phospholipase A2 precursor	86450426	104.06	51	6	<i>Bothrops jararaca</i>	Secretada - PLA ₂	Inflammatory response
	40S ribosomal protein S20	71725689	73.40	25	3	<i>Oxyuranus scutellatus</i>	Citoplasma	Translation
86*	Phospholipase A2 2	292630844	102.60	60	4	<i>Bothrops asper</i>	Secretada - PLA ₂	Inflammatory response
	Bothroinsularin subunit alpha	229621684	52.14	17	2	<i>Bothrops insularis</i>	Secretada - CTL	Blood coagulation cascade inhibiting
87#	Coagulation factor IX/factor X-binding protein subunit A	82116577	100.89	50	5	<i>Bothrops jararaca</i>	Secretada - CTL	Blood coagulation cascade inhibiting toxin
	Phospholipase A2 2	158518414	91.13	15	4	<i>Bothrops insularis</i>	Secretada - PLA ₂	Inflammatory response
88#	Phospholipase A2 2	292630844	129.56	60	5	<i>Bothrops asper</i>	Secretada - PLA ₂	Inflammatory response
	C-type lectin isoform 3	215275178	60.40	26	3	<i>Sistrurus c. edwardsi</i>	Secretada - CTL	Hemagglutinating activity
	ATP synthase alpha subunit	118562410	78.99	18	3	<i>Elaphe quadrvirgata</i>	Mitocôndria	ATP synthesis, Transport
89#	Phospholipase A2 2	158518414	111.50	50	7	<i>Bothrops insularis</i>	Secretada - PLA ₂	Inflammatory response
	Bothroinsularin subunit beta	229621684	87.15	26	4	<i>Bothrops insularis</i>	Secretada - CTL	Blood coagulation cascade inhibiting
90*	Glycoprotein IB-binding protein β	82116883	129.02	35	3	<i>Bothrops jararaca</i>	Secretada - CTL	Hemostasis impairing toxin, Platelet aggregation inhibiting toxin
91*	Glycoprotein IB-binding protein β	82116883	137.74	47	4	<i>Bothrops jararaca</i>	Secretada - CTL	Hemostasis impairing toxin, Platelet aggregation inhibiting toxin
92#	Bothroinsularin subunit alpha	229621684	145.95	33	8	<i>Bothrops insularis</i>	Secretada - CTL	Blood coagulation cascade inhibiting
	C-type lectin BiL	82126834	106.55	44	6	<i>Bothrops insularis</i>	Secretada - CTL	Hemagglutinating activity
93#	C-type lectin BiL	82126834	167.17	77	21	<i>Bothrops insularis</i>	Secretada - CTL	Hemagglutinating activity
	Bothroinsularin subunit alpha	229621684	142.39	52	8	<i>Bothrops insularis</i>	Secretada - CTL	Blood coagulation cascade
	Galactose-specific lectin	34922459	133.92	65	16	<i>Bothrops jararacussu</i>	Secretada - CTL	inhibiting

APÊNDICE D - Proteínas identificadas de *spots* específicos de gel 2-DE das glândulas de veneno da serpente *Bothrops jararaca* tratadas com reserpina durante 4 dias.

(continuação)

Nº <i>Spot</i> Res 4d	Proteína	Número acesso	Proteína -10lgP	Cobertura %	Peptídeo	Organismo	Localização Celular	Processo Biológico
								Hemagglutinating activity
94#	Glycoprotein IB-binding protein β	82116883	198.62	74	20	<i>Bothrops jararaca</i>	Secretada - CTL	Hemostasis impairing toxin, Platelet aggregation inhibiting toxin
	Coagulation factor IX/factor X-binding protein subunit B1	32130006	103.02	30	4	<i>Bothrops jararaca</i>	Secretada - CTL	Blood coagulation cascade inhibiting toxin
	Thioredoxin	20140734	78.39	23	2	<i>Ophiophagus hannah</i>	Citoplasma	Cell redox homeostasis
95*	Glycoprotein IB-binding protein β	82116883	156.11	47	4	<i>Bothrops jararaca</i>	Secretada - CTL	Hemostasis impairing toxin, Platelet aggregation inhibiting toxin
96*	Glycoprotein IB-binding protein β	82116883	198.62	74	20	<i>Bothrops jararaca</i>	Secretada - CTL	Hemostasis impairing toxin, Platelet aggregation inhibiting toxin
	Thioredoxin	20140734	78.39	23	2	<i>Ophiophagus hannah</i>	Citoplasma	Cell redox homeostasis
97#	Coagulation factor IX/factor X-binding protein subunit B1	32130006	118.56	53	6	<i>Bothrops jararaca</i>	Secretada - CTL	Blood coagulation cascade inhibiting toxin
	Glycoprotein IB-binding protein β	82116883	82.95	33	6	<i>Bothrops jararaca</i>	Secretada - CTL	Hemostasis impairing toxin, Platelet aggregation inhibiting toxin
98#	Glycoprotein IB-binding protein β	82116883	139.28	41	6	<i>Bothrops jararaca</i>	Secretada - CTL	Hemostasis impairing toxin, Platelet aggregation inhibiting toxin
99#	14 kDa phosphohistidine phosphatase- like	327281524	60.70	23	3	<i>Anolis carolinensis</i>	Citoplasma	Regulation of actin cytoskeleton reorganization
100#	14 kDa phosphohistidine phosphatase- like	327281524	70.11	18	2	<i>Anolis carolinensis</i>	Citoplasma	Regulation of actin cytoskeleton reorganization

APÊNDICE D - Proteínas identificadas de *spots* específicos de gel 2-DE das glândulas de veneno da serpente *Bothrops jararaca* tratadas com reserpina durante 4 dias.

(continuação)

Nº <i>Spot</i>	Proteína	Número	Proteína	Cobertura	Peptídeo	Organismo	Localização Celular	Processo Biológico
Res 4d		acesso	-10lgP	%				
101*	Thioredoxin	20140734	126.60	46	9	Ophiophagus hannah	Citoplasma	Cell redox homeostasis

Nota: (*) Dados obtidos no banco de dados Metazoa nr 19082011 e Proteopeptidome_NCBInr_29042012 do MALDI-TOF/TOF

(#) Dados obtidos no banco de dados Metazoa nr 19082011 e Proteopeptidome_NCBInr_29042012 do Orbitrap

Retículo endoplasmático (ER), Lectinas tipo C (CTL), Serinoproteinases (SVSP), Proteínas secretadas ricas em cisteína (CRISP), Classes de Metaloproteinases (PI, PII, PIII), Fosfolipases A2 (PLA₂), L-aminoácido oxidase (LAAO), Inibidores de Fosfolipases A2 (PLI).

APÊNDICE E

APÊNDICE E - Proteínas identificadas de *spots* específicos de gel 2-DE das glândulas de veneno da serpente *Bothrops jararaca* tratadas com reserpina, fenilefrina e isoprenalina durante 4 dias.

Nº <i>Spot</i> RFI 4d	Proteína	Número acesso	Proteína -10lgP	Cobertura %	Peptídeo	Organismo	Localização Celular	Processo Biológico
1*	Zinc metalloproteinase-disintegrin BITM06A	82214993	138.37	44	28	Bothrops insularis	Secretada - PIII	Proteolysis
2*	Zinc metalloproteinase-disintegrin BITM06A	82214993	94.13	12	2	Bothrops insularis	Secretada - PIII	Proteolysis
3*	Heat shock 70 kDa protein	242003741	412.52	7	4	Pediculus humanus corporis	Citoplasma	Stress response
4#	Anti-hemorrhagic factor Bj46a	48428681	153.43	48	20	Bothrops jararaca	Secretada	Negative regulation of proteolysis
	L-amino acid oxidase	195927838	132.89	26	11	Bothropoides pauloensis	Secretada - LAAO	Apoptosis, Cytolysis, Hemolysis
	PDI	63146076	106.65	18	9	Oxyuranus scutellatus	Retículo endoplasmático	Homeostasis, Metabolic and apoptotic process
5*	Anti-hemorrhagic factor Bj46a	48428681	94.16	11	2	Bothrops jararaca	Secretada	Negative regulation of proteolysis
6*	Chain B, The three dimensional structure of Bothropasin	209870468	151.29	9	3	Bothrops jararaca	Secretada - PIII	Cell adhesion
7#	Zinc metalloproteinase-disintegrin BITM06A	82214993	190.19	45	53	Bothrops insularis	Secretada - PIII	Proteolysis
	Tubulin, alpha 4, isoform CRA_b	148667971	147.25	81	18	Mus musculus	Citoplasma	Microtubule-based movement, Protein polymerization
8*	ATP synthase beta subunit mitochondrial precursor	71897237	140.87	56	27	Gallus gallus	Mitocôndria	ATP synthesis, Transport
	Tubulin beta-4-chain-like	327263983	129.03	72	27	Anolis carolinensis	Citoplasma	Microtubule-based movement, Protein polymerization
	Zinc metalloproteinase-disintegrin BITM06A	82214993	110.93	34	19	Bothrops insularis	Secretada - PIII	Proteolysis
9#	ATP synthase subunit beta, mitochondrial precursor	71897237	172.73	52	16	Gallus gallus	Mitocôndria	ATP synthesis, Transport
	Zinc metalloproteinase-disintegrin	82214993	165.93	44	35	Bothrops insularis	Secretada - PIII	Proteolysis

APÊNDICE E - Proteínas identificadas de *spots* específicos de gel 2-DE das glândulas de veneno da serpente *Bothrops jararaca* tratadas com reserpina, fenilefrina e isoprenalina durante 4 dias. .

(continuação)

Nº <i>Spot</i> RFI 4d	Proteína	Número acesso	Proteína -10lgP	Cobertura %	Peptídeo	Organismo	Localização Celular	Processo Biológico
	BITM06A Vimentin	17386168	139.04	24	13	Daboia russellii	Citoplasma	Intermediate filament organization
10#	Zinc metalloproteinase-disintegrin	82214993	178.38	47	42	Bothrops insularis	Secretada - PIII	Proteolysis
	BITM06A Tubulin alpha 4A-chain	327260422	134.85	56	10	Anolis carolinensis	Citoplasma	Microtubule-based movement, Protein polymerization
11#	Zinc metalloproteinase-disintegrin	82214993	149.43	32	28	Bothrops insularis	Secretada - PIII	Proteolysis
	BITM06A Protein disulfide isomerase A3-precursor	387017522	116.06	36	10	Crotalus adamanteus	Retículo endoplasmático	Homeostasis, Metabolic and apoptotic process
12*	Protein disulfide isomerase family A, member 3	45361505	83.00	23	4	Xenopus tropicalis	Retículo endoplasmático	Homeostasis, Metabolic and apoptotic process
13*	Aldehyde dehydrogenase 9 family, member A1	224058898	74.75	11	3	Taeniopygia guttata	Citoplasma	Metabolic process
	L-amino acid oxidase precursor	195927838	107.41	11	5	Bothropoides pauloensis	Secretada - LAAO	Apoptosis, Cytolysis, Hemolysis
	Protein disulfide isomerase A3-precursor	387017522	102.89	26	6	Crotalus adamanteus	Retículo endoplasmático	Cell redox homeostasis, Metabolic process
14*	Actin, alpha skeletal muscle	67462115	200.28	13	4	Atractaspis microlepidota	Citoplasma	Skeletal muscle fiber development
	Beta actin	58198383	155.33	20	3	Pseudonaja textilis	Citoplasma	Structural element organization
15*	Beta actin	52078486	117.46	25	4	Oxyuranus scutellatus	Citoplasma	Structural element organization
16*	Actin, alpha skeletal muscle	67462115	170.08	16	5	Atractaspis microlepidota	Citoplasma	Skeletal muscle fiber development
17*	Actin, alpha skeletal muscle	67462115	119.46	13	3	Atractaspis microlepidota	Citoplasma	Skeletal muscle fiber

APÊNDICE E - Proteínas identificadas de *spots* específicos de gel 2-DE das glândulas de veneno da serpente *Bothrops jararaca* tratadas com reserpina, fenilefrina e isoprenalina durante 4 dias. .

(continuação)

Nº <i>Spot</i> RFI 4d	Proteína	Número acesso	Proteína -10lgP	Cobertura %	Peptídeo	Organismo	Localização Celular	Processo Biológico
	Beta actin	58198383	132.70	20	3	Pseudonaja textilis	Citoplasma	development Structural element organization
18#	Alpha enolase	17367183	46.22	14	3	Phyton regius	Citoplasma	Glycolysis
19*	Actin, alpha skeletal muscle	67462115	140.11	16	4	Atractaspis microlepidota	Citoplasma	Skeletal muscle fiber
	Beta actin	58198383	136.84	25	4	Pseudonaja textilis	Citoplasma	development Structural element organization
20#	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide	224076320	76.33	29	4	Taeniopygia guttata	Mitocôndria	Protein targeting to mitochondria
	Nucleophosmin-like	387017382	142.94	61	11	Crotalus adamanteus	Núcleo	DNA repair, protein oligomerization
	Beta actin	52078486	129.82	36	7	Oxyuranus scutellatus	Citoplasma	Structural element organization
21#	Platelet aggregating serine peptidase	34148047	94.67	354	6	Bothrops jararaca	Secretada - SVSP neutro	Proteolysis
	Venom metalloproteinase jararin	87245249	88.27	36	5	Bothrops jararaca	Secretada - PII	Cell Adhesion, Proteolysis
22*	Venom serine proteinase HS114	82233395	126.12	44	16	Bothrops jararaca	Secretada - SVSP ácido	Proteolysis
	Beta tropomyosin	6573280	118.67	33	8	Homo sapiens	Citoplasma	Muscle contraction, Regulation of ATPase activity
23*	Venom serine proteinase HS114	82233395	174.68	63	25	Bothrops jararaca	Secretada - SVSP ácido	Proteolysis
	Beta tropomyosin	6573280	133.50	33	11	Homo sapiens	Citoplasma	Muscle contraction, Regulation of ATPase activity
24#	Venom serine proteinase HS114	82233395	155.78	51	18	Bothrops jararaca	Secretada - SVSP ácido	Proteolysis
25#	Proteasome subunit alpha type 3-like	126282483	88.84	42	7	Monodelphis domestica	Citoplasma	Ubiquitin-dependent protein catabolic process
		52078486	138.69	50	10	Oxyuranus scutellatus	Citoplasma	Structural element organization
	Beta actin	123883733	107.51	23	7	Bothrops asper	Secretada - SVSP ácido	Metabolic process

APÊNDICE E - Proteínas identificadas de *spots* específicos de gel 2-DE das glândulas de veneno da serpente *Bothrops jararaca* tratadas com reserpina, fenilefrina e isoprenalina durante 4 dias. .

(continuação)

Nº <i>Spot</i> RFI 4d	Proteína	Número acesso	Proteína -10lgP	Cobertura %	Peptídeo	Organismo	Localização Celular	Processo Biológico
	Venom serine proteinase-like							
26#	Venom serine proteinase HS114	82233395	164.30	59	22	<i>Bothrops jararaca</i>	Secretada - SVSP ácido	Proteolysis
	Actin, alpha skeletal muscle	67462115	122.25	24	7	<i>Atractaspis microlepidota</i>	Citoplasma	Skeletal muscle fiber development
27#	*Venom serine proteinase-like	123883733	111.33	32	9	<i>Bothrops asper</i>	Secretada - SVSP ácido	Metabolic process
	*Actin, alpha skeletal muscle	67462115	118.04	19	9	<i>Atractaspis microlepidota</i>	Citoplasma	Skeletal muscle fiber development
	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 3-like	327288084	86.57	25	4	<i>Anolis carolinensis</i>	Citoplasma	Translational initiation
28#	14-3-3 protein	530049	79.02	45	5	<i>Ovis aires</i>	Citoplasma	Negative regulation of transcription
	Cytoskeletal tropomyosin	833603	78.93	40	7	<i>Coturnix coturnix</i>	Citoplasma	Muscle contraction
33*	*Jararhagin C=28 kda disintegrin homolog	546898	110.20	39	7	<i>Bothrops jararaca</i>	Secretada	Cell adhesion, Apoptosis, Inflammatory response
	*Chain A, The three-dimensional structure of bothropasin	253722676	143.07	37	19	<i>Bothrops jararaca</i>	Secretada - PIII	Cell adhesion
	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta polypeptide	66347207	65.76	28	4	<i>Homo sapiens</i>	Mitocôndria	Protein targeting to mitochondria
34*	Voltage-dependent anion selective channel protein 1-like	327265290	76.83	31	3	<i>Anolis carolinensis</i>	Mitocôndria	Ion transport
	*Cysteine-rich secretory protein 1	358801543	132.54	41	7	<i>Crotalus oreganus helleri</i>	Secretada - CRISP	-
35*	Gamma phospholipase A2 inhibitor	157885066	132.19	32	7	<i>Bothrops jararaca</i>	Secretada - PLI	Regulation of phospholipase A2 activity
36*	Gamma phospholipase A2 inhibitor	157885066	96.28	32	5	<i>Bothrops jararaca</i>	Secretada - PLI	Regulation of phospholipase A2 activity

APÊNDICE E - Proteínas identificadas de *spots* específicos de gel 2-DE das glândulas de veneno da serpente *Bothrops jararaca* tratadas com reserpina, fenilefrina e isoprenalina durante 4 dias. .

(continuação)

Nº <i>Spot</i> RFI 4d	Proteína	Número acesso	Proteína -10lgP	Cobertura %	Peptídeo	Organismo	Localização Celular	Processo Biológico
37*	Gamma phospholipase A2 inhibitor	157885066	100.22	32	5	Bothrops jararaca	Secretada - PLI	Regulation of phospholipase A2 activity
38#	Zinc metalloproteinase-disintegrin BITM02A	82214994	107.27	24	9	Bothrops insularis	Secretada - PI	Proteolysis
	Actin, alpha skeletal muscle	67462115	103.92	16	6	Atractaspis microlepidota	Citoplasma	Skeletal muscle fiber development
39#	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8-like	327284479	45.61	11	2	Anolis carolinensis	Citoplasma	Ubiquitin-dependent protein catabolic process
	Cysteine-rich secretory protein 2	358801574	78.37	23	4	Crotalus oreganus helleri	Secretada - CRISP	-
	Zinc metalloproteinase BmooMPalfa-I	259090190	82.38	12	3	Bothrops moojeni	Secretada - PI	Proteolysis
40*	Proteasome subunit alpha type 6	225705796	720.69	17	3	Oncorhynchus mykiss	Citoplasma	Ubiquitin-dependent protein catabolic process
41*	Calbindin D28k	55003506	1176.80	12	4	Sorghum bicolor	Citoplasma	Calcium ion transport
42*	Myosin light chain 4	115496173	86.33	30	3	Bos taurus	Citoplasma	Muscle contraction
43*	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	124249432	63.82	30	3	Gallus gallus	Citoplasma	Regulation GTPase activity
	Zinc metalloproteinase BnP1	172044591	94.70	37	4	Bothropoides pauloensis	Secretada - PI	Apoptosis
44#	Beta actin	52078486	97.49	35	5	Oxyuranus scutellatus	Citoplasma	Structural element organization
	Zinc metalloproteinase BmooMPalfa-I	259090190	79.84	12	3	Crotalus oreganus helleri	Secretada - PI	Proteolysis
45*	Zinc metalloproteinase BnP2	172044592	96.28	32	3	Bothropoides pauloensis	Secretada - PI	Apoptosis
46*	Beta actin	52078486	137.24	45	7	Oxyuranus scutellatus	Citoplasma	Structural element organization
	Zinc metalloproteinase BnP1	172044591	92.91	37	4	Bothropoides pauloensis	Secretada - PI	Apoptosis
47*	Zinc metalloproteinase BnP2	172044592	139.59	96	11	Bothropoides pauloensis	Secretada - PI	Apoptosis
	Gluthatione S-transferase P-like	387016254	130.32	56	10	Crotalus adamanteus	Citoplasma	Gluthatione metabolic process
48#	Zinc metalloproteinase BnP1	172044591	99.38	46	5	Bothropoides pauloensis	Secretada - PI	Apoptosis

APÊNDICE E - Proteínas identificadas de *spots* específicos de gel 2-DE das glândulas de veneno da serpente *Bothrops jararaca* tratadas com reserpina, fenilefrina e isoprenalina durante 4 dias. .

(continuação)

Nº <i>Spot</i> RFI 4d	Proteína	Número acesso	Proteína -10lgP	Cobertura %	Peptídeo	Organismo	Localização Celular	Processo Biológico
49#	Gluthatione S-transferase P-like	387016254	135.22	33	12	Crotalus adamanteus	Citoplasma	Gluthatione metabolic process
	Proteasome-like protein	71725697	69.57	19	2	Oxyuranus scutellatus	Citoplasma	Ubiquitin-dependent protein catabolic process
50*	Proteasome-like protein	71725697	63.46	37	3	Oxyuranus scutellatus	Citoplasma	Ubiquitin-dependent protein catabolic process
	Zinc metalloproteinase BnP2	172044592	55.99	26	2	Bothropoides pauloensis	Secretada - PI	Apoptosis
51#	Zinc metalloproteinase BnP2	172044592	133.24	93	20	Bothropoides pauloensis	Secretada - PI	Apoptosis
52#	Chain A, The three dimensional struture of Bothropasin	253722676	105.23	13	6	Bothrops jararaca	Secretada - PIII	Cell adhesion
53*	Alpha-type phospholipase A2 inhibitor	215275475	126.53	57	12	Bothrops jararaca	Secretada - PLI	Regulation of phospholipase A2 activity
	Beta actin	52078486	112.24	35	5	Oxyuranus scutellatus	Citoplasma	Structural element organization
54#	Adenine phosphoribosyltransferase-like	387014644	92.89	80	5	Crotalus adamanteus	Citoplasma	AMP salvage, Purine salvage
55#	ATP synthase subunit H+ transporting mitochondrial	BINS0740S	182.47	67	21	-	Mitocôndria	ATP synthesis, Transport
	Alpha-type phospholipase A2 inhibitor	215275475	104.96	44	9	Bothrops jararaca	Secretada - PLI	Regulation of phospholipase A2 activity
56*	Ferritin havy chain-like	301781722	570.89	12	2	Ailuropoda melanoleuca	Mitocôndria	Iron ion transport
57*	Myosin light polypeptide 6-like	327264385	125.89	69	9	Anolis carolinensis	Citoplasma	Muscle contraction
	isoform 1	229621685	156.83	51	14	Bothrops insularis	Secretada - CTL	Blood coagulation cascade inhibiting
58*	Botrocetin subunit alpha	264834	115.09	50	9	Bothrops jararaca	Secretada - CTL	Blood coagulation cascade inhibiting
	Bothroinsularin subunit beta alpha	229621685	93.03	36	7	Bothrops insularis	Secretada - CTL	Blood coagulation cascade inhibiting

APÊNDICE E - Proteínas identificadas de *spots* específicos de gel 2-DE das glândulas de veneno da serpente *Bothrops jararaca* tratadas com reserpina, fenilefrina e isoprenalina durante 4 dias. .

(continuação)

Nº <i>Spot</i> RFI 4d	Proteína	Número acesso	Proteína -10lgP	Cobertura %	Peptídeo	Organismo	Localização Celular	Processo Biológico
59*	Calmodulin	12862373	500.29	14	2	Clemmys japonica	Citoplasma	Metabolic process
60*	Bothroinsularin subunit beta	229621685	116.62	35	6	Bothrops insularis	Secretada - CTL	Blood coagulation cascade inhibiting
61*	Bothrojaracin subunit beta	82124360	56.72	20	2	Bothrops jararaca	Secretada - CTL	Blood coagulation cascade inhibiting
	Alpha actin	52078484	83.76	24	4	Oxyuranus scutellatus	Citoplasma	Structural element organization
62#	Alpha actin	52078484	102.16	24	4	Oxyuranus scutellatus	Citoplasma	Structural element organization
	Glycoprotein IB-binding protein subunit β	82116883	72.03	26	4	Bothrops jararaca	Secretada - CTL	Hemostasis impairing toxin, Platelet aggregation inhibiting toxin

Nota: (*) Dados obtidos no banco de dados Metazoa nr 19082011 e Proteopeptidome_NCBI nr 29042012 do MALDI-TOF/TOF

(#) Dados obtidos no banco de dados Metazoa nr 19082011 e Proteopeptidome_NCBI nr 29042012 do Orbitrap

Retículo endoplasmático (ER), Lectinas tipo C (CTL), Serinoproteinases (SVSP), Proteínas secretadas ricas em cisteína (CRISP), Classes de Metaloproteinases (PI, PII, PIII), L-aminoácido oxidase (LAAO), Inibidores de Fosfolipases A2 (PLI).

APÊNDICE F

APÊNDICE F - Proteínas da glândula acessória da serpente *Bothrops jararaca* que não sofreu extração de veneno identificadas através do nanoESI-LTQ/Orbitrap XL.

Nº. Banda 0 d	Nome da Proteína	Número Acesso	Proteína -10lgP	Cobertura %	Peptídeos	Únicos	Localização Celular	Organismo
1	Na/K-ATPase	336043940	226.20	25	9	9	Membrana	L. semifasciata
	Putative ADP/ATP translocase	324497718	99.75	25	8	8	Membrana	H. judaicus
	Ribosomal protein L8	336042958	75.24	32	3	3	Citoplasma	L. semifasciata
	Snake venom metalloprotease inhibitor precursor	159232573	46.57	18	4	3	Secretada - pEKW	Echis ocellatus
2	Na/K-ATPase	336043940	226.20	25	9	9	Membrana	L. semifasciata
	HSP70	63146078	305.30	43	30	23	Citoplasma	O. scutellatus
	Myosin-9	161669238	107.10	21	7	6	Citoplasma	L. singoriensis
	Thrombin-like enzyme	82466483	162.71	37	11	3	Secretada - SVSP	Bothrops asper
	Disintegrin jararin	123911605	142.93	31	6	2	Secretada	Bothrops jararaca
3	Na/K-ATPase	336043940	226.20	25	9	9	Membrana	L. semifasciata
	Phosphodiesterase 1	338855302	169.09	10	8	8	Citoplasma	C. adamanteus
	40S ribosomal protein S2, partial	71725683	129.14	35	9	5	Citoplasma	O. scutellatus
	60s ribosomal protein L10	260207865	88.68	18	6	5	Citoplasma	Tityus discrepans
	Transport protein Sec61 beta subunit	387018500	95.00	29	4	4	RE	C. adamanteus
	C-type natriuretic peptide	123884707	41.00	29	4	4	Secretada	Philodryas olfersii
	Dipeptidylpeptidase 4b	40363636	112.90	11	9	3	Membrana	G. brevicaudus
	MP_III2 SVMP precursor, partial	308212498	138.46	30	16	2	Secretada - PIII	Bothrops neuwiedi
4	Actinin alpha 4	269994460	241.32	41	17	17	Citoplasma	L. r. rubritaeniata
	Phosphodiesterase 1	338855302	169.09	10	8	8	Citoplasma	C. adamanteus
	Bothrocten	13399950	198.67	73	20	8	Secretada - CTL	Bothrops jararaca
	Dipeptidylpeptidase 4b	40363636	112.90	11	9	3	Membrana	G. brevicaudus
	Elongation factor 2	63146080	76.45	15	6	3	Citoplasma	O. s. scutellatus
	Heat shock protein 90	89515102	141.81	12	12	2	RE	Bufo gargarizans
5	HSP70	63146078	305.30	43	30	23	Citoplasma	O. scutellatus
	Actinin alpha 4	269994460	241.31	41	17	17	Citoplasma	L. r rubritaeniata
	Serum albumin	56790036	185.24	18	13	13	Secretada	T. flavoviridis
	Heat shock protein 8-like	269994458	250.91	52	17	11	Citoplasma	L. r rubritaeniata
	Transferrin precursor	108792443	134.24	13	11	5	Membrana	Python bivittatus
	MP_III3 SVMP precursor, partial	308212500	175.09	22	13	4	Secretada - PIII	Bothrops neuwiedi
	Dipeptidylpeptidase 4b	40363636	112.90	11	9	3	Membrana	G. brevicaudus
	Golgi-associated protein	67480125	103.92	23	3	3	Golgi	O. s. scutellatus
	Elongation factor 2	63146080	76.45	15	6	3	Citoplasma	O. s. scutellatus
	Heat shock protein 90	89515102	141.81	12	12	2	RE	Bufo gargarizans
6	HSP70	63146078	305.30	43	30	23	Citoplasma	O. scutellatus
	Vimentin	17386168	165.19	28	19	14	Citoplasma	Daboia russellii
	Serum albumin	56790036	185.24	18	13	13	Secretada	T. flavoviridis
	ATP synthase beta chain	372479772	165.68	22	9	9	Mitocôndria	S. trifasciata
	Antihemorrhagic factor Bj46a	9954430	168.51	32	12	10	Secretada	B. jararaca

APÊNDICE F - Proteínas da glândula acessória da serpente *Bothrops jararaca* que não sofreu extração de veneno identificadas através do nanoESI-LTQ/Orbitrap XL

(continuação)

Nº. Banda 0 d	Nome da Proteína	Número Acesso	Proteína -10lgP	Cobertura %	Peptídeos	Únicos	Localização Celular	Organismo
	Phosphoglucose isomerase	20067631	184.34	21	11	6	Citoplasma	Boiga kraepelini
	Transferrin precursor	108792443	134.24	13	11	5	Membrana	Python bivittatus
	Glutaminyl cyclase	3868931	115.95	18	6	5	Secretada - GC	B. jararaca
	Putative pyruvate kinase	15558810	87.22	19	5	5	Mitocôndria	Elaphe sp.
	MP_III3 SVMP precursor, partial	308212500	175.09	22	13	4	Secretada - PIII	B. neuwiedi
	C-type natriuretic peptide	123884707	41.00	29	4	4	Secretada -	Philodryas olfersii
	Elongation factor 2	63146080	76.45	15	6	3	Citoplasma	O. s. scutellatus
	Snake venom metalloprotease inhibitor precursor	159232573	46.57	18	4	3	Secretada - pEKW	Echis ocellatus
	Heat shock protein 90	89515102	141.81	12	12	2	RE	Bufo gargarizans
	Putative beta-tubulin	324497907	113.95	26	3	2	Citoplasma	H. judaicus
	L-amino acid oxidase precursor	195927838	157.63	23	11	1	Secretada - LAAO	B. pauloensis
	Gamma-phospholipase A2 inhibitor	157885070	127.12	40	7	1	Secretada - PLI	B. jararacussu
7	PDI	63146076	198.63	33	16	16	ER	O. scutellatus
	Serum albumin	56790036	185.24	18	13	13	Secretada	T. flavoviridis
	Vimentin	17386168	165.19	28	19	14	Citoplasma	Daboia russellii
	ATP synthase beta chain	372479772	165.68	22	9	9	Mitocôndria	S. trifasciata
	Antihemorrhagic factor Bj46a	9954430	168.51	32	12	10	Secretada	B. jararaca
	Phosphoglucose isomerase	20067631	184.34	21	11	6	Citoplasma	Boiga kraepelini
	Putative pyruvate kinase	15558810	87.22	19	5	5	Mitocôndria	Elaphe sp.
	Actin 5C	161661023	307.66	68	50	3	Citoplasma	L. singoriensis
	MP_III2 SVMP precursor, partial	308212498	138.46	30	16	2	Secretada - PIII	B. neuwiedi
	L-amino acid oxidase precursor	195927838	157.63	23	11	1	Secretada - LAAO	B. pauloensis
	Gamma-phospholipase A2 inhibitor	157885070	127.12	40	7	1	Secretada - PLI	B. jararacussu
8	PDI	63146076	192.13	42	26	25	RE	O. scutellatus
	Alpha enolase	5305427	279.29	47	21	19	Citoplasma	Python regius
	Vimentin	17386168	165.19	28	19	14	Citoplasma	Daboia russellii
	Antihemorrhagic factor Bj46a	9954430	168.51	32	12	10	Secretada	Bothrops jararaca
	ATP synthase alpha subunit	118562410	191.70	36	7	5	Mitocôndria	E. quadrivirgata
	Bothrostatin precursor	13194760	235.23	28	24	8	Secretada - PII	Bothrops jararaca
	Zinc metalloproteinase-disintegrin HF3	82219706	194.49	26	22	5	Secretada - PIII	Bothrops jararaca
	Glutaminyl cyclase	3868931	115.95	18	6	5	Secretada - GC	B. jararaca
	MP_III3 SVMP precursor, partial	308212500	175.09	22	13	4	Secretada - PIII	B. neuwiedi
	Actin 5C	161661023	307.66	68	50	3	Citoplasma	L. singoriensis
	Snake venom metalloprotease inhibitor precursor	159232573	43.57	18	4	3	Secretada - pEKW	Echis ocellatus
	Phospholipase A2 inhibitor	3358089	41.81	8	3	3	Secretada - PLI	G. brevicaudus
	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	347466178	174.25	32	13	2	Citoplasma	Orthriophis taeniurus
	Heat shock protein 90	89515102	141.81	12	12	2	RE	Bufo gargarizans
	Putative beta-tubulin	324497907	113.95	26	3	2	Citoplasma	H. judaicus
9	PDI	63146076	198.63	33	16	16	RE	O. scutellatus
	Serum albumin	56790036	185.24	18	13	13	Secretada	T. flavoviridis

APÊNDICE F - Proteínas da glândula acessória da serpente *Bothrops jararaca* que não sofreu extração de veneno identificadas através do nanoESI-LTQ/Orbitrap XL

(continuação)

Nº. Banda 0 d	Nome da Proteína	Número Acesso	Proteína -10lgP	Cobertura %	Peptídeos	Únicos	Localização Celular	Organismo
	alpha enolase	5305427	279.29	47	21	19	Citoplasma	Python regius
	Vimentin	17386168	165.19	28	19	14	Citoplasma	Daboia russellii
	ATP synthase beta chain	372479772	165.68	22	9	9	Mitocôndria	S. trifasciata
	Zinc metalloproteinase-disintegrin HF3	82219706	194.49	26	22	5	Secretada – PIII	Bothrops jararaca
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	39652292	182.75	39	7	7	Citoplasma	L. semifasciata
	Glutaminyl cyclase	3868931	115.95	18	6	5	Secretada - GC	Bothrops jararaca
	60s ribosomal protein L10	260207865	88.68	18	6	5	Citoplasma	Tityus discrepans
	MP_III3 SVMP precursor, partial	308212500	175.09	22	13	4	Secretada - PIII	B. neuwiedi
	C-type natriuretic peptide	123884707	41.00	29	4	4	Secretada	Philodryas olfersii
	Actin 5C	161661023	307.66	68	50	3	Citoplasma	L. singoriensis
	Snake venom serine protease BthaTL	82173559	89.04	26	5	3	Secretada - SVSP	B. alternatus
	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	347466178	174.25	32	13	2	Citoplasma	Orthriophis taeniurus
	Putative beta-tubulin	324497907	113.95	26	3	2	Citoplasma	H. judaicus
10	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide	89515082	188.13	31	10	7	Mitocôndria	Bufo gargarizans
		-	-	-	-	-	-	-
	Snake venom serine protease HS114	82233395	174.31	49	13	9	Secretada - SVSP	Bothrops jararaca
	Putative ADP/ATP translocase	324497718	99.25	25	8	8	Membrana	H. judaicus
	40S ribosomal protein S3a	82219689	113.76	30	8	7	Citoplasma	O. Hannah
	MP_Iib2 SVMP precursor	308212508	148.47	20	10	6	Secretada - PII	Bothrops neuwiedi
	Beta-fibrinogenase	6706013	65.79	19	4	1	Secretada – SVSP	G. blomhoffi
	Transport protein Sec61 beta subunit	387018500	95.00	29	4	4	ER	C. adamanteus
	Actin 5C	161661023	307.66	68	50	3	Citoplasma	L. singoriensis
	Thrombin-like enzyme asperase	82466483	162.71	37	11	3	Secretada – SVSP	Bothrops asper
	Snake venom serine protease BthaTL	82173559	89.04	26	5	3	Secretada – SVSP	B. alternatus
	Elongation factor 2	63146080	76.45	15	6	3	Citoplasma	O. s. scutellatus
	Disintegrin jararin	123911605	142.93	31	6	2	Secretada	Bothrops jararaca
11	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide	89515082	188.13	31	10	7	Mitocôndria	Bufo gargarizans
		-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-
	Snake venom serine protease HS114	82233395	174.31	49	13	9	Secretada – SVSP	Bothrops jararaca
	Metalloproteinase jararafibrase-2	82219563	233.51	39	31	7	Secretada – PII	Bothrops jararaca
	GTP binding protein Rab1a	15281839	126.39	63	7	6	Golgi	Gallus gallus
	40S ribosomal protein S2, partial	71725683	129.14	35	9	5	Citoplasma	O. scutellatus
	Adenine nucleotide translocator	71725703	103.48	32	4	4	Membrana	O. scutellatus
	Thrombin-like enzyme asperase	82466483	162.71	37	11	3	Secretada – SVSP	Bothrops asper
	Elongation factor 2	63146080	76.45	15	6	3	Citoplasma	O. s. scutellatus
	Ribosomal protein L8	336042958	75.24	32	3	3	Citoplasma	L. semifasciata
	Disintegrin jararin	123911605	142.93	31	6	2	Secretada	Bothrops jararaca
	Translocon-associated protein-like protein	71725701	80.27	20	2	2	ER	O. scutellatus

APÊNDICE F - Proteínas da glândula acessória da serpente *Bothrops jararaca* que não sofreu extração de veneno identificadas através do nanoESI-LTQ/Orbitrap XL

(continuação)

Nº. Banda 0 d	Nome da Proteína	Número Acesso	Proteína -10lgP	Cobertura %	Peptídeos	Únicos	Localização Celular	Organismo
12	venom gland cyclophilin	38374146	157.40	40	10	8	Citoplasma	Bitis gabonica
	Gamma-phospholipase A2 inhibitor	157885066	148.08	50	8	8	Secretada – PLI	Bothrops jararaca
	Metalloproteinase jararafibrase-2	82219563	233.51	39	31	7	Secretada – PII	Bothrops jararaca
	GTP binding protein Rab1a	15281839	126.39	63	7	6	Golgi	Gallus gallus
	Zinc metalloproteinase-disintegrin HF3	82219706	194.49	26	22	5	Secretada – PIII	Bothrops jararaca
	Proteasome-like protein	71725697	147.64	41	7	5	Citoplasma	O. scutellatus
	60s ribosomal protein L10	260207865	88.68	18	6	5	Citoplasma	Tityus discrepans
	40S ribosomal protein S18, partial	71725687	96.37	34	5	4	Citoplasma	O. scutellatus
	Actin 5C	161661023	307.66	68	50	3	Citoplasma	L. singoriensis
	Alpha-phospholipase A2 inhibitor precursor	167547107	119.31	46	9	3	Secretada – PLI	Bothrops jararaca
	Snake venom metalloprotease inhibitor precursor	159232573	43.57	18	4	3	Secretada - pEKW	Echis ocellatus
	MP_III2 SVMP precursor, partial	308212498	138.46	30	16	2	Secretada – PII	B. neuwiedi
	Translocon-associated protein-like protein	71725701	80.27	20	2	2	ER	O. scutellatus
13	Venom gland cyclophilin	38374146	157.40	40	10	8	Citoplasma	Bitis gabonica
	Putative pyruvate kinase	15558810	87.22	19	5	5	Mitocôndria	Elaphe sp.
	GPIb-BP alpha subunit	1839441	177.74	70	12	7	Secretada - CTL	Bothrops jararaca
	40S ribosomal protein S18, partial	71725687	96.37	34	4	4	Citoplasma	O. scutellatus
	Alpha-phospholipase A2 inhibitor precursor	167547107	119.31	46	9	3	Secretada	Bothrops jararaca
14	Histone H2A	256077334	172.22	22	8	8	Citoplasma	S. masoni
	Bothroinsularin subunit beta	229621685	184.89	83	10	10	Secretada – CTL	Bothrops insularis
	Venom gland cyclophilin	38374146	157.40	40	10	8	Citoplasma	Bitis gabonica
	Phospholipase A2 precursor	20069137	182.73	72	19	4	Secretada – PLA ₂	Bothrops insularis
	GPIb-BP alpha subunit	1839441	177.74	70	12	7	Secretada - CTL	Bothrops jararaca
	Thrombin-like enzyme	82466483	162.71	37	11	3	Secretada - CTL	Bothrops asper
	Cytochrome c	119388034	86.27	44	4	2	Mitocôndria	Crotalus atrox
15	HSP70	63146078	305.30	43	30	23	Citoplasma	O. scutellatus
	PDI	63146076	198.63	33	16	16	RE	O. scutellatus
	Histone H4	294653213	194.15	53	12	12	Núcleo	Pelinobius muticus
	Bothroinsularin subunit beta	229621685	184.89	83	10	10	Secretada - CTL	Bothrops insularis
	Zinc metalloproteinase-disintegrin BITM06A	82214993	264.82	27	29	9	Secretada - PIII	Bothrops insularis
	Bothrocetin	13399950	198.67	73	20	8	Secretada – CTL	Bothrops jararaca
	GPIb-BP beta subunit	1839442	158.27	47	6	6	Secretada - CTL	Bothrops jararaca
	Phospholipase A2 precursor	20069137	182.73	72	19	4	Secretada – PLA ₂	Bothrops insularis
	Transport protein Sec61 beta subunit	387018500	95.00	29	4	4	ER	C. adamanteus
	Thrombin-like enzyme asperase	82466483	162.71	37	11	3	Secretada - SVSP	Bothrops asper
	Cytochrome c	119388034	86.27	44	4	2	Mitocôndria	Crotalus atrox

Nota: Dados obtidos no banco de dados Metazoa nr 19082011 e Proteopeptidome_NCBInr_29042012 do Orbitrap.

Retículo endoplasmático (ER), Lectinas tipo C (CTL), Serinoproteinases (SVSP), Proteínas secretadas ricas em cisteína (CRISP), Classes de Metalloproteinases (PI, PII, PIII), Fosfolipases A2 (PLA₂), L-aminoácido oxidase (LAAO), Glutaminil Ciclotransferase, (GC), Fator de crescimento do endotélio vascular de serpente (svVEGF), Precursor do tri-peptídeo (pEKW).

APÊNDICE G

APÊNDICE G - Proteínas da glândula acessória da serpente *Bothrops jararaca* 4 dias após a extração de veneno identificadas através do nanoESI-LTQ/Orbitrap XL.

Nº Banda 4 d	Nome Proteína	Número Acesso	Proteína -10lgP	Cobertura %	Peptídeos	Únicos	Localização Celular	Organismo
1	ATPase, Ca++ transporting, cardiac muscle, slow switch 2	269994450	86.37	7	2	2	Mitocôndria	L. r. rubritaeniata
	Na/K-ATPase	336043940	181.85	20	8	1	Membrana	L. semifasciata
2	Putative pyruvate kinase	15558810	139.22	36	10	9	Mitocôndria	Elaphe sp.
3	ATPase, Ca++ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2	269994450	86.37	7	2	2	Mitocôndria	L. r. rubritaeniata
	Na/K-ATPase	336043940	181.85	20	8	1	Membrana	L. semifasciata
4	Antihemorrhagic factor Bj46a	9954430	240.71	50	25	19	Secretada	Bothrops jararaca
	Phosphodiesterase 1	338855302	253.27	25	23	14	Citoplasma	C. adamanteus
	Dipeptidylpeptidase 4b	40363636	166.23	15	11	5	Membrana	Gloydus brevicaudus
	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	302393725	138.58	48	6	5	Citoplasma	O. hannah
	Cullin-associated and neddylation-dissociated 1, partial	336245059	149.30	18	6	3	Núcleo	Naja atra
	Thrombin-like enzyme	82466483	182.32	33	9	1	Secretada - SVSP	Bothrops asper
5	Phosphodiesterase 1	338855302	253.27	25	23	14	Citoplasma	C. adamanteus
	Actinin alpha 4	269994460	213.28	37	13	13	Citoplasma	L. r. rubritaeniata
	Dipeptidylpeptidase 4b	40363636	166.23	15	11	5	Membrana	Gloydus brevicaudus
	HSP 90	67480188	174.32	18	8	3	RE	O. s. scutellatus
	Snake venom serine protease BITS01A	82244284	149.23	21	8	2	Secretada – SVSP	Bothrops insularis
	Serum albumin	56790036	258.54	33	31	26	Secretada	T. flavoviridis
	HSP70	63146078	249.29	47	33	21	Citoplasma	O. s. scutellatus
	Transferrin	108792441	172.68	12	9	4	Membrana	L. fuliginosus
	Eukaryotic translation elongation factor 2	269994436	132.75	18	6	4	Citoplasma	L. r. rubritaeniata
6	Serum albumin	56790036	258.54	33	31	26	Secretada	T. flavoviridis
	HSP70	63146078	249.29	47	33	21	Citoplasma	O. s. scutellatus
	Antihemorrhagic factor Bj46a	9954430	240.71	50	25	19	Secretada	Bothrops jararaca
	Z. metalloproteinase-disintegrin jararhagin	231997	304.02	41	47	14	Secretada - PIII	Bothrops jararaca
	Z. metalloproteinase-disintegrin jararafibrase-2	13194760	277.65	41	37	7	Secretada - PII	Bothrops jararaca
	Transferrin	108792441	172.68	12	9	4	Membrana	L. fuliginosus
	Bothropasin precursor	4895110	279.89	41	40	3	Secretada - PIII	Bothrops jararaca
	HSP 90	67480188	174.32	18	8	3	RE	O. s. scutellatus
	L-amino acid oxidase precursor	195927838	213.43	35	18	2	Secretada - LAAO	B. pauloensis
	Ecto-5' nucleotidase	338855300	209.61	32	17	1	Membrana	Crotalus adamanteus
7	Catroriarin	110610039	131.74	21	6	1	Secretada – PIII	Crotalus atrox
	PDI	63146076	250.09	46	30	30	RE	O. s. scutellatus
	Serum albumin	56790036	258.54	33	31	26	Secretada	T. flavoviridis
	HSP70	63146078	249.29	47	33	21	Citoplasma	O. s. scutellatus
	Antihemorrhagic factor Bj46a	9954430	240.71	50	25	19	Secretada	Bothrops jararaca
	Z. metalloproteinase-disintegrin jararhagin	231997	304.02	41	47	14	Secretada - PIII	Bothrops jararaca

APÊNDICE G - Proteínas da glândula acessória da serpente *Bothrops jararaca* 4 dias após a extração de veneno identificadas através do nanoESI-LTQ/Orbitrap XL.

(continuação)

Nº Banda 4 d	Nome Proteína	Número Acesso	Proteína -10lgP	Cobertura %	Peptídeos	Únicos	Localização Celular	Organismo
	Putative pyruvate kinase	15558810	139.22	36	10	9	Mitocôndria	Elaphe sp.
	Z. metalloproteinase-disintegrin jararafibrase-2	13194760	277.65	41	37	7	Secretada - PII	Bothrops jararaca
	Catenin beta 1	269994426	144.11	14	6	6	Citoplasma	L. r. rubritaeniata
	Phosphoglucose isomerase	20067631	185.86	17	10	5	Citoplasma	Boiga kraepelin
	ATP synthase alpha chain	372479676	148.46	10	7	5	Mitocôndria	Sansevieria trifasciata
	Bothropasin precursor	4895110	279.89	41	40	3	Secretada - PIII	Bothrops jararaca
	L-amino acid oxidase precursor	195927838	213.43	35	18	2	Secretada - LAAO	B. pauloensis
	Catroriarin	110610039	131.74	21	6	1	Secretada - PIII	Crotalus atrox
	Phospholipase A2 2	292630844	56.84	10	2	2	Secretada	Bothrops jararaca
8	PDI	63146076	250.09	46	30	30	RE	O. s. scutellatus
	Serum albumin	56790036	258.54	33	31	26	Secretada	T. flavoviridis
	Alpha enolase	5305427	250.49	46	20	19	Citoplasma	Python regius
	Antihemorrhagic factor Bj46a	9954430	240.71	50	25	19	Secretada	Bothrops jararaca
	Vimentin	17386168	185.07	29	17	15	Citoplasma	Daboia russellii
	Z. metalloproteinase-disintegrin jararhagin	231997	304.02	41	47	14	Secretada - PIII	Bothrops jararaca
	ATP synthase beta chain	372479772	167.35	21	9	9	Mitocôndria	S. trifasciata
	Putative pyruvate kinase	15558810	139.22	36	10	9	Mitocôndria	Elaphe sp.
	Z. metalloproteinase-disintegrin jararafibrase-2	13194760	277.65	41	37	7	Secretada - PII	Bothrops jararaca
	Metalloproteinase precursor	20069133	276.62	52	34	5	Secretada - PI	Bothrops insularis
	Phosphoglucose isomerase	20067631	185.86	17	10	5	Citoplasma	Boiga kraepelin
	Eukaryotic translation elongation factor 2	269994436	132.75	18	6	4	Citoplasma	L. r. rubritaeniata
	Bothropasin precursor	4895110	279.89	41	40	3	Secretada - PIII	Bothrops jararaca
	L-amino acid oxidase precursor	195927838	213.43	35	18	2	Secretada - LAAO	B. pauloensis
9	Alpha enolase	5305427	250.49	46	20	19	Citoplasma	Python regius
	Vimentin	17386168	185.07	29	17	15	Citoplasma	Daboia russellii
	Z. metalloproteinase-disintegrin jararhagin	231997	304.02	41	47	14	Secretada - PIII	Bothrops jararaca
	ATP synthase beta chain	372479772	167.35	21	9	9	Mitocôndria	S. trifasciata
	Z. metalloproteinase-disintegrin jararafibrase-2	13194760	277.65	41	37	7	Secretada - PII	Bothrops jararaca
	Eukaryotic translation elongation factor 2	269994436	132.75	18	6	4	Citoplasma	L. r. rubritaeniata
	Bothropasin precursor	4895110	279.89	41	40	3	Secretada - PIII	Bothrops jararaca
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	39652292	119.70	22	4	3	Citoplasma	L. semifasciata
	Catroriarin	110610039	131.74	21	6	1	Secretada - PIII	Crotalus atrox
	Actin	294653207	204.18	52	18	1	Citoplasma	Pelinobius muticus
10	Antihemorrhagic factor Bj46a	9954430	240.71	50	25	19	Secretada	Bothrops jararaca
	ATP synthase beta chain	372479772	167.35	21	9	9	Mitocôndria	S. trifasciata
	Berythactivase	17865171	198.78	18	14	4	Secretada - PIII	B. erythromelas
	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	336089582	146.17	36	10	3	Citoplasma	Nerodia fasciata
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	39652292	119.70	22	4	3	Citoplasma	L. semifasciata
11	Vimentin	17386168	185.07	29	17	15	Citoplasma	Daboia russellii
	40S ribosomal protein S2, partial	71725683	165.86	40	10	6	Citoplasma	Oxyuranus scutellatus

APÊNDICE G - Proteínas da glândula acessória da serpente *Bothrops jararaca* 4 dias após a extração de veneno identificadas através do nanoESI-LTQ/Orbitrap XL.

(continuação)

Nº Banda 4 d	Nome Proteína	Número Acesso	Proteína -10lgP	Cobertura %	Peptídeos	Únicos	Localização Celular	Organismo
	Metalloproteinase 3	338855314	188.44	24	14	4	Secretada - PII	Crotalus adamanteus
	Venom protein Ci-40b	315131319	78.67	10	4	4	Citoplasma	Chelonus inanimatus
	Actin	294653207	204.18	52	18	1	Citoplasma	Pelinobius muticus
	Serine protease	32396014	158.86	46	11	2	Secretada – SVSP	Bothrops jararacussu
12	Vimentin	17386168	185.07	29	17	15	Citoplasma	Daboia russellii
	40S ribosomal protein S8, partial	71725685	178.90	45	7	7	Citoplasma	Oxyuranus scutellatus
	Adenine nucleotide translocator	71725703	149.12	44	6	5	Membrana	Oxyuranus scutellatus
	Metalloproteinase 3	338855314	188.44	24	14	4	Secretada - PII	Crotalus adamanteus
	Venom protein Ci-40b	315131319	78.67	10	4	4	Citoplasma	Chelonus inanimatus
	Thrombin-like enzyme	82466483	182.32	33	9	1	Secretada - SVSP	Bothrops asper
	Serine protease	32396014	158.86	46	11	2	Secretada – SVSP	Bothrops jararacussu
13	Z. metalloproteinase-disintegrin jararafibrase-2	13194760	277.65	41	37	7	Secretada – PII	Bothrops jararaca
	Histone H2A	256077334	161.54	22	6	6	Núcleo	Schistosoma mansoni
	Metalloproteinase precursor	20069133	276.62	52	34	5	Secretada - PI	Bothrops insularis
	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide	89515082	170.33	26	7	5	Mitocôndria	Bufo gargarizans
	Proteasome-like protein	71725697	160.92	33	5	5	Citoplasma	Oxyuranus scutellatus
	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	302393725	138.58	48	6	5	Citoplasma	O. hannah
	60S ribosomal protein L13a, partial	71725679	99.98	20	5	5	Citoplasma	Oxyuranus scutellatus
	GTP binding protein Rab1a	15281839	125.93	35	4	4	Golgi	Pantherophis guttatus
	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	336089582	146.17	36	10	3	Citoplasma	Nerodia fasciata
	Cysteine-rich secretory protein Da-CRPb	190195339	130.10	18	3	1	Secretada - CRISP	D. acutus
14	Vimentin	17386168	185.07	29	17	15	Citoplasma	Daboia russellii
	Z. metalloproteinase-disintegrin jararafibrase-2	13194760	277.65	41	37	7	Secretada - PII	Bothrops jararaca
	Histone H2A	256077334	161.54	22	6	6	Núcleo	Schistosoma mansoni
	Metalloproteinase precursor	20069133	276.62	52	34	5	Secretada - PI	Bothrops insularis
	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	302393725	138.58	48	6	5	Citoplasma	Oxyuranus scutellatus
	Berythrinase	17865171	198.78	18	14	4	Secretada - PIII	B. erythromelas
	Metalloproteinase 3	338855314	188.44	24	14	4	Secretada - PII	Crotalus adamanteus
	40S ribosomal protein S18, partial	71725687	94.08	32	4	4	Citoplasma	Oxyuranus scutellatus
	Bothropasin precursor	4895110	279.89	41	40	3	Secretada - PIII	Bothrops jararaca
	Alpha-phospholipase A2 inhibitor precursor	167547107	156.30	47	9	3	Secretada – PLI	Bothrops jararaca
15	Vimentin	17386168	185.07	29	17	15	Citoplasma	Daboia russellii
	Z. metalloproteinase-disintegrin jararhagin	231997	304.02	41	47	14	Secretada - PIII	Bothrops jararaca
	GPIb-BP alpha subunit	1839441	198.56	55	13	8	Secretada - PIII	Bothrops jararaca
	Histone H2A	256077334	161.54	22	6	6	Núcleo	Schistosoma mansoni
	Venom gland cyclophilin	38374146	160.50	43	8	6	Citoplasma	Bitis gabonica
	40S ribosomal protein S18, partial	71725687	94.08	32	4	4	Citoplasma	Oxyuranus scutellatus
	Histone	109159040	170.56	65	8	3	Núcleo	Bembrops heterurus
	Actin	294653207	204.18	52	18	1	Citoplasma	Pelinobius muticus

APÊNDICE G - Proteínas da glândula acessória da serpente *Bothrops jararaca* 4 dias após a extração de veneno identificadas através do nanoESI-LTQ/Orbitrap XL.

(continuação)

Nº Banda 4 d	Nome Proteína	Número Acesso	Proteína -10lgP	Cobertura %	Peptídeos	Únicos	Localização Celular	Organismo
	Translocon-associated protein-like protein	71725701	122.78	20	2	2	RE	Oxyuranus scutellatus

Nota: Dados obtidos no banco de dados Metazoa nr 19082011 e Proteopeptidome_NCBInr_29042012 do Orbitrap.

Retículo endoplasmático (ER), Lectinas tipo C (CTL), Serinoproteinases (SVSP), Proteínas secretadas ricas em cisteína (CRISP), Classes de Metaloproteinases (PI, PII, PIII), Fosfolipases A2 (PLA₂), L-aminoácido oxidase (LAAO), Glutaminil Ciclotransferase, (GC), Fator de crescimento do endotélio vascular de serpente (svVEGF), Precursor do tri-peptídeo (pEKW).

APÊNDICE H

APÊNDICE H: Proteínas da glândula acessória da serpente *Bothrops jararaca* 7 dias após a extração de veneno através do nanoESI-LTQ/Orbitrap XL.

Nº. Banda 7 d	Nome Proteína	Número Acesso	Proteína -10lgP	Cobertura %	Pepetídeos	Únicos	Componente Celular	Organismo
1	Antihemorrhagic factor BJ46a	48428681	204.19	34	13	10	Secretada	Bothrops jararaca
	Histone H4	294653213	178.02	52	10	10	Núcleo	Pelinobius muticus
	GP1b-BP subunit beta	82116883	165.02	43	5	5	Secretada - CTL	Bothrops jararaca
	Bothroinsularin subunit beta	229621685	146.30	48	5	5	Secretada - CTL	Bothrops insularis
	Cytochrome c	119388034	124.97	31	3	2	Mitocôndria	Crotalus atrox
	svVEGF	48428663	72.50	18	2	2	Secretada - svVEGF	Bothrops jararaca
	Na/K-ATPase	336043940	157.16	19	7	1	Membrana	L. semifasciata
2	Aminopeptidase A	148367284	148.36	3	2	1	Citoplasma	G. brevicaudus
	Na/K-ATPase	336043940	157.16	19	7		Membrana	L. semifasciata
3	Vimentin	17386168	201.53	26	16	14	Citoplasma	Daboia russelli
	Na/K-ATPase	336043940	157.16	19	7	1	Membrana	L. semifasciata
4	Phosphodiesterase 1	338855302	244.06	19	17	12	Citoplasma	Crotalus adamanteus
	Aminopeptidase A	148367284	148.36	3	2	1	Citoplasma	G. brevicaudus
5	Actinin alpha 4	269994460	222.76	31	13	13	Citoplasma	L. r. rubritaeniata
	Phosphodiesterase 1	338855302	244.06	19	17	12	Citoplasma	Crotalus adamanteus
	Antihemorrhagic factor cHLP-B	82126266	146.10	18	8	4	Secretada	G. brevicaudus
	Golgi-associated protein	67480125	127.41	29	4	4	Golgi	O. s. scutellatus
	Heat shock protein 90	89515102	162.79	11	7	2	RE	Bufo gargarizans
	Elongation factor 2	63146080	122.52	11	4	2	Citoplasma	O. s. scutellatus
	Na/K-ATPase	336043940	157.16	19	7	1	Membrana	L. semifasciata
	Heat shock protein 8-like	269994458	196.01	41	12	5	Citoplasma	L. r. rubritaeniata
	Zinc metalloproteinase-disintegrin HF3	82219706	160.45	11	8	2	Secretada - PIII	Bothrops jararaca
	Transferrin precursor	108792443	122.47	5	5	2	Membrana	Python bivittatus
6	PDI	63146076	257.93	43	29	29	ER	O. s. scutellatus
	HSP70	63146078	250.53	30	23	14	Citoplasma	O. s. scutellatus
	Serum albumin	56790036	214.23	25	16	12	Secretada	T. flavoviridis
	Antihemorrhagic factor BJ46a	48428681	204.19	34	13	10	Secretada	Bothrops jararaca
	Putative pyruvate kinase	15558810	135.67	26	7	7	Mitocôndria	Elaphe sp
	ATP synthase beta chain	372479772	123.72	14	6	6	Mitocôndria	S. trifasciata
	Heat shock protein 8-like	269994458	196.01	41	12	5	Citoplasma	L. r. rubritaeniata
	Phosphoglucose isomerase	20067631	145.26	14	9	5	Citoplasma	Boiga kraepelini
	ATP synthase alpha chain	372479676	128.91	8	5	3	Mitocôndria	S. trifasciata
	L-amino acid oxidase precursor	195927838	176.98	20	11	2	Secretada – LAAO	B. pauloensis
7	PDI	63146076	257.93	43	29	29	ER	O. s. scutellatus
	HSP70	63146078	250.53	30	23	14	Citoplasma	O. s. scutellatus
	Serum albumin	56790036	214.23	25	16	12	Secretada	T. flavoviridis
	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	336089582	141.64	27	10	3	Citoplasma	Nerodia fasciataB. pauloensis
		-	-	-	-	-	-	

APÊNDICE H - Proteínas da glândula acessória da serpente *Bothrops jararaca* 7 dias após a extração de veneno identificadas através do nanoESI-LTQ/Orbitrap XL.

(continuação)

Nº. Banda	Nome Proteína	Número	Proteína	Cobertura	Pepetídeos	Únicos	Componente Celular	Organismo
7 d		Acesso	-10lgP	%				
	L-amino acid oxidase precursor	195927838	176.98	20	11	2	Secretada - LAAO	Bothrops jararaca
	Zinc metalloproteinase-disintegrin HF3	82219706	160.45	11	8	2	Secretada - PIII	Crotalus adamanteus
	metalloproteinase 3	338855314	130.66	13	6	2	Secretada - PIII	Crotalus atrox
	Catrariarin	110610039	110.77	21	5	1	Secretada - PIII	
8	PDI	63146076	257.93	43	29	29	ER	O. s. scutellatus
	Alpha enolase	5305427	228.41	37	12	11	Citoplasma	Python regius
	Antihemorrhagic factor BJ46a	48428681	204.19	34	13	10	Secretada	Bothrops jararaca
	Putative pyruvate kinase	15558810	135.67	26	7	7	Mitocôndria	Elaphe sp
	Phosphoglucose isomerase	20067631	145.26	14	9	5	Citoplasma	Boiga kraepelini
	ATP synthase alpha chain	372479676	128.91	8	5	3	Mitocôndria	Sansevieria trifasciata
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	39652292	118.14	18	3	3	Citoplasma	Laticauda semifasciata
	L-amino acid oxidase precursor	195927838	176.98	20	11	2	Secretada - LAAO	B. pauloensis
	Z. metalloproteinase-disintegrin Jararhagin	62468	230.95	18	16	1	Secretada - PIII	Bothrops jararaca
9	Vimentin	17386168	201.53	26	16	14	Citoplasma	Daboia Russelli
	Alpha enolase	5305427	228.41	37	12	11	Citoplasma	Python regius
	Antihemorrhagic factor BJ46a	48428681	204.19	34	13	10	Secretada	Bothrops jararaca
	ATP synthase beta chain	372479772	123.72	14	6	6	Mitocôndria	Sansevieria trifasciata
	Insularinase and insularin precursor	52426579	201.41	23	14	3	Secretada - PIII	Bothrops insularis
	Metalloproteinase 3	338855314	130.66	13	6	2	Secretada - PIII	Crotalus adamanteus
	Elongation factor 2	63146080	122.52	11	4	2	Citoplasma	O. s. scutellatus
	Elongation Factor 1	67480091	79.80	15	2	2	Citoplasma	O. s. scutellatus
	Actin 5C	161661023	273.74	36	19	1	Citoplasma	Lycosa singoriensis
	Z. metalloproteinase-disintegrin Jararhagin	62468	230.95	18	16	1	Secretada - PIII	Bothrops jararaca
	Catrariarin	110610039	110.77	21	5	1	Secretada - PIII	Crotalus atrox
10	HSP70	63146078	250.53	30	23	14	Citoplasma	O. s. scutellatus
	Vimentin	17386168	201.53	26	16	14	Citoplasma	Daboia russelli
	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	39652292	118.14	18	3	3	Citoplasma	Laticauda semifasciata
	Elongation factor 2	63146080	122.52	11	4	2	Citoplasma	O. s. scutellatus
	Actin 5C	161661023	273.74	36	19	1	Citoplasma	Lycosa singoriensis
11	Metalloproteinase jararafibrase-2	82219563	181.80	29	20	4	Secretada - PII	Bothrops jararaca
	Snake venom serine protease HS114	82233395	119.08	24	5	4	Secretada - SVSP	Bothrops jararaca
	Insularinase and insularin precursor	52426579	201.41	23	14	3	Secretada - PII	Bothrops insularis
	Metalloproteinase 3	338855314	130.66	13	6	2	Secretada - PIII	Crotalus adamanteus
	Elongation factor 2	63146080	122.52	11	4	2	Citoplasma	O. s. scutellatus
	Adenine nucleotide translocator	71725703	51.12	13	2	2	Membrana	Oxyuranus scutellatus
12	Vimentin	17386168	201.53	26	16	14	Citoplasma	Daboia russelli
	Histone H2A	256077334	175.44	22	8	8	Núcleo	Schistosoma mansoni
	Venom gland cyclophilin	38374146	151.37	35	7	5	Citoplasma	Bitis gabonica
	GTP binding protein Rab1a	15281839	122.84	43	5	5	Golgi	Gallus gallus

APÊNDICE H - Proteínas da glândula acessória da serpente *Bothrops jararaca* 7 dias após a extração de veneno identificadas através do nanoESI-LTQ/Orbitrap XL.

(continuação)

Nº. Banda 7 d	Nome Proteína	Número Acesso	Proteína -10lgP	Cobertura %	Pepetídeos	Únicos	Componente Celular	Organismo
	Metalloproteinase jararafibrase-2	82219563	181.80	29	20	4	Secretada - PII	Bothrops jararaca
	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein	89515082	114.53	23	6	4	Mitocôndria	Bufo gargarizans
	Insularinase and insularin precursor	52426579	201.41	23	14	3	Secretada - PIII	Bothrops insularis
	Alpha-phospholipase A2 inhibitor precursor	167547107	153.18	51	9	3	Secretada - PLI	Bothrops jararaca
	Proteasome-like protein	71725697	144.70	24	3	3	Citoplasma	Oxyuranus scutellatus
	Histone	109159040	142.62	55	7	3	Núcleo	Bembrops heterurus
	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	336089582	141.64	27	10	3	Citoplasma	Nerodia fasciata
	Calbindin D28K	58003506	108.10	17	3	3	Citoplasma	Pantherophis guttatus
	Ribosomal protein L14	18000283	68.87	25	3	3	Citoplasma	Lapemis hardwickii
	Zinc metalloproteinase-disintegrin HF3	82219706	160.45	11	8	2	Secretada - PIII	Bothrops jararaca
	Z. metalloproteinase-disintegrin Jararhagin	62468	230.95	18	16	1	Secretada - PIII	Bothrops jararaca
	Catroriarin	110610039	110.77	21	5	5	Secretada - PIII	Crotalus atrox
13	Histone H4	294653213	178.02	52	10	10	Núcleo	Pelinobius muticus
	C-type lectin	41353970	171.74	47	9	6	Secretada - CTL	Bothrops insularis
	GTP binding protein Rab1a	15281839	122.8411	43	5	5	Golgi	Gallus gallus
	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein	89515082	14.53	23	6	4	Mitocôndria	Bufo gargarizans
	Ribosomal protein S15 isoform	18000277	113.54	31	5	4	Citoplasma	Lapemis hardwickii
	40S ribosomal protein S18, partial	71725687	86.41	32	4	4	Citoplasma	Oxyuranus scutellatus
	Insularinase and insularin precursor	52426579	201.41	23	14	3	Secretada - PIII	Bothrops insularis
	Alpha-phospholipase A2 inhibitor precursor	167547107	153.18	51	9	3	Secretada - PLI	Bothrops jararaca
	Histone	109159040	142.62	55	7	3	Núcleo	Bembrops heterurus
	Cytochrome c	119388034	124.97	31	3	2	Mitocôndria	Crotalus atrox
	Actin 5C	161661023	273.74	36	19	1	Citoplasma	Lycosa singoriensis
14	GPIb-BP alpha subunit	1839441	182.37	50	11	8	Secretada - CTL	Bothrops jararaca
	Histone H2A	256077334	175.44	22	8	8	Núcleo	Schistosoma mansoni
	Venom gland cyclophilin	38374146	151.37	35	7	5	Citoplasma	Bitis gabonica
	40S ribosomal protein S18, partial	71725687	86.41	32	4	4	Citoplasma	Oxyuranus scutellatus
	Alpha-phospholipase A2 inhibitor precursor	167547107	153.18	51	9	3	Secretada - PLI	Bothrops jararaca
	Histone	109159040	142.62	55	7	3	Núcleo	Bothrops jararaca
	Translocon-associated protein-like protein	71725701	101.26	20	2	2	RE	Oxyuranus scutellatus
	Chain C, Crystal Structure Of Botrocetin	13399950	128.90	39	6	1	Secretada - CTL	Bothrops jararaca
15	Histone H4	294653213	178.02	52	10	10	Núcleo	Pelinobius muticus
	GPIb-BP alpha subunit	1839441	182.37	50	11	8	Secretada - CTL	Bothrops jararaca
	Histone H2A	256077334	175.44	22	8	8	Núcleo	Schistosoma mansoni
	C-type lectin	41353970	171.7411	47	9	6	Secretada - CTL	Bothrops insularis
	Ribosomal protein L30	10442706	37.66	37	6	6	Citoplasma	Ophiophagus Hannah
	Ribosomal protein S15 isoform	18000277	113.54	31	5	4	Citoplasma	Lapemis hardwickii

APÊNDICE H - Proteínas da glândula acessória da serpente *Bothrops jararaca* 7 dias após a extração de veneno identificadas através do nanoESI-LTQ/Orbitrap XL.

(continuação)

Nº. Banda 7 d	Nome Proteína	Número Acesso	Proteína -10lgP	Cobertura %	Pepetídeos	Únicos	Componente Celular	Organismo
	Cytochrome c	119388034	124.97	31	3	2	Mitocôndria	Crotalus atrox
	Ttransport protein Sec61 beta subunit	18000273	102.77	26	2	2	RE	Lapemis hardwickii
	Thioredoxin protein	12958636	84.94	17	2	2	Citoplasma	Ophiophagus Hannah
	svVEGF	48428663	72.50	18	2	2	Secretada - svVEGF	Bothrops jararaca
	Chain C, Crystal Structure Of Botrocetin	13399950	128.90	39	6	1	Secretada – CTL	Bothrops jararaca

Nota: Dados obtidos no banco de dados Metazoa nr 19082011 e Proteopeptidome_NCBInr_29042012 do Orbitrap.

Retículo endoplasmático (ER), Lectinas tipo C (CTL), Serinoproteinases (SVSP), Proteínas secretadas ricas em cisteína (CRISP), Classes de Metaloproteinases (PI, PII, PIII), Fosfolipases A2 (PLA₂), L-aminoácido oxidase (LAAO), Glutaminil Ciclotransferase, (GC), Fator de crescimento do endotélio vascular de serpente (svVEGF), Precursor do tri-peptídeo (pEKW).